



HAL
open science

Implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol et dans la douleur inflammatoire

Nicolas Kerckhove

► **To cite this version:**

Nicolas Kerckhove. Implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol et dans la douleur inflammatoire. Pharmacologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1PP04 . tel-01165233

HAL Id: tel-01165233

<https://theses.hal.science/tel-01165233v1>

Submitted on 18 Jun 2015

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.



Nicolas KERCKHOVE

Thèse

Soutenue le 20 septembre 2013

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

DOCTEUR DES UNIVERSITÉS

Spécialité

NEUROPHARMACOLOGIE

**Implication des canaux Cav3.2 dans
l'effet antalgique du paracétamol et
dans la douleur inflammatoire**

Président: Pr. Claude DUBRAY

Membres: Pr. Alain ESCHALIER (directeur de thèse)

Dr. Nicolas AUTHIER

Dr. Emmanuel BOURINET

Rapporteurs: Pr. Rémy SCHLICHTER

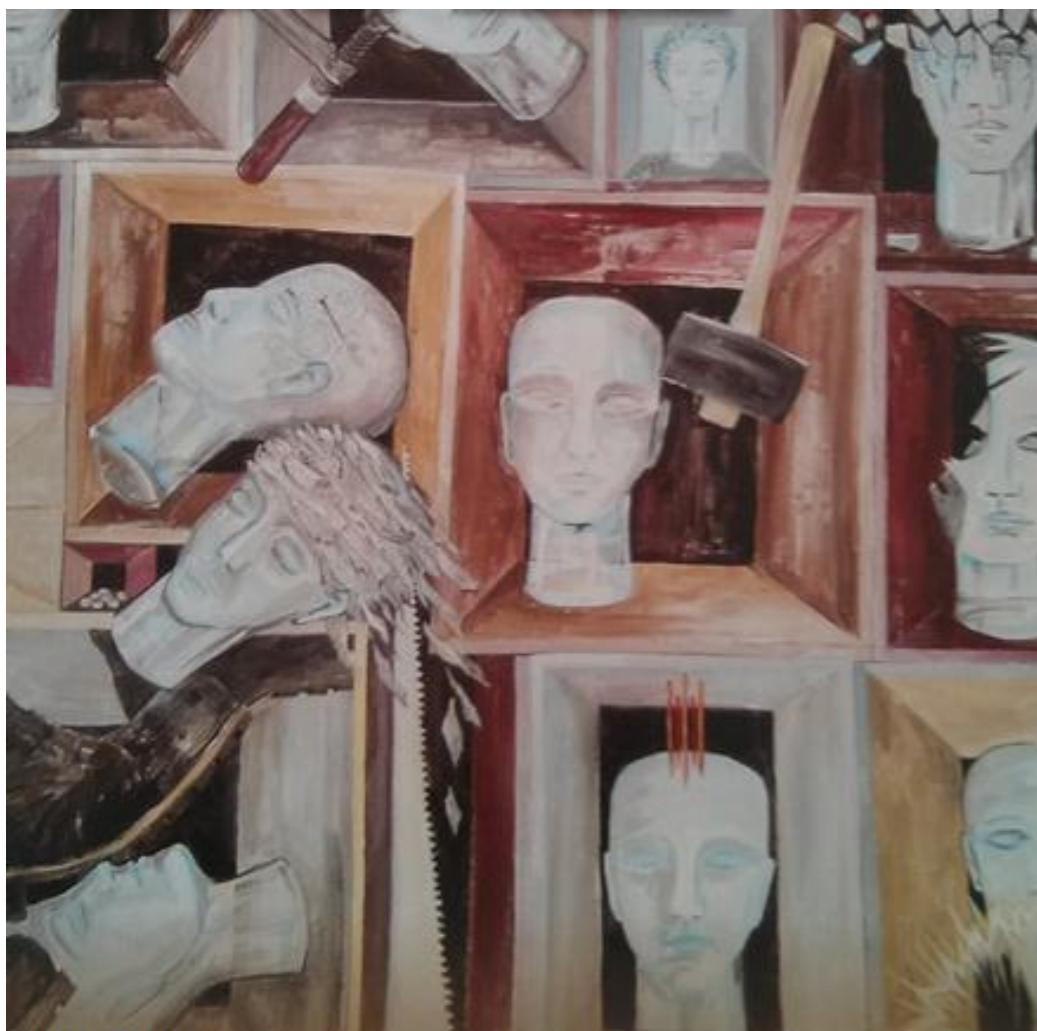
Pr. Serge PERROT



UMR 1107 INSERM / Uda NEURO-DOL

Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur
Facultés de Médecine et Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand





Hildegard Bieler

Oil on canvas (20^e siècle)

A 54-years-old female patient suffering from two migraine attacks with aura per week and a daily persistent headache, without medication overuse, paints her personal experience of the headache.



Résumé

Le paracétamol est l'antalgique le plus consommé au monde et pourtant son mécanisme d'action n'est toujours pas élucidé. Longtemps reconnu comme un produit proche des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) son profil est aujourd'hui reconsidéré grâce aux travaux effectués depuis une dizaine d'années. Il est désormais admis que le paracétamol est un antalgique d'action prioritairement cérébrale et l'impact sur les cyclo-oxygénases, cibles traditionnelles des AINS, ne représente plus la base de son mécanisme d'action.

Nos travaux de thèse montrent que l'action antalgique du paracétamol est perdue chez des animaux dont le canal Cav3.2 a été invalidé, ceci dans divers contextes expérimentaux. Ainsi ces canaux semblent être indispensables à l'effet antalgique du paracétamol. Nous avons également démontré le site de cette implication. En effet, seuls les canaux Cav3.2 cérébraux sont impliqués dans l'effet du paracétamol, ce qui rejoint les résultats précédents qui présentent le paracétamol comme un antalgique d'action centrale. Au niveau cérébral nous avons aussi démontré que les canaux Cav3.2 agissaient de concert avec deux acteurs primordiaux pour l'effet du paracétamol : l'AM404, son métabolite actif et les récepteurs TRPV1. La finalité de cette relation est l'inhibition des canaux Cav3.2 qui induit l'effet antalgique du paracétamol. Parallèlement, nous avons démontré pour la première fois que l'inhibition des canaux Cav3.2 cérébraux induisait une analgésie. Ceci confirme l'implication tonique de ces canaux supra-spinaux dans la perception douloureuse.

Enfin, nous avons également démontré que les canaux Cav3.2 étaient fortement impliqués dans la douleur de type inflammatoire et, de manière plus surprenante et intéressante, dans les processus inflammatoires associés (développement œdémateux et production des médiateurs pro-inflammatoires). En conformité avec ces résultats, nous avons démontré que l'éthosuximide (un bloqueur des canaux Cav3.2) était efficace dans le traitement des douleurs inflammatoires et de l'inflammation ainsi que sur leurs comorbidités associées (anxiété et dépression).

En conclusion, la confirmation de l'implication des canaux Cav3.2 dans l'effet du paracétamol et dans la douleur inflammatoire ouvre une voie nouvelle dans la compréhension du mécanisme d'action de cet antalgique et dans la conception et le développement de nouveaux antalgiques, ciblant ces canaux. Cette perspective est renforcée par les démonstrations déjà faites du rôle de ces canaux dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques. De plus et de façon intéressante, l'éthosuximide, un antiépileptique utilisé chez l'homme et inhibiteur des canaux Cav3, permet d'envisager la réalisation d'une étude clinique pilote sur l'évaluation de son effet antalgique. Nous proposons le protocole de cette étude, preuve de concept, réalisée dans un premier temps chez des patients atteints de douleurs neuropathiques.

Abstract

Acetaminophen is the most analgesic consumed worldwide, but its mechanism of action is still not understood. Long recognized as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), its profile is now reconsidered thanks to the work done over the last ten years. It is now accepted that acetaminophen is an analgesic with a central action and the impact on cyclooxygenase, traditional targets of NSAIDs, is no longer the basis of its mechanism of action.

This work shows that the analgesic effect of acetaminophen is lost in animals whose Cav3.2 channel has been invalidated, this in various experimental contexts. Thus, these channels appear to be essential for the analgesic effect of acetaminophen. We also demonstrated the nature of that involvement. Indeed, only the brain Cav3.2 channels are involved in the effect of acetaminophen, which joined the previous results showing that acetaminophen is a centrally acting analgesic. In the brain, we also demonstrated that Cav3.2 channels acting in concert with two crucial actors to the effect of acetaminophen: AM404, its active metabolite, and TRPV1 receptors. The purpose of this relationship is the inhibition of Cav3.2 channels that induces analgesic effect of acetaminophen. In parallel, we have demonstrated for the first time that inhibition of brain Cav3.2 channels induced analgesia. This confirms the tonic involvement of these channels in supraspinal pain perception.

Finally, we also demonstrated that Cav3.2 channels were heavily involved in the inflammatory pain and, more surprising and interesting, in inflammatory processes associated (edema development and production of pro-inflammatory mediators). Related to these results, we demonstrated that ethosuximide (a Cav3.2 channel blocker) was effective in the treatment of inflammatory pain and inflammation as well as their associated comorbidities (anxiety and depression).

In conclusion, the confirmation of the interaction of Cav3.2 channels in the effect of acetaminophen and pain perception opens a new path in understanding the mechanism of action of acetaminophen and in the design and development of new analgesics targeting Cav3.2 channels. This perspective is reinforced by the demonstrations previously done of the role of these channels in the pathophysiology of neuropathic pain. More and interestingly, ethosuximide, an antiepileptic drug used in humans and Cav3 channels inhibitor, allows to consider the realization of a pilot clinical study on the evaluation its analgesic effect. We propose the protocol of this study, proof of concept, performed in a first time in patients of neuropathic pain.

Remerciements

Je suis sincèrement reconnaissant envers le Professeur Alain Eschalièr de la confiance qu'il a bien voulu m'accorder en m'accueillant dans son laboratoire. Votre "niaque" et vos compétences scientifiques m'ont toujours été d'une grande aide tout au long de mon travail de thèse. Vous m'avez montré l'importance de la rigueur et de la perfection aussi bien dans l'expérimentation que dans la communication scientifique. Je vous adresse mes reconnaissances et mon humble admiration pour tout ce que vous avez fait durant ces 4 années.

Je remercie également un autre acteur majeur ayant permis la réalisation de cette thèse, le docteur Christophe Mallet. Merci, Christophe pour ton encadrement quotidien, tes conseils pertinents, ton écoute et ta patience. Je te remercie également pour les moments passés hors contexte professionnel, en espérant continuer à collaborer avec toi.

Je remercie le docteur Abdelkrim Alloui pour ces conseils précieux tout au long de mes travaux de thèse.

Je remercie le Professeur Claude Dubray pour son aide précieuse et sa collaboration dans nos projets cliniques, ainsi que pour ses conseils avisés. Que vous preniez une part active au jugement de ma thèse en tant que Président me fait honneur et me réjouit sincèrement. Soyez assuré de ma respectueuse reconnaissance et de ma gratitude. En espérant continuer à collaborer avec vous pour de futurs projets cliniques.

Je remercie les Professeurs Rémy Schlichter et Serge Perrot de m'avoir fait le l'honneur d'accepter de siéger à mon jury de thèse et d'assumer le rôle de rapporteur pour le jugement de mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plaisir pour votre présence.

Je suis très heureux de compter parmi mon jury le Docteur Emmanuel Bourinet en tant qu'examineur. Je te remercie vivement d'avoir accepté de juger mon travail. Merci pour tous tes conseils, tes idées et ton jugement qui ont su orienter mes travaux de thèses. Je te remercie également, ainsi que toute ton équipe et notamment Amaury François, pour votre accueil et collaboration précieuse et efficace dans ce projet de thèse. Amaury, je tiens à te remercier pour tes conseils et ta disponibilité ainsi que pour les bons moments passés à Montpellier. Je te porte une grande estime en tant que collaborateur et ami. En espérant retravailler avec toi et se revoir dans d'autres contrées que Montpellier. Je ne me fais pas de souci pour la suite de ta carrière scientifique, bon voyage !

Je prie le Docteur Nicolas Authier, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail, de bien vouloir trouver ici l'assurance de ma respectueuse considération. En espérant avoir l'honneur de travailler avec toi durant mon parcours professionnel.

Je tiens également à remercier la région Auvergne, le FEDER et la SFETD pour leur soutien financier sans lequel ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Serge Alziari et à toute l'équipe de la plateforme PAVIRMA de Clermont-Ferrand pour leur collaboration.

Je remercie tous les collègues, qui sont devenus maintenant des amis, de l'équipe Neuro-Dol et autres pour leur aide, leur écoute, leur soutien, leurs conseils et ainsi que pour tous les moments de joies passés hors du laboratoire :

Les 3 compères de la promo

- Vanessa qui aura su m'initier aux folklores portugais et japonais (fukushima).
- Alexis, le New-yorkais bessonais toujours prêt à rendre service que ce soit professionnel ou personnel. En espérant te rendre visite prochainement !
- Jérémy, dit « mymy », la proie des pigeons clermontois et l'adepte du camouflage carreau !

Les collègues du laboratoire

- Mailly ou Mayli ou Mailly ou Mayelie ou... Bref un nom chinois ! Grande professionnelle du style Classe / Pas classe.
- Mathieu dit... biiiip (censure) qui aura su me faire découvrir le Kiwi !
- David, l'homme au pieds touffus de la comté de Mauriac avec son précieux Billy qu'il porte autour du doigt et son radis.
- Stéphane, grand épicurien et mentor (durant quelques mois, faut pas pousser) à la cheville fragile mais au bel organe.
- Jérémy, la personne la plus swag du laboratoire malgré sa rousseur et son dégoût du cheval et de la gente féminine cavalière.
- Les pioupioux qui n'ont pas encore passé leur thèse (Bonux ! Radhouné, Ludivine, Alisson, Véro, la niakos, Justine, Amandine), je vous souhaite bon courage et surtout continuez à perpétuer la bonne ambiance du laboratoire !
- Les permanents, Fabien « choumy », Jérôme et sa madre de Jose, Eric l'homme du ciné du vendredi soir, Maryse Chalut, Anne-Marie (bon rétablissement), Fred Libert « notre maître brasseur », Fred C « notre second portos », Youssef, Chouki, Christine, Agathe, Laurence, Catherine, Mireille, Alice, Monique, Denis, les animaliers.

Je tiens également à remercier mon entourage personnel : mes parents, ma sœur et mon frère, ma famille, mes amis du foot notamment Jérémy, ami ch'ti et collègue de travail adepte d'Usher et Sam bodybuilder et statisticien à ses heures perdues.

Enfin, je remercie tout particulièrement Elodie, ma compagne, qui a su me soutenir, me remonter le moral, me changer les idées, m'apporter des conseils durant les moments de doutes.

Sans vous tous rien n'aurait été pareil, l'aboutissement heureux de ma thèse, ainsi que l'ambiance tout au long de ces 4 années de thèse n'ont été possible que grâce à vous tous.

Encore MERCI...

Contributions scientifiques

Publications :

Ethosuximide for treatment of anxiety related to chronic inflammatory pain. [N.Kerckhove](#), J. Bourdier, E. Bourinet, A. Eschalier and C. Mallet. En rédaction.

Cav3.2 calcium channels are involved in inflammation and pain related. [N.Kerckhove](#), F. Carvahlo, E. Bourinet, A. Eschalier and C. Mallet. En rédaction.

Cav3.2 calcium channels: the key protagonist of the supraspinal effect of acetaminophen. [N.Kerckhove](#), C. Mallet, A. Francois, M. Boudes, J. Chemin, T. Voets, E. Bourinet, A. Alloui and A. Eschalier. *Scientific Reports*, en révision.

State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)_{3.2} selectivity and support analgesic effects. Francois A, [Kerckhove N](#), Meleine M, Alloui A, Barrere C, Gelot A, Uebele VN, Renger JJ, Eschalier A, Ardid D, Bourinet E. *Pain*, 2013.

Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, [Kerckhove N](#), Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, Conrad M, Drevet JR, Kocer A. *Plos One*, 2012.

Communications scientifiques :

Congrès SFETD, Paris. Présentation orale, Cav3.2 calcium channels and inflammatory pain, 2013.

Congrès P2T, Angers. Présentation poster, Cav3.2 calcium channels and inflammatory pain. [N. Kerckhove](#), A. François, A. Alloui, E. Bourinet, C. Mallet and A. Eschalier, 2013.

Symposium douleur INSERM, Bordeaux. Présentation orale, Cav3.2 calcium channels and inflammatory pain. 2013.

Congrès SFETD, Lille. Présentation poster, Cav3.2 T-type calcium: a new target for acetaminophen. [N. Kerckhove](#), A. François, A. Alloui, E. Bourinet, C. Mallet and A. Eschalier. 2012

Congrès IASP, Milan. Présentation poster, Cav3.2 T-type calcium: a new target for acetaminophen. [N. Kerckhove](#), A. François, A. Alloui, E. Bourinet, C. Mallet and A. Eschalier. 2012.

Abcam conference, New frontiers in persistent pain, Paris . Présentation poster, Cav3.2 T-type calcium: a new target for acetaminophen. [N. Kerckhove](#), A. François, A. Alloui, E. Bourinet, C. Mallet and A. Eschalier. 2011.

Prix et récompenses :

Prix de thèse P2T, 2013.

Prix de thèse SFPT, 2012.

Enseignements / Encadrements :

Master 2 (Justine Bourdier). Master 1 (Rebecca Rimbaud et Marie-Ambre Monet). IUT (Julie Tessaire).

120h de cours (cours magistraux, TD et TP) en master sciences du médicament et licence de physiologie (UdA, Clermont-Ferrand).

SOMMAIRE

SOMMAIRE

PREFACE	1
----------------------	----------

INTRODUCTION GENERALE

I. LE PARACETAMOL : MODE D'EMPLOI	11
A. <i>Historique : retour sur un vieux médicament</i>	11
B. <i>Généralités : Qu'est-ce que le paracétamol ?.....</i>	12
1. Pharmacocinétique	13
a. <i>Absorption et distribution.....</i>	13
b. <i>Elimination.....</i>	13
2. Toxicité.....	15
a. <i>Hépatotoxicité</i>	15
b. <i>Néphrotoxicité</i>	16
c. <i>Autres réactions et interactions médicamenteuses</i>	16
3. Actions pharmacologiques.....	17
a. <i>Antipyréxie.....</i>	17
b. <i>Antalgie</i>	17
i. <i>Etudes cliniques et efficacité antalgique du paracétamol</i>	17
ii. <i>La controverse : action centrale ou périphérique du paracétamol ?.....</i>	18
C. <i>Utilisations cliniques : Us et coutumes du paracétamol.....</i>	18
1. <i>Hors milieu hospitalier</i>	18
2. <i>Milieu hospitalier</i>	19

II. MECANISME D'ACTION ANTALGIQUE DU PARACETAMOL : LES FONDAMENTAUX.....	23
A. <i>Généralités : vers un pro-médicament</i>	23
B. <i>Le système cox : le controversé</i>	25
1. <i>Mode d'action.....</i>	25
2. <i>Relation paracétamol et COX.....</i>	26
i. <i>Mécanismes de l'inhibition des COX par le paracétamol.....</i>	27
ii. <i>Réduction des COX par le paracétamol.....</i>	27
iii. <i>AM404 et inhibition des COX</i>	28
iv. <i>Paracétamol et inflammation.....</i>	29
C. <i>Système cannabinoïde.....</i>	29
1. <i>Généralités.....</i>	30

2. Paracétamol et système cannabinoïde.....	31
3. L'AM404, activateur des récepteurs TRPV1	32
<i>D. Système vanilloïde</i>	<i>33</i>
1. Généralités	33
2. Paracétamol, AM404 et récepteur TRPV1	34
<i>E. Le système sérotoninergique</i>	<i>35</i>
1. Voies sérotoninergiques descendantes et perception douloureuse.....	36
<i>a. Les noyaux supraspinaux sérotoninergiques.....</i>	<i>36</i>
i. La substance grise périaqueducale.....	37
ii. La moelle rostroventrale	38
<i>b. Impact médullaire des voies sérotoninergiques</i>	<i>39</i>
2. Voies sérotoninergiques et paracétamol.....	41
3. Résumé (Figure 10)	42

III. « ARACHIDONIC-RELATED COMPOUNDS » : NOUVELLE CLASSE DE MEDIATEURS LIPIDIQUES 47

<i>A. Anabolisme des endocannabinoïdes</i>	<i>48</i>
1. L'anandamide.....	48
2. Le 2-AG.....	48
<i>B. Catabolisme des endocannabinoïdes</i>	<i>49</i>
1. L'anandamide.....	49
<i>a. Anandamide Membrane Transporter (AMT).....</i>	<i>49</i>
<i>b. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)</i>	<i>49</i>
2. Le 2-arachidonoylglycérol.....	51
<i>C. Récepteurs aux lipoaminoacides et fonctions biologiques.....</i>	<i>53</i>
1. Récepteurs aux cannabinoïdes	53
<i>a. Distribution</i>	<i>53</i>
<i>b. Ligands.....</i>	<i>53</i>
<i>c. Mécanismes de signalisation intracellulaire</i>	<i>54</i>
<i>d. Effets pharmacologiques.....</i>	<i>54</i>
<i>e. Aspects cliniques.....</i>	<i>55</i>
2. Récepteurs aux vanilloïdes	57
<i>a. Généralités.....</i>	<i>57</i>
<i>b. Le récepteur TRPV1.....</i>	<i>57</i>

i.	Expression.....	57
ii.	Rôle dans la nociception.....	59
iii.	Aspect clinique	60
3.	Lipoaminoacides et TRPV1.....	61
a.	<i>L'anandamide</i>	61
b.	<i>Le N-arachydonoyl-dopamine</i>	61
c.	<i>Le 2-arachydonoyl-glycérol</i>	61

IV.	LES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T : VERS UN NOUVEL AVENIR THERAPEUTIQUE ?	65
A.	<i>Genèse de l'influx nerveux</i>	65
1.	Généralités.....	65
2.	Canaux ioniques voltage dépendant et influx nerveux	66
B.	<i>Canaux calciques voltage-dépendants</i>	68
1.	Généralités	68
2.	Les canaux HVA.....	71
a.	<i>Les canaux Cav1 (ou type L)</i>	71
b.	<i>Les canaux Cav2 (ou type N, P/Q, R)</i>	72
3.	Les canaux LVA (ou type T)	72
a.	<i>Caractéristiques des canaux de type T</i>	72
b.	<i>Rôles dans l'influx nerveux</i>	74
c.	<i>Pharmacologie</i>	75
i.	Ions métalliques	75
ii.	Les toxines	76
iii.	Molécules endogènes.....	76
iv.	Molécules de synthèse	77
Non spécifiques.....		77
Spécifiques		78
d.	<i>Expression des canaux de type T</i>	80
e.	<i>Douleur et canaux Cav3.2</i>	80

PROJETS

V.	PROJETS SCIENTIFIQUES : PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS.....	89
A.	<i>PROJET 1 : IMPLICATION DES CANAUX CAV3.2 DANS L'EFFET ANTALGIQUE DU PARACETAMOL (ARTICLE 1)</i>	89

SOMMAIRE

1. Problématique	89
2. Objectifs	90
B. PROJET 2 : IMPLICATION DES CANAUX CAV3.2 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE ET LES PROCESSUS ASSOCIÉS (ARTICLE 2)	91
1. Problématique	91
2. Objectifs	91
C. PROJET 3 : CANAUX DE TYPE T ET COMORBIDITES ASSOCIEES A LA DOULEUR INFLAMMATOIRE (ARTICLE 3)	92
1. Problématique	92
2. Objectifs	93
D. PROJET CLINIQUE : ETUDE PILOTE « EDONOT » : EVALUATION DE L'EFFET DE L'ETHOSUXIMIDE CHEZ DES PATIENTS NEUROPATHIQUES D'ORIGINE TRAUMATIQUE.....	94
1. Problématique	94
2. Objectifs	95

RESULTATS

VI. ARTICLE 1 : Cav3.2 calcium channels: the key protagonist of the supraspinal effect of acetaminophen	101
A. RESUME	101
B. INTRODUCTION	102
C. RESULTATS.....	103
1. Le paracetamol échoue à produire un effet antalgique chez les KO Cav3.2	103
2. Les canaux Cav3.2 supraspinaux sont nécessaires à l'effet du paracétamol.	105
3. L'AM404, requiert les canaux Cav3.2 pour induire son effet antalgique	107
4. Récepteur TRPV1 et canal Cav3.2 : preuve d'une relation fonctionnelle.....	108
D. MATERIELS ET METHODES	112
1. Animaux	112
2. Etudes comportementales.....	113
a. Immersion de la patte et de la queue.....	113
b. Test au formol.....	113
c. Test de von Frey.....	113
d. Induction du modèle de monoarthrite.....	113
3. Électrophysiologie.....	113
a. Culture cellulaire et enregistrements électrophysiologiques	113

<i>b.</i>	<i>Imagerie calcique</i>	114
4.	Analyses statistiques.....	114
<i>E.</i>	<i>INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES</i>	115
<i>F.</i>	<i>RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIÉS</i>	118
<i>G.</i>	<i>DISCUSSION / PERSPECTIVES</i>	120
1.	Cav3.2 supraspinaux et perception douloureuse.....	120
2.	Cav3.2 et paracétamol.....	123
3.	Les canaux Cav3.2 et l'AM404.....	124
4.	Relation fonctionnelle entre canaux Cav3.2 et récepteurs TRPV1.....	125
5.	Canaux Cav3.2 et récepteurs CB1.....	127
6.	Canaux Cav3.2 et voies descendantes sérotoninergiques.....	128
7.	Canaux Cav3.2 et autres antalgiques.....	131
8.	Conclusion.....	132
VII.	ARTICLE 2 : Cav3.2 channels are involved inflammatory pain and associated process	137
<i>A.</i>	<i>INTRODUCTION</i>	137
<i>B.</i>	<i>RESULTATS</i>	139
<i>C.</i>	<i>INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES</i>	145
<i>D.</i>	<i>RESULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS</i>	146
<i>E.</i>	<i>MATERIELS ET METHODES</i>	148
1.	Animaux.....	148
2.	Modèle Carragénine.....	148
3.	Test de von Frey.....	148
4.	Culture de macrophages issus de moelle osseuse (BMDM).....	148
5.	ELISA.....	149
6.	Mesure et culture d'œdème.....	149
7.	Immunocytochimie.....	149
8.	Imagerie Calcique.....	149
9.	Souris chimériques.....	149
10.	RT-q-PCR.....	150
11.	Analyses Statistiques.....	150
<i>F.</i>	<i>DISCUSSION / PERSPECTIVES</i>	151
1.	Implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire.....	151

2. Implication des canaux Cav3.2 dans le développement œdémateux	152
3. Les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires interviennent dans le développement œdémateux.....	152
4. Les canaux Cav3.2 participent à l'activation des macrophages.....	154
5. Ethosuximide et douleurs inflammatoires.....	155
6. Conclusion.....	156

VIII. ARTICLE 3 : Canaux de type T et comorbidités associées à la douleur inflammatoire.161

A. INTRODUCTION	161
B. RESULTATS.....	162
C. MATERIELS ET METHODES	167
1. Animaux	167
2. Produits.....	167
3. Comportements	167
a. Modèle monoarthrite (CFA).....	167
b. Test de von Frey.....	168
c. Grip test	168
d. Rotarod.....	168
e. Open field	168
f. Elevated plus maze	168
g. Tail suspension test	169
h. Forced swimming test.....	169
i. Novelty suppress feeding test.....	169
4. Analyses Statistiques.....	169
D. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES.....	170
E. DISCUSSION / PERSPECTIVES.....	170
1. Implication du canal Cav3.2 dans l'anxiété et la dépression en contexte sain.....	170
2. Effet anxiolytique et antidépresseur de l'éthosuximide en contexte inflammatoire.....	172
3. Conclusion.....	174

IX. PROJET CLINIQUE EDONOT: Ethosuximide et DOuleur Neuropathique d'Origine Traumatique ..

.....	179
A. RESUME	180
B. RATIONNEL DE L'ETUDE / JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE	183

SOMMAIRE

1. Dernier état des connaissances scientifiques	183
2. Etat des lieux des connaissances sur l'expérimentation préclinique	184
3. Retombées attendues.....	186
<i>C. MEDICAMENT A L'ETUDE</i>	<i>186</i>
1. Description du traitement	186
2. Posologie, modalités d'administration et durée du traitement	187

CONCLUSION

X. CONCLUSION GENERALE	193
-------------------------------------	------------

XI. ANNEXES	197
--------------------------	------------

<i>ANNEXE 1 : ARTICLE 1.....</i>	<i>197</i>
----------------------------------	------------

<i>ANNEXE 2 : SCHEMA DE L'ETUDE CLINIQUE EDONOT.....</i>	<i>217</i>
--	------------

<i>ANNEXE 3 : TABLEAU DES EVALUATIONS POUR UN SUJET</i>	<i>218</i>
---	------------

<i>ANNEXE 4 : CARNET DE SUIVI.....</i>	<i>219</i>
--	------------

<i>ANNEXES 5 : ABREVIATIONS.....</i>	<i>220</i>
--------------------------------------	------------

XII. REFERENCES.....	223
-----------------------------	------------





Franz Xaver Messerschmidt (18^e siècle)

« Bustes de la souffrance »

Atteint d'une maladie inconnue qui le faisait énormément souffrir, il estimait que la douleur devenait moins forte après quelques pincements très douloureux qu'il s'administrait au niveau des côtes. En observant son visage déformé par la souffrance lors de cette procédure, il décida de reproduire ces expressions sur ces bustes.



PREFACE

PREFACE

Ayant eu depuis toujours l'ambition de faire mon métier au sein de la recherche médicale et en contact avec le milieu hospitalo-universitaire, je me suis orienté très tôt dans le domaine de la biologie et plus récemment dans le domaine des neurosciences et de la pharmacologie. La compréhension de notre système nerveux cérébral et la perspective d'apporter de nouvelles innovations scientifiques pour le patient et plus généralement pour le monde médical ont toujours su garder ma motivation et mes ambitions intactes. Afin de pouvoir réaliser mes ambitions, à Clermont-Ferrand, le choix de rejoindre l'équipe du Pr. Alain Eschalier s'est imposé de lui-même. En effet, cette équipe nommée « Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur » possède toutes les structures, le personnel, l'expérience, les connaissances et les collaborations (CHU, CIC, CETD) permettant une recherche préclinique avancée pouvant prétendre à une transposition clinique à court terme.

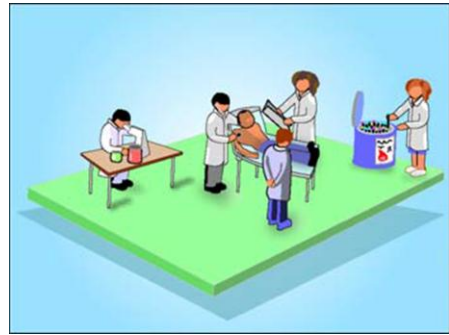
Ainsi, mes travaux de thèse s'inscrivent dans une optique de recherche originale, partant de l'observation clinique pour aboutir à l'élaboration d'un projet clinique faisant suite à nos travaux précliniques. Cette vision innovante de la recherche scientifique, appelée « recherche translationnelle », est définie par l'Agence Nationale de la Recherche comme tel :

« Le concept de recherche translationnelle s'est imposé comme l'expression d'un besoin essentiel pour que les promesses de la recherche fondamentale se traduisent rapidement par une amélioration de la santé des individus et des populations. L'activité translationnelle est un moteur puissant pour la recherche clinique. Elle la stimule par des innovations thérapeutiques, méthodologiques ou des outils d'investigation émanant de la recherche fondamentale, et réciproquement par la dissémination vers la recherche fondamentale d'observations nouvelles sur la nature et la progression des maladies ».

Durant une longue période, la recherche clinique a subi un certain manque de prestige par rapport à son partenaire, la recherche fondamentale, créant ainsi un large fossé entre ces deux disciplines. L'apparition d'une nouvelle optique de recherche appelée « recherche translationnelle » a permis de réduire ce fossé, facilitant la coopération entre recherche fondamentale et recherche clinique, ceci étendu sur la totalité du processus de recherche.

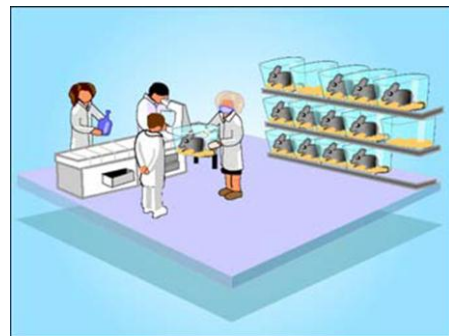
Mais à quoi correspondent et quels sont les buts de ces différentes visions de la recherche ?

La recherche clinique concerne l'Homme, qu'il soit patient ou non, dans toutes les spécialités qui s'intéressent à sa santé. Elle se base sur des outils statistiques et épidémiologiques, se développe au chevet du patient ou en consultation, mais aussi en réseau avec les partenaires de la prise en charge du patient. Les hôpitaux ou les lieux spécialisés comme les centres d'investigations cliniques (CIC) et les centres



d'études du traitement de la douleur (CETD) sont les structures où s'effectue la recherche clinique, faisant appel, directement ou indirectement, à tous les métiers hospitaliers (médecins, infirmiers, pharmaciens, attachés de recherche clinique...). Son but principal est **d'améliorer la connaissance d'une maladie, d'une méthode d'investigation ou d'un traitement.**

La recherche cognitive, ou plus communément dénommée **recherche fondamentale**, est définie telle quelle dans le dictionnaire : « recherche orientée vers les domaines fondamentaux d'une discipline ». Dans les sciences du vivant, le but premier de la recherche fondamentale est de **découvrir et déchiffrer les systèmes biologiques** qui régissent et déterminent



notre vie et la vie en générale, sans **aucune prétention à d'éventuelles applications futures**. Par conséquent, la recherche fondamentale étudie divers modèles biologiques comme principalement les végétaux, la bactérie, le virus, le ver, la drosophile, le poisson et également les mammifères comme le rat et la souris qui restent tous des organismes moins complexes que l'être humain.

A la vue de ces définitions, l'Homme et plus particulièrement le patient pourraient grandement bénéficier d'une interaction entre recherche fondamentale et clinique. C'est dans ce but que la recherche dite « translationnelle » a émergé durant ces vingt dernières années.

La recherche translationnelle est donc devenue la passerelle nécessaire entre recherche fondamentale et clinique ayant pour but d'accélérer l'accès aux innovations diagnostiques et thérapeutiques les plus modernes au bénéfice du patient. C'est par son intermédiaire que les avancées scientifiques aboutissent à des applications cliniques parfois distantes de leurs projets initiaux. Autrement dit, la recherche translationnelle permet **la vectorisation des connaissances**

issues de la recherche fondamentale vers l'application concrète de ces innovations scientifiques chez l'Homme (Figure 1). La recherche translationnelle se sert de la recherche fondamentale pour découvrir et mettre à l'essai de nouveaux ou anciens médicaments qui pourraient potentiellement prévenir, guérir et traiter des maladies, le traitement de la douleur chronique par exemple.

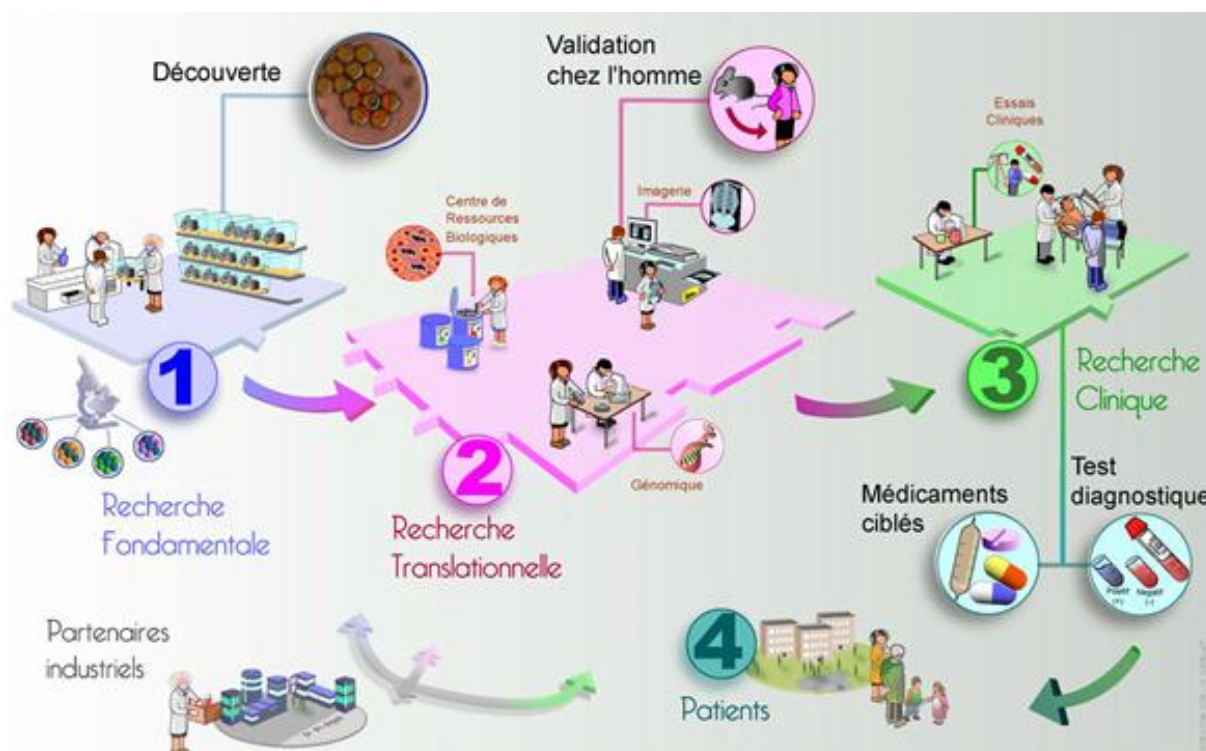
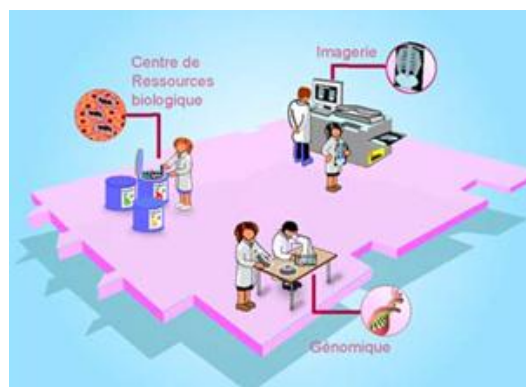


Figure 1: La recherche translationnelle: de la recherche au patient. D'après Pr. Gilles Vassal et Dr. Suzette Delalogue, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Conférence de presse du jeudi 14 septembre 2006

La recherche translationnelle ne se cantonne pas seulement dans le sens recherche fondamentale vers recherche clinique. La recherche translationnelle se base également sur l'observation clinique afin de poser des questions à la recherche fondamentale dans le but de répondre aux questions de santé publique (Figure 2). Prenons l'exemple de l'hypersensibilité douloureuse ou des effets indésirables induits par la consommation d'opiacés, phénomènes observés par la clinique et actuellement étudiés d'un point de vue fondamental par notre laboratoire afin de répondre à ce problème notoire dans la prise en charge de la douleur. Ainsi, c'est sur ces observations cliniques que notre laboratoire se repose pour **répondre aux problématiques de santé publique concernant le traitement de la douleur.**

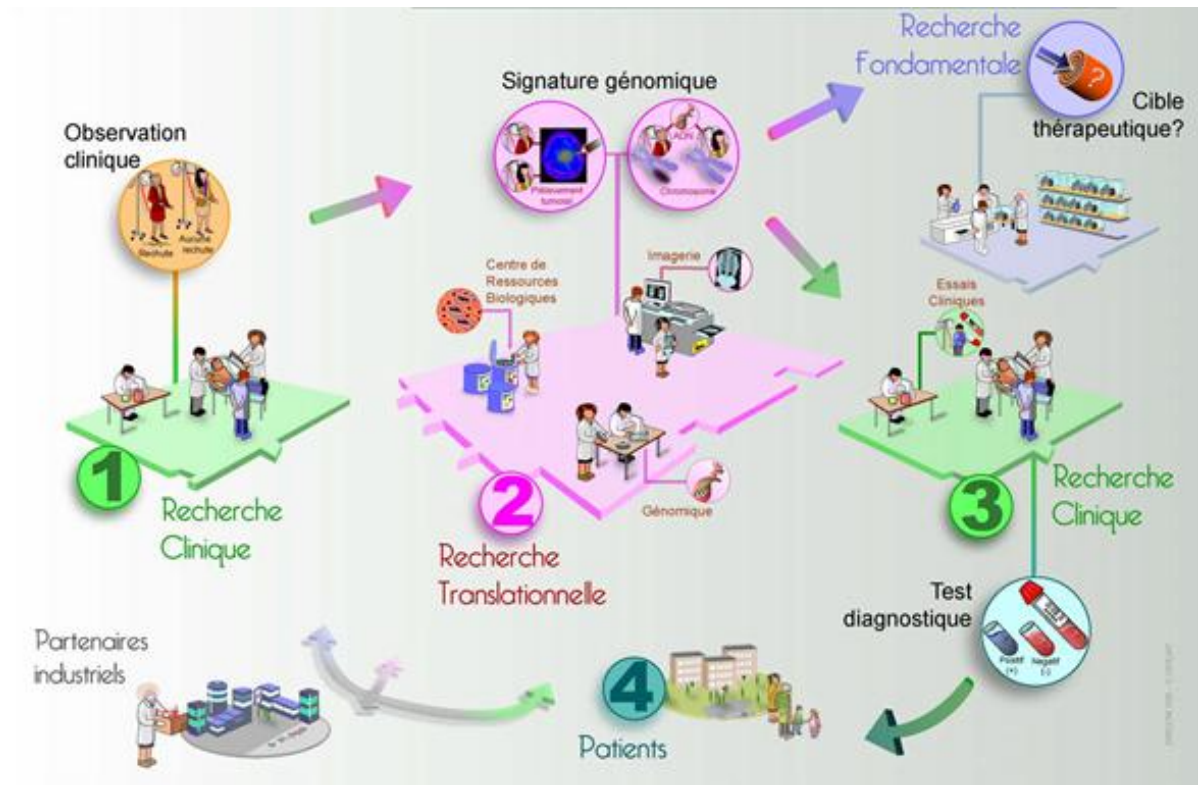


Figure 2 : La recherche translationnelle: du patient à la recherche. D'après Pr. Gilles Vassal et Dr. Suzette Delaloge, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Conférence de presse du jeudi 14 septembre 2006

Ainsi, la recherche translationnelle se développe en partie à proximité du patient et a plusieurs objectifs :

- **Analyser et transmettre** rapidement les innovations scientifiques vers des applications diagnostiques et thérapeutiques, au bénéfice des patients, avec objectif de résultats rapide (< à 5 ans).
- **Assurer un continuum** entre recherche scientifique et soins, du chercheur au malade, en associant médecins, chercheurs et patients.
- **Contribuer à la mise à disposition rapide des innovations** validées en termes de rapport bénéfique/risque.
- **Observer la clinique et interroger la recherche fondamentale** pour répondre à des sujets de santé publique majeurs.

Au final, ces différentes étapes de recherche possèdent des **objectifs propres et entrelacés**, mais malgré leurs objectifs, leurs lieux d'activités et leur production des connaissances distincts, elles se **nourrissent mutuellement**.

Depuis près de 20 ans, le Pr. Alain Eschalié, s'efforce de construire cette relation autour du traitement de la douleur. Cependant, à l'heure actuelle, il existe encore **trop peu d'études** dites

de « **recherche translationnelle** ». La recherche sur le traitement de la douleur n'échappe pas à ce constat. En effet, à ce jour, beaucoup de **nouvelles cibles ou de nouveaux médicaments** ayant un **potentiel thérapeutique** sont étudiés mais **rare sont ceux qui atteignent les études cliniques** soit par manque de données précliniques, soit par manque de moyen, soit du fait d'une pertinence clinique trop faible ou soit encore par échec du concept lors d'études plus poussées chez l'animal (absence d'effet espéré, toxicité, effets indésirables...). A la vue de ce constat, beaucoup d'entreprises pharmaceutiques ont abandonné la recherche de nouveaux antalgiques, s'orientant vers d'autres domaines de recherches plus d'actualité (cancer, Alzheimer, Parkinson...) ou sur de nouvelles associations médicamenteuses et formes galéniques.

De ce fait, en dépit d'immenses efforts d'investissement réalisés chaque année pour mettre au point de nouvelles innovations à visée thérapeutique, **l'arsenal thérapeutique** disponible pour le **traitement de la douleur**, et plus particulièrement les douleurs chroniques (neuropathiques et inflammatoires), repose majoritairement sur des **molécules empiriques** possédant un **rapport bénéfique / risque faible** à long terme¹.

Malgré cela **notre laboratoire** garde pour objectif de comprendre les **mécanismes physiopathologiques** impliqués dans la **perception douloureuse** avec, pour but final, d'apporter aux cliniciens et aux patients de **nouvelles stratégies thérapeutiques** visant à traiter la douleur. Il a également recours à une stratégie basée sur l'étude des **mécanismes d'actions d'antalgiques de références**. Ceci permettra aux chimistes de créer de nouvelles molécules, à visée antalgique, agissant sur les acteurs impliqués dans leurs effets antalgiques, avec pour but final, un développement clinique.

C'est ce que nous nous proposons de faire dans cette thèse en étudiant un antalgique universellement connu et utilisé, **le paracétamol**. Son effet antalgique certes limité est contrebalancé par sa très bonne tolérance par l'organisme aux doses thérapeutiques adéquates, ceci suggérant que les processus physiologiques impliqués dans son mécanisme d'action soient spécifiques à l'antalgie. Il est donc important de connaître les processus biologiques mis en jeu et son mécanisme d'action, ceci pouvant mettre à terme l'élaboration de **nouvelles molécules à visée antalgique** plus efficaces que le paracétamol tout en gardant sa très bonne tolérance.

Nos **recherches pré-cliniques**, *via* l'étude du mécanisme d'action du paracétamol, nous ont permis de découvrir une **nouvelle cible thérapeutique** potentielle : les **canaux calciques Cav3.2**. La finalité de nos études fut le **retour à la clinique** avec l'évaluation de l'effet d'un bloqueur de ces canaux, **l'éthosuximide** (zarontin®), sur les **douleurs chroniques neuropathiques**. Ainsi, ces travaux, de par un va et vient entre recherche clinique et pré-clinique, s'intègrent totalement dans une volonté de **recherche translationnelle**.



Rodin

« le cri » (19^e siècle)

La représentation du motif du cri, qui s'appuie sur une analyse approfondie des traits du modèle, n'est pas sans rappeler l'exercice académique de la « tête d'expression » qui décortique les émotions et les passions humaines. Rodin illustra plusieurs fois ce thème dans sa sculpture, ainsi la Tête de la Douleur de 1903-1904 qui semble pousser un cri de lamentation. Ce buste en marbre, aux yeux creusés et aux lèvres tendues, s'inscrit dans une série de têtes conçues pour le linteau de la Porte de l'Enfer,

INTRODUCTION GENERALE

LE PARACETAMOL :

MODE D'EMPLOI

I. LE PARACETAMOL : MODE D'EMPLOI

A. Historique : retour sur un vieux médicament

Durant les années 1800, les innovations scientifiques et médicales en termes de pharmacopée étaient systématiquement publiées chaque année dans un journal de référence : *l'Officine*. A cette époque, la pharmacopée des antalgiques est plus que conséquente, s'expliquant par un large engouement des industriels de l'époque dans la découverte et la formulation de nouveaux antalgiques (galénique, associations). Ceci permit d'enrichir grandement les étagères de la pharmacopée, en termes d'antalgiques (en moyenne une trentaine par an)².

C'est justement durant ce siècle qu'un nouveau composé, possédant des propriétés antalgiques et antipyrétiques, fut découvert de manière fortuite* et appelé **acétanilide**. Suite à cette découverte, le Dr. Morse (chimiste), appartenant à la compagnie Bayer, synthétisa en 1878 plusieurs dérivés de l'acétanilide dont la phénacétine et le para-acétyl-amino-phénol (**paracétamol**)³.

Parmi ces deux composés, la **phénacétine** fut sélectionnée et le paracétamol mis à l'écart du fait de sa supposée néphrotoxicité, qui s'avérera erronée ou surestimée par la suite. Ainsi, durant plusieurs années, la phénacétine connut un fort engouement dans le monde médical. Quelques années plus tard, l'aspirine fut découverte (1899) et éclipsa en partie la phénacétine conduisant à la commercialisation de plusieurs associations d'antalgiques contenant majoritairement de la phénacétine, de l'aspirine, de la caféine, et parfois un barbiturique. Malheureusement, la surconsommation de ces mélanges médicamenteux entraîna l'observation de graves effets indésirables et intoxications⁴.

Avec les évolutions technologiques de la chimie durant le siècle suivant, la molécule active de l'acétanilide et de la phénacétine, suite à leur métabolisation, fut découverte, redécouverte même⁵, et à la grande surprise ce fut le **paracétamol**, permettant, enfin, sa commercialisation⁶. Par la suite, grâce à son rapport bénéfice / risque et son excellente tolérance, le paracétamol

* Cahn et Hepp étudiaient les effets du naphthalène sur les parasitoses intestinales et durent aller se fournir dans une officine alors qu'ils étaient en rupture de stock. Le pharmacien délivra par erreur de l'acétanilide qui fut administré à leurs patients parasités. Cette erreur leur permit de constater que leurs patients présentaient une forte réduction de leur fièvre. Cahn, A; Hepp, P. (1886), "Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel", *Centralbl. Klin. Med.* 1886, 7, 561-65.

devint l'antalgique et l'antipyrétique de référence dans le monde pour le traitement symptomatique des douleurs faibles à modérées et de la fièvre quel que soit l'âge⁷.

B. Généralités : Qu'est-ce que le paracétamol ?

Le paracétamol (ou *acetaminophen*) appartient à la classe des **antalgiques antipyrétiques non salicylés**. La dénomination *acetaminophen* est utilisée aux Etats-Unis, au Canada, au Japon, en Corée du Sud, à Hong Kong et en Iran alors que le nom paracétamol est utilisé dans les autres pays⁸.

En France, le paracétamol reste le **médicament le plus utilisé**. D'ailleurs, les trois médicaments les plus prescrits sont tous composés de paracétamol et totalisent plus de 260 millions de doses (*le moniteur des pharmacies – cahier III, 2006*). Cette utilisation massive et universelle s'explique par son avantage, non négligeable et rare dans la médication, d'avoir peu de contre-indications, de pouvoir être prescrit à tout âge et d'être **dénué d'effets indésirables graves** lors de son utilisation à la posologie recommandée. Néanmoins, comme toute molécule active, en cas de fort surdosage le paracétamol est toxique pour le foie et est chaque année responsable de décès par hépatite fulminante. En effet, le surdosage involontaire en paracétamol est la première cause de défaillance du foie en Angleterre et aux États-Unis⁹⁻¹². Les Etats-Unis comptent chaque année plus de 100 000 cas de surdosage avec en moyenne plus de 450 décès^{13,14}. Ces chiffres importants sont expliqués par le fait que de nombreux produits sont disponibles aux États-Unis en vente libre sans ordonnance contenant du paracétamol sans que cela ne soit indiqué sur la boîte et par le fait que les conditionnements des antalgiques à base de paracétamol dépassent souvent la dose de 8 grammes susceptible d'induire des troubles graves. En France dans les années 1980, l'Agence du médicament, ancien nom de l'Afssaps et maintenant de l'ANSM, avait réduit le conditionnement des antidouleurs à base de paracétamol pour qu'ils ne dépassent pas cette dose. Depuis ce changement de conditionnement, les décès par intoxication n'ont pas augmenté alors que la consommation n'a pas cessé de croître. Ainsi en 1990, 177 420 000 boîtes de paracétamol ont été vendues en France, et 5 335 intoxications et 6 décès ont été recensés. Ces chiffres restent stables.

Aux USA et en Europe, le paracétamol est également fréquemment utilisé pour des tentatives de suicide¹³. En France en 2006, 1798 intoxications volontaires par le paracétamol ont

été dénombrées, soit 10% des intoxications médicamenteuses volontaires, ce qui place le paracétamol en première position devant le bromazépam¹⁵. Les suicides au paracétamol sont aussi difficiles à évaluer car il n'existe pas de registre national des intoxications volontaires¹⁶.

1. Pharmacocinétique

a. Absorption et distribution

Suite à son ingestion, le paracétamol est **rapidement absorbé**, indépendamment de la dose, par diffusion passive, ceci étant corrélé à ses propriétés physicochimiques (pKa = 9,5 ; non ionisé dans l'intestin)^{6,17,18}. Un tiers de cette absorption s'effectue au niveau gastrique et colique alors que les deux tiers restant sont absorbés au niveau intestinal. Chez l'Homme, le pic plasmatique du paracétamol (Tmax) est variable selon sa forme galénique et la voie d'administration, cela peut-être rapide, **15-60 min, ou plus lent, 2-3 h**^{6,19-21}.

En ce qui concerne les autres paramètres pharmacocinétiques, sa biodisponibilité (dépendante de la dose) est de 0,89 pour une dose orale de 1 g, et son volume de distribution est important, 0,8 à 1,4 L/kg chez l'adulte^{6,22}. De manière intéressante, les concentrations observées dans le liquide céphalorachidien sont équivalentes à celles retrouvées dans le plasma, traduisant une **diffusion au travers de la barrière hématoencéphalique très rapide**¹⁷, ce qui est compatible avec une **potentielle action centrale du paracétamol**.

b. Élimination

L'élimination d'un médicament est évaluée par le temps nécessaire pour diminuer de moitié la concentration plasmatique (**temps de demi-vie d'élimination**) et est la résultante de plusieurs phénomènes associés à la métabolisation et l'excrétion du médicament par l'organisme. Elle est de **2 h** chez l'Homme pour le paracétamol⁶.

Suite à l'effet de premier passage hépatique survenant lors d'une administration orale, l'élimination urinaire sous forme inchangée du paracétamol est seulement de 2 à 5%, traduisant une **métabolisation majoritaire au niveau du foie et du rein**. C'est à ce niveau que 2 voies de métabolisation majeures interviennent : la glycuconjugaison et la sulfoconjugaison permettant la transformation du paracétamol, à hauteur de 90%, en divers métabolites²² dont la majorité sera éliminée dans les urines au bout de 24h^{23,24}.

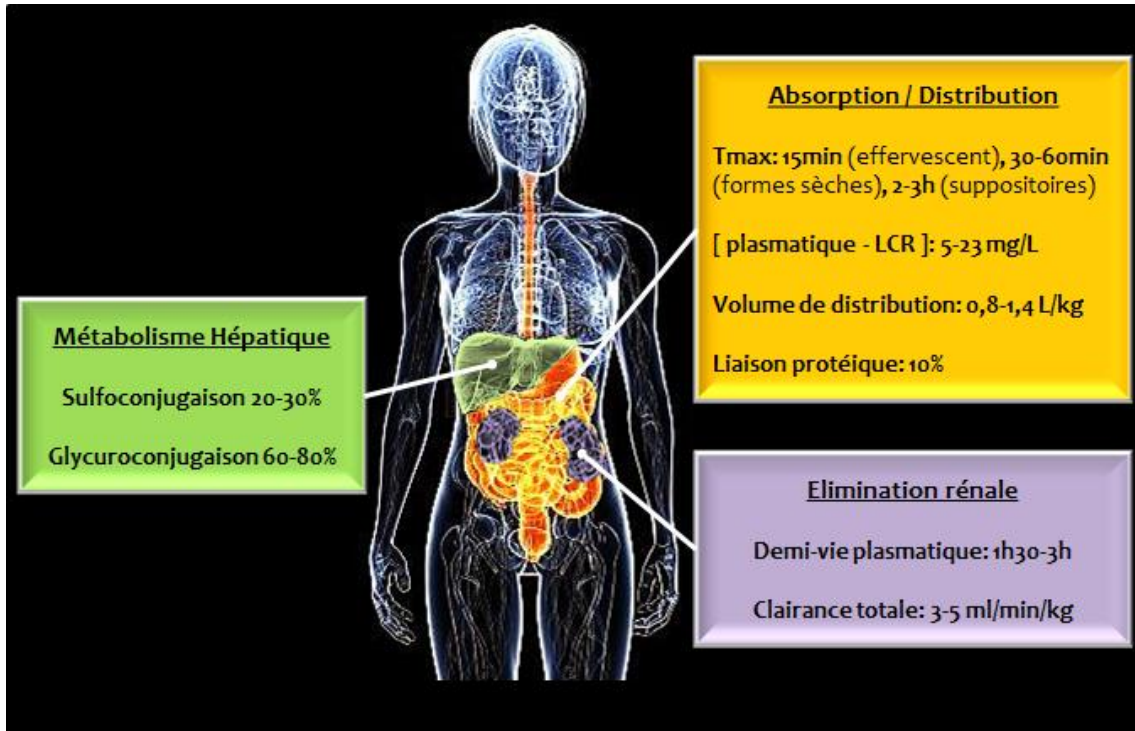


Figure 3: Pharmacocinétique du paracétamol. D'après Bannwarth et Pehourcq 2003; Clissold 1986; Grattan 2000; Rygnestad et coll. 2000.

Un des métabolites majoritaires du paracétamol est le **NAPQI** (N-acétyl-para-benzoquinone imine)²⁵⁻²⁷, c'est également ce composé qui est **responsable de la toxicité du paracétamol** en cas de surdosage. En condition thérapeutique, l'acteur principal dans la métabolisation du paracétamol est le **cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)**^{28,29} permettant la formation du NAPQI (composé très hépatotoxique) qui sera rapidement détoxifié puis éliminé dans les urines.

Dans le cas d'une intoxication suite à un **surdosage** en paracétamol, les mécanismes de détoxification arrivent à saturation et les taux de **NAPQI qui s'accumule massivement** dépassent les capacités de réduction par le glutathion.

Enfin, en ce qui concerne sa clairance totale, aux doses thérapeutiques, elle est de l'ordre de 3 à 5 ml/min/kg pour le paracétamol et de 7 et 9 ml/min/kg respectivement pour ses métabolites sous formes glucuro- et sulfoconjuguées.

Il faut noter toutefois qu'une nouvelle voie métabolique a été découverte par Högestatt et coll.³⁰, celle-ci sera développée dans le chapitre « Mécanismes d'action antalgique du paracétamol : les fondamentaux ». Voir résumé (Figures 3 et 4).

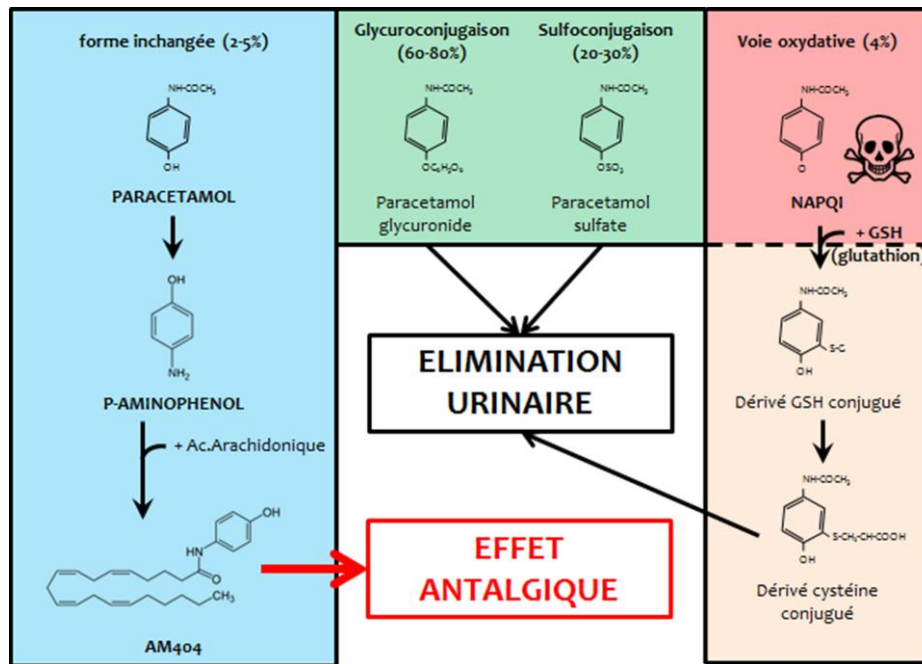


Figure 4 : Métabolisme du paracétamol

2. Toxicité

Comme mentionné en début de chapitre, le paracétamol a l'avantage d'être très bien toléré par l'organisme aux doses thérapeutiques³¹. Malheureusement, lors d'un **surdosage** involontaire ou volontaire, si ingestion de plus de 8 g chez l'adulte et 150 mg/kg chez l'enfant, il apparaît des risques de toxicité.

a. Hépatotoxicité

L'hépatotoxicité sévère est liée à la saturation du système de détoxification hépatique vue précédemment³². En effet, le **NAPQI**, métabolite très toxique, induit à forte dose une **nécrose hépatique** par divers mécanismes^{13,33-38}.

Heureusement, dès 1974 un **antidote** fut mis à disposition lors d'intoxication au paracétamol : la **N-acétylcystéine**. Cet antidote a pour but principal de se substituer au glutathion endogène et d'assurer la détoxification du NAPQI, réduisant et limitant ainsi sa toxicité cellulaire (**dommages oxydatifs**)³⁹.

Suite à cela, toutes atteintes du système hépatique chez l'Homme, insuffisance hépatique chronique ou alcoolisme, doit être prise en considération en cas de prise de paracétamol. Ainsi,

dans le cas d'insuffisance hépatique chronique, même si aucune étude ne montre d'influence chez l'Homme⁴⁰⁻⁴², la dose maximale de 1 g trois fois par jour est préconisée par sécurité. En ce qui concerne les patients alcooliques, les conclusions sont plus complexes, il existe plusieurs études contradictoires dont certaines montrent une potentialisation de l'hépatotoxicité du paracétamol par la prise d'alcool chronique⁴³⁻⁴⁸ alors que d'autres ne montrent aucune corrélation⁴⁹⁻⁵². Malgré tout, la FDA recommande un maximum de 2,5 g/jour de paracétamol pour les personnes ayant consommé 57 g d'alcool (1,5 litre de bière à 5° ou 1 bouteille (75 cl) de vin à 12° ou ¼ d'une bouteille (environ 20 cl) de whisky à 40°).

b. Néphrotoxicité

Comme pour la toxicité hépatique, aucune étude scientifique (clinique, expérimentale et épidémiologique) n'a démontré d'effet néphrotoxique du paracétamol toujours dans le cadre de doses thérapeutiques^{53,54}. Pourtant, lors **d'intoxication ou de surdosage**, des nécroses rénales ont été rapportées que ce soit chez l'Homme ou l'animal⁵⁵⁻⁶⁰. Le responsable désigné pourrait être, via les mêmes mécanismes que précédemment, le NAPQI⁶¹. Mais cette fois, un autre coupable semble être désigné: le **p-aminophénol**, un autre métabolite issu de la déacétylation du paracétamol⁵⁷. Ce composé, découvert antérieurement, est un puissant néphrotoxique^{62,63}.

Comme pour l'hépatotoxicité, rien ne démontre un risque augmenté de nécrose rénale chez des patients insuffisants rénaux, malgré quelques controverses⁶⁴⁻⁶⁶. Une prise à hauteur 3 g/jour, à raison de 1 g trois fois par jour est toutefois recommandée pour ces patients.

c. Autres réactions et interactions médicamenteuses

Beaucoup d'études ont évalué la toxicité et les effets indésirables du paracétamol dans diverses situations, par exemple au niveau gastrique, au niveau hématologique et même au niveau allergique. Toutes les études ne montrent **aucun effet indésirable ni toxicité du paracétamol** malgré quelques cas contradictoires isolés et contestés⁶⁷⁻⁷⁰.

Concernant les interactions médicamenteuses, le probénécide (uricosurique dans le traitement de l'hyperuricémie et de la goutte) réduit environ de moitié la clairance du paracétamol en bloquant sa conjugaison avec l'acide glucuronique. Une diminution de la dose de paracétamol doit être prise en considération lors d'un traitement simultané avec du probénécide. La salicylamide (médicament vendu sans prescription, similaire à l'aspirine) peut prolonger la demi-vie d'élimination du paracétamol. L'administration concomitante de paracétamol et de

zidovudine (antirétroviral) renforce la tendance à la neutropénie. L'utilisation concomitante de paracétamol (4 g par jour pendant au moins 4 jours) et d'anticoagulants oraux peut conduire à de légères variations de l'*International Normalized Ratio* (INR), un indicateur de la coagulation. Dans ce cas, une surveillance accrue de l'INR est nécessaire pendant la période d'utilisation concomitante et 1 semaine après l'arrêt du paracétamol.

3. Actions pharmacologiques

a. Antipyrexie

Dès la découverte du paracétamol, son effet antipyrétique associé à son effet antalgique, a déclenché l'engouement médical pour cette molécule. Par la suite, de nombreuses études cliniques ont confirmé cette action antipyrétique⁷¹⁻⁷⁴. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce mécanisme serait l'inhibition des cyclooxygénases, et plus particulièrement l'isoforme COX-2⁷⁵⁻⁷⁸. En effet, l'augmentation de la concentration de la PGE₂, dans le fluide cébrospinal, suite à un agent pyrogène est diminuée lors de l'administration de paracétamol⁷⁹. Cette hypothèse reste néanmoins controversée et la tendance actuelle des études tend à montrer **un effet plutôt hypothermisant qu'antipyrétique**⁷⁹. En effet, le paracétamol n'a pas de prévention sur la survenue de la fièvre et son administration chez un sujet sain semble induire une hypothermie⁸⁰. Les mécanismes mis en jeu seraient la résultante d'un mécanisme associé au système cannabinoïdérique⁸¹.

b. Antalgie

Cette partie sera détaillée et plus approfondie dans le chapitre suivant. Ne seront repris ici que quelques généralités sur l'effet antalgique du paracétamol.

i. Etudes cliniques et efficacité antalgique du paracétamol

D'un point de vue purement clinique, dès sa commercialisation **l'effet antalgique du paracétamol** fut confirmé et accepté par la communauté scientifique et médicale⁸² et ceci dans **différents types de douleur** qu'elles soient aiguës ou chroniques.

ii. La controverse : action centrale ou périphérique du paracétamol ?

Bien que l'effet antalgique du paracétamol soit avéré et non discutable, son mécanisme d'action quant à lui reste encore flou et son site d'action (central ou périphérique) reste encore actuellement très discuté même si l'accumulation des données fait pencher la balance pour un effet majoritairement voire strictement central. Voici quelques arguments plaidant pour la dernière hypothèse.

- 1) Le paracétamol **passé la barrière hémato-encéphalique**^{17,83-86}.
- 2) Le paracétamol induit un **effet antinociceptif sur des tests nociceptifs dits "centraux"**, tels que le réflexe aux fibres C chez le rat⁸⁷, le « *hot plate test* »⁸⁸, le « *tail immersion test* »⁸⁹, le test de Randall et Selitto⁹⁰, le réflexe RIII chez l'Homme^{91,92} ou encore l'administration intrathécale de NMDA ou de substance P ou de capsaïcine^{93,94}.
- 3) **La modulation d'acteurs centraux**, comme le système sérotoninergique^{83,90,95-99}, le récepteur TRPV1¹⁰⁰, le récepteur TRPA1¹⁰¹ et le récepteur adénosine A1^{98,102}, **modifie l'action antalgique du paracétamol**.
- 4) **Aucun effet antalgique observé lors d'une administration locale de paracétamol**¹⁰³⁻¹⁰⁶.

C'est sur ce dernier point que le débat existe et sur lequel les « pro-périphérie » se basent pour défendre un **effet périphérique du paracétamol**. Quelques études ont d'ailleurs démontré un effet antalgique du paracétamol lorsque celui-ci est injecté au niveau de sites périphériques^{98,107-109}.

C. Utilisations cliniques : Us et coutumes du paracétamol

1. Hors milieu hospitalier

Le paracétamol reste l'antalgique de choix prescrit par les médecins généralistes pour le **traitement symptomatique des douleurs aiguës ou chroniques, d'intensité légère à modérée** (pour revue¹¹⁰). Plusieurs formes galéniques et associations médicamenteuses contenant du paracétamol existent pour une utilisation seule (Doliprane®, Efferalgan®, Dafalgan®) ou en

association avec d'autres antalgiques (codéine, tramadol, acide acétylsalicylique, ibuprofène). Lors d'associations avec d'autres antalgiques, il rentre dans la classification des antalgiques indiqués dans les douleurs d'intensité modérée à intense ou ne répondant pas à l'utilisation d'antalgiques seuls.

Le second contexte justifiant la prescription du paracétamol est le **traitement symptomatique de la fièvre**, en particulier chez l'enfant chez qui il constitue l'antipyrétique de première intention¹¹¹.

Malheureusement, **l'efficacité antalgique** du paracétamol a des limites en particulier lorsque l'intensité de la douleur devient importante. C'est le cas pour certaines douleurs arthrosiques à stade avancé^{112,113} et cancéreuses^{110,114,115}. Malgré cela, le paracétamol est présent dans les recommandations de l'OMS, pour le traitement des douleurs chroniques, lorsque son efficacité suffit.

2. Milieu hospitalier

Le paracétamol est **peu efficace seul** sur la plupart des **douleurs post-opératoires**, mais son « innocuité » en fait une molécule utilisée quasiment systématiquement. Toutefois, il possède un **effet additif** et une synergie vraie, respectivement, sur l'action des anti-inflammatoires stéroïdiens (**AINS**) et des **morphiniques**¹¹⁶, sans toutefois réduire les effets secondaires dus à la morphine¹¹⁷. Après une chirurgie plus légère, il peut réduire la consommation et les effets indésirables du **tramadol**¹¹⁸. Sa puissance n'est comparable à celle des AINS que lorsque la chirurgie est peu algogène^{119,120}, mais sur certains modèles postopératoires (p.ex. extractions dentaires, ORL pédiatrique), il est illusoire de penser se passer des AINS^{121,122}. Dans la plupart des cas, le paracétamol est utilisé en **combinaison avec d'autres antalgiques** comme les morphiniques, les AINS, la caféine...dans le traitement des **douleurs inflammatoires** (post-opératoires, arthrite), **neuropathiques** (lombalgies) et **cancéreuses**¹¹⁰.

- Effets **additifs** sur les AINS¹²³.

- **Synergie** additive avec les opiacés¹²³⁻¹²⁵.

- Chez l'enfant : ½ ml/kg toutes les 4-6 h de Parfalgan® pur (500 mg / 50 ml). Pour les douleurs modérées, la forme intrarectale (40 mg/kg) a le mérite d'agir plus longtemps que la forme intraveineuse¹²⁶.

- Des formes à libération prolongée sont en cours de développement¹²⁷.

Nous avons ainsi fait le portrait du médicament le plus utilisé dans le monde qui possède l'avantage majeur d'être très bien toléré mais aussi l'inconvénient d'être peu ou pas efficace dans les douleurs intenses et chroniques. Malgré plus d'un siècle d'interrogations sur son mécanisme d'action, celui-ci reste encore flou. Nous allons détailler, dans la partie suivante, les différents mécanismes évoqués à ce jour.

INTRODUCTION GENERALE

MECANISME D'ACTION ANTALGIQUE

DU PARACETAMOL :

LES FONDAMENTAUX

II. MECANISME D'ACTION ANTALGIQUE DU PARACETAMOL : LES FONDAMENTAUX

Du XXème siècle jusqu'à nos jours, de nombreuses études se sont attelées à découvrir et comprendre le mécanisme d'action du paracétamol avec plus ou moins de succès. Ceci débute dès 1971 avec les prix Nobel **Vane et Flower**, découvreurs du mécanisme d'action des AINS¹²⁸, tels que l'**aspirine**, mettant en jeu le **blocage** d'enzymes appelées **cyclooxygénases (COX)**. Ces deux nobélisés ont émis l'hypothèse d'un **mécanisme similaire pour le paracétamol**¹²⁹, malgré le fait que celui-ci ne possède pas d'action anti-inflammatoire, ni les effets indésirables associés aux AINS (ulcération, syndrome hémorragique...)¹³⁰. Encore actuellement, plusieurs études recherchent une relation entre le système « COX » et l'effet antalgique du paracétamol, **études très contestées et peu concluantes**. Plus récemment, d'autres études ont mis en évidence l'implication d'autres systèmes centraux : les **systèmes sérotoninergique**^{103,131} et **cannabinoïde / vanilloïde**^{100,131}.

Force est de constater qu'à l'heure actuelle le paracétamol garde encore jalousement ses secrets même si les récentes études ainsi que mes travaux de thèse permettent de disperser quelque peu le brouillard autour de son mécanisme d'action. Suite à ces différentes études, il est établi et accepté par la communauté scientifique que le **paracétamol n'agit pas sur une cible unique**. Il met en jeu **différentes voies métaboliques et neuronales** qui elles-mêmes impliquent **différents acteurs**, constituant ainsi un réseau de protagonistes participant chacun à leur façon et à différents niveaux aux cascades de réactions biologiques nécessaires à l'effet antalgique du paracétamol. **Un système très complexe pour un vieux médicament**.

Démêlons tout d'abord les connaissances actuelles afin de mieux percevoir son mécanisme d'action.

A. Généralités : vers un pro-médicament

De nombreuses études mettent en avant plusieurs arguments reposant sur différentes voies centrales possibles. Parmi ces différentes voies, **l'inhibition des COX centrales** fut la première à être supposée^{130,132,133} mais cette hypothèse reste à l'heure actuelle **controversée**. Plus tard, de nombreuses études ont mis en lumière, que ce soit chez l'animal ou l'Homme, une

implication des **voies sérotoninergiques descendantes** dans l'effet antalgique du paracétamol, mettant en jeu des **récepteurs sérotoninergiques médullaires** différents en fonction de la modalité de la stimulation nociceptive^{83,90,95,96,98,99,103,131,134-138}. Récemment, deux nouveaux systèmes, très reliés entre eux, ont été découverts comme étant très fortement impliqués dans le mécanisme d'action du paracétamol : les **systèmes cannabinoïde et vanilloïde**. En effet, le **blocage** du récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (**CB1**) , par leur antagoniste AM251, **inhibe l'effet antalgique du paracétamol**^{131,139,140}. Le système vanilloïde quant à lui met en jeu les récepteurs **TRPV1** et comme précédemment, le **blocage** central de ce récepteur **inhibe l'effet antalgique du paracétamol**¹⁰⁰. Ces différentes études montrent plusieurs choses, tout d'abord qu'il existe bien un effet central du **paracétamol** mais plus intéressant, que l'inhibition d'une seule de ces différentes voies permet l'inhibition de l'effet antalgique du paracétamol amenant à la conclusion d'un **effet strictement central** (dans le cas du système vanilloïde) mais également l'existence d'un **lien fonctionnel entre ces voies**. Ce point commun entre ces deux systèmes fut découvert très récemment par notre laboratoire en collaboration avec une équipe suédoise. Cette découverte a permis de mettre en évidence une **nouvelle voie métabolique** du paracétamol, uniquement mise en jeu **au niveau central**, aboutissant à la formation d'un composé inédit, l'**AM404**³⁰. Ce composé formé à partir de l'association entre l'acide arachidonique et le *p*-aminophénol grâce à une enzyme particulière, la Fatty Amino Acid Hydrolase (**FAAH**), a la particularité originale d'être un **activateur** à la fois des récepteurs **TRPV1 et CB1**^{30,131,140-142} (Barrière et coll., *in press*). De ce fait, cet AM404 semble être le **métabolite actif du paracétamol** induisant, de par ses actions centrales, l'effet antalgique du paracétamol. L'hypothèse avancée expliquant le lien entre ces protagonistes et le système sérotoninergique, serait que l'activation des récepteurs CB1 et TRPV1 par l'AM404 au niveau cérébral permettrait l'**activation de zones** spécifiques impliquées dans la mise en œuvre des **voies sérotoninergiques descendantes**. Une des zones privilégiées et en cours d'étude dans notre laboratoire est la substance grise périaqueducule (**PAG**), zone qui possède la particularité d'**exprimer**, au niveau neuronal, les récepteurs **CB1 et TRPV1** et l'enzyme **FAAH**. De plus, son activation directe induit un effet antalgique chez l'animal¹⁴³⁻¹⁴⁸ *via* l'activation de la moelle rostro ventrale (RVM)¹⁴⁹⁻¹⁵³ et des voies sérotoninergiques descendantes¹⁵⁴⁻¹⁵⁹.

Fort de ces différents et nombreux arguments, le courant majoritaire actuel montre que le paracétamol agirait uniquement au niveau central. Malgré cela, certaines études montrent un **effet périphérique** potentiel du paracétamol^{98,108,109,160}.

Le mécanisme d'action antalgique du paracétamol reste encore à être élucidé mais les données actuelles nous orientent vers des mécanismes centraux. Comment sont mis en jeu ces différents processus ?

B. Le système cox : le controversé

Les **AINS**, dont l'aspirine, sont des **inhibiteurs de la production des prostaglandines** comme l'ont démontré John Vane et coll. en 1971¹²⁸. Néanmoins, si l'on creuse les écrits scientifiques plus anciens, on se rend compte que les effets de l'aspirine sont **connus et décrits depuis plusieurs siècles** remontant même jusqu'à la période du règne égyptien (1850 av. J.C.). A cette époque, des feuilles de saule blanc étaient utilisées à des fins antalgique et antipyrétique, feuilles qui par la suite ont montré qu'elles contenaient le principe actif de l'aspirine : **la salicine**.

Revenons brièvement sur l'implication de ces enzymes dans la nociception.

1. Mode d'action

Les COX sont les enzymes essentielles pour la **synthèse des prostaglandines**¹⁶¹ (Figure 5). Il en existe deux isoformes (**COX-1** et **COX-2**). Ces deux enzymes possèdent une différence majeure en termes d'expression dans l'organisme :

- La **COX-1** est exprimée dans la majorité des tissus de manière **constitutive** en tant qu'enzyme de régulation¹⁶².
- La **COX-2**, est exprimée uniquement dans quelques tissus (prostate, système nerveux central (SNC), reins, endothélium vasculaire et appareils reproducteurs)¹⁶², mais surtout essentiellement de manière **inductible**¹⁶³ en réponse à un stress (p.ex. inflammation).

Si l'on se concentre sur le **SNC**, la COX-1 est majoritairement exprimée au niveau des cellules du **tronc cérébral** et de la **moelle épinière**¹⁶⁴, alors que la COX-2 est retrouvée dans les neurones et les cellules gliales de **l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex, l'amygdale et la moelle épinière**^{165,166}.

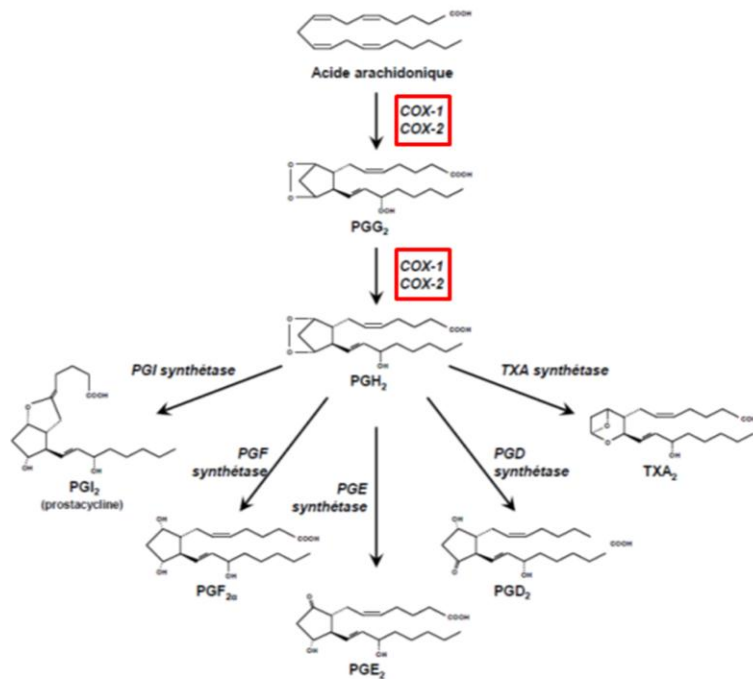


Figure 5: Métabolisme des prostanoïdes

Mais qu'en est-il de la relation entre ces COX et l'effet antalgique du paracétamol ?

2. Relation paracétamol et COX

Une des premières publications mettant en avant une relation entre paracétamol et COX est une étude réalisée *in vitro* sur des COX purifiées mises en contact avec différentes concentrations de paracétamol. Plusieurs études *in vitro*, sur culture cellulaire, ont montré que le paracétamol était capable de **diminuer la production de PGE₂**^{79,167-171}, ceci variant selon la dose de paracétamol utilisée. Enfin, d'autres études *ex vivo*, menée chez l'Homme, montrent une **inhibition de l'activité COX-2** par des **doses thérapeutiques** de paracétamol¹⁷² ou plus récemment chez la souris¹⁷³.

Ainsi, nous ne pouvons exclure le fait d'une relation plausible entre COX et paracétamol. Penchons-nous sur les mécanismes moléculaires potentiellement mis en jeu dans cette inhibition.

i. Mécanismes de l'inhibition des COX par le paracétamol

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme moléculaire de l'inhibition des COX par le paracétamol, la plupart étant écartées ou non confirmées:

- 1) Inhibition de la libération d'acide arachidonique des membranes cellulaires^{172,174} → **Invalidée**¹⁷⁵.
- 2) Compétition entre paracétamol et acide arachidonique pour le site actif de la COX → **Non confirmée**¹⁷⁶
- 3) Inhibition par le NAPQI¹⁶⁸ → **Invalidée**¹³³.
- 4) Réduction de la COX, de ce fait inactivée, par l'inhibition d'un tonus peroxyde^{130,133,172,177,178} → **Controversée**¹⁷⁹.
- 5) Inhibition de la COX par l'AM404^{30,180}.

Les deux dernières hypothèses semblent être cohérentes et seront développées ci-dessous.

ii. Réduction des COX par le paracétamol

Dès 1982, Hanel et Lands ont émis l'hypothèse que l'**activation des COX** par leur **oxydation** pouvait être « médiée » par les **peroxydes** et que cette oxydation serait diminuée voire **supprimée** en présence de **composés réducteurs** aboutissant *in fine* à l'inactivation des COX par réduction¹³⁰. Partant de cette hypothèse, plusieurs études se sont intéressées à la **capacité de réduction du paracétamol** vis-à-vis des COX. Ceci a été démontré par plusieurs études dès 1987^{132,172,174,181,182}. De plus, les peroxynitrites ont été confirmées comme nécessaires à l'activité de la COX et le **paracétamol** décrit comme un **puissant piègeur de peroxynitrites** et réducteur des COX *via* ce mécanisme¹³³ (Figure 6).

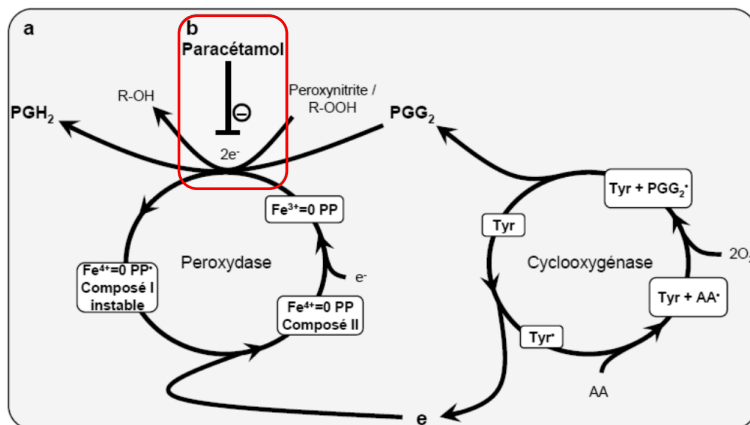


Figure 6: Inhibition des cyclooxygénases par le paracétamol. a) Mécanisme d'action des cyclooxygénases. b) Site d'action du paracétamol sur l'activité COX. AA : acide arachidonique ; PP : protoporphyrine ; R-OOH : hydroperoxyde lipidique ; Tyr : tyrosine. Modifié d'après Ouellet et Percival 2001 ; Schildknecht et coll. 2007.

Ces études confirment que les **conditions d'oxydo-réduction modulent l'effet du paracétamol sur les COX**. Le cerveau étant un organe très protégé du stress oxydatif, contrairement à la périphérie en cas d'inflammation, l'activité inhibitrice du paracétamol sur les COX serait donc plus favorable dans le tissu cérébral que dans le tissu périphérique présentant une inflammation. Ainsi, la faiblesse de son effet antalgique et anti-inflammatoire périphérique peut être expliquée par la conjonction de différents paramètres : - Présence d'autres peroxydes¹⁸³, - Fort taux de radicaux libres, - Forte expression de la COX-2, - Taux très faibles de peroxydes nécessaires à son activation¹⁸⁴, - Taux élevés d'espèces oxygénées réactives. De ce fait, les peroxydes de par leur action oxydante, limitent le pouvoir réducteur du paracétamol vis-à-vis des COX et donc son efficacité anti-inflammatoire et antalgique. Les taux de peroxydes sont bien inférieurs dans le SNC d'où l'hypothèse d'une action anti-COX centrale du paracétamol.

Ainsi, l'action du paracétamol sur l'activation des COX semble être expliquée par une théorie plus plausible qui est la diminution de leur oxydation nécessaire à leur activation. Mais, avec les études très récentes, une autre théorie a vu le jour.

iii. AM404 et inhibition des COX.....

En 2005, Högestätt et coll., ont proposé que l'**inhibition des COX** par le paracétamol s'effectue *via* un de ses nouveaux métabolites : l'**AM404**³⁰. En effet, l'AM404 est capable d'**inhiber** de manière dose-dépendante (0,1-1,0 µM) à la fois l'activité des **COX** purifiées et la **synthèse de PGE2** induite par le LPS (1 µg/mL) sur une culture de macrophages³⁰. Cette hypothèse est séduisante puisque l'AM404 est **produit uniquement dans le cerveau**, elle est en accord avec l'action principalement centrale du paracétamol. Ceci vient corroborer l'hypothèse précédente selon laquelle le paracétamol aurait une action inhibitrice des COX préférentiellement au niveau central.

En conclusion, le paracétamol semble posséder la capacité d'inhiber les COX avec une action centrale préférentielle. Malgré cela, les COX ne pouvant être séparées de la réponse inflammatoire et tous les symptômes s'y rapportant, le paracétamol pourrait avoir un potentiel anti-inflammatoire. Qu'en est-il réellement?

iv. Paracétamol et inflammation-----

Comme pour les études *in vitro*, les résultats obtenus *in vivo* chez l'animal n'échappent pas aux divergences de résultats. En effet, la capacité du paracétamol à **réduire une inflammation** (œdème) chez l'animal a été démontrée par Seegers¹⁸⁵ dans le modèle à la carragénine chez le rat. *A contrario*, plusieurs autres études n'ont **observé aucune activité anti-inflammatoire** dans ce même modèle^{129,136,186,187} ou dans d'autres modèles d'inflammation^{103,188}.

En clinique, chez des patients poly-arthritiques, les résultats obtenus convergent vers la même conclusion que chez l'animal : **le paracétamol ne réduit pas l'inflammation**^{189,190}. Ceci est corrélé avec les concentrations synoviales en PGE2 inchangées chez ces patients suite à un traitement par du paracétamol¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

Néanmoins, comme chez l'animal des **divergences** apparaissent. C'est le cas de plusieurs études qui montrent que le paracétamol **réduit l'inflammation tissulaire** suite à une chirurgie¹⁹⁵⁻²⁰⁰. Associé à ces effets macroscopiques, le paracétamol administré par voie orale (500 mg) **réduit la synthèse de prostacycline** chez des volontaires sains^{201,202}. Enfin, une étude, cette fois *ex-vivo*, par mesure du taux plasmatique de PGE2 induit par le LPS et du niveau de coagulation induit par le TBX2 a été réalisée sur des volontaires sains ayant reçu du paracétamol (1 g, *per os*) et montre une **réduction de l'activité COX**²⁰³.

En conclusion, le système COX semble, en fonction du contexte douloureux, impliqué dans l'effet du paracétamol mais au vu des nombreuses discordances et du faible impact du paracétamol sur ce système, il est fort probable qu'un autre système intervienne. C'est ce que nous allons voir dans les parties suivantes avec pour commencer le système cannabinoïde.

C. Système cannabinoïde

Reprenons où nous nous étions arrêté en début de chapitre : à la découverte d'une nouvelle voie métabolique cérébrale du paracétamol et de son métabolite actif, l'AM404.

L'**AM404** est un composé lipophile, dont la structure primaire se compose d'acide arachidonique, il est donc un « *arachidonic-related compound* » et se rapproche structurellement

de la famille des **lipoaminoacides** qui inclut les **endocannabinoïdes** (ou lipides endogènes) tels que l'anandamide²⁰⁴, le N-arachydonoyl-dopamine et le 2-AG^{205,206} ainsi que les composés synthétiques tels que l'oléamide, l'arvanil, le palvanil et le linvanil^{207,208}. Ces composés induisent de multiples effets biologiques et de manière intéressante partagent les **effets antalgiques** des cannabinoïdes exogènes (p.ex. Δ 9-tetrahydrocannabinol ou Δ 9-THC) dans de nombreux tests d'exploration de la nociception chez l'animal. Une étude récente a néanmoins montré que la plupart de ces composés induisaient une antalgie non dépendante des CB1 et CB2²⁰⁹. Cela suppose que leur action antalgique implique d'autres systèmes que nous verrons par la suite.

Avant de détailler les fonctions et effets de l'AM404 ainsi que ceux des « arachidonic-related compound » (voir chapitre « arachidonic-related compound »: Nouvelle classe de médiateurs lipidiques) intéressons-nous aux rôles du système cannabinoïde dans l'effet antalgique du paracétamol.

1. Généralités

L'origine du système cannabinoïde provient de la plante **Cannabis sativa** qui est à la fois une plante médicinale reconnue mais également une drogue psychotrope illicite, plus connue sous le nom de **cannabis, marijuana ou haschich**²¹⁰. La description de ses propriétés thérapeutiques remonte en 2737 avant J.C. dans un traité de pharmacologie de la médecine traditionnelle chinoise, le Shen Nung Ben Ts'ao écrit par l'empereur chinois Shen-Nung. Dès 950 avant J.C., des traces de **Δ 9-THC**, le principal composé psychoactif du cannabis, ont été retrouvées dans des momies égyptiennes²¹¹. Enfin, ses effets psychotropes ont été décrits au 19ème siècle par le poète Charles Baudelaire dans "Les Paradis Artificiels".

C'est seulement après plus de vingt ans de recherches pharmacologiques, suite à l'identification du Δ 9-THC²¹², que la caractérisation et le clonage des cibles moléculaires du cannabis furent dévoilés au grand jour. Ces cibles sont principalement : les récepteurs cannabinoïdes **CB1 et CB2**^{213,214}.

Nous reviendrons sur leurs rôles et fonctions dans le chapitre « arachidonic-related compound »: Nouvelle classe de médiateurs lipidiques ». Pour le moment intéressons-nous à leur implication dans l'effet antalgique du paracétamol.

2. Paracétamol et système cannabinoïde

Suite à la découverte de la nouvelle voie métabolique du paracétamol, une étude menée dans notre laboratoire fut la première à émettre l'hypothèse d'une interaction entre système cannabinoïde et paracétamol. **Quel est ce lien?** Le responsable serait l'**AM404**, le nouveau composé actif dérivant de la transformation du *p*-aminophénol (issu de la transformation hépatique du paracétamol) par l'enzyme FAAH. Cet AM404 est retrouvé très majoritairement dans le **cerveau** mais aussi en faible quantité au niveau spinal, il reste absent dans le foie et le sang alors que le *p*-aminophénol est présent dans tous les tissus, notamment au niveau hépatique où les taux sont les plus élevés³⁰ (Figure 7).

L'implication de l'enzyme FAAH dans cette métabolisation a été mise en évidence de par son blocage soit de manière pharmacologique par le PMSF (inhibiteur des sérines protéases) soit génétiquement chez les souris KO FAAH. Le blocage de la FAAH empêche la formation cérébrale d'AM404 autant *in vivo* qu'*in vitro*³⁰.

Ainsi, le paracétamol serait déacétylé au niveau hépatique en *p*-aminophénol, lui-même conjugué à l'acide arachidonique par la FAAH au niveau cérébral pour former l'AM404.

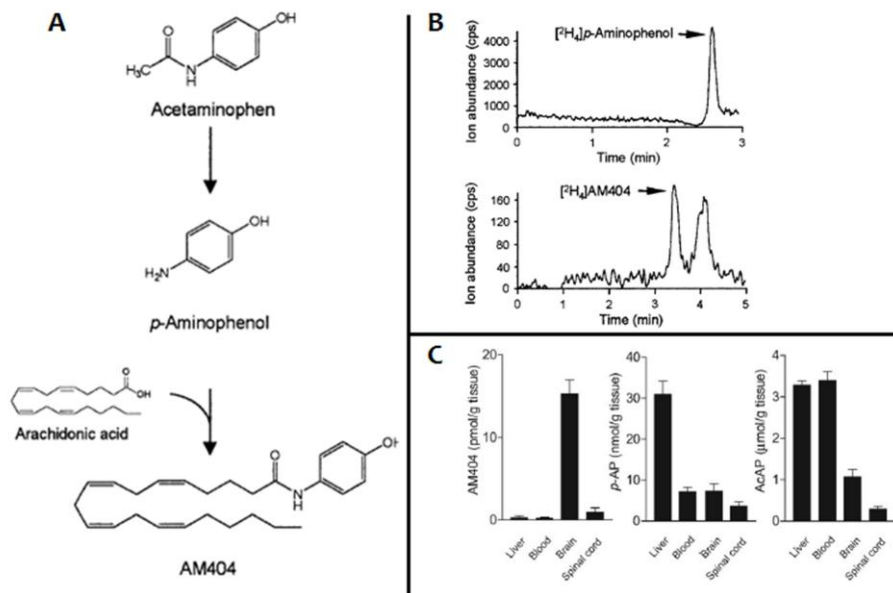


Figure 7 : Métabolisme cérébral du paracétamol et distribution de ses métabolites. A) Nouvelle voie métabolique du paracétamol aboutissant à la formation de l'AM404. **B)** Chromatogrammes représentatifs des échantillons obtenus à partir de cerveau de rat montrant la présence de $[^2\text{H}_4]$ AM404 et $[^2\text{H}_4]$ *p*-aminophénol chez des animaux traités avec 300 mg / kg $[^2\text{H}_4]$ paracétamol pendant 20 min. **C)** L'AM404, le *p*-aminophénol (p-PA), et le paracétamol (AcAP) ont été dosés dans divers tissus obtenus à partir de rats après l'administration de paracétamol (300 mg / kg) ou d'un véhicule pendant 20 min. Les quantités maximales d'AM404 et de *p*-aminophénol ont été trouvées dans le cerveau et le foie, respectivement. Modifié d'après Högestätt et coll. 2005.

Malgré cette étude, il restait la question du lien entre paracétamol (AM404) et système cannabinoïde. C'est dans ce but que notre laboratoire s'est mis à l'œuvre pour découvrir ce lien. Et ce fut le cas en 2008, grâce à l'étude de Mallet et coll.¹³¹ qui a démontré que l'effet du **paracétamol** (300 mg/kg p.o.) chez le rat était **inhibé** lors d'une administration d'**AM251** (antagoniste CB1) et ceci dans toutes les modalités expérimentales (thermique, mécanique et chimique). Cet effet fut confirmé à l'aide de souris déficientes pour le gène codant le récepteur CB1 (**KO CB1**), validant le lien entre paracétamol et système cannabinoïde déjà soulevé par Ottani et coll.¹⁴⁰. Notre équipe est allée plus loin dans l'investigation et a montré que le **blocage de la FAAH** par l'**URB597**, ainsi que par le **PMSF**, **diminuait** aussi **l'antalgie induite par le paracétamol**, confirmant à la fois l'implication de la FAAH et de l'indispensable AM404 pour l'effet antalgique du paracétamol.

Ainsi, il existe bien une relation entre AM404 et récepteurs CB1 mais ce lien est-il une interaction directe entre ces deux protagonistes ? La réponse est mitigée, l'étude de Zygmunt¹⁴¹ a démontré que l'**AM404** était capable de **se fixer** sur les récepteur **CB1** mais avec une **faible affinité** ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$) alors que, contrairement aux agonistes connus des récepteurs CB1, l'AM404 n'induit **pas d'accumulation d'AMPC in vitro**²¹⁵. Ces données tendent à **écarter l'hypothèse** selon laquelle l'AM404 pourrait activer directement le récepteur CB1. Par contre, l'AM404 est capable de **renforcer l'activité du système cannabinoïde par l'inhibition de la recapture de l'anandamide** (effectuée par la FAAH), et donc provoquer son accumulation^{142,215-218}. Or l'anandamide possède quant à elle une **forte affinité pour le CB1** ($K_i = 17 \text{nM}$)¹⁴¹.

Ainsi, l'AM404 sous-tendrait l'effet antalgique du paracétamol via l'activation directe ou indirecte des récepteurs CB1.

3. L'AM404, activateur des récepteurs TRPV1

Parallèlement aux recherches sur le système cannabinoïde et ses récepteurs CB1/ CB2 dans l'action du paracétamol, Zygmunt et coll. ont également montré que l'**AM404** était capable **d'agir positivement** sur un autre récepteur largement impliqué dans la nociception, le *Transient Receptor Potential Vanilloid-1* (**TRPV1**) appartenant au système **vanilloïde**. En effet, l'AM404 induit une **augmentation des courants TRPV1**, abolie par la **capsazépine** (antagoniste spécifique du TRPV1), dans un modèle d'expression hétérologue en œuf de Xénope¹⁴¹ tout en possédant une forte affinité pour ce récepteur¹⁴².

Ainsi l'**AM404**, de par sa structure chimique, se comporte comme les **lipoaminoacides**, tels que l'anandamide, en possédant la capacité d'activer les récepteurs TRPV1 et indirectement les CB1[†], devenant à la fois un **endovanilloïde et un endocannabinoïde**.

L'AM404 semble donc interagir très fortement avec le récepteur TRPV1 et donc le système vanilloïde. Quel est le rôle de ce système dans la nociception et surtout est-il, lui aussi, mobilisé dans l'effet antalgique du paracétamol ?

D. Système vanilloïde

1. Généralités

L'origine des observations ayant permis d'aboutir à la découverte du récepteur TRPV1 et du système vanilloïde remonte à l'antiquité avec les **Euphorbium** (médication à base d'*Eucalyptus resinifera*). Ces *Euphorbium*, dont le nom dérive du médecin romain Euphorbius, furent utilisés dans le traitement des **douleurs articulaires et inflammatoires** jusqu'à la fin de la Renaissance où ils furent abandonnés à cause de leur pouvoir irritant trop important²¹⁹.

Le principe actif de l'*Euphorbium* fut identifié en 1975 et nommé résinifératoxine (**RTX**) du nom de la plante dont elle est extraite²²⁰. Cette RTX possède une analogie structurale très importante avec la **capsaïcine** (principe actif irritant du piment), toutes deux possédant une fonction (homo)vanillyl responsable de leurs actions biologiques et appartenant à la famille des **vanilloïdes**²¹⁹.

Du fait du faible coût et de la grande disponibilité de la capsaïcine, la majorité des recherches se sont concentrées sur cette molécule. La première observation biologique suite à l'administration de la capsaïcine fut son effet **pronociceptif**, via l'activation des nocicepteurs polymodaux, chez l'animal et chez l'Homme²²¹⁻²²⁴. D'autres études ont mis en évidence qu'une forte dose de capsaïcine administrée chez le rat nouveau-né (50 mg/kg) produisait **une dégénérescence des fibres périphériques de petits diamètres et des neurones des DRG** respectivement à hauteur de 40% et 43%. Cette dégénération est associée également à une

[†] L'AM404 est capable d'augmenter les taux d'anandamide circulant et cérébraux via l'inhibition de la recapture de l'anandamide. L'accumulation d'anandamide est susceptible d'activer les récepteurs CB1^{215,216}.

diminution de la production de substance P (80 à 90%), de CGRP, ceci permettant de conclure que les neurones exprimant la substance P et la CGRP sont capsaïcine sensibles (*Pour revue*²²⁵).

A la vue de ce constat, l'existence d'un récepteur spécifique à la capsaïcine ou aux vanilloïdes en général semble être fort probable : un récepteur présent sur les fibres de petit diamètre, participant à la production de substance P et CGRP et impliqué dans les phénomènes douloureux. Les études de radiomarquage (^[3H]RTX) ont permis de visualiser le récepteur tout au long de la fibre et au niveau des couches superficielles de la moelle épinière^{226,227}. Suite à cela, le clonage et la caractérisation biologique de ce récepteur ont été réalisés en 1997 et ont mis en évidence que ce récepteur appartenait à la famille des **récepteurs TRPs** (Transient Receptors Potential)²²⁸ et fut appelé **TRPV1**.

Comme pour les récepteurs aux cannabinoïdes, l'implication de ce canal dans la nociception sera détaillé dans le chapitre « arachidonic-related compound »: Nouvelle classe de médiateurs lipidiques ». Quel est son rôle dans l'antalgie produite par le paracétamol ?

2. Paracétamol, AM404 et récepteur TRPV1

Comme précédemment, tout débuta en 2005 avec les études menées sur le métabolisme du paracétamol par Högestätt³⁰ qui ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie de métabolisation du paracétamol, aboutissant à la formation, strictement supraspinal, d'un nouveau composé actif, appelé AM404 chez des rats traités avec une dose antalgique de paracétamol (300 mg/kg i.p.). Parallèlement, les récents travaux se penchant sur l'impact de l'**activation** des récepteurs **TRPV1 supraspinaux**, et particulièrement au niveau de la **PAG**, sur la nociception concluent à un rôle de ces récepteurs dans l'initiation de **processus antalgiques** via l'activation des **voies inhibitrices descendantes**²²⁹⁻²³⁴. Enfin, en 2010, Mallet et coll.¹⁰⁰ ont démontré une **relation** étroite entre les **TRPV1 supraspinaux** et l'action antalgique du **paracétamol**. En effet, l'**action antalgique** du paracétamol (et de l'AM404) est **abolie lors de l'inhibition des récepteurs TRPV1** que ce soit de manière systémique par l'utilisation de souris *knock-out* TRPV1 ou soit de manière plus ciblée par l'injection intracérébroventriculaire de capsazépine (antagoniste TRPV1). De plus, cette étude a montré que l'injection **intracérébroventriculaire d'AM404** provoquait un **effet antinociceptif**, effet totalement **abolie lors du blocage des récepteurs TRPV1** (KO TRPV1 et capsazépine).

Pour finir, des études en cours au laboratoire ont montré 1) que **la FAAH, le TRPV1 et le CB1** étaient présents et **colocalisés au niveau supraspinal** (PAG) (Barrière et coll., en rédaction), ce qui corrobore les résultats de Maione et coll. sur la colocalisation CB1 / TRPV1 dans la PAG²³⁰ ; 2)

que le blocage de ces différents acteurs (FAAH, CB1 et TRPV1), spécifiquement dans la PAG à l'aide de divers antagonistes, abolit l'effet antalgique du paracétamol et de l'AM404 (Barrière et coll. *in press*).

Ainsi, au vu de cette dernière étude et de celles en cours, il apparaît une implication du système vanilloïde dans l'effet antalgique du paracétamol, système qui en plus est en étroite relation avec le système cannabinoïde lui aussi également impliqué dans l'effet du paracétamol. Ces deux systèmes possèdent un point commun : les « *arachidonic-related compound* », dont l'AM404, qui sont capables de moduler ces deux systèmes pour induire leur effet antalgique.

Maintenant que les acteurs (AM404, FAAH, CB1 et TRPV1) et la structure (PAG) au niveau supraspinal ont été identifiés, d'autres questions restent en suspens notamment quelle est la voie neuronale mise en jeu dans l'effet antalgique du paracétamol ? Les études précédentes semblent nous orienter vers les voies inhibitrices descendantes (notamment sérotoninergique) secondairement à l'implication de la PAG. Qu'en est-il réellement ?

E. Le système sérotoninergique

La première description de la contribution du système sérotoninergique descendant à l'action antalgique du paracétamol fut faite dès 1991²³⁵. Cette étude se base sur de précédents résultats ayant démontré que **plusieurs antalgiques**, comme l'aspirine²³⁶, **mettaient en jeu le système sérotoninergique descendant** pour induire leur **effet antalgique**. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que **l'inhibition des voies sérotoninergiques** soit par la 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)⁹⁵, soit par le p-chlorophénylalanine (PCPA)²³⁷ **abolissait l'effet antalgique du paracétamol**.

Ces études mettent en lumière l'implication d'une voie neuronale dans l'effet antalgique du paracétamol et appuient le fait que l'action du paracétamol est principalement voire exclusivement au niveau central.

Cette voie neuronale prend naissance au niveau des **noyaux de la Rostro Ventrale Medulla (RVM)**† pour venir faire **synapse au niveau médullaire** avec des neurones exprimant les **récepteurs à la 5-HT** afin de les activer ce qui, *in fine*, engendrerai le **processus antalgique**.

1. Voies sérotoninergiques descendantes et perception douloureuse

a. Les noyaux supraspinaux sérotoninergiques

Les structures nerveuses supraspinales sont nombreuses à recevoir des afférences sérotoninergiques. La zone du cerveau produisant la majorité de la 5-HT est la **RVM** qui contient à elle seule la moitié de toute la 5-HT cérébrale^{238,239}.

C'est en grande partie à partir de la RVM que des afférences nerveuses se projettent jusque dans la moelle épinière (ME), *via* le **faisceau dorsolatéral** (funiculus dorsolateralis), en majorité au niveau des neurones des **couches superficielles de la corne dorsale** (couches I et II)^{154,239-242} (Figure 8). Il existe également une source périphérique de 5-HT provenant des afférences nerveuses au sein de la ME même si celle-ci reste de faible proportion expliquant le fait que l'élimination de la 5-HT dans la ME après section de cette dernière ne soit pas totalement complète^{243,244}.

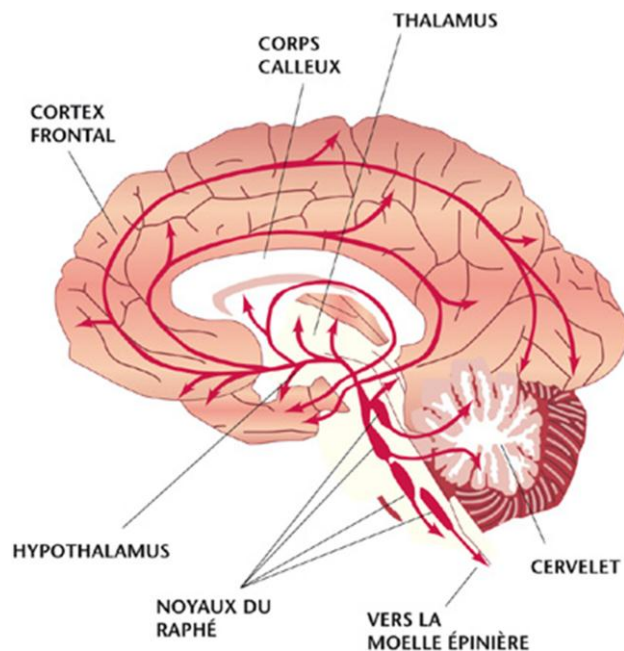


Figure 8: Voies sérotoninergiques. Les zones du cerveau innervées par les voies sérotoninergiques sont illustrées en rouge. Les noyaux du raphé (RVM) sont à l'origine des afférences sérotoninergiques

D'autres noyaux ont également été reliés au système sérotoninergique descendant, c'est le cas pour la **PAG**, noyau très connu pour son implication dans la nociception et principal **modulateur de la RVM**. L'hypothalamus, le noyau parabrachiale, le noyau du tractus solitaire et également le cortex participent à l'activation des voies sérotoninergiques descendantes *via* divers relais mettant en jeu la PAG et la RVM ou directement sur la ME. Il est aujourd'hui admis que le

† La RVM contient notamment les noyaux du raphé tels que le noyau raphé magnus, obscurus et pallidus.

funiculus dorsolateralis regroupe principalement les **voies inhibitrices descendantes** en provenance de ces différents noyaux²⁴⁵⁻²⁴⁷.

Dans la suite de ce chapitre, par souci de simplicité et de cohérence, nous ne nous pencherons que sur les deux noyaux principaux : la PAG et la RVM.

i. La substance grise périaqueducale -----

Reprenons le noyau source majoritaire de 5-HT : la **RVM**. Ce noyau est **sous le contrôle** d'un autre noyau : **la PAG**. Ces deux noyaux font partie intégrante d'une boucle spino-bulbo-spinale largement connue comme étant impliquée dans la **modulation de la nociception**^{248,249}. La communauté scientifique s'est intéressée à la **PAG** dès lors que Reynolds et coll.²⁵⁰ ont démontré qu'une **stimulation électrique** de cette zone chez un rat éveillé pouvait induire une **antalgie profonde**, résultat **reproduit chez le chat** une vingtaine d'années plus tard^{251,252}. Ces recherches ont été complétées par des études anatomiques, électrophysiologiques et pharmacologiques afin de mieux comprendre ces relations dans la physiologie de la nociception. Voici les résultats obtenus :

- La PAG envoie des **afférences dans la RVM**^{154,253,254},
- La stimulation électrique de la PAG induit un **effet antalgique**²⁵⁵⁻²⁵⁸,
- Une **lésion ou un blocage** pharmacologique de la **RVM abolit l'antalgie** produite par une stimulation de la **PAG**²⁵⁶⁻²⁶⁰,
- Une injection d'**opioïde dans la PAG** produit à la fois une **antalgie et une activation** des neurones de la **RVM**²⁶¹.

Il a été corrélé à ces études une **libération de la 5-HT au niveau médullaire** résultant de la stimulation électrique ou d'une microinjection de morphine dans la PAG^{262,263} expliquant l'effet antalgique observé. Il est à noter que celle-ci est inhibée par une administration intrathécale d'antagonistes des récepteurs de la 5-HT^{262,264-266} prouvant **l'implication spécifique de la 5-HT dans l'effet antalgique observé**.

Ces résultats ont permis d'établir que la PAG, via l'activation des voies sérotoninergiques descendantes, était impliquée dans la nociception et également reliée fonctionnellement avec la RVM qui est un véritable relais dans la modulation de la nociception. Voyons maintenant le rôle de cette fameuse RVM dans la nociception.

ii. La moelle rostroventrale-----

Comme vu précédemment, les neurones sérotoninergiques issus de la **RVM** participent activement à la **modulation de la transmission nociceptive médullaire**, notamment en inhibant l'activité des cellules neuronales de la corne dorsale de la ME^{154,249,254,255,267-273}. Ceci est confirmé par le fait que des administrations systémiques d'un agent « **déplétant** » la 5-HT ou intrathécales d'**antagonistes des récepteurs à la 5-HT empêchent cette modulation nociceptive médullaire**^{242,274-276}. De plus, la source majoritaire des afférences descendantes du faisceau dorsolatéral (voies inhibitrices descendantes) jusqu'à la ME sont des fibres issues de la RVM^{254,269}.

Néanmoins, les voies sérotoninergiques descendantes ne sont pas exclusivement inhibitrices, elles peuvent être également facilitatrices^{240,245,277-280}.

Différentes études ont permis de mettre en évidence que l'activation de la RVM par de **faibles stimulations** (électrique et pharmacologique) induisait une **facilitation** de la nociception au niveau médullaire, observation inverse lors de fortes doses^{245,281-283}. Il existe donc au sein de la RVM des unités cellulaires répondant spécifiquement et différenciellement aux stimulations, contribuant à la modulation bidirectionnelle de la transmission nociceptive spinale. Ces cellules neuronales ont été caractérisées^{254,284}:

- Les cellules **OFF** → activité constante et mise en pause lors d'une stimulation nociceptive;
- Les cellules **ON** → non actives à l'état basal et décharge par bouffée de potentiel d'action (PA) en réponse à une stimulation douloureuse;
- Les cellules **neutres** → aucun changement de leur activité quelle que soit la stimulation.

Ces cellules se projettent, dans leur totalité, au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (couches I, II et V)²⁸⁵. L'activité des **cellules OFF** a été corrélée à l'**inhibition des afférences nociceptives** et serait donc la génératrice de la **voie descendante inhibitrice**. A *contrario*, l'activité des **cellules ON** serait la responsable de la **voie facilitatrice**²⁸⁵⁻²⁸⁷. Suite à plusieurs autres études, il a été admis que l'activité de ces cellules, ainsi que leur boucle modulatrice spino-bulbo-spinale étaient fortement impliquées dans le développement et le maintien des symptômes d'hypersensibilité associés à la douleur^{254,280,288}. Il faut néanmoins ajouter un bémol à cette dualité qui ne semble pas si simple que cela et que quelques études remettent en cause²⁸⁹⁻²⁹¹.

Plusieurs études ont donc démontré que la 5-HT modulait la nociception à partir des deux

structures évoquées ci-dessus ; d'autres noyaux centraux (thalamus, cortex somatosensoriel, formation réticulée ou la substance noire)^{242,294-298} sont également impliqués. Mais que se passe-t-il au niveau médullaire ?

b. Impact médullaire des voies sérotoninergiques

Une chose est certaine à propos du système sérotoninergique médullaire, c'est que ce système est **très complexe** et qu'encore beaucoup de points d'interrogations persistent. Cette complexité s'explique par plusieurs points :

- Existence de **quatorze** sous-types de récepteurs à la 5-HT^{240,292-296} (Tableau 1),
- **Expression différente** selon le type de neurone (GABAergique, glutamatergique...), localisation pré ou post-synaptique.
- **Fonctions différentes**[§] selon le type de récepteur à la 5-HT (activateur, inhibiteur) et de la stimulation douloureuse^{90,240,297}.

Tableau 1: Tableau récapitulatif des fonctions des récepteurs 5-HT

Récepteur	Couplage	Transduction	Localisation globale	Localisation spinale	Population neuronale	Excitabilité neuronale	Influence dans la nociception spinale
5-HT _{1A}	G _i /G ₀	↓AMPc ; ↑K ⁺ ; ↓Ca ²⁺	Principalement dans le SNC	I-II, V-VI, X	NP, ININ (GABA, ENK), FAP (?), autorécepteurs	↓	PRO : ININ ANTI : NP
5-HT _{1B}	G _i /G ₀	↓AMPc ; ↑K ⁺	SNC et nerfs périphériques	I-II, IV	NP, FAP (SP, CGRP), ININ (?) autorécepteurs	↓	PRO : ININ (?) ANTI : NP, FAP
5-HT _{1D}	G _i /G ₀	↓AMPc ; ↑K ⁺	Principalement dans le SNC	I, IV, X	FAP (SP, CGRP), neurones intrinsèques (couche X au niveau cervical)	↓	ANTI (?)
5-HT _{1E}	G _i /G ₀	↓AMPc ; ↑K ⁺	Uniquement dans le SNC				
5-HT _{1F}	G _i /G ₀	↓AMPc	Principalement dans le SNC	Corne dorsale	FAP	↓	ANTI
5-HT _{2A}	G _q /G ₁₁	↑PLC ; ↓K ⁺	Muscle lisse vasculaire, SNC, plaquettes pulmonaires, tractus gastro-intestinal	Corne dorsale	FAP, NP, INI (GABA, Gly)	↑	PRO : NP, FAP ANTI : ININ
5-HT _{2B}	G _q /G ₁₁	↑PLC ; ↓K ⁺	Fundus du rat, SNC	Corne dorsale	FAP, neurones intrinsèques	↑	
5-HT _{2C}	G _q /G ₁₁	↑PLC ; ↓K ⁺	SNC (forte concentration dans le plexus choroïdien)	I-II, V-VI, X	NP, FAP, ININ (?)	↑	PRO : NP, FAP ANTI : ININ (?)
5-HT ₃		↑PLC ; ↓K ⁺ ; ↑Na ⁺	Neurones périphériques et centraux	I-II, V-VI	FAP (SP), ININ (GABA, ENK), NP (?), EXIN (?)	↑	PRO : FAP ANTI : ININ
5-HT ₄	G _s	↑AMPc ; ↓K ⁺	Tractus gastro-intestinal, SNC, cœur, vessie	I-II	FAP, neurones intrinsèques	↑	PRO : PAF, NP (?)
5-HT _{5A} *	G _i /G ₀ (?)	↓AMPc ; K ⁺	SNC	I-II, III-VI, X	FAP, neurones intrinsèques	↓	?
5-HT _{5B} *	?	?	SNC	-	-		?
5-HT ₆	G _s	↑AMPc ; ↓K ⁺	SNC	Corne dorsale	FAP (?), neurones intrinsèques	↑	PRO
5-HT ₇	G _s	↑AMPc ; ↓K ⁺	SNC	I-II	FAP	↑	

D'après Barnes et Sharp, 1999; Doly et coll., 2004; Millan 2002; Mogil et Grisel, 1998.

AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ANTI : antinociceptif ; Ca²⁺ : canaux calciques ; EXIN : interneurons excitateurs ; FAP : fibres afférentes primaires ; ININ : interneurons inhibiteurs ; K⁺ : canaux potassiques ; NP : neurones de projection ; PLC : phospholipase C ; PRO : pronociceptif ; SNC : système nerveux central. * L'existence des récepteurs 5-HT_{5A} reste putative d'où la nomenclature particulière.

§ 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} et 5-HT₃ seraient impliqués pour des stimulations mécaniques, alors que les 5-HT_{1A} seraient impliqués pour des stimulations thermiques.

Plusieurs études ont montré que l'injection de 5-HT par voie intrathécale induisait un effet antalgique dans divers tests nociceptifs (*tail-flick*, pression de la patte...) chez le rat et la souris²⁹⁸⁻³⁰¹. D'autres études révèlent que les sous-types 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} et 5-HT₃ sont les plus abondants au niveau médullaire^{302,303}. Ceci laisse penser que l'effet antinociceptif de la 5-HT injectée par voie i.t. passerait par ces différents sous-types mais malheureusement, les **études et conclusions restent limitées du fait du manque d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques**. Voir résumé Figure 9.

Comment s'intègre cette voie neuronale dans l'effet antalgique du paracétamol ?

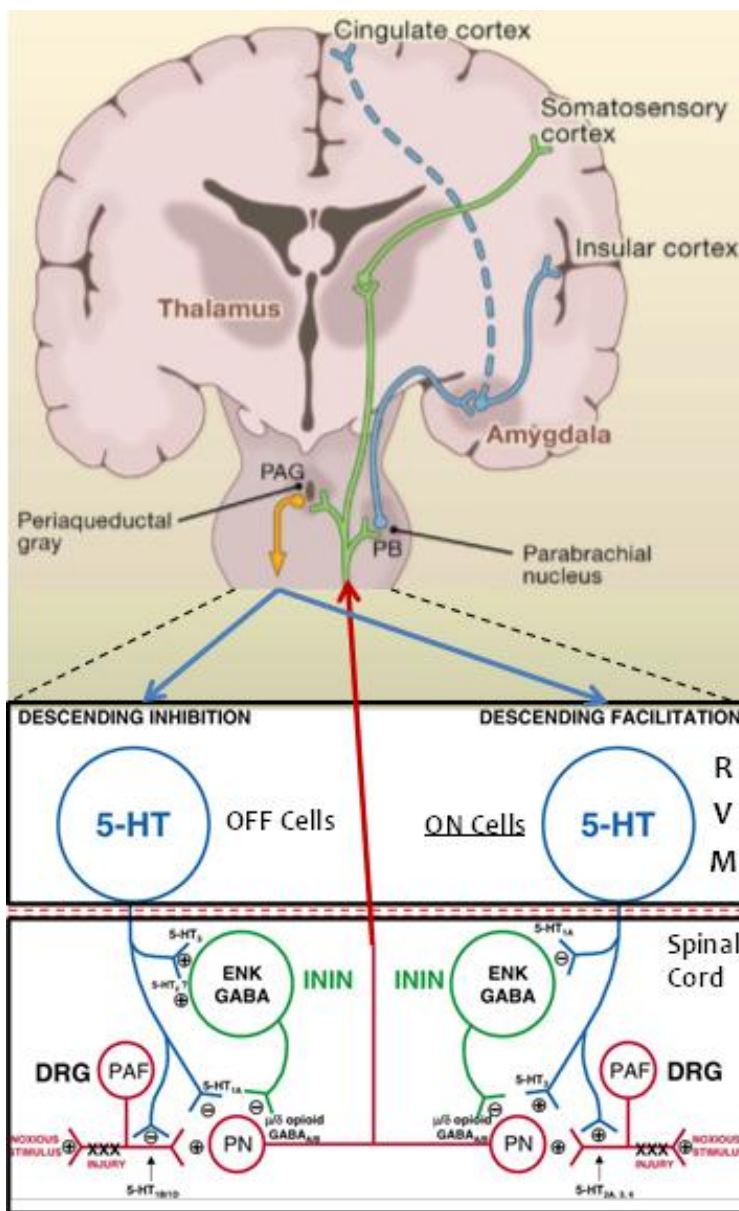


Figure 9: Voies sérotoninergiques descendantes. Représentation schématique de la régulation des voies sérotoninergiques descendantes et leur influence sur la modulation de la nociception spinale. **DRG** : ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière ; **ININ** : interneurons inhibiteurs ; **PAF** : fibres afférentes primaires ; **PN** : neurones de projection ; **RVM** : rostroventral medulla. Modifié d'après Millan 2002 et Basbaum 2009.

2. Voies sérotoninergiques et paracétamol

Notre unité de recherche s'est largement penchée sur l'implication de cette voie neuronale dans l'effet antalgique du paracétamol, dans le but d'en démêler les différents acteurs et les mécanismes sous-jacents. Suite à de nombreuses publications, nous avons largement contribué à démontrer et confirmer **l'implication des récepteurs sérotoninergiques spinaux**, cible finale de la voie sérotoninergique descendante, dans **l'effet du paracétamol**. En effet, **l'inhibition des récepteurs de la 5-HT** par administration intrathécale d'antagonistes, **réduit l'effet antalgique du paracétamol** dans le cas de stimulus mécanique ou chimique et ceci de manière différentielle en fonction du sous-type de récepteur bloqué^{90,99,135,136,300,304}. Au vu de ces études, il apparaît que l'effet antalgique du paracétamol impliquerait bien spécifiquement les **voies sérotoninergiques descendantes**.

De plus, notre équipe a démontré l'implication du système sérotoninergique **chez l'Homme**. En effet, l'administration **d'antagonistes des récepteurs 5-HT** (tropisétron, 5 mg, i.v. et granisétron, 3 mg, i.v.), chez des volontaires sains exposés à une douleur induite par stimulation électrique, **supprime l'effet antalgique du paracétamol** (1 mg, p.o.)^{96,97}. Néanmoins ces derniers **résultats sont à confirmer** car une étude récente **n'a pas montré d'effet inhibiteur du tropisétron** sur l'effet antalgique du paracétamol³⁰⁵.

La théorie d'une **action directe du paracétamol** sur les récepteurs à la 5-HT a été **vite balayée** par deux études^{306,307}. De ce fait, un mécanisme sérotoninergique par **mobilisation de la 5-HT** a été postulé. Ceci fut confirmé au niveau supraspinal par **l'observation d'une augmentation** dose-dépendante de la **concentration cérébrale en 5-HT** dans le cortex, l'hypothalamus, le striatum, l'hippocampe et le tronc cérébral après **administration systémique de paracétamol**^{83,237,308,309}.

Les mêmes antagonistes des récepteurs à la 5-HT inhibent l'effet antalgique de la 5-HT et du paracétamol. Cet argument supplémentaire conforte l'hypothèse d'un **renforcement de la voie sérotoninergique descendante** par le paracétamol, aboutissant à la production médullaire de 5-HT pouvant expliquer son effet antalgique.

La compréhension encore partielle de l'effet du paracétamol sur le système sérotoninergique justifie cependant de plus amples études concernant la nature même de cette relation notamment au niveau spinal. En effet, notre équipe a montré que, malgré une inhibition de l'effet du paracétamol par le tropisétron, des oligonucléotides antisens contre les récepteurs 5-

HT3 ne modifiaient pas cet effet¹³⁵. Ainsi ces récepteurs semblent exclus au profit d'un récepteur tropisétron sensible qui reste à identifier.

Enfin, suite à nos recherches ayant mis en évidence l'implication du système sérotoninergique, Mallet et coll.¹³¹ se sont également attelés à découvrir son lien avec le système cannabinoïde. Lien qui est sans nul doute existant vu que l'inhibition d'un seul de ces systèmes inhibe totalement l'effet antalgique du paracétamol. Pour cela, l'effet antalgique induit par l'**ACEA** (agoniste CB1) fut testé chez des animaux dont les voies descendantes sérotoninergiques étaient détruites (**5,7-DHT**) ou ayant leurs récepteurs 5-HT1A et tropisétron sensibles spinaux bloqués par respectivement le **WAY100635** et le **tropisétron**. L'**ACEA** perd son effet antalgique dans ces différentes conditions mettant en lumière pour la première fois l'implication des voies descendantes sérotoninergiques dans l'effet antalgique « médié » par le système cannabinoïde¹³¹. Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour évaluer le lien avec le système vanilloïde.

3. Résumé (Figure 10)

En résumé de ce chapitre, nous suggérons que le mécanisme d'action du paracétamol au niveau central puisse être le suivant :

- 1) **Nouvelle voie métabolique** du paracétamol donnant naissance au **p-aminophénol**, composé apte à traverser la BHE.
- 2) Ce **p-aminophénol** est spécifiquement transformé en **AM404** grâce à la **FAAH** réalisant l'association du **p-aminophénol** avec l'acide arachidonique. Ceci est restreint à quelques **régions cérébrales** exprimant la FAAH (p.ex. PAG).
- 3) L'**AM404**, un « *arachidonic-related compound* » proche de l'anandamide, **activerait** le récepteur **TRPV1**, qui agit conjointement avec le **récepteur CB1** afin d'activer la **PAG** aboutissant ainsi à l'augmentation de l'activité des cellules OFF de la RVM initiant ainsi **l'activation des voies inhibitrices descendantes**.
- 4) L'activation des **voies inhibitrices descendantes** recruterait spécifiquement les faisceaux sérotoninergiques descendants qui, au **niveau médullaire**, activeraient les **récepteurs sérotoninergiques** capables d'induire une antalgie soit par le biais d'une activation des interneurons inhibiteurs, soit par l'inhibition de l'activité des interneurons excitateurs, des neurones de projection ou bien des fibres afférentes primaires.

Cette hypothèse, qui impose la nécessaire présence conjointe des trois protagonistes **CB1/TRPV1/FAAH** dans des **régions cérébrales** par ailleurs impliquées dans la modulation de la douleur est telle que peu de régions semblent susceptibles d'être impliquées. Parmi ces structures, la **PAG**, au regard de l'expression de ces trois protagonistes, de son rôle dans les processus intégratifs de la nociception et enfin par ses connexions avec les voies inhibitrices descendantes semble être la plaque tournante dans l'effet central du paracétamol. Ce qui est confirmé actuellement au sein du laboratoire.

Il est à noter que très récemment, trois études ont démontré respectivement l'implication des récepteurs spinaux **TRPA1**¹⁰¹ et **adénosine A1**^{98,102}. Cela montre que les mécanismes spinaux mis en jeu dans l'effet antalgique du paracétamol **restent encore à être élucidés**.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que l'AM404 est le fer de lance de l'effet antalgique du paracétamol, du fait de son implication dans tous les systèmes biologiques impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol cités précédemment. L'effet de cet AM404 passerait par l'augmentation du tonus endocannabinoïde / vanilloïde (lipoaminoacides) au niveau du cerveau. Le prochain chapitre s'étendra plus largement sur les rôles de cette famille de molécules dans la nociception et l'activation des systèmes cannabinoïde et vanilloïde.

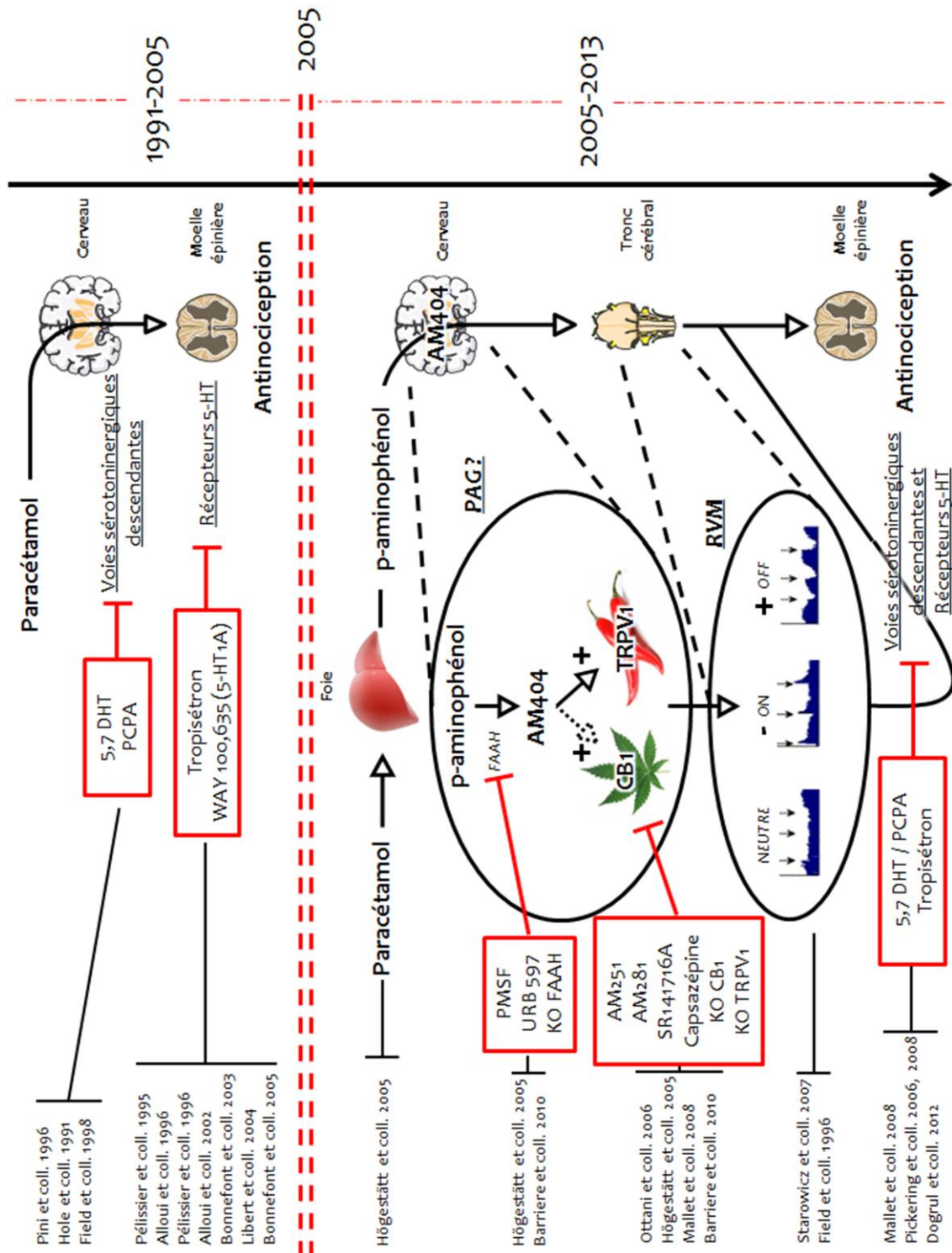


Figure 10 : Historique des découvertes et hypothèses sur l'effet du paracétamol.

INTRODUCTION GENERALE

« *ARACHIDONIC-RELATED COMPOUNDS* » :

NOUVELLE CLASSE DE MEDIATEURS
LIPIDIQUES

III. « ARACHIDONIC-RELATED COMPOUNDS » : NOUVELLE CLASSE DE MEDIATEURS LIPIDIQUES

Comme présenté dans le chapitre précédent, l'AM404, un « *arachidonic-related compounds* », comme l'est l'anandamide, est la plaque tournante commune à tous les systèmes biologiques impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol. Cette classe de **médiateurs lipidiques**, dont font partie les **endocannabinoïdes**, a été décrite, dans les années 1990, comme présentant un effet antinociceptif. Une multitude d'études sur ces composés lipidiques et leur rôle dans la nociception a ouvert de **nouvelles perspectives pharmacologiques** dans le traitement de la douleur.

Dans cette partie, nous ne nous intéresserons qu'aux membres majeurs de la famille des « arachidonic-related compounds » endogènes : les endocannabinoïdes.

L'existence dans l'organisme, notamment au niveau du système nerveux central, des récepteurs cannabinoïdes et vanilloïdes laissent supposer l'implication de **ligands endogènes** dans leur modulation. C'est dans ce cadre que le membre majeur de la famille des endocannabinoïdes fut découvert et appelé *N*-arachidonoyl-éthanolamide (**anandamide**)^{204,232}. D'autres membres ont par la suite été découverts dont les principaux sont le 2-arachidonoyl-glycérol (**2-AG**), le *N*-arachidonoyl-dopamine (**NADA**) et le *N*-arachidonoyl-glycine (**NAGly**)^{206,310,311}. Ces différents lipides bioactifs interagissent avec beaucoup de cibles mais principalement avec des récepteurs aux protéines G comme les récepteurs **CB1** / **z**^{204,311} et des canaux ioniques comme le **TRPV1**^{141,205,312}. Les endocannabinoïdes anandamide et 2-AG ont été retrouvés avec des taux élevés dans l'ensemble du **SNC** (du pmol au µmol/g de tissus selon les régions)^{313,314}, ceci sans corrélation avec la présence ou non des récepteurs CB.

L'existence de ce système endocannabinoïdérique au sein du SNC ainsi que les effets centraux déjà connus des exocannabinoïdes (comme le THC), suggèrent que ce système jouerait un rôle important dans la modulation de la nociception. Qu'en est-il réellement ?

Dans les parties qui suivront, il ne sera détaillé, par souci de simplicité, que les deux membres majeurs des endocannabinoïdes, l'anandamide et le 2-AG représentatifs de cette famille lipidique.

A. Anabolisme des endocannabinoïdes

1. L'anandamide

Initialement, des travaux ont suggéré l'implication de la **FAAH** dans la formation de l'anandamide par association **d'acide arachidonique et d'éthanolamine**³¹⁵, mais les concentrations cellulaires de ces deux acteurs sont trop faibles pour permettre à la FAAH cette transformation. Ainsi, cette enzyme n'est **probablement pas impliquée** dans le rôle de la synthèse physiologique de l'anandamide.

Actuellement, la formation de l'anandamide ne dépend pas que d'une seule voie métabolique. **Trois voies** peuvent être mises en jeu, indépendantes les unes des autres et compensatrices en cas de déficit d'une des voies. La voie métabolique majoritaire propose que l'anandamide soit synthétisée à partir d'un **précurseur lipidique** identique dans les différentes voies, appelé *N*-arachidonoylphosphatidyléthanolamine (**NArPE**) issu de l'association entre l'acide arachidonique et le diacylglycérol. Suite à cela, le NArPE sera **pris en charge par différentes enzymes** constituant ces différentes voies, qui sont la *N*-acyl phosphatidyléthanolamine-spécifique phospholipase D (**NArPE-PLD**), l' α,β -hydrolase 4 (**ABHD4**), la glycérophospho-diestérase 1 (**GDE1**), la protéine tyrosine phosphatase N22 (**PTPN22**), et la lysophospholipase-D (**lysoPLD**)^{316,317}, aboutissant à la formation d'anandamide et ceci de manière calcium dépendante³¹⁷⁻³¹⁹.

2. Le 2-AG

En ce qui concerne le 2-AG, son anabolisme est moins complexe que celui de l'anandamide. Il fait intervenir **une voie majoritaire** débutant par le **clivage** des **phospholipides** membranaires par la phospholipase C β (PLC β) formant le 1-acyl-2-arachidonoylglycérol (**AARG**). L'AARG est ensuite pris en charge par les deux isoformes α et β de la diacylglycérol lipase (**DAGL α et β**) pour être **hydrolysé** et former le 2-AG^{316,317}. Ces données sont appuyées par le fait que l'**invalidation** du gène de la **DAGL α ou β** induit une **perte de la formation de 2-AG** à hauteur de 80% et 30% respectivement dans le cerveau^{232,320}.

B. Catabolisme des endocannabinoïdes

1. L'anandamide

Suite à sa libération dans la synapse et ses actions sur ses récepteurs, l'anandamide est rapidement pris en charge par son **transporteur membranaire** (Anandamide Membrane Transporter, AMT), situé en **post-synaptique**, pour faciliter sa diffusion membranaire et sa dégradation cytosolique.

a. Anandamide Membrane Transporter (AMT)

Ce transporteur membranaire reste encore **controversé** du fait des propriétés physicochimiques de l'anandamide communes à tous lipides qui lui permettent de traverser les membranes plasmiques avec une grande facilité. Deux autres hypothèses ont vu le jour : une diffusion passive de l'anandamide ou l'implication de la FAAH dans ce transport³²¹⁻³²⁴. Malgré tout, plusieurs études tendent à démontrer qu'il existerait bien un **transporteur spécifique**^{317,325-330}. La dernière étude en date à ce sujet vient lever le voile sur ce transporteur membranaire, il serait un variant d'épissage de la FAAH (FAAH-1) qui permet le transport actif de l'anandamide de la synapse vers la cellule postsynaptique³³¹. Enfin dès 1997, l'**AM404** a été démontré comme capable d'**inhiber** spécifiquement le transport d'anandamide, décrit aujourd'hui comme étant une isoforme de la FAAH^{208,215,332,333}.

Ainsi, bien que les caractéristiques physico-chimiques de cet AMT restent encore à être confirmées, le variant d'épissage de la FAAH semble lui correspondre. Nous verrons plus tard que le paracétamol semble être un inhibiteur indirect de la FAAH, via l'AM404, participant à l'augmentation du tonus endocannabinoïdérique central dans son effet antalgique.

b. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)

Dès que l'anandamide est libérée dans le cytoplasme cellulaire, l'enzyme **FAAH** entre en jeu pour la **dégrader**. La FAAH se localise au niveau des membranes microsomiales et

mitochondriales sous forme de dimères. Son **expression** dans l'organisme reste **très large** du fait de sa participation dans de nombreux processus biologiques : cirrhotiques³³⁴, capacitation testiculaire³³⁵, modulation du transit³³⁶ et de la transmission nociceptive^{337,338}. Au sein du système nerveux, la FAAH possède une expression majoritaire dans les **cellules neuronales** avec une étroite colocalisation avec les récepteurs CB1 que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme^{339,340}. Cette enzyme fait partie de la famille des **sérines hydrolases** avec l'unique particularité, au sein de cette famille, de posséder une triade catalytique Sérine-Sérine-Lysine qui a permis la synthèse d'inhibiteurs comme l'URB597 (pour revue³⁴¹).

Les rôles biologiques de la FAAH ont tout d'abord été étudiés par l'utilisation de souris *knock-out* pour le gène codant la FAAH. Ces souris *faah*^{-/-} présentent une **dégradation des endocannabinoïdes** jusqu'à **100 fois moins importante**, ceci accompagné d'une augmentation du taux d'endocannabinoïde cérébral (10 fois plus) en comparaison à des souris sauvages, confirmant ainsi le rôle prépondérant de cette enzyme dans le catabolisme des endocannabinoïdes. D'un point de vue comportemental, les souris *faah*^{-/-} réagissent plus fortement aux effets hypothermisants et pro-cataleptiques d'une injection d'anandamide (50 mg/kg, i.p.). Elles présentent également un phénotype **d'hyposensibilité à la douleur** dans différents tests de douleur aiguë (thermique et chimique) et chronique (neuropathique et inflammatoire)^{342,343}. En condition inflammatoire (modèle à la carragénine), les souris *faah*^{-/-} présentent un **développement œdémateux diminué**, ce qui laisse supposer un rôle également pro-inflammatoire périphérique de cette enzyme³⁴³. Pour répondre à cette question, des souris *knock-out* FAAH spécifiquement à la périphérie ont été générées. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que la **FAAH centrale** serait impliquée dans les processus de modulation de la **douleur**, ceci dépendant du récepteur CB1. De plus, la **FAAH périphérique** participerait aux **phénomènes inflammatoires** indépendamment cette fois des récepteurs aux cannabinoïdes^{344,345}. Suite à ces résultats, plusieurs **inhibiteurs de la FAAH (URB-)** ont vu le jour avec pour but final le **traitement de la douleur aiguë et chronique**. L'année dernière, seul le **PF-04457845** fut testé en essai clinique de **phase 2** chez des patients souffrants de douleur arthrosique au genou et malheureusement l'étude fut arrêtée lors de l'analyse intermédiaire qui n'a montré **aucune amélioration de la douleur** (score WOMAC) en comparaison au placebo³⁴⁶. Actuellement, aucune étude clinique n'étudie l'impact sur la douleur d'inhibiteur de la FAAH qui ont pourtant l'avantage de ne pas induire les effets indésirables classiquement observés lors de l'administration d'agonistes CB1, comme l'hypolocomotion ou l'augmentation de l'appétit^{344,347}.

2. Le 2-arachidonoylglycérol

La monoacylglycérol lipase (**MAGL**) est l'enzyme principale participant à la **dégradation du 2-AG**, bien que la FAAH semble y participer en moindre mesure³⁴⁸. Comme la FAAH, la MAGL est une **sérine hydrolase**, exprimée de manière hétérogène dans le cerveau au niveau des **terminaisons axonales**³⁴⁹. Actuellement, le développement d'**inhibiteurs spécifiques** de la MAGL comme le **JZL184** a permis de mettre en évidence que le blocage de cette enzyme **diminue les symptômes d'hypersensibilité au chaud et au froid** dans le modèle de *Chronic Constriction Injury* (CCI), corrélé avec l'augmentation des taux de 2-AG cérébraux^{350,351}.

Quels sont les récepteurs membranaires de ces lipides endogènes nécessaires à leurs actions biologiques ? (Pour résumé voir figure 11)

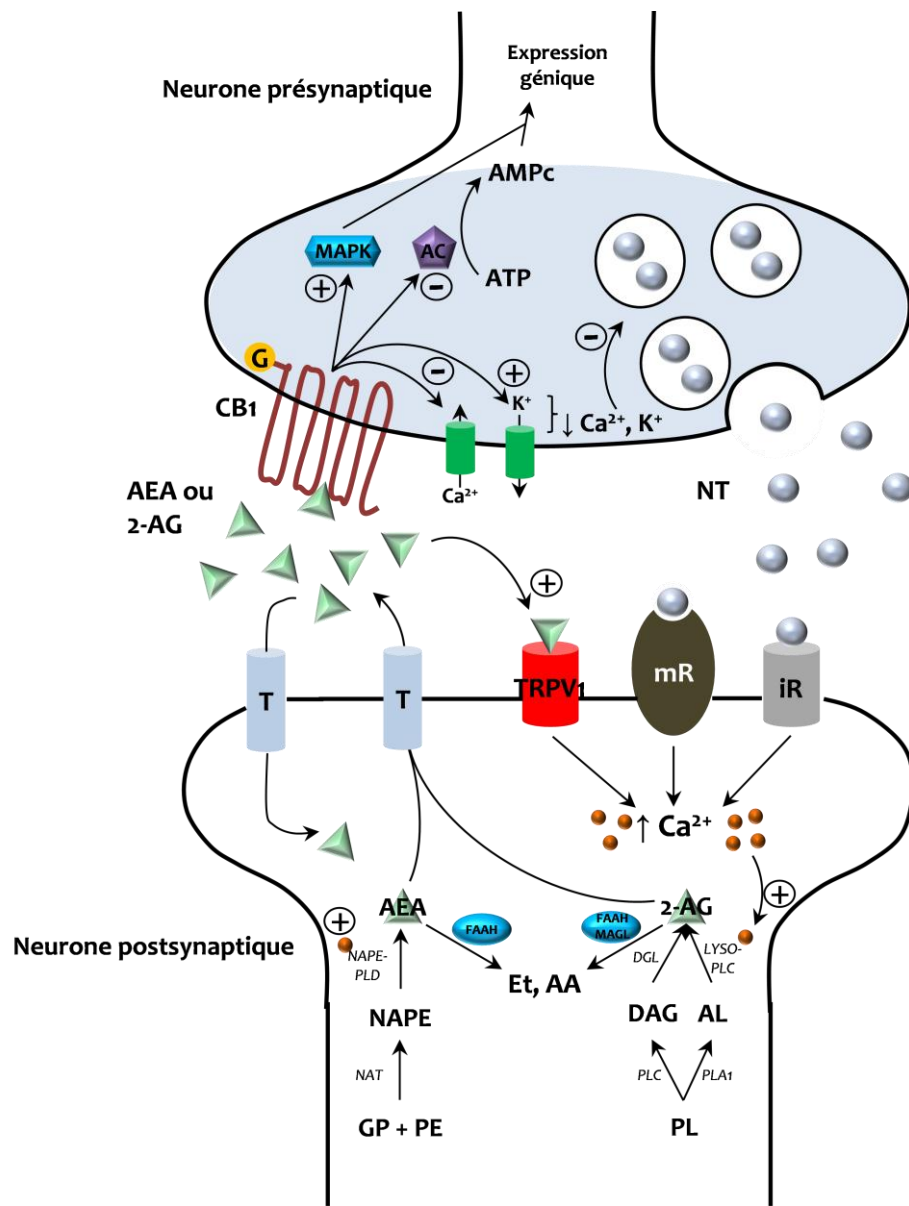


Figure 11 : Métabolisme et transduction du signal de l'anandamide et du 2-AG. 2-AG : 2-Arachidonoylglycérol ; AA : Acide Arachidonique ; AC : Adénylate Cyclase ; AL : 2-arachidonoyl-lysophospholipide ; AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique ; ATP : Adénosine triphosphate ; CB1 : récepteur cannaïboïde 1 ; DAG : 1,2 Diacylglycérol ; DGL : diacylglycerol lipase ; EA : Ethanol Amine ; Et : ethanol ; FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase ; G : protéines Gi/Go ; GP : Glycéro-Phospholipide ; iR : récepteur ionique ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases ; MGL : Monoglycéride Lipase ; mR : récepteur métabotrope ; NAPE : N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine ; NAPE-PLD : NAPE Phospholypase D ; NAT : N-acétyltransférase ; PL : Phospholipide ; PLA1 : Phospholipase A1 ; PLC : Phospholipase C ; T : Transporteur Membranaire ; TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloïd-1. Modifié d'après Guzmán et coll. 2003 et Di Marzo et coll. 2004.

C. Récepteurs aux lipoaminoacides et fonctions biologiques

Les lipoaminoacides et leurs récepteurs associés sont très anciens et très conservés à travers les espèces, traduisant leur importance pour l'organisme³⁵². Chez les mammifères, il existe plusieurs récepteurs aux lipoaminoacides :

- Cannabinoïdérique : **CB1** et CB2³⁵³.
- Récepteurs TRPs : **TRPV1**, TRPA1 et TRPV4³⁵⁴⁻³⁵⁷
- Autres : récepteurs nucléaires PPAR γ et α , récepteur orphelin GPR55³⁵⁸⁻³⁶⁰.

Dans le cadre de cette thèse nous ne nous focaliserons que sur les récepteurs impliqués dans l'action du paracétamol : CB1 et TRPV1.

1. Récepteurs aux cannabinoïdes

a. Distribution

Le récepteur **CB1** est très largement exprimé dans le **SNC** au niveau des terminaisons **pré-synaptiques** du cortex, de certains noyaux de la base, du thalamus, de l'hippocampe, du septum, de l'amygdale, du cervelet ainsi qu'au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, des ganglions de la racine dorsale et des terminaisons des afférences primaires^{213,361-369}. Cette expression quasi ubiquitaire dans le SNC montre l'importance majeure de ce système neurochimique dont la signification fonctionnelle n'a été explorée que très récemment. Toutefois, le récepteur CB1 possède une **faible expression périphérique** dans divers tissus³⁷⁰⁻³⁷⁵.

b. Ligands

Plusieurs membres de la famille des lipoaminoacides sont capables d'interagir avec les récepteurs CB1, parmi ceux-ci il y a :

- Les **cannabinoïdes**, principaux ligands exogènes issus de la plante *cannabis sativa*^{212,376},
- Les **cannabinoïdes « modifiés » ou non classiques** issus de l'industrie pharmaceutique^{377,378},
- Les **aminoalkylindoles**³⁷⁹,

- Les cannabinoïdes endogènes ou **endocannabinoïdes**,
- Divers **antagonistes synthétiques**³⁸⁰⁻³⁸².

c. Mécanismes de signalisation intracellulaire

De par leur localisation pré-synaptique, les récepteurs CB1, *via* les cannabinoïdes, joueraient un rôle dans la modulation de la **libération des neurotransmetteurs** des terminaisons axonales. Cette hypothèse a été confirmée par un grand nombre de données expérimentales, qui montrent par exemple que la **Δ9-THC inhibe la libération d'acétylcholine** suite à la stimulation électrique de l'iléon ou encore des neurones du SNC (*Pour revue*³⁸³). Leur activation entraîne plusieurs actions intracellulaires :

- **Inhibition des canaux calciques** de type L, N, P/Q³⁸⁴⁻³⁸⁶.
- **Activation de certains canaux potassiques**^{384,387}.
- **Activation** de plusieurs isoformes des *Mitogen- Activated Protein Kinases (MAPK)* telles que ERK1 et ERK2, p38, phosphatidylinositol-3-kinase et JNK³⁸⁸⁻³⁹³.

Ces effets se produisent *via* **l'activation de la protéine Gi/Go**^{394,395} mais également *via* une voie indépendante de la protéine Gi/Go faisant intervenir des protéines adaptatrices³⁹⁶.

d. Effets pharmacologiques

Chez l'animal, les cannabinoïdes induisent une "**tétrade**" d'effets pharmacologiques caractéristiques^{397,398} utilisée pour le criblage des cannabinoïdes. La tétrade se compose de :

- **Hypothermie** : les cannabinoïdes agissent sur la température corporelle en induisant une **hypothermie**, effet surtout étudié chez l'animal³⁹⁹⁻⁴⁰²
- **Sédation et Catalepsie** : la sédation, chez l'animal, s'évalue en majorité par l'étude de la locomotion. Les effets des cannabinoïdes, chez l'animal, sur la locomotion sont biphasiques. En effet, de **faibles doses** de cannabinoïdes induisent une **hyperlocomotion**^{403,404} alors qu'à contrario de **fortes doses** provoquent une **hypolocomotion**, pouvant aller jusqu'à induire une **catalepsie**^{403,405}.
- **Antinociception** : les effets des agonistes CB1, en termes d'antalgie sont connus depuis plus d'un millénaire grâce à l'utilisation du **cannabis**. Malgré tout, cela ne fait qu'un peu plus d'une dizaine

d'années que le circuit neuronal mis en jeu fut découvert. L'utilisation d'un agoniste des récepteurs CB₁ (le **WIN55,212-2**) a permis cette découverte suite à l'observation de l'abolition de la réponse des cellules ON et le maintien de la fréquence de dépolarisation des cellules OFF de la RVM faisant suite à son administration. Ceci aboutissant à **l'activation de la RVM** et donc aux **voies inhibitrices descendantes** bloquant l'influx nociceptif au niveau médullaire, effet similaire à celui de la morphine²⁴⁰.

D'autres expériences se sont intéressées aux rôles des endocannabinoïdes dans une autre zone supraspinale importante dans la nociception : la **PAG**. Ces études ont montré que **l'anandamide**, de manière CB₁ dépendante, **inhibait** dans cette zone les **influx nociceptifs** et que lors d'une activation de la PAG par électrostimulation ou d'une **stimulation douloureuse** périphérique, une **accumulation d'anandamide** était observée dans la PAG²³¹. L'implication des endocannabinoïdes et du récepteur CB₁ a été également mise en évidence dans le cas de l'antalgie induite par le stress. En effet, il est connu que le stress induit un effet antalgique chez l'animal, effet qui n'est pas retrouvé lors du blocage des récepteurs CB₁ par le SR141716A dans la PAG ou effet potentialisé lors de l'augmentation du tonus endocannabinoïdérique par des inhibiteurs de la MAGL (URB602) ou de la FAAH (URB597)³⁴⁹.

e. Aspects cliniques

Suite à ces observations précliniques, de nombreuses études se sont intéressées au **potentiel thérapeutique** de l'utilisation des **cannabinoïdes** et **d'inhibiteurs de la FAAH** dans la prise en charge de la douleur.

Cela fait de nombreuses décennies que le **cannabis** est connu pour ses **vertus thérapeutiques**. De nombreux articles sur différentes espèces de cannabis sont publiés en Europe et en Amérique du Nord pendant la seconde moitié du XIXe siècle. L'usage thérapeutique du cannabis et du hashish est **courant aux États-Unis** jusque dans les **années 1930**, et fait son apparition dans la pharmacopée américaine officielle en 1851. Il est prescrit généralement comme **un antalgique, un sédatif, un antispasmodique ou un antiémétique**. Au **XXIe siècle**, dans les pays où il est autorisé, le **cannabis médical** est employé dans une très **grande variété de maladies et de pathologies**, incluant nausées et vomissements, anorexie et cachexie, spasmes, troubles du mouvement, douleurs, glaucome, diarrhées, épilepsie, asthme, dépendance et état de manque, symptômes psychiatriques, maladies auto-immunes et inflammations et insomnies. Le cannabis existe sous plusieurs formes médicales, dont la disponibilité dépend de la législation du pays où il est autorisé. Il peut aussi être **prescrit à l'état naturel** afin d'être consommé **fumé**, ou par

inhalation de vapeur de THC (tétrahydrocannabinol) sublimé, et là encore sa prescription la plus courante reste relative aux **malades en phase terminale**. En **France**, l'utilisation de médication à base de cannabis reste **illégal** mais une **ATU** (Autorisation Temporaire d'Utilisation) a été accordée par l'ANSM pour le **Dronabinol®** ou **Marinol®** (delta-9-tétrahydrocannabinol synthétique) délivrés dans les indications suivantes : douleurs résistantes aux traitements standards (41 cas) ; affections inflammatoires du système nerveux (12 cas) ; maladie d'*Unverricht-lundborg* (8 cas) ; appétit / nausées (7 cas) ; syndrome de Tourette (3 cas) ; dystonie résistante aux traitements standards (8 cas) ; douleurs paroxystiques (1 cas).

Depuis 2001, toutes les ATU demandées pour le **Sativex®** (8 cas) ont été **refusées**. En **juin 2013** est publié au Journal officiel un décret permettant à l'ANSM de délivrer éventuellement des **AMM pour des médicaments contenant du cannabis ou ses dérivés** (Décret no 2013-473 du 5 juin 2013).

De nombreuses études ont confirmé cet **effet antalgique** dans divers types de douleur⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁹. En effet, différentes médications à base de cannabis (dronabinol®, nabilone®, extrait de cannabis, cigarette au cannabis, Sativex®) ont été montrées comme bénéfiques dans les douleurs **migraineuses**⁴¹⁰, **cancéreuses**⁴¹¹⁻⁴¹⁴, **neuropathiques périphériques**⁴¹⁵⁻⁴¹⁸ et **centrales**⁴¹⁹⁻⁴²², **rhumatismales**^{423,424} et **fibromyalgiques**⁴²⁵. De nombreuses études cliniques, menées par les laboratoires GlaxoSmithKline sont actuellement en cours pour valider l'utilisation du cannabis dans différents contextes douloureux. A noter que plusieurs études cliniques étudient actuellement l'effet antalgique d'un agoniste synthétique CB2 (le **GW842166**) dans les douleurs inflammatoires et arthrosiques (source : www.clinicaltrials.gov). Malgré une étude précédente non concluante, du même laboratoire, sur les douleurs aiguës⁴²⁶.

Dans la continuité de ces études, l'utilisation d'un **antagoniste de la FAAH** (le PF-04457845) a été étudiée dans deux études cliniques menées par les laboratoires **Pfizer**, évaluant son effet antalgique sur la douleur **aiguë et arthrosique**. Les résultats sont malheureusement non concluants³⁴⁶.

Voyons maintenant l'implication des récepteurs aux vanilloïdes dans les effets des lipoaminoacides.

2. Récepteurs aux vanilloïdes

a. Généralités

Dans la famille des canaux TRPs, il existe six sous familles : les TRPC (Canonical), **TRPV (Vanilloïd)**, TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin) et TRPA (Ankyrin). Chaque sous-famille est composée de plusieurs membres qui s'organisent en tétramères pour être fonctionnels soit sous forme homotétramérique soit sous forme hétérotétramérique. Ce sont tous des canaux perméables aux cations, dont le domaine pore est situé entre le cinquième et le sixième domaine transmembranaire. Contrairement à d'autres familles de récepteurs, l'homologie de séquence entre les récepteurs TRPs est très faible expliquant leur diversité de modes d'activation (température, composés chimiques, osmolarité, stimulation mécanique, lipides, lumière, produits du stress oxydatif, acidité ou encore les phéromones). A ce jour, presque toutes les cellules testées expriment au moins un membre de cette famille. Ainsi, les rôles physiologiques de ces canaux sont multiples et non limités aux mécanismes de transduction du message douloureux⁴²⁷.

Le récepteur **TRPV1**, par exemple, est capable d'interagir directement avec des résidus de type **vanilloïdes**, mais pas seulement. Le **chaud nociceptif** (> 43°C), et le **pH acide** ont été largement décrits comme activateurs du TRPV1. Ainsi, il est donc communément admis pour être un **thermorécepteur périphérique**^{228,427,428}. De plus, depuis son clonage, un large panel d'études pharmacologiques et fonctionnelles a démontré que ce canal est un acteur important dans le développement des **processus douloureux périphériques** qu'ils soient aigus ou chroniques.

Ainsi, l'administration périphérique de **capsaïcine, agoniste des récepteurs TRPV1**, induit un **phénomène douloureux important immédiat suivi d'un effet antalgique** expliqué par la **désensibilisation des fibres nociceptives primaires**⁴²⁹⁻⁴³⁶. De plus, l'utilisation d'antagonistes sélectifs du TRPV1 permet d'abolir les processus d'hypersensibilité observés et ceci dans de nombreux modèles animaux^{428,437}.

b. Le récepteur TRPV1

i. Expression

Le récepteur TRPV1 a initialement été jugé comme uniquement exprimé dans les neurones de petit et moyen diamètre dans les DRG et le trijumeau, conformément à l'action sélective des

vanilloïdes^{228,438-440}. Cependant, des études ultérieures utilisant des techniques plus sensibles ont démontré que le TRPV1 était exprimé dans de nombreuses autres structures neuronales⁴⁴¹⁻⁴⁴⁵ et non neuronales^{441,446,447}. Le niveau d'expression dans les neurones sensoriels périphériques de petit diamètre semble être 30 fois plus élevé au moins que partout ailleurs dans le corps. L'expression des récepteurs TRPV1 et leur fonctionnalité au niveau périphérique n'est plus à démontrer et est admise par la communauté scientifique. Malheureusement, ce n'est pas encore tout à fait le cas d'un point de vue central et plus particulièrement supraspinal.

Plusieurs études comportementales ont largement démontré les effets **hypothermisant et antinociceptif** de la capsaïcine injectée au niveau supraspinal^{431,448,449}. Ces résultats suggèrent que les récepteurs **TRPV1 supraspinaux**, à l'inverse des récepteurs TRPV1 périphériques, sont impliqués dans des **processus d'antinociception**. Malgré tout, la présence et la fonctionnalité du récepteur TRPV1 au niveau supraspinal fait débat encore actuellement avec des études qui se contredisent à tour de rôle.

L'expression du récepteur TRPV1 au niveau supraspinal a été étudiée par diverses méthodes (radioligands, immunohistochimie, hybridation in situ, RT-Q-PCR...)^{442-445,450,451}. Malgré cela, ces études n'ont pas permis d'avoir une réponse nette sur sa présence et il aura fallu attendre une étude récente de Cavanaugh et coll.^{441,452} afin d'éclaircir ce débat grâce à la génération d'une souche de souris **C57Bl6J Trpv1-LacZ** qui permet de visualiser spécifiquement les neurones exprimant le récepteur TRPV1 (couleur bleue). Les résultats ont montré une **expression**, certes faible mais présente, **des récepteurs TRPV1 au niveau supraspinal** (Figure 12).

Qu'en est-il de ses fonctions dans la nociception ?

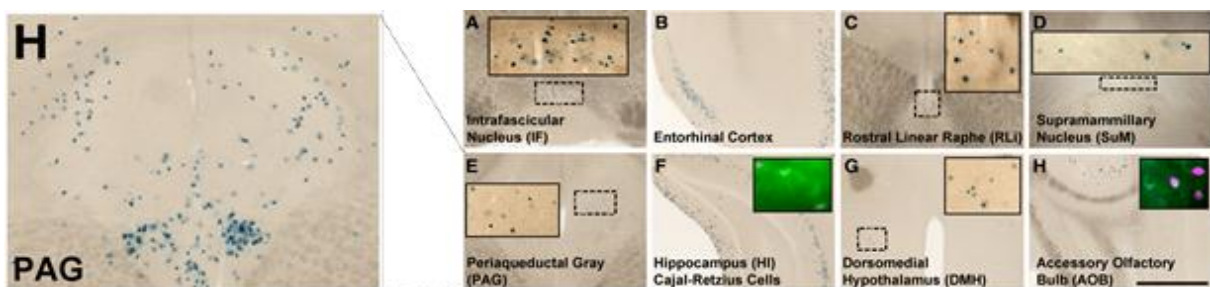


Figure 12 : Expression supraspinale du TRPV1. Evaluation de l'expression du récepteur TRPV1 chez des souris exprimant un gène rapporteur Lac-Z sous promoteur TRPV1. **H, gauche)** Expression du TRPV1 au niveau de la PAG. **A-H, droite)** Diverses régions supraspinales exprimant de manière plus ou moins importante le récepteur TRPV1. Modifié d'après Cavanaugh et coll. 2011.

ii. *Rôle dans la nociception* -----

L'implication des récepteurs **TRPV1 périphériques et spinaux** dans la nociception, avec un **effet pronociceptif** lors de son activation, n'est plus à démontrer et est bien admise par la communauté scientifique (pour revue⁴⁵³). Ainsi, dans ce manuscrit de thèse nous ne nous focaliserons que sur l'aspect supraspinal de l'implication du TRPV1 dans les processus douloureux.

Seules quelques études récentes se sont intéressées à la modulation du TRPV1 au niveau supraspinal en se focalisant sur la PAG. Il a été démontré que le **blocage** du récepteur **TRPV1 supraspinal** (résinifératoxine, 0,5 nmol, intra-PAG) induit une **hyperalgie thermique** corrélée à la diminution de l'activité des cellules OFF de la RVM et, *a contrario*, **l'activation du TRPV1** (capsaïcine 6 nmol, intra-PAG) induit un **effet opposé** (antalgie et activation des cellules OFF)²²⁹. Ce qui est plus intéressant dans ces études est que cet effet antinociceptif est **drastiquement réduit** par l'inhibition du récepteur TRPV1 par la **capsazépine** (6 nmol, intra-PAG) mais plus surprenant, également par la coadministration d'un **agoniste CB1** (WIN55,212-2 ; 25 nmol). Par la suite, deux études^{230,454}, toujours dans cette zone du cerveau, chez le rat ont permis de confirmer le lien fonctionnel entre ces deux récepteurs dans la régulation de la nociception.

Au final, les récepteurs **TRPV1 supraspinaux** sont bien impliqués dans la **nociception** et il semblerait que ceux-ci soient en **interrelation avec le système cannabinoïde** *via* les récepteurs CB1. Cette dernière donnée n'est pas surprenante si l'on considère que l'anandamide est à la fois un activateur des TRPV1 et CB1, et l'hypothèse mise en avant serait qu'au niveau cellulaire, dans la PAG, le récepteur TRPV1 serait étroitement **associé avec le récepteur CB1**, lui permettant de répondre à une augmentation des taux des endocannabinoïdes. Cette activation physiologique du récepteur TRPV1 par l'anandamide serait responsable de l'activation des voies inhibitrices descendantes au travers de l'activation des cellules OFF de la RVM.

Ainsi, le fait que l'anandamide soit à la fois un fort agoniste des récepteurs CB1 et TRPV1 suggère une forte interaction entre ces deux récepteurs dans les processus physiologiques dépendants des lipoaminoacides, et potentiellement de **l'AM404**. Pour appuyer cette hypothèse, une étude a montré une **colocalisation supraspinale** entre les récepteurs **CB1 et TRPV1** dans plusieurs zones du cerveau dont la **PAG**⁴⁵⁰.

Cette interaction reste toutefois à être confirmée par de plus amples études qui sont actuellement en cours au laboratoire.

Suite à ces nombreuses études sur l'implication des récepteurs TRPV1 dans les processus nociceptifs, intéressons-nous aux débouchés cliniques actuels.

iii. *Aspect clinique* -----

Les nombreuses études précliniques, ayant maintes fois démontré l'implication des récepteurs TRPV1 dans la nociception, ont encouragé les industries pharmaceutiques à s'orienter massivement dans le développement de nouvelles thérapeutiques impliquant le TRPV1⁴⁵⁵.

Ainsi chez l'Homme, comme observé chez l'animal, l'administration périphérique **d'agonistes TRPV1** induit immédiatement une **sensation douloureuse** importante qui est **suivie d'une antalgie** provoquée par la désensibilisation des fibres nociceptives périphériques⁴⁵⁵. Suite à ces observations, de nombreuses préparations de capsaïcine sont désormais utilisées dans la pratique clinique, comme l'Elastotherm 0,075% crème® (AMM en 2006) et le Qutenza® 8% 179 mg (AMM en 2009). Ces types de crèmes à base de capsaïcine sont indiqués, respectivement, dans le **traitement local** des douleurs **neuropathiques et musculaires**.

Les effets antinociceptifs chez l'Homme de la capsaïcine ont été plus ou moins validés par de récentes méta-analyses cliniques^{455,456}. Il a été rapporté un **effet bénéfique** de ces crèmes sur la douleur chez des patients souffrant d'une **névralgie post-herpétique**, de **douleurs post-chirurgicales** (bunionectomie = *hallux valgus*) et **articulaires** (prothèse totale de genou). Il faut néanmoins ajouter à cela que la douleur provoquée par l'application du patch et l'érythème qui s'en suit impose l'utilisation d'autres antalgiques (lidocaïne 4%) avant l'application (60 min) afin de permettre au patient de supporter le traitement.

Malgré tout, l'utilisation de ces crèmes à base de capsaïcine dans la pratique clinique doit encore être soumise à une évaluation précise de leurs effets antalgiques et notamment dans plusieurs types de douleurs au travers d'études cliniques multicentriques.

En ce qui concerne le développement des **antagonistes TRPV1**, les **effets indésirables** associés à ce type de molécules constituent un **frein important**. En effet, il est bien connu qu'ils induisent une **hyperthermie** (+ 1 à 1,4°C) chez l'Homme comme l'animal, ainsi qu'une perte de la sensation de la chaleur (brûlures fréquentes). C'est pour cela que l'étude de phase I, utilisant l'AMG597 (le plus puissant antagoniste TRPV1) a été arrêtée suite à des hyperthermies persistantes de l'ordre de 39 voire 40°C, pendant 3 à 4 jours⁴⁵⁵. La molécule la plus prometteuse dans le traitement de la douleur actuellement en test est le **SB-705498**. Dans un modèle de douleur induite chez le volontaire sain (modèle de brûlure aux UVB), le SB-705498 augmente les seuils de douleurs induites par le chaud mais pas par la capsaïcine⁴⁵⁷.

3. Lipoaminoacides et TRPV1

a. L'anandamide

Les « exovanilloïdes », dont le représentant majeur est la **capsaïcine**, sont connus depuis plusieurs décennies. Ce ne fut que plus récemment que le premier « endovanilloïde » fut décrit, c'est un composé largement connu comme endocannabinoïde et appelé **anandamide**^{354,458-460}. Malgré tout, l'anandamide reste un agoniste bien moins puissant que la capsaïcine, de l'ordre d'un facteur $10^{355,460}$, mais ceci est dépendant de la température (puissance maximale à 37°C)⁴⁶¹ et du type cellulaire^{355,462,463}.

Les interactions anandamide / TRPV1 sont bien décrites au niveau périphérique mais très peu d'études existent sur cette interaction au niveau supraspinal, notamment à cause de la controverse sur l'existence même du TRPV1 au sein du cerveau. Seule une étude montre que l'augmentation du taux **d'anandamide cérébral** (PAG) était à même de provoquer une **hyposensibilité thermique** au travers de l'activation du récepteur **TRPV1** et de l'activation des **voies inhibitrices descendantes**²³⁰. Résultats qui confirment ceux d'une étude précédente qui a démontré que l'antalgie induite par une stimulation électrique de la PAG est accompagnée d'une augmentation des taux d'anandamide dans cette même structure.

Ainsi, le rôle antinociceptif du couple anandamide / TRPV1 dans cette région du cerveau semble exister.

b. Le N-arachydonoyl-dopamine

Il existe une multitude d'autres ligands TRPV1 similaires à l'anandamide mais leur implication dans la nociception reste encore à déterminer. Prenons par exemple le **NADA**, un composé qui possède une affinité forte pour les récepteurs **TRPV1 et CB1** et qui se trouve en **forte quantité dans le cerveau** contrairement à la périphérie^{205,311,464-466}. Son anabolisme reste encore à être identifié et il semblerait jouer le rôle de neuromodulateur au travers des récepteurs TRPV1 et CB1.

c. Le 2-arachydonoyl-glycérol

Une étude actuellement menée par notre laboratoire a montré que le 2-AG était capable d'activer les récepteurs TRPV1 au niveau d'artères mésentériques de rat. Consistant avec le

résultat précédent, le 2-AG n'induit plus ou très peu de vasodilatation chez les souris KO TRPV1. A *contrario*, l'inhibition de la dégradation du 2-AG par la MAGL potentialise ses effets vasodilatateurs, ceci dépendant du TRPV1. Enfin, d'un point de vue comportemental, l'utilisation d'un antagoniste de la MAGL (JZL-184) par voie intracérébroventriculaire induit un effet antinociceptif, également dépendant du TRPV1 (Zygmunt et coll., en soumission).

En conclusion de ces études, existe-t-il une pertinence clinique à l'utilisation de ligands TRPV1 ?

Malgré un effet clinique notable sur la douleur, le développement de thérapeutiques antalgiques basées sur la modulation spécifique du récepteur TRPV1 se heurte à plusieurs facteurs:

- 1) **Complexité** de la biologie du récepteur TRPV1 au travers des espèces,
- 2) Nécessité d'une modulation de récepteurs **TRPV1 centraux** pour obtenir un effet antalgique suffisant,
- 3) **Effets hyperthermisants** des antagonistes.

Très récemment un travail impliquant notre laboratoire a démontré que les lipoaminoacides étaient capables de moduler négativement un autre type d'acteur très impliqué dans les processus douloureux, les canaux ioniques voltage dépendants et plus précisément les canaux calciques voltage dépendant de type T⁴⁶⁷. Cette nouvelle famille de canaux calciques fut découverte il y a peu de temps mais déjà de nombreuses études ont démontré leur forte implication dans la nociception. L'importance de ces canaux calciques dans les processus douloureux et le fait que les « arachidonic-related compounds », comme l'anandamide et l'AM404, soient capables de les inhiber⁴⁶⁸, en plus de moduler des acteurs comme le CB1 et TRPV1, constituent des arguments forts en faveur de l'intérêt de ces protéines pour la modulation pharmacologique de la douleur. Compte tenu de l'implication de l'AM404 dans l'effet du paracétamol, nous émettons l'hypothèse que ces canaux pourraient également être mobilisés dans l'effet antalgique du paracétamol, ce qui justifie de donner plus de détails sur ces canaux calciques voltage dépendants.

INTRODUCTION GENERALE

LES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T

IV. LES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T : VERS UN NOUVEL AVENIR THERAPEUTIQUE ?

A. Genèse de l'influx nerveux

1. Généralités

Toute perception de l'environnement par l'organisme n'est possible que par la transformation des stimulations en **signal détectable et analysable par l'organisme**, c'est-à-dire en **signal électrique ou chimique**. Pour cela il existe des **protéines spécialisées** dans la détection spécifiques des diverses stimulations extérieures ou endogènes à l'organisme. Dans le système nerveux, ces protéines ont pour rôle de **détecter les stimulations** (mécanique, thermique, chimique) puis de les **coder en message électrique**. Message électrique qui sera à son tour **transmis** le long de l'axone grâce à d'autres types protéiques ayant pour but final la **transformation du signal électrique en signal chimique** par des protéines spécialisées au niveau des synapses ce qui permettra la transmission du signal entre neurones.

Parmi les différentes protéines intervenant, nous pouvons citer les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou à la tyrosine kinase (RTK) et les **canaux ioniques**. Ce sont ces derniers que nous développerons plus en détail.

Ce sont ces différents canaux qui vont **transformer la stimulation en influx électrique** grâce au flux d'ion généré (hyperpolarisant ou dépolarisant) par leur activation. C'est suite à la somme de ces flux d'ions qu'un courant va être généré et que le potentiel membranaire de repos du neurone sera changé en **potentiel transducteur**. Le courant produit est dépendant de la **nature** de la stimulation mais également proportionnel à son **intensité** et sa **durée**.

Le courant généré, s'il est assez fort pour donner naissance à un potentiel transducteur important, va permettre la création de **potentiels d'action** (PA), permis par l'activation des **canaux sodiques** voltage-dépendants (Nav) entraînant une dépolarisation du neurone. Cette **dépolarisation** va immédiatement activer d'autres canaux voltage-dépendants, les **canaux potassiques** (Kv), qui eux vont à l'inverse créer un courant **hyperpolarisant** pour contrer la dépolarisation et restaurer le **potentiel membranaire de repos** du neurone. Ces phases de dépolarisation / repolarisation vont générer les PA isolés ou en bouffées, en fonction du type de

stimulation et du type de neurone. C'est alors que le message nerveux sera codé en fonction de la fréquence des PA.

Dans le cas d'une stimulation douloureuse périphérique, 1) la stimulation est **détectée** au niveau des terminaisons libres des fibres afférentes primaires, 2) la stimulation est **transformée en signal électrique**, 3) le signal électrique (PA) est **propagé** sans interruption le long de l'axone jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière (en passant par le DRG), 4) le signal électrique est **transformé en signal chimique** au niveau de la synapse pour être **transmis** au second neurone (neurone de projection), grâce à l'intervention de **canaux calciques voltage dépendants**.

2. Canaux ioniques voltage dépendant et influx nerveux

Dans la suite de ce paragraphe nous détaillerons les canaux calciques voltage-dépendants, famille possédant le canal calcique Cav3.2 étudié dans mes travaux de thèse, et leurs rôles dans la nociception.

La super famille des canaux ioniques voltage-dépendants comprend 152 membres caractérisés⁴⁶⁹ (Figure 13). On peut dénombrer :

- les **canaux sodiques** : Nav1.1 à 1.9^{469,470},
- les **canaux potassiques** : Kv1 à 12, K2p1 à 18, Kir1 à 7 et Kca1 à 5⁴⁷¹⁻⁴⁷³,
- les **canaux calciques** : Cav1 (Cav1.1 à 1.4), Cav2 (Cav2.1 à 2.3) et Cav3 (Cav3.1 à 3.3)^{469,470,474}.
- les canaux **non sélectifs** : TRP (TRPC à 7, TRPM1 à 8, TRPV1 à 6, ANKTM1, TRPP1 à 3 et TRPML1 à 3, préférentiellement Ca²⁺), HCN1 à 4, CNGA1 à A4, CNGB1 et CNGB3 (préférentiellement K⁺)⁴⁶⁹

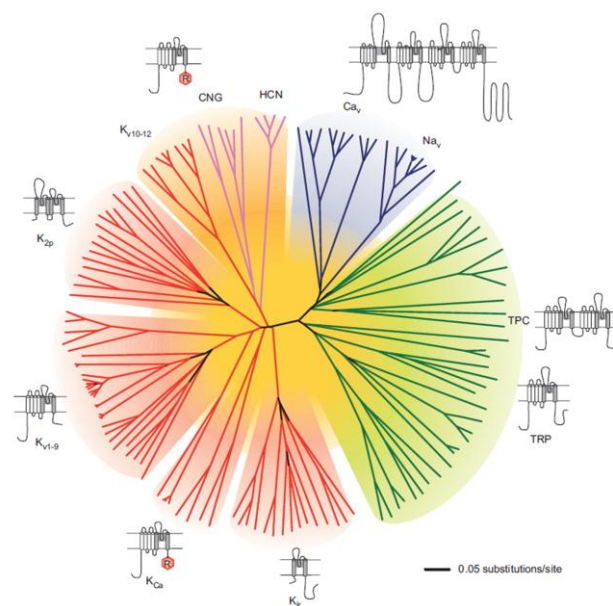


Figure 13 : Superfamille des canaux ioniques voltage dépendants. D'après Yu et Catterall 2004.

Ces canaux participent à l'excitabilité neuronale, la génération des PA, la propagation du message nerveux, la libération des neurotransmetteurs et donc par conséquent jouent un rôle important dans la nociception. Les canaux sodiques et calciques sont les acteurs majoritaires participant à la phase de dépolarisation du PA, les canaux potassiques, quant à eux, contribuent à la phase de repolarisation et d'hyperpolarisation (Tableau 2).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des structures et fonctions des canaux voltage dépendants

Famille	Structure	Sous famille : membres	Fonctions	Pathologies	Drogues
Na _v	24TM/4P	1:10	<ul style="list-style-type: none"> • Initiation PA 	<ul style="list-style-type: none"> • Paralytie • Arythmie cardiaque • Epilepsie 	<ul style="list-style-type: none"> • Anesthésiques locaux • Antiarythmiques • antépileptiques
Ca _v	24TM/4P	4:11	<ul style="list-style-type: none"> • Dépolarisation • Transduction du signal 	<ul style="list-style-type: none"> • Arythmie cardiaque • Migraine • Ataxie épisodique • Paralytie • Epilepsie • Cécité nocturne stationnaire congénitale 	<ul style="list-style-type: none"> • Bloqueurs calciques (traitement maladies cardiovasculaires)
K _v	6TM/1P	12:40	<ul style="list-style-type: none"> • Repolarisation • Flux ionique transépithélial 	<ul style="list-style-type: none"> • Arythmie cardiaque • Surdité 	<ul style="list-style-type: none"> • Antiarythmiques
K _{Ca}	6TM/1P	4:8	<ul style="list-style-type: none"> • Repolarisation en réponse aux influx de Ca²⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> • - 	<ul style="list-style-type: none"> • -
CNG	6TM/1P	2:6	<ul style="list-style-type: none"> • Transduction du signal 	<ul style="list-style-type: none"> • - 	<ul style="list-style-type: none"> • -
HCN	6TM/1P	1:4	<ul style="list-style-type: none"> • Fréquence des PA 	<ul style="list-style-type: none"> • - 	<ul style="list-style-type: none"> • -
TRP	6TM/1P	7:32	<ul style="list-style-type: none"> • Régulation influx Ca²⁺ • Transduction du signal • Fertilisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Mucoïdose • Rein polycystique • Surdité 	<ul style="list-style-type: none"> • -
TCP	12TM/2P	3:2	<ul style="list-style-type: none"> • Inconnue 	<ul style="list-style-type: none"> • - 	<ul style="list-style-type: none"> • -
K _{ir}	2TM/1P	7:15	<ul style="list-style-type: none"> • Définition et régulation du potentiel de repos • Flux ionique transépithélial 	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperinsulinémie • Dysfonction rénale 	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonylureas
K _{sp}	4TM/2P	15:15	<ul style="list-style-type: none"> • Définition et régulation du potentiel de repos 	<ul style="list-style-type: none"> • - 	<ul style="list-style-type: none"> • Anesthésiques généraux

B. Canaux calciques voltage-dépendants

1. Généralités

Pendant longtemps le **sodium** fut considéré comme l'ion majoritaire nécessaire à la **génération des PA**. Dès 1953 cette idée fut révoquée par l'étude de muscles de crustacé ayant démontré l'**implication** des **ions calcium** dans la génération des PA⁴⁷⁵. Plus tard, l'implication des ions calcium fut étudiée plus en détail et l'on découvrit l'existence d'une augmentation calcique durant la phase ascendante du PA⁴⁷⁵ et qu'il existe une grande hétérogénéité dans l'expression et la distribution des **canaux calciques** dans l'organisme quelle que soit l'espèce. La fonction de ces canaux ne se cantonne pas à l'excitabilité neuronale, les canaux calciques participent également à de **nombreuses fonctions biologiques** allant de la contraction musculaire, l'exocytose jusqu'à la maturation des spermatozoïdes^{474,476-478} (Tableau 3).

Suite à la découverte de ces différents canaux calciques ainsi que des différents courants calciques associés, **deux grands groupes** de canaux calciques ont été distingués en fonction de leur réponse au voltage. Le groupe des canaux calciques à **haut seuil d'activation** (*High Voltage Activated, HVA*) et le groupe à **bas seuil d'activation** (*Low Voltage Activated, LVA*)^{469,479} (Figure 14).

La famille des canaux **HVA** se compose de différents membres (L, N, P/Q, R), différenciés selon leur **profil électrophysiologique**. Les canaux calciques de type L sont appelés ainsi pour leur « Large conductance » et leur temps d'inactivation très lent (« *Long lasting* »). Les types N, n'ayant aucune similitude électrophysiologique avec les L, caractérisés au niveau des neurones sensoriels de poulet furent ainsi nommés pour « Neuronal ou *Neither* » (non type L). Par la suite, à l'aide de la découverte et de l'utilisation de nouvelles toxines, les canaux de type P/Q furent découverts dans les cellules de Purkinje du cervelet, d'où leur nom. Enfin, les types R tiennent leur nom de « Résistant ou *Residual* » du fait que ces courants résistent à toutes les toxines.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des fonctions des canaux calciques voltage dépendant.

Type de courant Ca ²⁺	Sous-unité $\alpha 1$	Bloqueurs spécifiques	Fonctions	Pathologies
L	Cav1.1	• DHPs	<ul style="list-style-type: none"> • Excitation-contraction musculaire • Régulation de la transcription 	<ul style="list-style-type: none"> • Paralysie périodique hypokaliémique
	Cav1.2		<ul style="list-style-type: none"> • Excitation-contraction musculaire • Sécrétion endocrine • Influx calciques neuronaux • Régulation enzymatique • Régulation de la transcription 	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de Timothy: • Arythmie • Anormalité développementale • Autisme
	Cav1.3		<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion endocrine • Influx calciques neuronaux • Activité pacemaker cardiaque • Transduction auditive 	—
	Cav1.4		<ul style="list-style-type: none"> • Transduction visuelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Cécité nocturne stationnaire
N	Cav2.1	• ω -CTX-GVIA	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage des neurotransmetteurs • Courants Ca²⁺ dendritiques 	—
	Cav2.2	• ω - Agatoxine	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage des neurotransmetteurs • Courants Ca²⁺ dendritiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Migraine hémiplésique • Ataxie cérébrale
R	Cav2.3	• SNX-482	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage des neurotransmetteurs • Courants Ca²⁺ dendritiques 	—
T	Cav3.1	• Aucun • TTAAs (?)	<ul style="list-style-type: none"> • Activité pacemaker cardiaque • Bouffée de PAS 	—
	Cav3.2		<ul style="list-style-type: none"> • Genèse et fréquence des PAS • Activité pacemaker cardiaque • Bouffée de PAS 	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsie de type absence
	Cav3.3		<ul style="list-style-type: none"> • Genèse de circuits neuronaux (développement) 	—

La famille des canaux **LVA** quant à elle ne se compose que des **canaux de type T** pour « *Tiny and Transient conductance* » en raison de leur faible conductance et leur inactivation rapide.

Les types L et T sont les seuls à être exprimés dans une grande variété de types cellulaires alors que les courants de type N, P/Q, et R se retrouvent essentiellement dans les neurones⁴⁷⁴.

Les canaux calciques sont composés de plusieurs sous-unités⁴⁸⁰⁻⁴⁸³. La **sous-unité principale** est appelée **α_1** , elle possède une structure similaire à celle des canaux sodiques : quatre domaines de 6 segments transmembranaires chacun, reliés entre eux par des boucles intracellulaires. La boucle formant le pore (*P loop*) se situe entre les segments S5 et S6 de chaque domaine, et les segments S1 à S4 portent la sensibilité au voltage et la sélectivité au calcium est portée par la séquence d'acides aminés EEEE (4 acides aminés glutamate). Comme pour les canaux sodiques, la sous-unité α_1 est accompagnée de **sous-unités annexes**, la sous-unité β (intracellulaire) et la sous-unité α_2 (transmembranaire ou extracellulaire) reliée par des ponts disulfure à la sous-unité δ (transmembranaire), plus communément appelée sous-unité **$\alpha_2\delta$** (Figure 15). Ces sous-unités associées à la sous-unité α_1 sont essentielles à sa **fonctionnalité** dans le cas des canaux **HVA**. En effet, elles ont divers rôles comme l'adressage à la membrane, la dépendance au voltage et la probabilité d'ouverture du canal^{484,485}.

Le clonage des différentes sous-unités α_1 associées aux différents courants calciques observés a permis de déterminer **10 sous-unités α_1** différentes (α_1S et α_1A à I) organisées en **3 familles : Cav1, Cav2 et Cav3**. Les Cav1 représentent les courants de **type L** et sont composés de **4 membres** (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4). Les Cav2 regroupent les courants de **type N, P/Q, R** et comportent **3 membres** (Cav2.1 pour le type P/Q, Cav2.2 pour le type N, et Cav2.3 pour le type R)^{486,487}. Enfin, les Cav3 sont à l'origine des courants de **type T** et possèdent **3 membres : Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3**. Les arbres phylogénétiques de ces différents membres montrent une homologie de séquence à hauteur de 50% pour les canaux Cav1 et Cav2, alors que les canaux Cav3 n'en

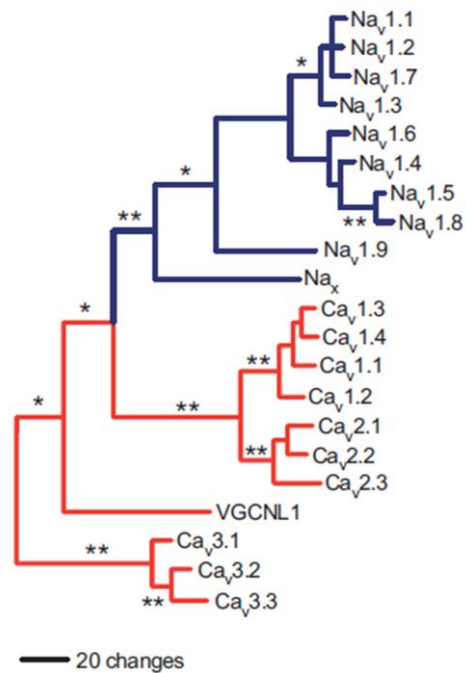


Figure 14 : Phylogénie des canaux sodiques (Nav) et calciques (Cav). Les valeurs de « bootstrap » allant de 50 à 74% sont représentées par un astérisque *; Les valeurs de 75 à 100% sont représentées par **, et celles qui sont <49% sont non représentées. La barre d'échelle correspond au nombre de changements nécessaires pour expliquer les différences dans les séquences protéiques. La longueur des branches verticales n'est pas représentative. D'après Yu et Catterall 2004.

présentent que 30%, constituant ainsi une distinction entre canaux HVA et LVA très tôt dans l'évolution des espèces^{474,488}.

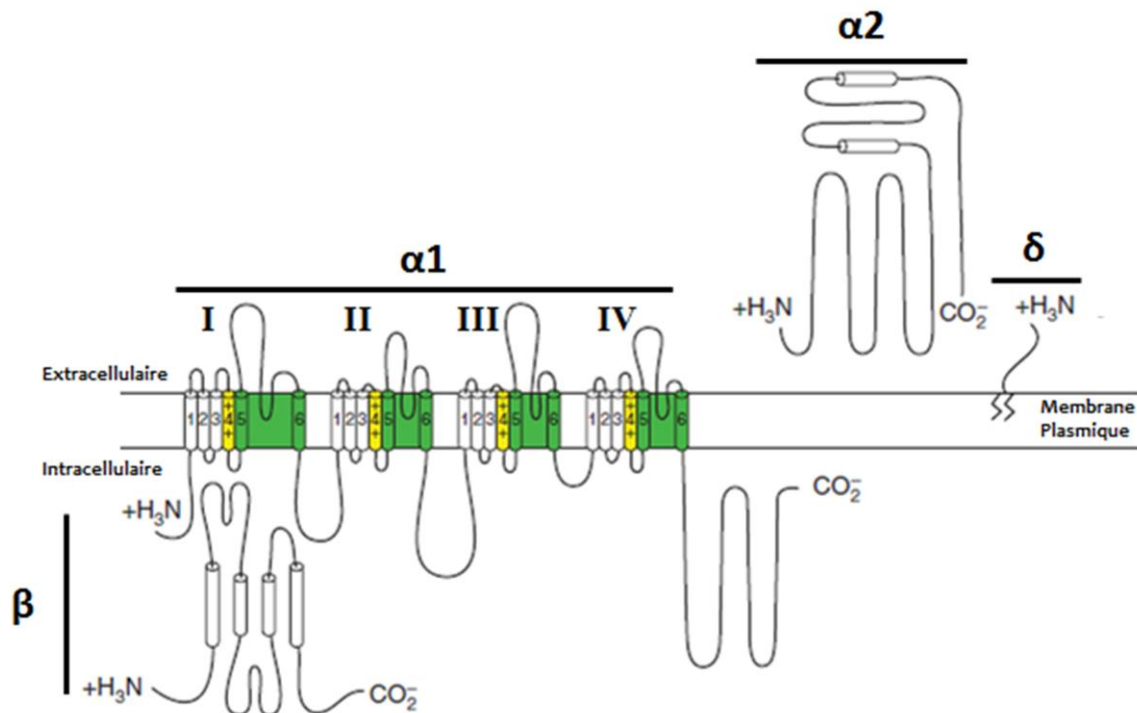


Figure 15: Structure primaire des canaux calciques voltage dépendant. Chaque cylindre représente les hélices alpha, reliés entre eux par les chaînes polypeptidiques. Les deux lignes en zigzag représentent l'ancrage glycoposphatidylinositol. Les chiffres romains indiquent les différents domaines de la sous-unité α . En jaune sont représentés les segments responsables de la détection du potentiel, et en vert les segments du pore du canal. Modifié d'après Catterall 2011.

2. Les canaux HVA

a. Les canaux Cav1 (ou type L)

Les canaux **Cav1** participent à de nombreuses fonctions biologiques comme la **contraction musculaire** (Cav1.1 dans le muscle et Cav1.2 dans le cœur)^{489,490}. Les courants de type L participent également activement à l'**exocytose**, c'est le cas par exemple pour la sécrétion des catécholamines (cellules chromaffines) et des neurotransmetteurs (photorécepteurs et cellules auditives)⁴⁹¹⁻⁴⁹³. Au niveau du système nerveux, les canaux Cav1 sont retrouvés au niveau des **DRGs**⁴⁹⁴⁻⁴⁹⁶ mais leur **fonction** est encore **mal connue**. Au niveau de la **ME**, ces canaux semblent avoir un rôle dans la **plasticité neuronale**⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹.

b. Les canaux Cav2 (ou type N, P/Q, R)

Le rôle prépondérant de ces canaux au sein du système nerveux est la **transmission du message nerveux** de par leur interaction avec la protéine SNARE impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques nécessaires au **relargage des neurotransmetteurs** (Cav2.1 et 2.2)⁵⁰⁰⁻⁵⁰⁵ et par leur implication dans la modulation de la **plasticité synaptique** (Cav2.1, 2.2 et 2.3)⁵⁰⁶⁻⁵¹⁰. Ces canaux calciques **N et P/Q** sont retrouvés au niveau des **synapses** entre les neurones des FAP et les neurones de la ME où ils contrôlent le relargage des neurotransmetteurs^{496,504,511-513}. Cependant, le courant majoritaire, responsable des courants HVA au niveau des DRGs, reste le courant Cav2.2 (type N), responsable entre autres de la libération de CGRP et de substance P par les fibres C et A δ ^{504,514}. En ce qui concerne la dernière isoforme, le canal Cav2.3 (type R), comme ces prédécesseurs, elle semblerait intervenir dans la transmission synaptique mais de plus amples études sont à effectuer^{496,515-517}.

3. Les canaux LVA (ou type T)

Cette dernière famille de canaux calciques concerne directement cette thèse est sera donc étudiée plus en détail.

Les membres de cette **nouvelle famille de canaux calciques** furent découverts pratiquement en même temps, à une année près, par l'équipe de Perez-Reyes en 1998-1999 chez le rat (Cav3.1 et 3.3) et le cœur humain (Cav3.2)⁵¹⁸⁻⁵²⁰. Par la suite, de **nombreux variants d'épissage** ont été découverts, variation notamment au niveau des boucles entre les domaines, présentant des courbes d'inactivation ou d'activation et une localisation cellulaire différentes⁵²¹⁻⁵²⁵.

Les canaux de **type T** ont la particularité de présenter une **différence majeure avec les canaux HVA** : celle de **ne pas posséder d'interaction** physique ou fonctionnelle avec la **sous-unité régulatrice β** , en condition physiologique⁵²⁶⁻⁵²⁹. De plus, **aucune sous-unité** nécessaire ou modulant l'activité des canaux LVA n'a été identifiée à l'heure actuelle⁵²².

a. Caractéristiques des canaux de type T

La caractéristique principale de ces canaux, qui en fait leur intérêt principal, est leur capacité à s'ouvrir à des potentiels membranaires proches du potentiel de repos des neurones. Leurs caractéristiques électrophysiologiques sont :

- **Activation** : -49 mV pour Cav3.1 ; -48 mV pour Cav 3.2 ; et - 41 mV pour Cav3.3. Les temps d'activation (dépolarisation de -110 mV à -40 mV) sont de 4.4 ms pour Cav3.1 ; 5,7 ms pour Cav3.2 et 33,9 ms pour Cav3.3⁵³⁰.

- **Inactivation** : -74 mV pour Cav3.1 ; -75 mV pour Cav3.2 ; et -69 mV pour Cav3.3. Les temps d'inactivation (dépolarisation de -110 mV à -40 mV) sont de 18,8 ms pour Cav3.1 ; 23,4 ms pour Cav3.2 et 122 ms pour Cav3.3⁵³⁰.

- **Déactivation** : une caractéristique des canaux T qui les différencient des canaux HVA est leur temps de déactivation (passage de l'état ouvert à fermé) qui est beaucoup plus lent (LVA : 2 à 12 ms ; HVA : 300 μ s)⁵³¹. Cette particularité permet une entrée de calcium plus importante lorsque ces canaux sont ouverts en réponse à des événements synaptiques brefs ou des PA.

Malgré tout, ces résultats peuvent varier selon les conditions expérimentales⁵²⁶. Dans tous les cas, les différentes études montrent que les canaux Cav3.1 et 3.2 possèdent des caractéristiques très proches (contrairement au canal Cav3.3), seule la déinactivation (passage de l'état inactivé à fermé) permet de différencier les 3 isoformes (137 ms pour Cav3.1, 448 ms pour Cav3.2 et 260 ms pour Cav3.3) (Figure 16)⁵³⁰.

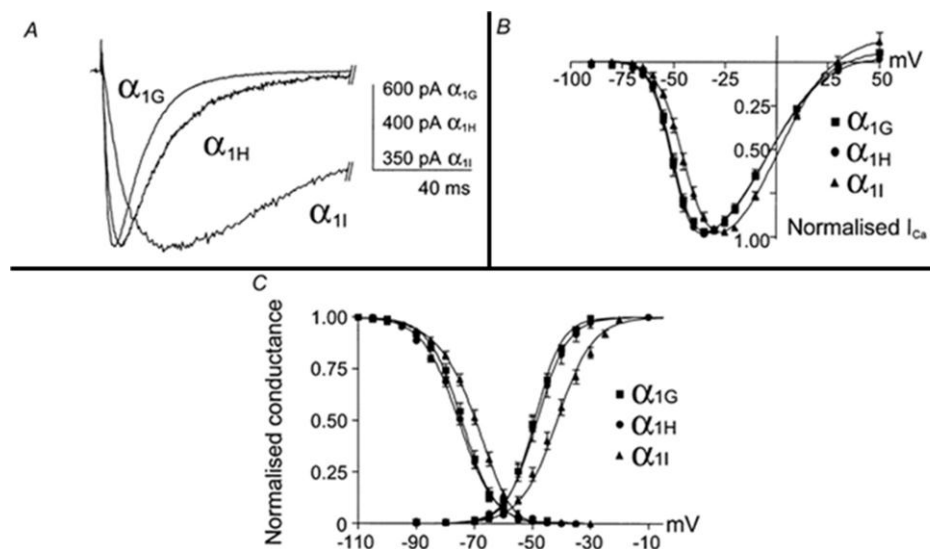


Figure 16 : Profil électrophysiologique des canaux de type T. A) Courants générés par les isoformes humaines de Cav3.1 (α_{1G}), Cav3.2 (α_{1H}) et Cav3.3 (α_{1I}) lors d'une dépolarisation de -110mV à -35mV pour Cav3.1 et Cav3.2 et -25mV pour Cav3.3. **B)** Relation courant-voltage (courbe I-V) des différentes sous-unités de canaux T. **C)** Courbes d'activation et d'inactivation des différentes sous-unités de canaux T. On observe vers -60mV un courant persistant dit de « fenêtre » pour les trois isoformes. D'après **Chemin et coll. 2002**.

b. Rôles dans l'influx nerveux

- **Déclenchement de PA** : du fait de leurs propriétés vues précédemment (à l'exception de Cav3.3), ces canaux peuvent contribuer à l'excitabilité neuronale en agissant sur l'**amplification transitoire des potentiels dépolarisants ou potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE)**. Ces PPSE sont induits, par exemple, par des canaux détecteurs (TRPV1, ASIC...) et permettent au neurone d'atteindre le taux de dépolarisation nécessaire au déclenchement des PA, par l'intermédiaire de l'ouverture des canaux sodiques⁵³².

- **Bouffées de PA** : leurs différentes cinétiques électrophysiologiques font que les canaux de type T répondent différemment à des trains de PA. **Cav3.1 et Cav3.2** seraient plutôt responsables de décharges de PA en **bouffées courtes** du fait de leur inactivation rapide, **Cav3.3** au contraire serait impliqué dans les **bouffées plus longues**^{530,533,534} (Figure 17).

- **Génération d'ondes électriques** (ou oscillation) : beaucoup d'études ont démontré l'implication des canaux T dans la génération d'ondes électriques, principalement au niveau des **neurones thalamo-corticaux**, lors de la phase de **sommeil à ondes lentes**^{526,535}. Cette oscillation s'explique comme suit : l'activation des canaux de type T déclenche un PA. Lors de l'hyperpolarisation subséquente, les canaux T sont inactivés et par la même occasion déclenche l'ouverture des canaux HCN ce qui dépolarise le neurone pour revenir au potentiel de repos. C'est lors de cette dépolarisation (-70 mV) que les canaux T vont être de nouveau activés et par conséquent réenclencher un PA⁵³⁶.

- **Transmission synaptique** : deux études récentes ont montré une implication pré-synaptique des canaux T dans la transmission du message nerveux. En effet, les canaux T agiraient sur la **fiabilité de la transmission synaptique** en tant que **régulateur** au niveau **supraspinal et spinal**^{537,538}.

- **Propagation du PA** : une étude, non encore publiée par l'équipe du Dr. E. Bourinet, semble montrer également un rôle des canaux de type T (Cav3.2) dans la propagation des PA. En effet, la mise en contact d'un inhibiteur des canaux T (TTA-A2) avec le nerf sciatique en préparation nerf-peau, réduit la propagation des PA suite à une stimulation de la peau innervée par ce même nerf (François et coll, en rédaction).

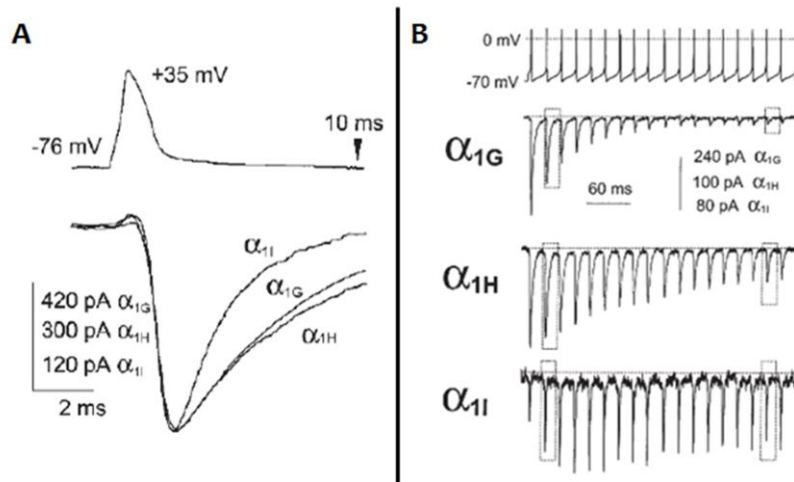


Figure 17: Participation des canaux calciques de type T aux potentiels d'action. A) Contribution des courants calciques de type T lors d'un potentiel d'action neuronal. Les isoformes α_{1G} et α_{1H} (Cav3.1 et Cav3.2) se différencient de l'isoforme α_{1I} (Cav3.3) de par leurs contributions qui perdurent plus longtemps lors de la phase de repolarisation. **B)** Contribution des différents courants calciques de type T lors d'un train de PAS déclenché dans des cellules de Purkinje. Les isoformes α_{1G} et α_{1H} (Cav3.1 et Cav3.2) présentent des courants qui s'épuisent rapidement alors que l'isoforme α_{1I} (Cav3.3) permet une entrée de calcium stable tout au long de la stimulation. D'après **Chemin et coll. 2002**.

c. Pharmacologie

Un des défis majeur dans l'étude des rôles des canaux ioniques est la production d'antagonistes ou agonistes spécifiques d'un canal ionique sans agir sur d'autres membres.

i. Ions métalliques

Les **ions métalliques** ont été utilisés pour bloquer les canaux calciques dès 1975⁵³⁹ et plus tard le **cadmium** fut utilisé pour **bloquer** spécifiquement les canaux calciques **HVA**⁴⁹⁴. Malheureusement, il existe peu d'ions capables de différencier les canaux HVA des LVA et encore moins les LVA entre eux. Actuellement, seuls les ions **nickel, cuivre et zinc** sont couramment utilisés pour **distinguer** les canaux **LVA des HVA** voir les LVA entre eux.

Le **nickel** possède une IC₅₀ de 250 μ M pour Cav3.1, 12 μ M pour Cav3.2 et 216 μ M pour Cav3.3 alors qu'elle est supérieure à 500 μ M pour les HVA (hors type R, IC₅₀ : 50 μ M). Le nickel est ainsi largement considéré et utilisé comme un **inhibiteur des canaux Cav3.2**⁵⁴⁰.

Les ions **cuivre et zinc** permettent de distinguer les canaux Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 entre eux (respectivement IC₅₀ Cav3.1: 22 et 135 μ M ; Cav3.2 0,9 et 23 μ M ; Cav3.3 : 26 et 470 pour le

zinc et le cuivre). De plus, le zinc augmente fortement le temps de désactivation du Cav3.3 alors qu'aucun effet n'est observé pour les autres isoformes de canaux T^{520,541,542}. Cette propriété peut être utilisée pour **isoler les courants Cav3.3** parmi les courants T.

ii. *Les toxines*

En pharmacologie, l'utilisation de toxines d'origine naturelle pour leurs actions biologiques est courante. La toxine la plus connue est la **toxine botulique** qui est une protéase détruisant le complexe SNARE **empêchant ainsi la libération d'acétylcholine** au niveau des synapses induisant une paralysie flasque.

Concernant les canaux ioniques, la toxine la plus utilisée est la **térodotoxine (TTX)**. Cette toxine est issue de la famille de poissons ayant donné son nom, les *Tetraodontidae* (tétréodon) mais également de certaines espèces de crapauds et de pieuvres (pieuvres à anneaux bleus). La térodotoxine est un **inhibiteur** de certains **canaux sodiques** et va conduire au **blocage de la génération des PA**. Très récemment, cette toxine fut utilisée en clinique dans le traitement de la douleur cancéreuse avec des résultats prometteurs⁵⁴³.

Dans la famille des **canaux calciques**, il existe deux toxines inhibitrices des canaux **HVA**, l' ω -agatoxine et l' ω -conotoxine respectivement isolées de venin d'araignées et de mollusques marins. L' ω -agatoxine de type IIIA et IVA possède une activité inhibitrice spécifique des canaux de **type P/Q** au niveau pré-synaptique ce qui bloquerait le **relargage des neurotransmetteurs**⁵⁴⁴. L' ω -conotoxine, quant à elle, est un inhibiteur des canaux de **type N** possédant un fort **pouvoir antalgique**, 100 à 1000 fois plus puissant que la morphine^{545,546}, ce qui a conduit à la mise sur le marché du **ziconotide (Prialt®)** uniquement en utilisation hospitalière par administration intrathécale dans le **traitement des douleurs chroniques intenses**.

Actuellement, il n'existe qu'**une seule toxine**, originaire du scorpion, qui bloque les canaux de **type T : la kurtoxine**⁵⁴⁷ avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. Malheureusement, pour cette même dose, il a été montré une **action inhibitrice sur les canaux HVA**⁵⁴⁸. Ainsi, il n'existe à l'heure actuelle aucune toxine spécifique des canaux de type T.

iii. *Molécules endogènes*

L'**acide lipoiïque** a été décrit comme **modulateur négatif** des canaux de **type T**, notamment le membre **Cav3.2**, par oxydation⁵⁴⁹. De manière plus intéressante, pour mes travaux de thèse, il a été démontré que les « **arachidonic-related compounds** », tels que l'**anandamide**,

possédaient une action inhibitrice, entre autres, sur les canaux de type T⁴⁶⁷. Ces deux molécules, par leur inhibition notamment du membre Cav3.2, ont été décrites comme des **molécules antalgiques endogènes**, ce qui pourrait expliquer un **mécanisme supplémentaire d'action du paracétamol via l'AM404**.

iv. Molécules de synthèse.....

Pour pallier à ce manque de spécificité et de choix des molécules antagonistes des canaux T, les entreprises pharmaceutiques ont produit de nouvelles molécules avec plus ou moins de succès. Voyons l'arsenal de molécules non spécifiques et spécifiques que nous possédons actuellement pour l'étude des canaux de type T.

Non spécifiques.....

- **Dihydropyridines** : famille de molécules dérivant de la pyridine et utilisée en tant que **bloqueur calcique** dans le traitement de **l'hypertension**. Quelques membres de cette famille sont capables de bloquer les canaux T tout aussi bien que les canaux L^{550,551}.

- **Mibéfradil** : produit et mis sur le marché par les laboratoires Roche en 1997, cette molécule, vendue sous le nom de **Posicor®**, serait le premier inhibiteur « spécifique » des canaux de type T. Le mibéfradil est prescrit pour le traitement de **l'hypertension et l'angine de poitrine** mais seulement après un an de mise sur le marché, Roche le retira suite à des **interactions avec le cytochrome P450 et deux décès par tachycardies ventriculaires**. Malgré la soit disant spécificité du mibéfradil pour les canaux T, de nombreuses études ont montré un **effet inhibiteur sur les canaux calciques HVA, sodiques, potassiques et chlorures**^{526,552-554}. De plus, les effets hypertenseurs observés seraient dus à l'action sur les canaux HVA de type L⁵⁵⁵.

- **L'éthosuximide** : **antiépileptique** pour le traitement des épilepsies de petit mal, commercialisé par Pfizer sous le nom de **Zarontin®** en France (1960). C'est actuellement un des antagonistes non spécifiques des canaux de type T **le plus utilisé** avec le mibéfradil dans les études pré-cliniques. L'éthosuximide possède un fort pouvoir antalgique notamment sur les **douleurs neuropathiques** chez l'animal⁵⁵⁶⁻⁵⁵⁹. A de fortes doses *in vitro* cette molécule agirait sur d'autres canaux ioniques. Malgré cela, nous verrons par la suite dans mes travaux de thèse que cet **effet antalgique passerait spécifiquement par les canaux Cav3.2**. Suite à ces données précliniques nous avons mis

en place, dans le cadre de cette thèse, un **projet clinique sur l'utilisation de l'éthosuximide dans le traitement des douleurs neuropathiques traumatiques.**

Spécifiques.....

Plusieurs équipes se sont penchées sur la conception de molécules antagonistes spécifiques des canaux de type T. Actuellement, les molécules découvertes sont dites spécifiques Cav3 mais rien n'empêche que dans quelques années, d'autres cibles soient trouvées, ce qui nous pousse à prendre ces résultats avec précautions. Malgré tout, le profil d'action de ces nouvelles molécules sur les canaux T semble être plus spécifique que pour les anciennes grâce aux nouvelles techniques de criblage disponibles. Parmi ces molécules nous comptons **la famille des TTAs** développée en 1998 par le laboratoire Merck. Les TTAs (*T Type Antagonist*) sont des dérivés des piperidines⁵⁶⁰. La famille des TTAs se compose des **TTA-A**, des **TTA-P** et des **TTA-Q**. Les TTA-A et -P, notamment **-A2 et -P2**, sont de **puissants inhibiteurs des canaux de type T** (contrairement au **TTA-Q** qui serait **un potentialisateur**) avec une IC₅₀ de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de nanomolaires. La vérification de la sélectivité de ces molécules a été effectuée par technique de « *binding* » sur un panel de canaux ioniques et de divers récepteurs et toutes ces études aboutissent à la même conclusion : les TTAs possèdent une **très grande sélectivité envers les canaux de type T**⁵⁶⁰⁻⁵⁶³. Actuellement, les TTA-A2 et -P2 restent les molécules antagonistes des canaux de type T les plus spécifiques. Plusieurs études ont été effectuées avec l'utilisation de ces molécules et reliées avec les canaux de type T, confirmant l'action des TTAs sur les canaux Cav3 d'un point de vue *in vivo*^{532,538,562-566}. Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons utilisé la molécule **TTA-A2** généreusement fournie par les laboratoires Merck par l'intermédiaire du Dr. Emmanuel Bourinet. L'avantage majeur de cette molécule est qu'elle est **administrable par voie orale**, qu'elle **passé la BHE**, qu'elle induit un **effet antalgique** chez l'animal et surtout qu'elle semble plus **spécifique pour le Cav3.2**⁵³² (Figures 18-19).

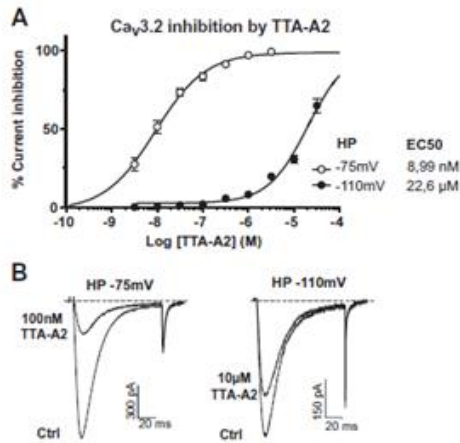


Figure 18 : Inhibition des canaux $Ca_v3.2$ par le TTA-A2.

A) Courbes dose réponses de TTA-A2 sur les courants $Ca_v3.2$ (dépolarisations de + 40 mV à une fréquence de 0,1 Hz à partir des potentiels de maintien à +110 mV ou + 75 mV). **B)** Gauche: traces de courant $Ca_v3.2$ provoquées toutes les 100 ms (dépolarisation à partir de -75 mV à -40 mV), en conditions contrôles (ctrl) et en présence de 100 nM de TTA-A2. Droite: même conditions mais dépolarisation à partir de -110 mV à -40 mV). D'après François et coll. 2013.

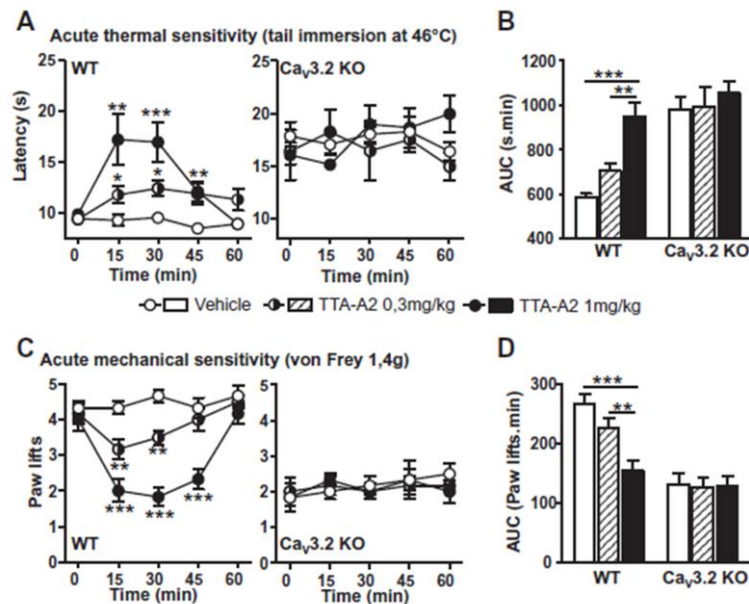


Figure 19 : Effet antalgique du TTA-A2 et spécificité sur $Ca_v3.2$. L'effet du TTA-A2 (0,3 ou 1 mg / kg per os) a été évaluée dans le test d'immersion de la queue à 46°C et par le test de von Frey à 15, 30, 45, et 60 minutes après administration. **A)** L'administration de TTA-A2 augmente la latence de retrait de la patte chez les souris WT dans les deux doses utilisées. Contrairement aux souris KO $Ca_v3.2$ ($Ca_v3.2$ KO). **B)** Aire sous la courbe des expériences présentées en A). **C)** L'administration de TTA-A2 diminue le nombre de retrait de patte lors du test de von Frey (filament de 1,4 g) chez les souris WT contrairement aux souris KO $Ca_v3.2$ ($Ca_v3.2$ KO). **D)** Aire sous la courbe des expériences présentées en C). D'après François et coll. 2013.

d. Expression des canaux de type T

Suite au clonage des isoformes Cav3, en 1999 une étude par hybridation *in situ* a permis de visualiser leur **expression au niveau du système nerveux central et périphérique** du rat⁵⁶⁷. Plus tard, ces résultats ont été confirmés par le projet *Allen Brain Atlas* chez la souris et l'Homme⁵⁶⁸. Ce qui est intéressant, c'est que l'on retrouve les canaux de type T pratiquement dans **toutes les structures du système nerveux**, de la périphérie à l'encéphale en passant par la moelle épinière. Il faut noter également que l'expression des canaux de type T n'est pas restreinte au système nerveux mais que plusieurs tissus les expriment comme le cœur, le muscle lisse, le rein et les tissus endocrines^{526,569,570}.

Au niveau du système nerveux et des structures impliquées dans la douleur, l'étude de Talley et coll. montre une **expression très majoritaire du membre Cav3.2** dans les neurones sensoriels des **DRGs** (avec une légère expression de Cav3.3)^{567,571}. Au niveau **médullaire**, les canaux **Cav3.1 et 3.2** sont exprimés de manière similaire dans les cornes dorsales et ventrales alors que Cav3.3 y est absent^{567,572,573}. Ces données expliquent pourquoi la plupart des études suivantes se sont intéressées principalement au membre Cav3.2 au niveau des DRGs et de la ME dans les processus douloureux.

Suite à ces données bibliographiques et dans le cadre de ces travaux de thèse, nous ne discuterons que de l'isoforme Cav3.2 et de son implication dans la douleur dans la suite et fin de ce chapitre.

e. Douleur et canaux Cav3.2

Malgré leur profil électrophysiologique et d'expression bien documenté^{479,494,495,567}, **les rôles physiologiques des canaux Cav3.2** ainsi que la nature des neurones les exprimant restent **encore mal connus et controversés**.

La première chose que l'on observe dans l'étude de Talley et coll. est que le canal Cav3.2 est **fortement exprimé** dans des **neurones de taille moyenne** (30-40 μm)⁵⁶⁷, neurones qui ont été identifiés par la suite comme des **neurones D-Hair**, innervant la base des poils de classe « *Down Hair* »^{574,575}. En patch clamp ceci fut confirmé par la présence de courants de type T « géants » dans ces neurones⁵⁷⁶. Ces neurones font partie des **fibres A δ LTM** impliquées dans la **mécanoperception**. D'autres études montrent l'existence de canaux Cav3.2 dans des **neurones de plus petite taille** (15-30 μm) correspondant aux **fibres C et A δ** ^{567,577-579}. Malgré une densité de

courant beaucoup plus faible que dans les neurones *D-Hair*, l'étude de Coste et coll. en 2007 suggère également un rôle de ces canaux dans la **mécanoperception**⁵⁷⁹.

Parallèlement à ces études de localisation, la génération de souris déficientes pour le gène Cav3.2 a permis de mettre en évidence une très **forte implication de ces canaux dans la perception douloureuse**. En effet, les souris **KO Cav3.2** présentent **une moindre réaction à des stimuli nociceptifs** quelle que soit la modalité douloureuse testée⁵⁸⁰ (Figure 20). Résultat conforme à celui obtenu par l'équipe du Dr. E. Bourinet qui ont montré que l'inhibition spécifique des récepteurs Cav3.2, à l'aide **d'ARN antisens au niveau spinal**, induit un **effet antalgique** chez le rat neuropathique⁵⁸¹ (Figure 20). Ces études traduisent un **rôle pronociceptif** des canaux Cav3.2. Par la suite, d'autres études ont confirmé son rôle dans la nociception^{538,549,582,583}. Beaucoup d'études se sont intéressées au **potentiel thérapeutique de l'inhibition des canaux Cav3.2 pour le traitement de la douleur, notamment neuropathique. L'inhibition de ces canaux**, par diverses stratégies, entraîne une **diminution des symptômes douloureux** (allodynie et hyperalgie) ainsi que de leur **développement** et leur **maintenance** dans divers **modèles neuropathiques** chez l'animal^{557,581,582,584}. Grâce à la même collaboration, nous avons également démontré très récemment que les canaux Cav3.2 étaient impliqués dans la **douleur viscérale** chez le rat (modèle butyrate)⁵⁸³ (Figure 20).

Il faut noter également que beaucoup d'études retrouvent les **mêmes résultats** lorsque des inhibiteurs « moins » spécifiques des canaux Cav3.2, comme **l'éthosuximide**, sont administrés chez l'animal⁵⁵⁶⁻⁵⁵⁹. Ces données précliniques rendent **l'inhibition des canaux Cav3.2 et plus particulièrement l'éthosuximide, très prometteuse dans le traitement des douleurs neuropathiques chez l'Homme** (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'effet antalgique de l'inhibition des canaux Cav3.2 et de type-T.

Types de douleur		Effet antalgique		Références
		Inhibition Cav3.2 (KO et AS)	Inhibition type-T (Antagonistes)	
Aigue	Thermique	OUI	OUI	Choi et coll. 2007 Todorovic et coll. 2002 François et coll. 2013
	Mécanique		OUI	
	Chimique		Non Déterminé	
Neuropathique	Traumatique	OUI	OUI	Messinger et coll. 2009 Bourinet et coll. 2005 Okubo et coll. 2011 Kawashiri et coll. 2012 Latham et coll. 2009 Dogrul et coll. 2003 Hamidi et coll. 2012 Flatters et coll. 2004
	Diabétique	OUI	OUI	
	Chimio-induite	Non Déterminé	OUI	
Viscérale	Inflammatoire	OUI	Non Déterminé	Marger et coll. 2011
	Non-inflammatoire	Non Déterminé	Non Déterminé	
Excès de nociception	Inflammatoire	Non Déterminé	Non Déterminé	
	Non-inflammatoire	Non Déterminé	Non Déterminé	

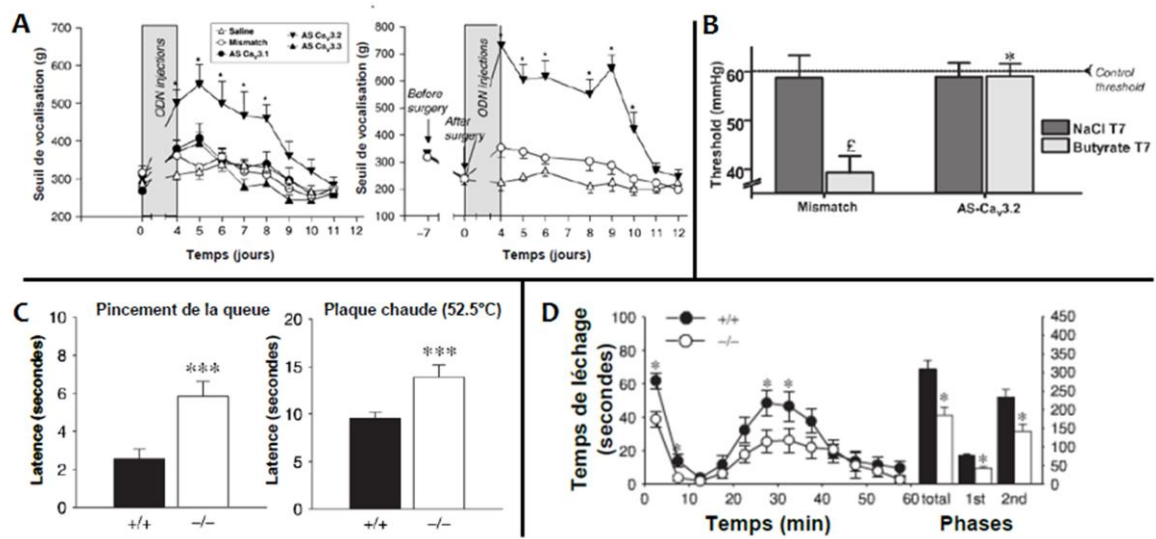


Figure 20 : Impact de l'inhibition des canaux Cav3.2 sur la nociception en conditions saines et pathologiques. **A)** Effet sur la douleur mécanique d'une injection i.t. d'ARN antisens dirigés contre Cav3.1 (rond noir), Cav3.2 (triangle vers le bas) et Cav3.3 (triangle vers le haut) chez le rat. Les animaux sont soumis au test de Randall et Selitto. Dans la figure de gauche les animaux sont sains alors que dans la figure de droite les animaux ont subi une constriction chronique du nerf sciatique. Dans les deux cas de figures les animaux ayant reçu les antisens Cav3.2 ont un seuil de tolérance à la douleur beaucoup plus élevé. **B)** Effet sur la douleur colorectale d'une injection i.t. d'ARN antisens dirigés contre Cav3.2 chez le rat. Les animaux sont soumis au test de distension colorectale. Ceci a été réalisé en condition normale (NaCl) ou en condition d'hypersensibilité colique (modèle butyrate). Les animaux ayant reçu les antisens Cav3.2 récupèrent un seuil de tolérance normal et ne développent pas d'hypersensibilité colique. **C)** A gauche : Test du pincement de la queue sur des souris WT (+/+), ou KO Cav3.2 (-/-). Le temps de latence des animaux à se lécher ou retirer la queue avec le pincement est évalué. A droite : Test de la plaque chaude à 52.5°C. Le temps de latence des animaux à retirer la patte de la plaque chaude est évalué. **D)** Comportement douloureux induit par le formol chez des souris WT (+/+), ou KO Cav3.2 (-/-). A gauche : Les valeurs représentent le temps que passent les animaux à se lécher après injection de formol dans la patte (2% ; 10µl). A droite : représentation du temps de léchage cumulé pendant la première phase (0-10 minutes) et la deuxième phase (10-60 minutes). D'après Bourinet et coll. 2005; Marger et coll. 2012; Choi et coll. 2007.

Actuellement aucune n'étude ne s'est penchée sur l'implication des canaux Cav3.2 dans un autre type de douleur chronique : les douleurs inflammatoires. C'est pour cela que dans le cadre de mes travaux de thèse je me suis intéressé à leur implication dans ce type de douleur.

En parallèle à toutes ces études sur la modulation négative des canaux Cav3.2, quelques études se sont intéressées à sa modulation positive par l'utilisation d'un agoniste très peu sélectif, le sulfite d'hydrogène (H₂S). Ces études montrent que l'activation des canaux Cav3.2 induit une hyperalgie⁵⁸⁵⁻⁵⁹¹. Le H₂S, issu de la L-cystéine, agit sur le canal Cav3.2 par réduction augmentant ainsi son activité.

Le rôle proalgique du canal Cav3.2 a également été montré par son niveau d'expression lors de pathologies douloureuses. En effet, en cas de neuropathie le canal Cav3.2 voit l'expression de son ARNm, son adressage membranaire, et ses courants augmentés, ceci corrélé à la sensibilité à la douleur accrue^{582-584,592} (Figure 21).

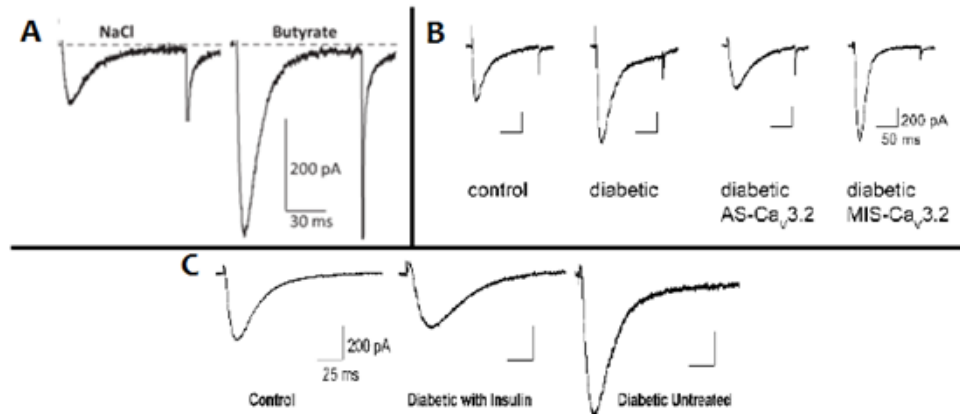


Figure 21: Modulation des courants Cav3.2 en conditions pathologiques. A) Traces de courants calciques de type T dans des DRGs de rats en culture en condition contrôle (NaCl) ou après injection de butyrate dans le côlon. B) Traces d'un courant calcique de type T enregistrées dans des DRGs en culture de rats. Traces représentatives d'animaux contrôles, diabétiques, diabétiques ayant reçu les ARNs antisens Cav3.2 et diabétiques ayant reçu les ARNs antisens contrôles. C) Traces d'un courant calcique de type T dans des DRGs en culture de rats. Traces représentatives d'animaux contrôles, diabétiques ayant un traitement à l'insuline, et diabétiques sans traitement. D'après Marger et coll. 2011; Messinger et coll. 2009.

Il faut aussi noter que les canaux Cav3.2 ne sont pas exclusivement exprimés en périphérie dans les DRGs mais aussi bien dans la ME (couche II-III, PKC γ ; François et coll. ; données non publiées) que dans certaines structures essentielles à la nociception au niveau du système nerveux central (PAG, données non publiées) (Figures 22-23), ce qui laisse penser à un rôle probable de ces canaux dans ces régions^{513,593-595}. En effet, il existe des études dans la moelle épinière et dans le thalamus soulevant le rôle des canaux Cav3.2 dans la nociception^{513,538,572,578,587,596}.

Cependant il s'agit des seules informations disponibles à ce jour sur l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception. L'identité des neurones exprimant les canaux Cav3.2, leur implication dans l'excitabilité neuronale ainsi que leurs rôles au niveau spinal et supraspinal possèdent toujours des parts d'ombre.

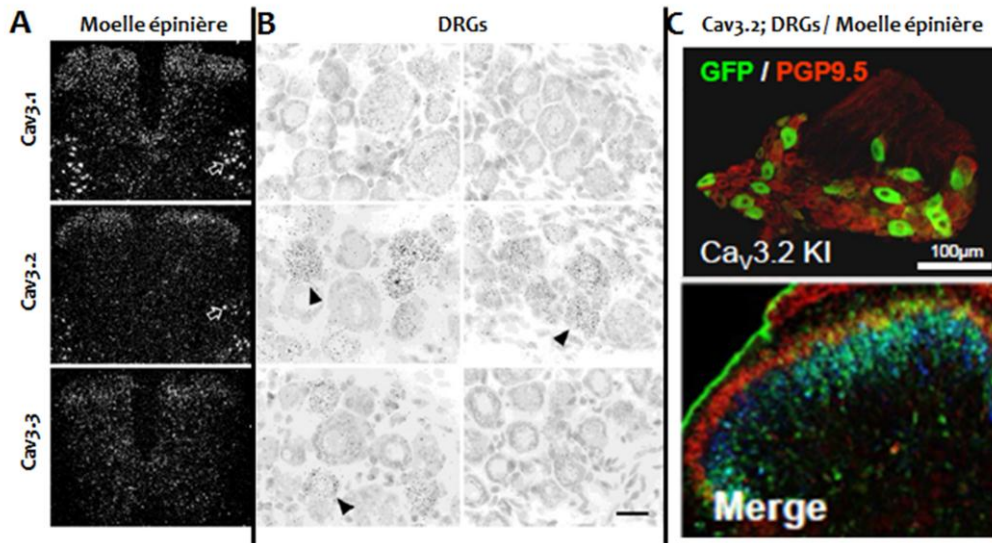


Figure 22 : Expression spinal et périphérique des canaux de type T. A) Hybridation *in situ* des trois isoformes de la famille des canaux de type T dans la moelle épinière et B) dans des DRGs de rat. La première ligne correspond à la sonde Cav3.1, la deuxième ligne Cav3.2 et la troisième, Cav3.3. C) Immunofluorescence de l'isoforme Cav3.2 dans les DRGs (en haut, souris knock-in Cav3.2-GFP, vert: GFP, rouge: PGP9.5) et dans la moelle épinière (en bas, souris knock-in Cav3.2-GFP, vert: GFP, rouge: IB4, bleu: PKCγ). Les canaux Cav3.2 se retrouvent majoritairement au niveau des couches II-III avec une forte co-localisation avec la couche PKCγ et de manière plus faible avec IB4. D'après Talley et coll. 1999 et François et coll ; en rédaction.

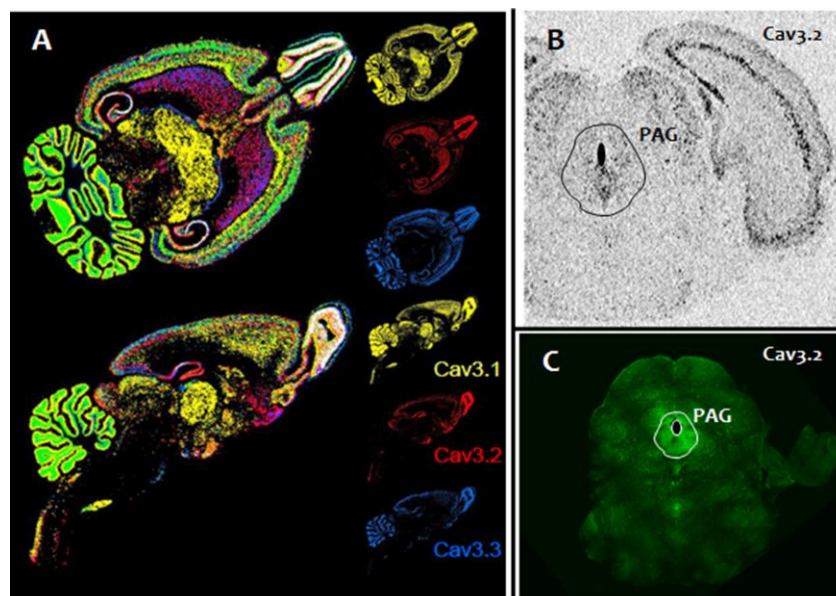


Figure 23 : Expression supraspinal des canaux de type T. A) Hybridation *in-situ* des trois isoformes de la famille des canaux de type T dans le cerveau de rat (Cav3.1 en jaune, Cav3.2 en rouge, Cav3.3 en bleu). B) Hybridation *in-situ* de l'isoformes Cav3.2 au niveau de la PAG. C) Immunofluorescence de l'isoforme Cav3.2 au niveau de la PAG (vert: anticorps anti-GFP, souris knock-in Cav3.2-GFP). D'après Talley et coll. 1999 et résultats non publiés.



Mariusz Lewandowski
« la douleur » (20^e siècle)

PROJETS SCIENTIFIQUES :

PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS

V. PROJETS SCIENTIFIQUES : PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS

A. PROJET 1 : IMPLICATION DES CANAUX CAV_{3.2} DANS L'EFFET ANTALGIQUE DU PARACETAMOL (ARTICLE 1)

1. Problématique

Le **projet initial** de mes travaux de thèse porte sur la **participation des canaux calciques de type T Cav_{3.2} à l'effet antalgique du paracétamol**. Pourquoi nous sommes nous orientés vers une relation Cav_{3.2} – paracétamol ? Pour cela, reprenons succinctement ce que nous avons appris au cours des chapitres précédents :

- **le paracétamol** : nous avons vu qu'il s'agissait d'un **pro-médicament** devant être métabolisé successivement au niveau du foie en *p*-aminophénol puis spécifiquement au niveau cérébral en **AM404** grâce à l'enzyme FAAH pour exercer son effet antalgique.

- **l'AM404**, qui semble être le métabolite actif du paracétamol, fait partie d'une nouvelle famille de médiateurs lipidiques endogènes appelés « **arachidonic-related compounds** ». Certains lipides endogènes sont des **activateurs** des récepteurs aux vanilloïdes (**TRPV1**), récepteurs essentiels à l'effet antalgique du paracétamol¹⁰⁰. De manière intéressante, les « *arachidonic-related compounds* », injectés chez l'animal produisent un fort **effet antalgique**, dépendant des récepteurs TRPV1^{354,356,459,460} (comme pour l'AM404)¹⁴¹ mais d'autres cibles leur sont attribuées. En effet, nous avons démontré que certains lipides endogènes sont capables de **moduler négativement les canaux de type T (Cav₃)** pour induire une antalgie⁴⁶⁷.

- **les canaux Cav_{3.2}** : la famille des canaux de type T se compose de 3 membres (Cav_{3.1}, 3.2 et 3.3). Les canaux de type T sont localisés dans toutes les structures du **système nerveux** (périphérique et central). Le membre **Cav_{3.2}** est le plus représenté dans ces structures, notamment au niveau des DRGs et de la ME^{567,568}, ce qui a poussé les équipes de recherche à s'intéresser d'avantage à cette cible. Comme énoncé dans les parties précédentes, le canal Cav_{3.2}, de par ses particularités électrophysiologiques et sa localisation, est très fortement impliqué dans la **nociception**. En effet, **l'inhibition** de ce canal soit par stratégie génétique (antisens, *knock-out*) ou pharmacologique (antagonistes) induit un **fort effet antalgique** chez l'animal^{580,581}. De plus, une étude récente que

nous avons effectué a montré que les canaux Cav3.2 pouvaient être **fortement inhibés** par les « **arachidonic-related compounds** » ce qui pourrait expliquer leur effet antalgique⁴⁶⁷.

Nous avons donc émis l'hypothèse que **le paracétamol, via l'AM404, un « arachidonic-related compounds », pouvait recruter les canaux Cav3.2 pour permettre son effet antalgique.** Voilà donc le départ et la base de mes travaux de thèse.

2. Objectifs

L'objectif premier fut de démontrer une implication des canaux Cav3.2 dans l'effet du paracétamol. Pour atteindre cet objectif, nous avons à disposition au laboratoire des souris invalidées pour le gène *CACNA1H* codant le canal Cav3.2 (**KO Cav3.2**) ainsi qu'un antagoniste spécifique des canaux Cav3.2⁵³², le **TTA-A2**, généreusement fournis par le Dr. Emmanuel Bourinet. L'effet antalgique du paracétamol fut testé chez les souris KO Cav3.2 **dans divers modèles nociceptifs et modalités douloureuses**. Le paracétamol étant un antalgique d'action centrale, nous avons également évalué l'impact de **l'inhibition des canaux Cav3.2** par le TTA-A2, spécifiquement au niveau **spinal** (injection intrathécale, i.t.) et **supraspinal** (injection intracérébroventriculaire, i.c.v.) sur son effet antalgique, ceci dans diverses conditions expérimentales. Enfin, nous avons également testé l'effet antalgique de **l'AM404** (i.c.v.) chez les souris **KO Cav3.2**, évaluant ainsi l'implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique de l'AM404 administré au niveau supraspinal.

L'objectif secondaire, parallèle au premier, fut de caractériser l'implication des canaux **Cav3.2 supraspinaux** dans la **nociception**. En effet, de nombreuses études ont montré leur implication au niveau périphérique et spinal mais aucune au niveau supraspinal. L'administration de **TTA-A2 par voie i.c.v.** chez des souris sauvages et KO Cav3.2 nous a permis de répondre à cette question.

Enfin, le **troisième et dernier objectif** fut de comprendre les **mécanismes** sous-tendant l'implication des canaux **Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol**. Pour cela, nous avons étudié l'action directe du paracétamol, du *p*-aminophénol et de l'AM404 sur les **courants Cav3.2** par la technique de patch clamp. Du fait de la nécessité absolue de la présence des récepteurs TRPV1 supraspinaux pour l'effet antalgique du paracétamol, nous nous sommes intéressés à la **relation probable des canaux Cav3.2 avec les récepteurs TRPV1**. Pour cela, nous avons tout d'abord confirmé, par technique d'imagerie calcique, que le ***p*-aminophénol devait être métabolisé par la FAAH** pour activer les récepteurs TRPV1. En parallèle, nous avons confirmé, par la même technique que précédemment, l'unique étude³⁵⁵ montrant que **l'AM404** était capable

d'activer directement les récepteurs TRPV1. Les bases conceptuelles étant posées et suite à une étude très récente de Comunanza⁵⁹⁷ ayant montré que **l'activation du récepteur TRPV1** était capable **d'inhiber fortement les courants de type T**, nous avons donc vérifié l'interaction fonctionnelle entre le récepteur TRPV1 et le canal Cav3.2. Ces études *in vitro* ont ensuite été couplées avec des **expériences in vivo** à l'aide de souris **KO Cav3.2 ou KO TRPV1** chez lesquelles nous avons évalué l'effet antalgique respectif de la **capsaïcine** (i.c.v.) et du **TTA-A2** (i.c.v.). L'ensemble de nos travaux a permis l'émergence d'une hypothèse mécanistique originale mettant en jeu les canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol et ainsi de compléter un système déjà bien complexe.

B. PROJET 2 : IMPLICATION DES CANAUX CAV3.2 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE ET LES PROCESSUS ASSOCIÉS (ARTICLE 2)

1. Problématique

Au cours du projet 1, dans lequel nous avons utilisé des modèles animaux de **douleur inflammatoire**, nous avons constaté une particularité intéressante des animaux **KO Cav3.2** : 1) ils ne présentent pas ou **très peu de symptômes d'allodynie et d'hyperalgie** associés aux douleurs inflammatoires, 2) ils présentent un **développement œdémateux réduit** suite à l'induction de l'inflammation. Au vu de ces résultats et du fait qu'aucune étude ne s'est penchée sur l'implication des canaux Cav3.2 dans les douleurs inflammatoires (contrairement aux douleurs neuropathiques), nous avons donc **évalué le rôle des canaux Cav3.2 dans les douleurs inflammatoires et les processus associés.**

2. Objectifs

D'un point de vue comportemental, comme pour le projet 1, nous avons utilisé deux stratégies (**KO Cav3.2** et le **TTA-A2**). A l'aide de ces outils, nous avons étudié l'impact de l'inhibition des canaux Cav3.2 sur le **comportement douloureux** et le **développement œdémateux**

en condition inflammatoire, permettant de répondre à la première question : les canaux Cav3.2 sont-ils impliqués dans la douleur inflammatoire et le développement œdémateux ?

Suite à l'observation d'un **développement œdémateux diminué**, la logique a voulu que nous nous orientions vers l'étude du mécanisme impliqué dans le développement de l'œdème en condition inflammatoire et sa **relation avec les canaux Cav3.2**. Les acteurs principaux dans le développement œdémateux sont les cellules immunitaires dont majoritairement les **macrophages** par la **sécrétion** de nombreux **médiateurs pro-inflammatoires**. Plusieurs études récentes ont démontré que les **canaux Cav3.2** étaient impliqués dans les phénomènes **d'exocytose** des catécholamines par les cellules chromaffines^{570,598-601}. Ainsi, l'hypothèse que nous avons émise est la suivante : **les canaux Cav3.2 seraient impliqués dans l'exocytose ou la production des médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages**. Pour répondre à cette question, la première étape fut de vérifier la présence des canaux **Cav3.2 sur les macrophages**. Nous avons ensuite évalué la **production des médiateurs pro-inflammatoires**, *in vivo* et *in vitro*, par les macrophages avec ou sans inhibition des canaux Cav3.2 (KO Cav3.2 et TTA-A2). Nous avons également évalué, par divers paramètres et techniques, **l'activation des macrophages** en réponse à leur stimulation, ceci en fonction de la présence ou non des canaux Cav3.2. Enfin, par une stratégie de **souris chimériques**, nous avons évalué l'impact de la délétion spécifique des canaux Cav3.2 au niveau du système immunitaire sur la douleur inflammatoire et les processus associés. Ces études ont permis de valider le canal Cav3.2 comme **cible thérapeutique potentiel pour le traitement des douleurs inflammatoires**.

C. PROJET 3 : CANAUX DE TYPE T ET COMORBIDITES ASSOCIEES A LA DOULEUR INFLAMMATOIRE (ARTICLE 3)

1. Problématique

Pour une grande partie des patients, les **douleurs chroniques** sont accompagnées d'anxiété et/ou de dépression qui contribuent à une **détérioration de leur qualité de vie**⁶⁰²⁻⁶⁰⁶. En effet, la prévalence des désordres **anxieux** chez les patients atteints de douleur chronique est de **20% à 40%**, alors qu'elle n'est que de 7% à 18% dans la population générale^{607,608}. De plus, les signes de **dépression** chez les patients sont estimés à plus de **50%**⁶⁰⁹. Ces patients présentent ainsi deux à

trois fois plus de risques de développer une **pathologie** de cette nature⁶¹⁰. Ainsi, une prise en charge inadaptée de la douleur peut avoir un impact négatif sur le développement de l'anxiété. Il est à noter également que des patients présentant des **troubles anxieux** auront un **risque plus élevé de développer des douleurs chroniques**⁶¹¹.

Les troubles **d'anxiété et de dépression** sont très fréquents chez les patients douloureux chroniques en condition inflammatoire, telle que **l'arthrite**^{612,613}. De plus, les symptômes d'anxiété, associés à l'arthrite, ont été démontrés comme **amplificateurs de la perception douloureuse**⁶¹⁴. Ainsi, un lien réciproque existerait entre douleur inflammatoire chronique et anxiété^{615,616}.

La **gestion efficace** de la douleur inflammatoire chronique et de ses comorbidités peut nécessiter une **combinaison de plusieurs médicaments** (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antirhumatismaux, antalgiques, anxiolytiques et antidépresseurs) pour atteindre le niveau souhaité de soulagement de la douleur et de réduction des comorbidités associées⁶¹⁷⁻⁶¹⁹. Néanmoins, la **polythérapie** comporte le risque **d'interactions médicamenteuses et d'effets indésirables**^{618,620,621} pouvant **diminuer le bénéfice espéré de la gestion de la douleur arthritique**⁶¹³. Ainsi, un réel **besoin d'innovation thérapeutique** est nécessaire pour limiter ces polythérapies et leurs effets indésirables. De par leur implication dans la douleur inflammatoire, les **canaux Cav3.2** semblent pouvoir être une cible d'intérêt et leur modulation une thérapeutique potentielle. Cependant il est au préalable indispensable d'évaluer l'impact de l'inhibition des canaux Cav3.2 et plus largement des canaux de type T sur les comorbidités (anxiété et dépression) associées aux douleurs inflammatoires.

2. Objectifs

L'objectif principal de cette étude fut de déterminer **l'efficacité de l'inhibition des canaux de type T sur l'anxiété et la dépression** développées dans le cas d'une **douleur inflammatoire chronique**.

Aucune étude ne s'étant intéressée à l'impact de l'invalidation du gène codant le canal Cav3.2 sur l'anxiété et la dépression en condition saine, nous avons tout d'abord « *phénotypé* » les souris KO Cav3.2 vis-à-vis de ces deux aspects cognitifs. Nous avons également couplé à cela une évaluation pharmacologique de l'inhibition des canaux Cav3.2, par le TTA-A2, et plus largement des canaux de type T, par l'éthosuximide, sur les phénomènes d'anxiété et de dépression. Cette première partie d'étude aura pour but d'évaluer l'impact de l'inhibition des canaux Cav3.2 et de type T sur l'état émotionnel des souris en **condition non douloureuse**.

La douleur chronique produit des désordres émotionnels chez les patients et les animaux. Nous avons donc évalué l'effet de l'éthosuximide sur la douleur et les comorbidités associées aux pathologies inflammatoires. Pour cela, le modèle d'inflammation chronique par injection péri-articulaire de CFA dans la patte de l'animal a été choisi pour mimer une pathologie humaine : l'arthrite. L'arthrite est bien connue comme source d'anxiété et de dépression chez les patients atteints^{612,622,623}. Cette étude permettra tout d'abord de rechercher chez l'animal des manifestations comportementales dans des tests considérés comme traduisant des états d'anxiété (*open field*, *elevated plus maze*, *novelty suppress feeding*), ou de dépression (*suspension par la queue*, *nage forcée*, *novelty suppress feeding*). Ensuite, les effets antalgique, anxiolytique et antidépresseur potentiel de l'éthosuximide et du TTA-A2 ont été étudiés.

La finalité de cette étude nous orientera sur l'intérêt potentiel d'utiliser **l'éthosuximide en clinique pour le traitement des douleurs chroniques inflammatoires et leurs comorbidités associées**.

D. PROJET CLINIQUE : ETUDE PILOTE « EDONOT » : EVALUATION DE L'EFFET DE L'ETHOSUXIMIDE CHEZ DES PATIENTS NEUROPATHIQUES D'ORIGINE TRAUMATIQUE

1. Problématique

Actuellement deux **antiépileptiques**, la gabapentine (Neurontin®) et la prégabaline (Lyrica®) sont prioritairement prescrits en tant qu'antalgiques dans le **traitement des douleurs neuropathiques**. Ces composés possèdent le même mode d'action qui est **l'inhibition de la sous-unité $\alpha_2\delta$ des canaux calciques HVA**⁶²⁴⁻⁶²⁷. Malheureusement, ces composés ont un **effet antalgique globalement limité** et peuvent induire des effets indésirables⁶²⁸⁻⁶³⁰. **L'éthosuximide**, autre antiépileptique, **bloqueur des canaux de type T** pourrait, comme évoqué plus haut, présenter un effet thérapeutique ou un *ratio* bénéfice / risque supérieur aux antiépileptiques utilisés habituellement pour le traitement des douleurs neuropathiques. Cette hypothèse repose sur plusieurs arguments :

- De nombreuses études précliniques ont démontré un **effet anti-allodynique et anti-hyperalgique** de l'éthosuximide dans divers modèles animaux de **neuropathies** douloureuses (traumatiques, métaboliques et chimio-induites)^{556-559,591}.
- L'éthosuximide est un **vieux médicament** (AMM en 1960) d'utilisation principalement pédiatrique et surtout ne possédant que **peu d'effets indésirables** notoires.
- Son prix d'achat reste très faible, seulement **7,50 euros** pour un flacon de 200 ml (sirop). Ceci pourrait avoir l'avantage supplémentaire de **réduire les dépenses du patient et de la sécurité sociale** pour le traitement des douleurs neuropathiques.

Ainsi, les résultats précliniques sont suffisants comme preuve de concept. Dans une démarche de recherche translationnelle, nos résultats : 1) Implication des canaux de type T Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol ; 2) Implication des canaux de type T Cav3.2 dans les douleurs chroniques neuropathiques^{581,582,584} et inflammatoires (voir **Projet 2**) ; et l'existence sur le marché d'un inhibiteur des canaux calciques de type T, nous a conduit à décider de réaliser une **étude clinique pilote multicentrique** nommée **EDONOT** (Ethosuximide et **DO**uleur **Neuropathique** d'**O**rigine **T**raumatique) évaluant les effets de l'éthosuximide dans le traitement des douleurs neuropathiques d'origine traumatique.

2. Objectifs

L'objectif principal sera d'évaluer l'efficacité antalgique de l'éthosuximide chez des patients douloureux neuropathiques d'origine traumatique. **L'objectif secondaire** sera d'évaluer l'impact de l'éthosuximide sur la qualité de vie et l'impression globale des patients vis-à-vis du traitement.

Cette étude sera un **essai thérapeutique pilote multicentrique**. Les patients seront traités pendant 42 jours soit par l'éthosuximide soit par un sirop homéopathique inactif sur la douleur. **Six centres investigateurs** dont un centre coordonnateur participeront.

Les critères d'évaluations seront les suivants : 1) le **critère principal** sera la différence (Δ) entre la moyenne de l'intensité douloureuse médiane évaluée quotidiennement par une échelle numérique simple (ENS) lors des 7 derniers jours précédant le début de l'étude (J_0) et la visite de fin d'étude ($J+42$): $\Delta = \text{score ENS } (J_0) - \text{score ENS } (J+42)$; 2) les **critères secondaires** seront :

- Evaluation quotidienne de la douleur moyenne et maximale ressentie (ENS),
- Evaluation de la douleur neuropathique par les questionnaires : Questionnaire d'Evaluation de la Douleur Neuropathique (QEDN) et Questionnaire Concis sur la Douleur (QCD),

- Evaluation de la qualité de vie des patients par le questionnaire *Medical Outcome Study Short Form 12* (MOS-SF12),
- Evaluation de la qualité de sommeil par le questionnaire de Leeds,
- Evaluation quotidienne de la qualité du sommeil et d'endormissement par ENS,
- Evaluation de l'impression globale des patients sur le traitement par le questionnaire *Patient's Global Impression of Change* (PGIC).

Le **nombre de sujets** nécessaire sera de 200 patients avec une puissance de 80% ($\alpha = 0,05$ bilatérale; $\beta = 0,20$, $\delta = 1,0$; $\sigma = 2,5$) et considérant les sorties d'étude à hauteur d'environ 10%, nous prévoyons de présélectionner **220 patients**, soit 110 patients par groupe.

L'étude se déroulera comme suit :

- **Recrutement** : Les patients suivis dans leur centre référent pour le traitement de la douleur sont sélectionnés par les médecins du centre. Le médecin investigateur les contactera afin de leur présenter le but de l'étude et prendre rendez-vous pour l'inclusion.
- **Visite d'inclusion (J-6)** : Remplissage des divers questionnaires et formulaires.
- **Début d'étude (Jo)** : Sept jours plus tard (Jo), appel du patient pour quantifier l'intensité moyenne de sa douleur ressentie au cours des 7 derniers jours à l'aide d'une ENS depuis la visite d'inclusion (J-6). Suite à cela, le patient est inclus ou non puis randomisé.
- **Période de Jo à J+42** : Ambulatoire à domicile, la prise du traitement (2 prises journalières pendant les repas) sera faite selon une posologie croissante, le patient devra effectuer un remplissage quotidien du carnet de suivi (douleur, endormissement/sommeil et évènements indésirables) et des appels téléphoniques seront effectués tous les 4 jours par l'attaché de recherche clinique rattaché au projet pour le recueil des évènements indésirables et le rappel de la posologie.
- **Visite de suivi à J+42 et fin d'étude** : Remplissage des divers questionnaires et formulaires et prise de sang pour un dosage plasmatique d'éthosuximide.



William Shirley
Gansevoort, New York
"Jon's Bad Day"

wood-fired ceramic

10 inches long x 5 inches wide x 3 inches deep

On November 7th of 2000 my son was driving to work in Prescott Arizona in his old VW van. A pickup truck smashed into the front of the van and my son was ejected through the windshield and into a coma. He has been locked-in for some years now after having first nearly died in a nursing home in Phoenix and then flown by hospital jet to Kingston New York to the only facility that would accept him in his state. We live 100 miles north of Kingston and I have a degenerative disc disease, bone spurs, arthritis, herniated discs and crushed vertebrae. When Jon was first brought up I would visit him every other day. I'd take my pain meds, drop my wife off at her office in Albany and then drive on to Kingston and stay with Jon for a few hours before taking more pain meds and driving home. I kept this up until between the pain and the drowsiness from the meds I had to cut back to weekly visits and then every few weeks. The pain got worse, Jon got worse. I would dose up, drive as far as I could until I had to pull over and walk off the pain, drive the rest of the way down to Kingston and then stay with Jon trying to get him to respond to my voice or touch. After a few hours where he would occasionally look right at me I'd have to take more meds and drive home as far as the pain would allow and then I would pull over and cry for awhile. On bad days Jon and I would cry together. To deal with his pain and mine I began coming home and going straight to the studio and try to make something out of it all. "Jon's Bad Day" is one of the results. I have approximately 30 masks relating to Jon and our pain.

RESULTATS

ARTICLE 1 :

*Cav3.2 calcium channels: the key protagonist
of the supraspinal effect of acetaminophen*

(en révision)

VI. ARTICLE 1 : Cav3.2 calcium channels: the key protagonist of the supraspinal effect of acetaminophen**CANAUX CALCIQUES CAV3.2: L'ACTEUR CLE DE L'EFFET SURPASPINAL DU PARACETAMOL.**

N. Kerckhove^{a,b}, C. Mallet^{a,b}, A. François^{d,e,f,g}, M. Boudes^h, J. Chemin^{d,e,f,g}, T. Voets^h, E. Bourinet^{d,e,f,g}, A. Alloui^{a,b}, A. Eschalier^{a,b,c}

Affiliations des auteurs:

(a) Clermont Université, Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France, (b) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1107 NEURO-DOL, Clermont-Ferrand, France (c) Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France, (d) Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, France, (e) CNRS UMR5203, Montpellier, France, (f) INSERM, U661, Montpellier, France, (g) IFR3 Universités Montpellier I&II, Montpellier, France, (h) Laboratory of Ion Channel Research, Department of Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium.

Correspondant: Alain Eschalier, alain.eschalier@udamail.fr, +33 (0)4 73 17 82 30, fax: +33 (0)4 73 27 71 62

A. RESUME

Pour exercer son action antalgique, le paracétamol nécessite une métabolisation complexe pour produire un composé apparenté aux lipoaminoacides, spécifiquement au niveau cérébral, l'AM404, qui cible les récepteurs supraspinaux TRPV1. Les lipoaminoacides sont connus pour induire une antalgie par inhibition des canaux de type T (Cav3.2). Dans cette étude, nous montrons que l'effet antinociceptif du paracétamol est perdu chez la souris lorsque les canaux Cav3.2 supraspinaux sont inhibés. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse d'une relation supraspinale entre les canaux Cav3.2 et les récepteurs TRPV1 supraspinaux, via l'AM404, pour induire l'effet antalgique du paracétamol. L'AM404 est capable d'activer le TRPV1 et d'inhiber faiblement le Cav3.2. Fait intéressant, l'activation du TRPV1 induit une forte inhibition du courant Cav3.2. Appuyant cela, l'administration intracérébroventriculaire d'AM404 ou de capsaïcine produit une antinociception qui ne se retrouve pas chez les souris KO Cav3.2. Notre étude, pour la première fois, (1) fournit un mécanisme moléculaire de l'effet antinociceptif supraspinal du paracétamol, (2) identifie la relation entre TRPV1 et Cav3.2 et (3) révèle l'inhibition supraspinale de Cav3.2 comme une stratégie pharmacologique potentielle pour soulager la douleur.

B. INTRODUCTION

Le paracétamol (acétyl-para-aminophénol; AcAP) est l'antalgique et l'agent antipyrétique le plus largement utilisé à travers le monde. Néanmoins, son mécanisme antalgique reste insaisissable et son métabolisme est très complexe. Les études concernant les métabolites de l'AcAP se focalisent essentiellement sur leurs actions toxiques, notamment par les composés hépatotoxiques comme le p-benzoquinone (p-BQ) et le N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI). Récemment, nous avons proposé qu'une nouvelle voie métabolique, précédemment décrite par Högestätt et coll.³⁰, serait impliquée dans son action antalgique. L'AcAP est métabolisé en p-aminophénol, qui est lui-même métabolisé dans le cerveau par l'enzyme FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*) en N-(4-hydroxy)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide (AM404), qui est capable d'induire un effet antalgique chez l'animal¹⁰⁰. Fait intéressant, ce métabolite actif est structurellement lié aux lipoaminoacides, une nouvelle classe de médiateurs lipidiques impliqués dans la modulation de la douleur^{206,215}.

Les membres de la famille des lipoaminoacides, comme l'anandamide (N-arachidonoyl-éthanolamide) et le 2-AG (2-arachidonoyl-glycérol), interagissent avec plusieurs cibles, y compris les récepteurs aux cannabinoïdes^{204,313} et le récepteur TRPV1^{141,206,312}, deux principaux acteurs impliqués dans la modulation de la douleur et dans l'action antalgique de l'AcAP^{100,131}. Mais curieusement, ces lipoaminoacides sont également capables d'inhiber fortement les canaux calciques de type T, en particulier le membre Cav3.2, effet expliquant leur propriété antalgique⁴⁶⁷.

Les canaux calciques de type T ont la caractéristique exclusive d'être activés par de faible dépolarisation, proche du potentiel de membrane au repos, leur conférant un rôle dans la modulation de l'excitabilité cellulaire⁵²⁶. Dans le système nerveux central, les canaux calciques de type T participent à l'épilepsie^{631,632}, aux décharges de potentiel d'action⁵²⁶, aux ondes lentes des phases du sommeil⁶³³ et à la perception douloureuse^{580,581,634}. Trois canaux calciques de type T, Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3, ont été décrits⁵²⁶. Parmi eux, les canaux Cav3.2 sont exprimés dans les neurones de petits et moyens diamètres des ganglions de la racine dorsale (DRG), dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière et dans plusieurs structures du cerveau⁶³⁵. Chez l'animal sain et neuropathique, nous avons montré que l'inhibition des canaux Cav3.2, par des antagonistes ou des oligonucléotides antisens, réduit les réactions nociceptives et l'hyperalgésie^{532,581}. Enfin, les souris *knock-out* Cav3.2 affichent une déficience importante dans la

perception de la douleur, ceci dans plusieurs tests nociceptifs confirmant le rôle important de ce canal dans la nociception^{58o}.

Considérant que l'AM404, composé proche des lipoaminoacides, est le métabolite actif de l'AcAP³⁰ et que les lipoaminoacides sont capables d'inhiber les canaux Cav3.2 pour moduler la nociception⁴⁶⁷, nous avons supposé que les canaux Cav3.2 pourraient être impliqués dans le mécanisme d'action antalgique de l'AcAP. Dans cette étude, nous avons étudié cette implication des canaux Cav3.2 en utilisant des stratégies génétiques (souris Cav3.2 *knock-out*) et pharmacologiques (antagoniste Cav3, TTA-A2) chez des souris soumises à divers tests nociceptifs et conditions pathologiques.

De plus, Zygmunt et coll.¹⁴¹ ont montré que l'AM404 est également un agoniste TRPV1. Nous avons déjà démontré que le TRPV1 exprimé dans le cerveau est un acteur essentiel à l'action antalgique du paracétamol¹⁰⁰. La double implication présumée du récepteur TRPV1 supraspinal et des canaux Cav3.2 dans l'action de l'AcAP nous a amené à étudier l'interaction entre ces deux protagonistes. Cette collaboration potentielle a été étudiée par une approche comportementale en utilisant des souris génétiquement modifiées (souris Cav3.2 ou TRPV1 *knock-out*) et par une stratégie pharmacologique (TTA-A2). Nous avons également utilisé des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie calcique pour étudier le mécanisme de l'interaction fonctionnelle entre les canaux Cav3.2 et les récepteurs TRPV1.

Nos résultats démontrent, pour la première fois, que le canal Cav3.2 supraspinal agit avec le récepteur TRPV1 pour soutenir l'action antalgique de l'AcAP et, par conséquent, devient une cible potentielle pour le développement de nouveaux antalgiques.

C. RESULTATS

1. Le paracétamol échoue à produire un effet antalgique chez les KO Cav3.2.

Une dose de paracétamol (AcAP, 200 mg/kg, *per os*) ou de véhicule (solution saline) a été administrée à des souris KO Cav3.2 (*Cav3.2^{-/-}*) et leurs littermates (*Cav3.2^{+/+}*). Différents tests nociceptifs mettant en jeu les trois stimuli fondamentaux (thermique, chimique et mécanique), ont été utilisés chez des animaux sains : immersion de la queue à 46°C, formol (2,5%, phase 1 : 0-5 min et phase 2 : 15-40 min) et test de von Frey (filament 1,4 g). Chez les souris *Cav3.2^{+/+}*, l'AcAP

augmente la latence de retrait de la queue dans le test d'immersion de la queue (véhicule : $7,69 \pm 0,60$ s et AcAP : $16,04 \pm 0,49$ s, $p < 0,001$) (Figure 24a). En outre, l'AcAP a diminué le nombre de retrait de la patte (PWR) dans le test de von Frey (véhicule : $3,38 \pm 0,18$ PWR et AcAP : $2,57 \pm 0,20$ PWR, $p < 0,01$) (Figure 24b) et le temps de léchage lors de la première phase (véhicule : 135 ± 11 s et AcAP : 72 ± 12 s, $p < 0,001$) et la deuxième phase (véhicule : 241 ± 31 s et AcAP : 61 ± 18 s, $p < 0,001$) du test au formol (Figure 24c). Dans les mêmes tests effectués chez les souris *Cav3.2^{-/-}*, l'AcAP n'est pas en mesure de modifier les scores douloureux comme obtenu chez les animaux témoins démontrant que l'action antalgique du paracétamol a été abolie lorsque le canal Cav3.2 a été supprimé (Figures 24a, b et c). Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle de douleur inflammatoire induite par l'injection péri-articulaire d'adjuvant complet de Freund dans la patte arrière gauche (modèle CFA). En effet, l'hyperalgie thermique (véhicule : $3,88 \pm 0,23$ s et AcAP : $10,03 \pm 0,75$ s, $p < 0,05$) (Figure 24d) et mécanique (véhicule : $4,5 \pm 0,19$ PWR et AcAP : $2,13 \pm 0,48$ PWR, $p < 0,01$) (Figure 24e) ont été réduites par l'AcAP chez les animaux *Cav3.2^{+/+}*, alors qu'il n'a produit aucun effet chez les souris *Cav3.2^{-/-}*.

Comme montré précédemment⁵⁸⁰, l'invalidation des canaux Cav3.2 atténue les réactions comportementales vis-à-vis de *stimuli* nocifs (ici mécanique et thermique principalement) (Figure 24). De ce fait, l'effet antalgique de l'AcAP pourrait être masqué par le phénotype hypoalgique manifesté par les souris *Cav3.2^{-/-}*, ce qui induirait un biais dans nos expériences. Nous avons donc évalué l'efficacité antalgique d'un autre antalgique (morphine, Mor, 2 mg/kg s.c.).

En accord avec la littérature^{467,636}, la morphine produit un effet antalgique significatif chez les souris *Cav3.2^{-/-}* et *Cav3.2^{+/+}* dans les tests utilisés (immersion de la queue, von Frey et formol) chez des souris saines ou dans le modèle au CFA (immersion de la patte et von Frey) (Figure 24).

Tous ces résultats identifient le nouveau rôle des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol.

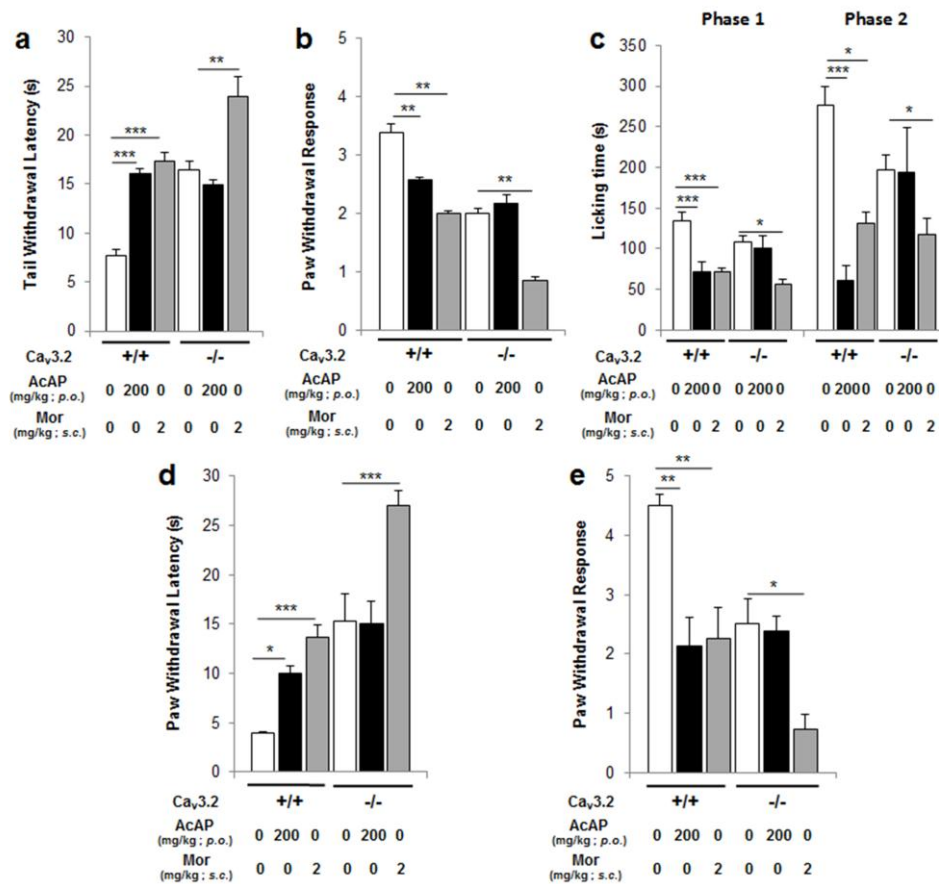


Figure 24 : Perte de l'effet antalgique du paracétamol chez les souris KO Cav3.2. L'effet antalgique du paracétamol (AcAP, 200 mg/kg per os) a été évalué par: (a) immersion de la queue, (b, e) von Frey, (c) formol et (d) immersion de la patte chez des KO Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) et WT (Cav3.2^{+/+}). L'immersion de la patte, de la queue et le test de von Frey ont été effectués 45 minutes après l'administration d'AcAP ou de morphine (Mor, 2 mg / kg s.c.) et 20 minutes avant l'injection de formol. Pour le modèle de douleur inflammatoire, un modèle de monoarthrite a été induit par une injection péri-articulaire de CFA dans la patte arrière. L'immersion de patte et le test de von Frey ont été effectués 7 jours après l'injection CFA et 45 minutes après l'administration des drogues. Les valeurs de base ont été réalisées au jour 0 et le 7ème jour avant les injections des drogues (données non présentées). Le groupe Mor a été utilisé comme groupe témoin positif. Dans tous les tests et conditions, l'AcAP n'induit pas d'effet antalgique chez les souris Cav3.2^{-/-}. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; par rapport aux groupes véhicule.

2. Les canaux Cav3.2 supraspinaux sont nécessaires à l'effet du paracétamol.

Aucun consensus n'est établi concernant le site d'action de l'AcAP. Même si quelques auteurs déclarent un site d'action périphérique^{98,108,109}, plusieurs autres équipes et nous même avons mis en relief plusieurs arguments en faveur pour d'un site d'action central^{96,97,100,103,131,637}. Dans ce même état d'esprit, nous avons émis l'hypothèse d'une implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans l'effet antalgique de l'AcAP. Récemment, une nouvelle classe d'antagonistes des canaux calciques de type T (famille des TTAs) a été découverte⁵⁶¹ et inclut le TTA-A2, le composé actuel le plus spécifique⁵³². L'impact du TTA-A2, administré par voie i.c.v., sur l'effet de

l'AcAP ou de la morphine, a été évalué pour déterminer l'implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans leurs effets antalgiques, à la fois chez des souris saines et dans un contexte inflammatoire (modèle CFA). La première observation fut que l'injection de TTA-A2 (12 µg, i.c.v.) induit un effet antinociceptif durant la phase 1 (véhicule : 109 ± 8 s et TTA-A2 : 72 ± 7 s, $p < 0,01$) et la phase 2 (véhicule : 193 ± 18 s et TTA-A2 : 93 ± 20 s, $p < 0,01$) du test au formol (Figure 25a) et dans le test de von Frey (véhicule : 3,9 ± 0,4 PWR et TTA-A2 : 2,6 ± 0,2 PWR, $p < 0,01$) (Figure 25b), sans induire d'effet sédatif (Figure supplémentaire S1). Ces résultats indiquent, pour la première fois, que l'inhibition supraspinale des canaux Cav3.2 peut spécifiquement réduire le comportement douloureux en réponse à une stimulation nocive. Ensuite, chez des souris soumises aux tests du formol (Figure 25a) et de von Frey (Figure 25b), la co-administration de TTA-A2 (i.c.v.) et d'AcAP (*per os*) ne produit pas d'effet antalgique significativement différent en comparaison de l'effet du TTA-A2 et de l'AcAP seul (Figures 25a et b). *A contrario*, la co-administration de TTA-A2 ou de morphine (1 mg/kg, *s.c.*) produit un effet antalgique significativement plus prononcé que l'effet de ces mêmes drogues injectées seules (Figures 25a et b). Ces résultats montrent que les canaux Cav3.2 supraspinaux sont impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol alors qu'ils ne le sont pas dans celui de la morphine.

En parallèle, l'action spécifique du TTA-A2 sur les canaux Cav3.2 a été testée par l'évaluation de son effet antalgique par voie i.c.v. chez les souris Cav3.2^{-/-} dans le test au formol. Aucun effet antalgique du TTA-A2 n'a été observé dans la phase 1 (véhicule : 68 ± 9 s et TTA-A2 : 56 ± 14 s) et dans la phase 2 (véhicule : 106 ± 12 s et TTA-A2 : 109 ± 23 s) (Figure supplémentaire S2), confirmant l'action spécifique de ce composé sur les canaux Cav3.2.

Les canaux Cav3.2 sont également exprimés dans la moelle épinière⁵⁶⁷ et l'antalgie induite par l'AcAP implique des récepteurs spinaux^{97,98,101,306}. Une potentielle implication des canaux Cav3.2 spinaux dans l'action de l'AcAP a été étudiée par l'évaluation de son effet antalgique chez des animaux sauvages soumis au test du formol et traités par du TTA-A2 (12 µg, *i.t.*). Le TTA-A2 induit un effet antalgique dans la phase 1 (véhicule : 106 ± 12 s et TTA-A2 : 65 ± 9 s, $p < 0,001$) et la phase 2 (véhicule : 255 ± 19 s et TTA-A2 : 119 ± 29 s, $p < 0,001$) du test au formol (Fig. 29c), confirmant que l'inhibition spinal des canaux Cav3.2 induit une antalgie⁵⁸¹. De manière intéressante, la co-administration de TTA-A2 avec l'AcAP (200 mg/kg, *p.o.*) induit un effet antalgique significativement plus fort que les deux produits injectés seuls. Le même résultat est obtenu avec la co-administration de morphine (1 mg/kg, *s.c.*) et de TTA-A2 (Fig. 27c). Cette expérience a démontré que les canaux Cav3.2 spinaux n'étaient pas impliqués dans l'effet antalgique de l'AcAP (et de la morphine).

Ensemble, ces résultats démontrent que les canaux Cav3.2 supraspinaux (et non spinaux) sont essentiels à l'effet antalgique de l'AcAP. De plus, ils montrent que l'inhibition spécifique des canaux Cav3.2 au niveau supraspinal et spinal induit un effet antalgique.

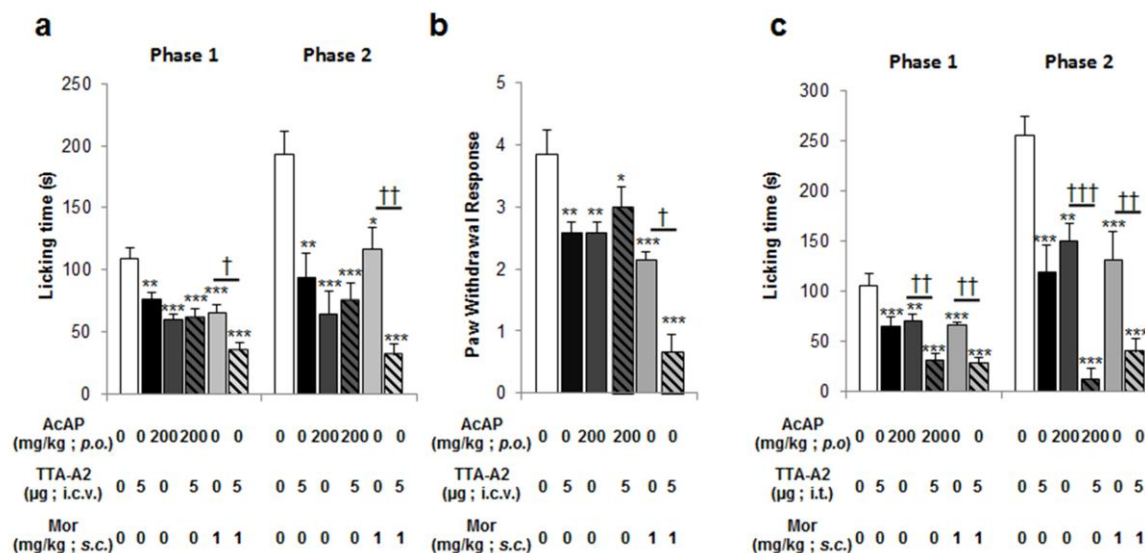


Figure 25 : Les canaux Cav3.2 supraspinaux sont impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol. L'implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans l'effet du paracétamol a été spécifiquement étudié par l'inhibition cérébrale (a, b) et spinale (c) des canaux Cav3.2. Les injections i.c.v. ou i.t. de TTA-A2 ont été réalisées et leur impact, sur l'effet antalgique du paracétamol, évalué. L'effet de la co-administration de TTA-A2 (5 µg / 2 µl i.c.v. et 5 µg / 5 µl i.t.) et de paracétamol (AcAP; 200 mg/kg per os) ou de morphine (Mor; 1 mg / kg s.c.) a été évalué dans : (a, c) le test du formol et (b) de von Frey. Ces tests ont été effectués respectivement 20 et 45 minutes après les injections des drogues. Le TTA-A2, l'AcAP et la Mor produisent une analgésie dans les deux tests. La co-administration de TTA-A2 + AcAP n'affiche pas d'effet antalgique supérieur à l'AcAP seul lors de l'injection i.c.v. de TTA-A2 contrairement à l'injection i.t.. La co-administration de TTA-A2 + Mor par rapport à la Mor seule provoque un effet antalgique fort que ce soit lors d'une injection i.c.v. et i.t. de TTA-A2. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, P < 0,001 comparé au groupe véhicule; †, p < 0,05; ††, p < 0,01; †††, p < 0,001 comparé au groupe TTA-A2 + Mor.

3. L'AM404, requiert les canaux Cav3.2 pour induire son effet antalgique

Une nouvelle voie métabolique du paracétamol a été récemment découverte³⁰. Après ingestion, le paracétamol est métabolisé en *p*-aminophénol dans le foie. Ce composé est associé dans le cerveau avec l'acide arachidonique par l'enzyme *fatty-acid-amine-hydrolase* (FAAH) qui donne naissance à l'AM404³⁰. L'AM404 a été montré comme responsable de l'effet antalgique de l'AcAP¹³¹ et appartenant à la famille des endocannabinoïdes, qui inclut l'anandamide, capable d'activer les récepteurs TRPV1⁴⁵⁹ et d'inhiber les courants Cav3.2⁴⁶⁷. Pour démontrer un potentiel lien *in vivo* entre l'AM404 et les canaux Cav3.2, l'effet antalgique de l'AM404 (2 µg, i.c.v.) a été évalué chez des souris Cav3.2^{-/-} and Cav3.2^{+/+}.

L'injection d'AM404 induit un effet antalgique chez les souris *Cav3.2^{+/+}* dans la première phase du test au formol (véhicule : 85 ± 10 s et AM404 : 47 ± 10 s; $p < 0,01$) (Figure 26a) et dans le test de von Frey, 7 jours après l'injection péri-articulaire de CFA (véhicule : $4,86 \pm 0,14$ PWR et AM404 : $2,75 \pm 0,31$ PWR; $p < 0,01$) (Figure 26b). Dans les mêmes tests, aucune action antalgique de l'injection i.c.v. d'AM404 n'a été observée chez les souris *Cav3.2^{-/-}* (Figure 26).

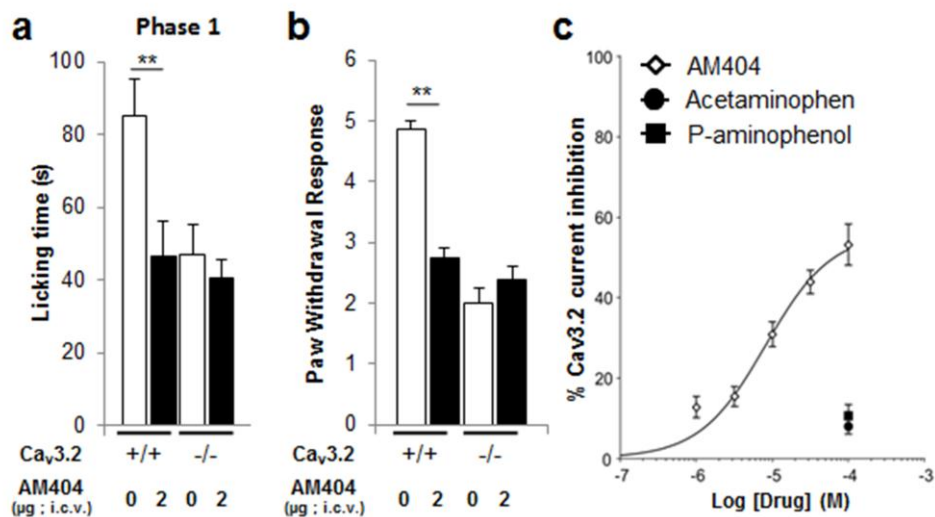


Figure 26 : Les canaux Cav3.2 sont inhibés par l'AM404 et sont essentiel à son action antalgique. La relation entre l'AM404 et les canaux Cav3.2 a été évaluée par une approche *in vitro* (whole-cell patch clamp) et *in vivo* (formol et von Frey). Dans les tests de comportements, l'effet antalgique de l'AM404 (2 µg / 2 µl, i.c.v.) a été évalué dans (a) la phase 1 du test au formol et (b) dans le test de von Frey chez des animaux *Cav3.2^{-/-}* et *Cav3.2^{+/+}*. Ces tests ont été effectués 10 minutes après l'injection d'AM404. Dans tous les tests, l'AM404 ne produit pas d'antalgie chez les souris *Cav3.2^{-/-}* contrairement aux souris *Cav3.2^{+/+}*. (c) Courbe dose-réponse de l'AM404 sur les courants Cav3.2 (n = 6-8, losanges ouverts). Les courants ont été provoqués par une dépolarisation de -75 mV à -30 mV (durée 200 ms) appliquée toutes les 5 s. L'AM404 est capable d'inhiber partiellement et faiblement les courants Cav3.2 ($EC_{50} = 13,67$ M). Le paracétamol (cercle plein) et le p-aminophénol (carré plein) sont presque inactifs dans des conditions similaires (inhibition à 100 µM : $8 \pm 2\%$ et de $10,5 \pm 2,5\%$ respectivement pour le paracétamol et le p-aminophénol). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 6-8).

Nous avons, en plus, examiné sur culture de neurones de DRG l'action de l'AM404 sur les courants Cav3.2 par la méthode du « whole-cell patch clamp ». Contrairement au paracétamol et au p-aminophénol, qui n'inhibent pas les courants Cav3.2, l'AM404 inhibe faiblement ces courants avec une forte $EC_{50} = 13,67$ µM (Figure 26c), en comparaison de l'inhibiteur TTA-A2 ($EC_{50} = 8,99$ nM)⁵³². Ces résultats démontrent une faible action directe de l'AM404 sur les canaux Cav3.2.

4. Récepteur TRPV1 et canal Cav3.2 : preuve d'une relation fonctionnelle.

Comme précédemment évoqué, l'AM404 est aussi connu comme étant un agoniste TRPV1³⁵⁵. Dans une étude précédente, nous avons démontré que l'AcAP, via l'AM404, activait les récepteurs TRPV1 supraspinaux pour induire son effet antalgique¹⁰⁰. Utilisant la technique

d'imagerie calcique sur des cellules HEK transfectées avec ou sans le récepteurs TRPV1, nous avons montré que l'AM404 (10 μM) induisait une forte entrée de calcium intracellulaire dépendante du TRPV1 (Figure 27a). L'AM404 est aussi efficace que la capsaïcine (0,5 μM) et induit une réponse dans toutes les cellules capsaïcine sensibles. Dans ces conditions, nous avons aussi démontré que le *p*-aminophénol (10 μM) induisait une mobilisation du calcium, bien que moins efficacement que l'AM404 ou la capsaïcine (Figure 27b). Cet effet résulte de l'effet local de la production d'AM404 (transformation du *p*-aminophénol par les cellules HEK qui expriment constitutivement la FAAH⁶³⁸). En effet, l'effet du *p*-aminophénol est perdu après un traitement avec un inhibiteur de la FAAH (PMSF, 10 μM ; Figure 27b). Comme après une application directe exogène d'AM404, la mobilisation calcique observée dépend du TRPV1, comme démontré par son inhibition si association du *p*-aminophénol avec l'antagoniste TRPV1 (capsazépine, CAPZ, 20 μM ; Figure 27b, Figure supplémentaire SI 3) ou de cellules non transfectées avec le récepteur TRPV1 (Figure 27b). Ces expériences confirment que l'AM404 est capable d'activer le TRPV1 et que, comme suggéré par nos précédents résultats *in vivo*¹⁰⁰, le *p*-aminophénol a besoin d'être métabolisé par la FAAH (en AM404) pour activer ce récepteur.

Le fait que les récepteurs TRPV1 et les canaux Cav3.2 soient impliqués dans l'action antalgique du paracétamol et de son métabolite actif, l'AM404, nous amène à étudier le potentiel lien fonctionnel entre ces deux protéines. Pour cela, l'effet de l'activation supraspinale des récepteurs TRPV1 est étudié par l'utilisation d'injection de capsaïcine (Cap, 10 μg i.c.v.) chez des souris Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+} dans le test au formol et de von Frey en condition saine ou inflammatoire (modèle CFA). Nous avons tout d'abord démontré que l'effet antalgique induit par la capsaïcine impliquait spécifiquement le récepteur TRPV1 en montrant l'inhibition totale de cet effet en présence de capsazépine (CAPZ, 10 μg i.c.v.) (Figure supplémentaire S4).

De plus, alors que chez des souris Cav3.2^{+/+} une injection supraspinal de capsaïcine induit un effet antalgique dans la première (véhicule : 88 \pm 9 s et Cap : 42 \pm 13 s, $p < 0,01$) et la seconde phase (véhicule : 231 \pm 24 s et Cap : 127 \pm 30 s, $p < 0,05$) du test au formol (Figure 28a) et dans le test de von Frey (véhicule : 4,86 \pm 0,14 PWR et Cap : 2,5 \pm 0,46 PWR, $p < 0,01$) (Figure 28b), nous avons montré que la capsaïcine n'avait aucun effet antalgique chez les souris Cav3.2^{-/-} (Figures 28a, b). Inversement, l'effet antalgique de l'injection i.c.v. de TTA-A2 est maintenu chez des souris KO TRPV1 (TRPV1^{-/-}) dans la première (véhicule : 92 \pm 11 s et TTA-A2 : 34 \pm 7 s, $p < 0,001$) et la seconde phase (véhicule : 145 \pm 17 s et TTA-A2 : 58 \pm 9 s, $p < 0,01$) du test au formol (Figure 28c).

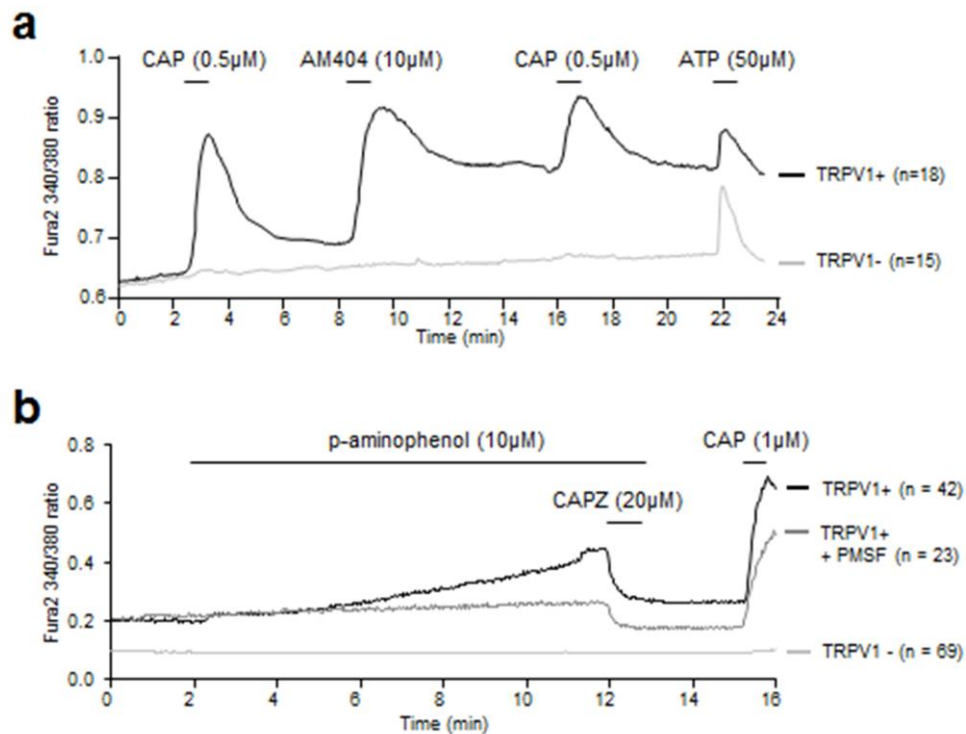


Figure 27 : L'AM404 et la métabolisation du p-aminophénol dépendante de la FAAH sont des activateurs du TRPV1. (a) Évolution dans le temps de l'élévation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK transfectées avec (traces noires, n = 18) ou sans le récepteur TRPV1 (traces grises, n = 17) montrant que l'application de capsaïcine (0,5 μM) ou d'AM404 (10 μM) suscite une élévation de calcium intracellulaire « médiée » par l'activation du TRPV1. Le PMSF (10 μM) a été appliqué dans toutes les expériences afin de bloquer la dégradation de l'AM404 par la FAAH. L'élévation intracellulaire de calcium lors de l'application de 50 μM d'ATP à la fin du protocole indique que toutes les cellules (contrôle et TRPV1 transfectées) ont été effectivement chargées avec la sonde sensible au calcium Fura2. (b) L'application du p-aminophénol augmente le rapport Fura2 340/380 dans les cellules HEK293 exprimant le TRPV1, contrairement aux cellules non transfectées, ou en présence de l'antagoniste de la FAAH, le PMSF (10 μM).

Ces résultats révèlent que l'effet antalgique induit par l'activation supraspinale des récepteurs TRPV1 nécessite les canaux Cav3.2 et suggèrent que ces deux protagonistes pourraient être impliqués séquentiellement. En effet, la perte de l'effet antalgique de la capsaïcine chez les *Cav3.2^{-/-}* et le maintien de celui du TTA-A2 chez les souris *TRPV1^{-/-}* suggère que les canaux Cav3.2 seraient localisés en aval des récepteurs TRPV1 et inhibés après l'activation du TRPV1, par exemple par l'AM404.

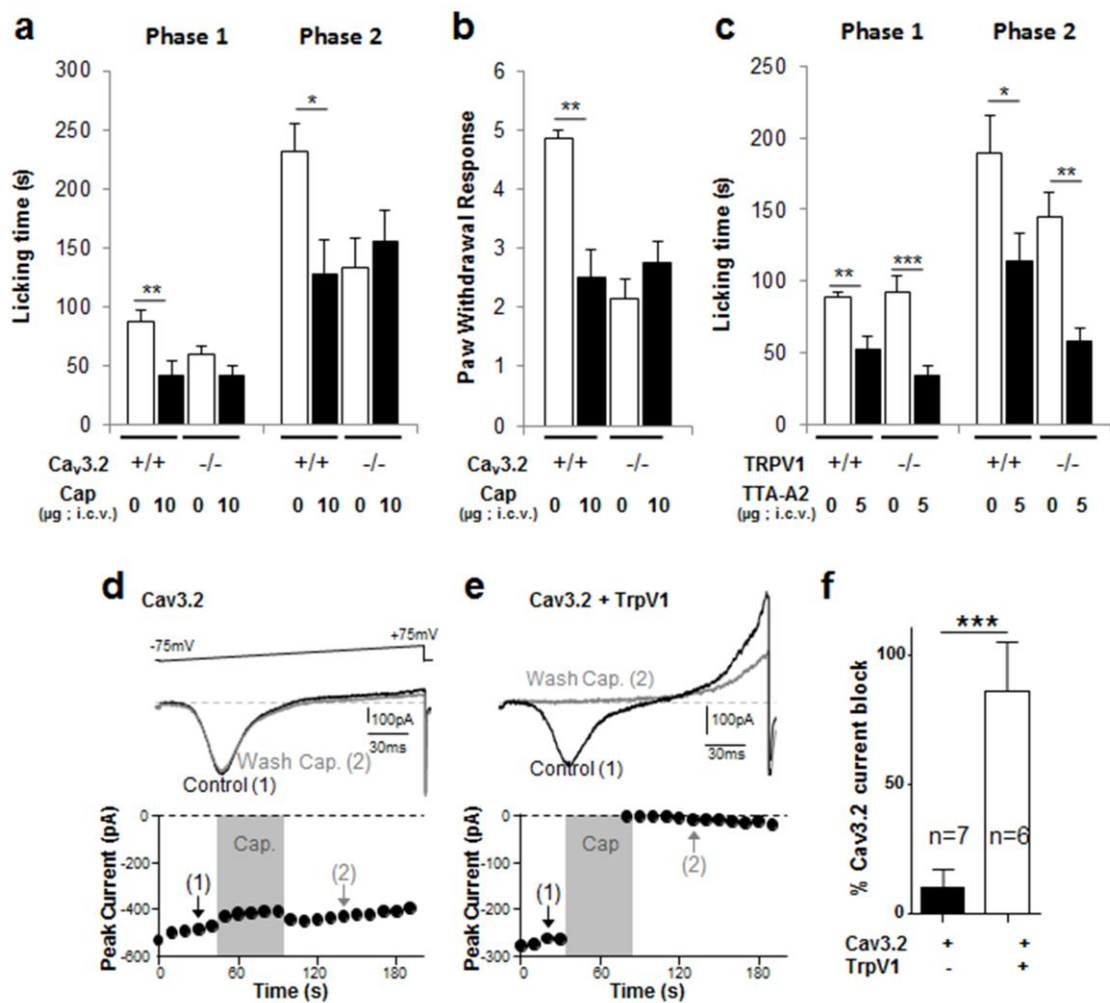


Figure 28 : Relation entre le canal Cav3.2 et le récepteur TRPV1. L'effet antalgique de la capsaïcine (CAP, 10 µg / 2 µg, i.c.v.) a été évalué dans le test (a) au formol (2,5%) et (b) de von Frey chez des souris Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+}. L'effet antalgique du TTA-A2 (5 µg / 2 µM, i.c.v.) a été évalué dans (c) le test au formol chez des souris TRPV1^{-/-} et leurs littermates sauvages (TRPV1^{+/+}). Ces tests ont été effectués 10 minutes après l'injection de capsaïcine ou de TTA-A2. Dans tous les tests, la capsaïcine n'a pas réussi à produire une antalgie chez les souris Cav3.2^{-/-} contrairement aux souris Cav3.2^{+/+}. Le TTA-A2 a gardé son effet antalgique chez les souris TRPV1^{-/-}. (d) Représentation des traces de courants Cav3.2 évoqués par une dépolarisation de -75 mV à +75 mV (200 ms), en conditions de contrôle (trace noire) et pendant le lavage de 1 µM de capsaïcine (trace grise) sur cellule HEK exprimant le Cav3.2 seul. L'évolution du courant maximal entrant évoqué par la rampe de dépolarisation au cours de la durée de l'expérience est tracée sur la partie inférieure. Les points de temps étiquetés comme (1) et (2) correspondent à la courbe contrôle et wash cap respectivement. (e) Même représentation que pour (d) cette fois pour une cellule HEK exprimant le canal Cav3.2 et le TRPV1. Notez que dans ce cas, le courant Cav3.2 est presque aboli après stimulation du TRPV1 par la capsaïcine (2). (f) Moyenne de l'inhibition des courants Cav3.2 après application de capsaïcine 1 µM avec co-expression de TRPV1 (histogramme noir) ou non (histogramme blanc). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 par rapport aux groupes véhicules (comportement) ou avec ou sans TRPV1 (électrophysiologie).

Par conséquent, *in vitro*, nous avons utilisé des cellules HEK recombinantes exprimant de façon stable les canaux Cav3.2 et transfectées avec ou sans les récepteurs TRPV1 pour tester les effets de son activation sur les courants Cav3.2. Les courants ont été enregistrés à partir d'un potentiel de maintien de -75 mV pour être proche des potentiels de repos normaux des neurones. Ceci permet de maintenir les canaux de type T dans un état partiellement inactivé ce qui les rend

préférentiellement sensibles aux modulations pharmacologiques^{467,532}. En outre, nous avons utilisé un protocole de rampe (-75 à +75 mV) pour visualiser simultanément les relations courant / tension exprimées par les canaux Cav3.2 et les récepteurs TRPV1 (en cas de co-expression). Dans ces conditions, la capsaïcine a un effet inhibiteur limité et entièrement réversible sur l'activité des canaux Cav3.2 en l'absence de TRPV1 (Figure 28d). En revanche, lorsque les récepteurs TRPV1 sont co-exprimés, les courants Cav3.2 sont puissamment inhibés lors de l'application de capsaïcine (Figure 28e). A noter que l'inhibition par la capsaïcine était presque irréversible même après lavage. L'activité basale des récepteurs TRPV1 masque les courants Cav3.2 lors de l'application de capsaïcine, de ce fait, il n'était pas possible de tracer l'amplitude du courant de type T lors de l'application de la drogue. En revanche, l'activation du récepteur TRPV1 conduit à une relation linéaire courant / tension et à l'augmentation des courants entrants et sortants à -75 et +75 mV (présenté dans la Figure complémentaire S5). Ces expériences montrent que la capsaïcine évoque un courant seulement lorsque le TRPV1 est exprimé. Toutes ces expériences mises en commun ont montré que la capsaïcine était capable d'induire une inhibition des canaux Cav3.2 via l'activation des récepteurs TRPV1 (Figure 28f). Enfin, chez des cellules HEK exprimant fortement les récepteurs TRPV1, le récepteur TRPV1 possède une activité tonique évidente observée lors des enregistrements. Dans ces cellules, l'activité des canaux Cav3.2 était indétectable suggérant leur inhibition tonique par l'activité basale des récepteurs TRPV1 dans l'incubateur de culture cellulaire.

D. MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Des souris *knock-out* Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}, 20-25 g, mâle) et TRPV1 (TRPV1^{-/-}, 20-25 g, mâle), à l'origine générées respectivement par Chen CC et coll.⁶³⁹ et Caterina et coll.⁴²⁸, et leurs littermates sauvages (Cav3.2^{+/+}, TRPV1^{+/+}, 20-25 g, mâle) ont été utilisées. Toutes les expériences ont été effectuées avec l'approbation du Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CEMEA Auvergne; nr: CE 53-12, CE 112-12, CE 24 à 11, CE 13 – 10) et par le Comité d'éthique du IASP. Les animaux ont été logés dans des conditions environnementales contrôlées (21-22°C, 55% d'humidité) et maintenus sous un cycle lumière / obscurité 12 / 12 h. La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*. Les animaux ont été euthanasiés au CO₂.

2. Etudes comportementales

Les animaux ont été habitués aux tests et / ou à l'enceinte du test avant l'expérimentation. L'expérimentation et l'administration des drogues ont été effectuées en aveugle du génotype des souris et des traitements. L'administration des drogues a été réalisée par une autre personne que l'expérimentateur.

a. Immersion de la patte et de la queue

Les souris ont été habituées à la manipulation pendant trois jours, une semaine avant le test. La queue ou la patte de la souris est immergée dans de l'eau chaude (46°C). La latence de réponse à la stimulation thermique, traduite par une flexion vigoureuse de la queue ou de la patte, a été mesurée trois fois et moyennée. Le cut-off est de 30 secondes, après quoi le membre immergé a été retiré du bain indépendamment de la réponse.

b. Test au formol

Les souris ont été acclimatées à la chambre en plexiglas (30 cm x 30 cm x 30 cm) pendant au moins 30 minutes avant le test. Le formol (20 µl, 2,5% de formol dans une solution saline) a été injecté par voie intraplantaire au niveau la patte arrière. Le comportement de douleur spontanée (léchage) a été enregistré au cours des deux phases nociceptives typiques : de 0 à 5 min (phase 1) et de 15 à 40 min (phase 2) après injection de formol comme précédemment décrit¹⁰⁰. Pour les expériences avec l'AM404, seule la phase 1 a été étudiée en raison de la dégradation rapide de l'AM404¹⁰⁰.

c. Test de von Frey

Les souris ont été placées dans des compartiments individuels sur le dessus d'une surface grillagée et ensuite laissées en acclimatation pendant une heure avant le test. Les seuils de douleur ont été évalués par le filament von Frey calibré à 1,4 g (Bioseb, France). Ce dernier a été pressé perpendiculairement cinq fois contre le milieu patte et maintenu pendant 3 secondes. Une réponse douloureuse a été notée seulement quand la patte est retirée ou léchée et un score de réponse à la douleur (0-5) est déterminé.

d. Induction du modèle de monoarthrite

Cinq microlitres d'adjuvant complet de Freund (CFA, Difco Laboratories, Detroit, Etats-Unis)⁶⁴⁰ ont été injectés au niveau des deux côtés de l'articulation de la cheville gauche de la souris sous anesthésie brève (halothane/N₂O/O₂). Les seuils de retrait de patte suite à une stimulation thermique et mécanique ont été déterminés avant et 7 jours après l'injection de CFA ou de véhicule.

3. Électrophysiologie

a. Culture cellulaire et enregistrements électrophysiologiques

Les DRG ont été disséqués à partir de souris C57BL/6J mâles adultes et une suspension cellulaire a été obtenue suite à une dissociation enzymatique et mécanique. Les enregistrements en *whole-cell patch-clamp* ont été réalisés 3-28 h de culture sur des neurones de taille moyenne avec un phénotype "rosette" précédemment décrit⁵³². Pour l'enregistrement des courants calciques, une solution extracellulaire contenant (en mM) : 2 CaCl₂, 100 TEACL, 2 NaCl, 1 MgCl₂, 40 choline Cl, 5 glucose, 5 4AP (pH à 7,4 avec

TEAOH ~ 330 mOsm). Les pipettes avec une résistance de 1-1,5 Mohm ont été remplies avec une solution interne contenant (en mM) : 110 CsCl, 3 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, GTP 0,6 (pH à 7,4 avec CsOH, ~ 300 mOsm). Tous les enregistrements ont été filtrés à 5 kHz en utilisant un amplificateur 200B Axopatch (Axon Instrument). Les données ont été enregistrées à l'aide du logiciel pClamp10 (Instrument Axon) et analysées par le logiciel Prism Graphpad.

Les cellules HEK exprimant de façon stable la séquence Cav3.2 humaine ont été utilisées comme précédemment décrit⁵³² et ont été transfectées avec des plasmides d'expression de la GFP seul ou avec un mélange de GFP-TRPV1 en utilisant JetPEI.

b. Imagerie calcique

Les cellules humaines embryonnaires de rein, HEK293T, ont été cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% (v/v) de sérum humain, 2 mM de L-glutamine, 2 unités/ml de pénicilline et 2 mg/ml de streptomycine à 37°C avec une humidité contrôlée dans un incubateur avec 10% de CO₂. Les HEK293T ont été transfectées de façon transitoire avec le TRPV1 humain en utilisant le vecteur Mirus 293 (Mirus Corporation, Madison, WI, USA). Afin de déterminer si les cellules ont été transfectées, la capsaïcine (1 µM) a été utilisée à la fin de chaque expérience. Les cellules qui ne répondent pas à la capsaïcine, ont été utilisés comme témoins.

Les cellules ont été chargées avec 2 µM Fura-2 acetoxyethyl ester pendant 30 minutes à 37°C. La concentration intracellulaire de calcium a été contrôlée par le rapport des signaux de fluorescence mesurés lors de l'éclairage alternatif à 340 et 380 nm, en utilisant un système MT-10 d'illumination et le logiciel Cell^M (Olympus). La solution de bain contient (en mM) 145 NaCl, KCl 5, 2 CaCl₂, 1,5 MgCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucose, pH = 7,4 tamponnée avec du NaOH.

Comme les cellules HEK expriment la FAAH⁴⁹⁴, une enzyme qui dégrade l'AM404, les expériences de la figure 29a ont été effectuées en présence d'un inhibiteur de la FAAH (PMSF, 10 µM).

4. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et analysées en utilisant le logiciel SigmaStats 3.5. Les données ont été testées pour la normalité et l'égalité des variances. Les mesures ont été comparées par le test ANOVA à deux voies ou par le test de Kruskal-Wallis ou Friedman dans le cas des données qui ne suivent pas la loi normale. Les comparaisons post hoc ont été réalisées par la méthode de Bonferroni. Les valeurs de p < 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

E. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

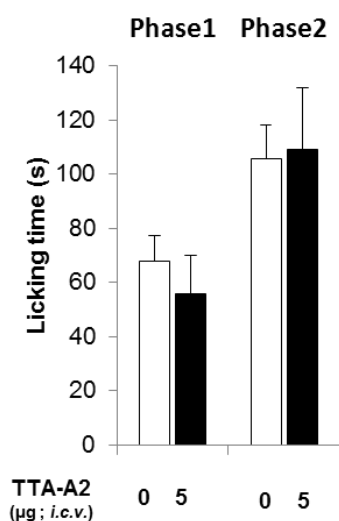


Figure S1: L'antalgie induite par l'injection supraspinale de TTA-A2 passe spécifiquement par les canaux Cav3.2. Pour vérifier la spécificité du TTA-A2 pour les canaux Cav3.2, le test au formol a été réalisé sur des souris Cav3.2^{-/-} avec ou sans injection de TTA-A2 (5 µg / 2 µl, i.c.v., T15min). Conformément à nos résultats précédents⁵³², le TTA-A2 n'induit pas d'action antalgique chez les souris Cav3.2^{-/-}. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8).

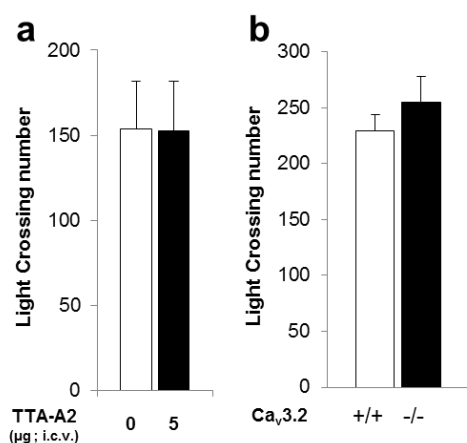


Figure S2: L'inhibition pharmacologique (TTA-A2) ou génétique (Cav3.2^{-/-}) des canaux Cav3.2 n'induit pas d'effet sédatif. Pour vérifier le potentiel effet sédatif de l'administration i.c.v. de TTA-A2 et de l'inactivation des canaux Cav3.2, un test d'actimétrie a été utilisé (a) chez des souris recevant du TTA-A2 (5 µg / 2 µl, i.c.v., T15min) et (b) chez des souris Cav3.2^{-/-}. Dans les deux cas, l'inhibition des canaux Cav3.2 n'induit pas d'effet sédatif. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8).

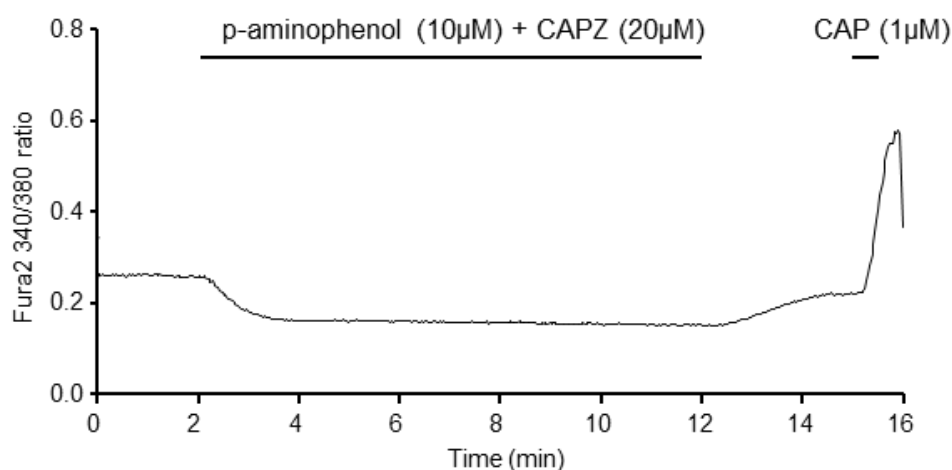


Figure S3: L'influx intracellulaire de calcium induit par le *p*-aminophénol dépend du TRPV1. Pour vérifier l'action spécifique des métabolites du *p*-aminophénol sur les récepteurs TRPV1, l'imagerie calcique en cellules HEK293 exprimant le TRPV1 a été faite en présence de *p*-aminophénol (10 µM) et de capsazépine (20 µM). L'activation des TRPV1 par les métabolites du *p*-aminophénol (voir figure 29b) est abolie en présence de capsazépine.

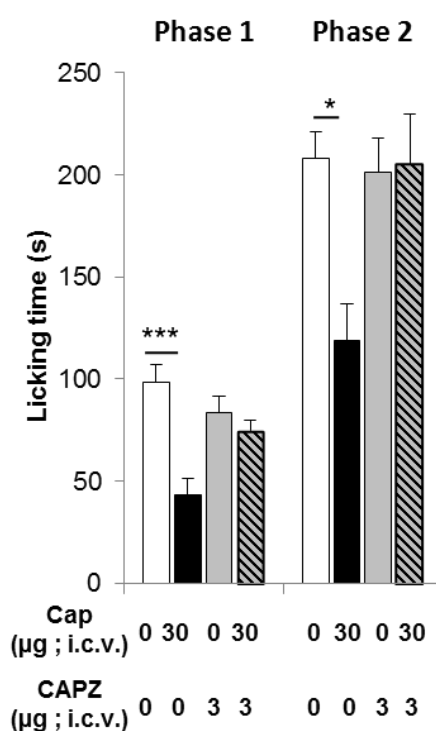


Figure S4: L'antalgie induit par l'injection supraspinale de capsaïcine est dépendante du TRPV1. Pour vérifier la spécificité de la capsaïcine vis à vis des TRPV1 supraspinaux, le test au formol a été réalisé chez des souris recevant la capsaïcine (30 µg / 2 µl, i.c.v., 10min avant injection de formol) avec ou sans capsazépine (3 µg / 2 µl, i.c.v.). Le blocage spécifique de TRPV1 par la capsazépine inhibe l'antalgie induite par la capsaïcine. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6-8). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ comparé au groupe véhicule.

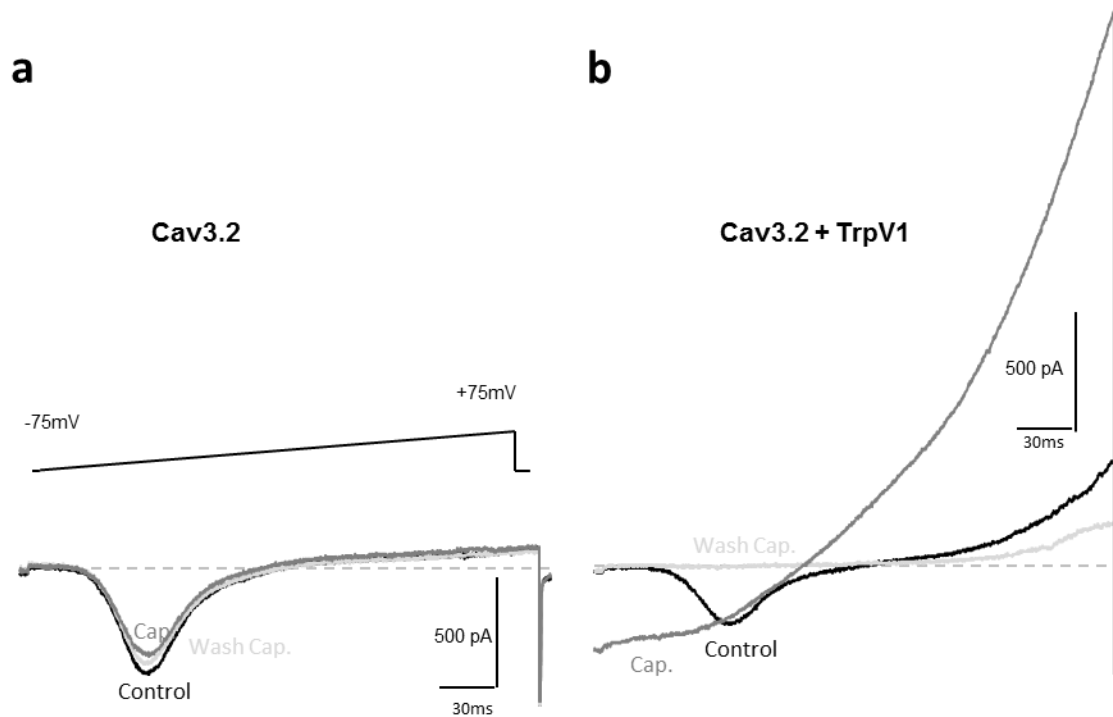


Figure S5: Les courants TRPV1 évoqués par la capsaïcine sont uniquement présents dans les cellules transfectées avec le TRPV1. (a) Traces de courants évoqués représentatifs (200 ms, rampes de dépolarisation de -75 mV à +75 mV) dans des conditions contrôles (trace contrôle) et lors de l'application de 1 μ M de capsaïcine (trace Cap.) et le wash de 1 μ M de capsaïcine (Wash Cap. trace) sur une cellule HEK exprimant le Cav3.2 seul (même cellule que dans la figure 30d). (b) une représentation identique avec une cellule HEK exprimant le Cav3.2 et le TRPV1 (même cellule que dans la figure 30e). Notez que la capsaïcine évoque des courants entrants lors de potentiels en dessous de zéro mV et de grands courants sortants à des potentiels positifs.

F. RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIÉS

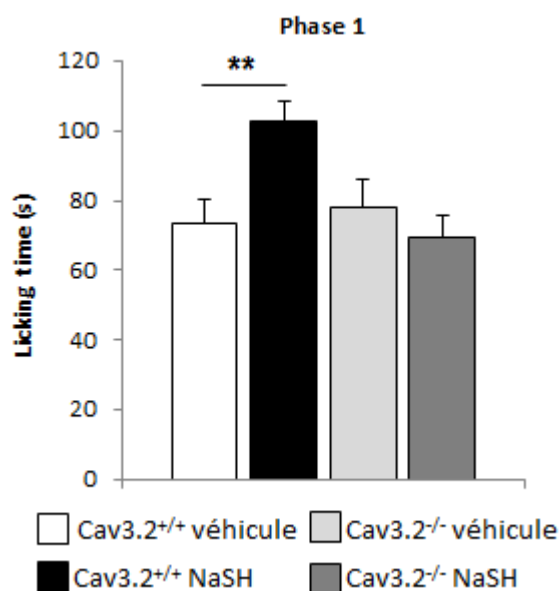


Figure 29: L'activation des canaux Cav3.2 supraspinaux par le NaSH induit une hyperalgie. L'effet, sur la perception douloureuse, de l'activation des canaux Cav3.2 supraspinaux a été évalué par le test du formol (phase 1 à cause de la dégradation rapide du NaSH) chez des souris Cav3.2^{+/+} et Cav3.2^{-/-}. L'activation des canaux Cav3.2 est permise grâce à l'injection i.c.v. de NaSH (3 nmol / 2 µl, donneur de H₂S). L'injection de NaSH est effectuée 10 min avant le test. Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n = 6-8). **, p < 0,01; par rapport aux groupes véhicules.

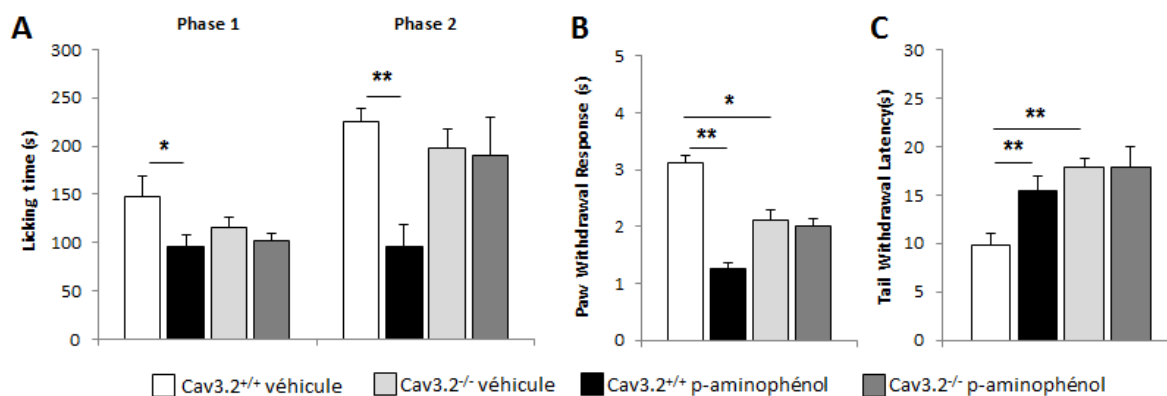


Figure 30: L'effet antalgique du p-aminophénol est perdu chez les souris KO Cav3.2. L'effet antalgique du p-aminophénol est évalué dans le test (A) au formol (2.5%), (B) de von Frey (filament de 1.4g) et (C) d'immersion de la queue (46°C). Le p-aminophénol est administré à la dose de 30 mg/kg i.p. et les tests sont effectués 20 (A) et 45 min (B, C) après injection. Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n = 6-8). *, p < 0,05; **, p < 0,01; par rapport aux groupes véhicules.

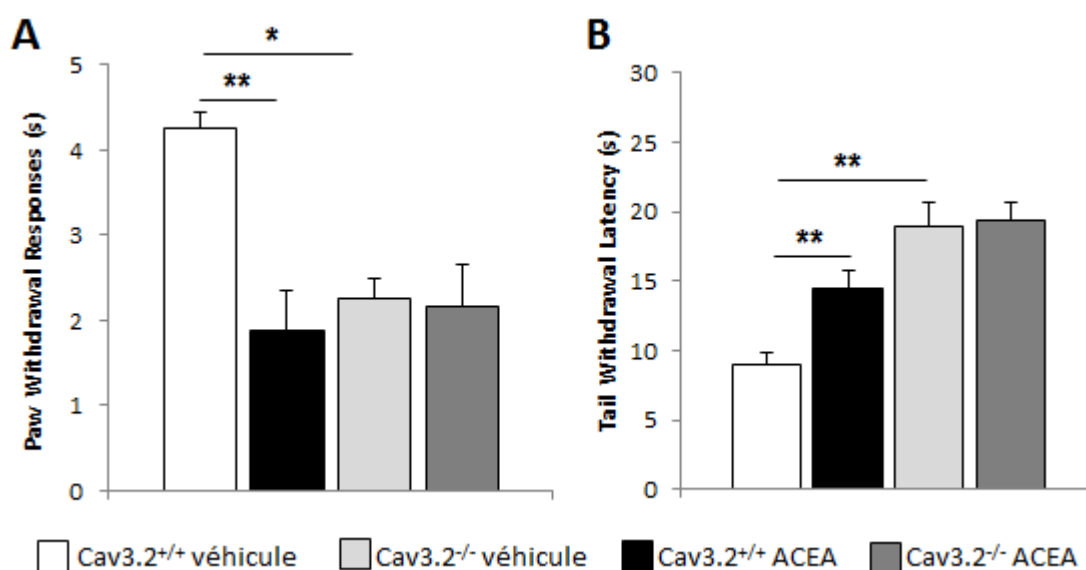


Figure 31: L'antalgie induite par l'activation des récepteurs CB1 nécessite les canaux Cav3.2. L'effet antalgique de l'activation des CB1, par l'administration d'ACEA (5 mg/kg, i.p.), a été évalué dans les tests (A) de von Frey (filament de 1,4g) et (B) d'immersion de la queue (46°C) chez des souris Cav3.2^{+/+} et Cav3.2^{-/-}. Les données sont présentées en moyenne \pm SEM (n = 6-8). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; par rapport aux groupes véhicules.

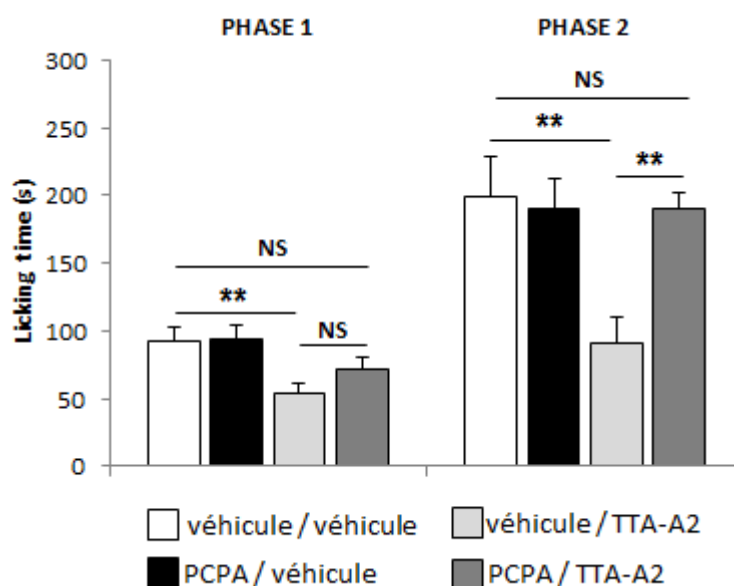


Figure 32: L'antalgie induite par le TTA-A2 implique les voies sérotoninergiques. L'impact de la déplétion en sérotonine de l'organisme sur l'effet antalgique du TTA-A2 (5 μ g / 2 μ l, i.c.v., 10min avant injection de formol) a été évalué dans le test au formol (2,5%) chez des souris WT. La déplétion en sérotonine est permise par l'injection journalière durant 4 jours de parachlorophénylalanine (100 mg/kg i.p., PCPA). Les données sont présentées en moyenne \pm SEM (n = 6-8). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

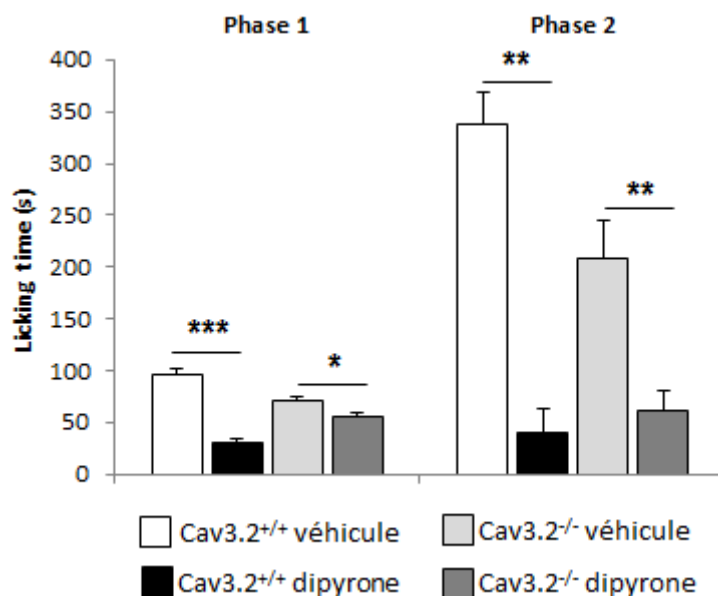


Figure 33 : L'effet antalgique de la dipyrone est conservé chez les animaux KO Cav3.2. L'étude de l'effet antalgique de la dipyrone (50 mg/kg i.p.) chez les souris Cav3.2^{-/-} a été évalué par le test au formol (2,5%). L'injection de dipyrone est effectuée 20 min avant le test. Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n = 6-8). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 par rapport aux groupes véhicules.

G. DISCUSSION / PERSPECTIVES

1. Cav3.2 supraspinaux et perception douloureuse

Le TTA-A2, administré seul, par voie supraspinale ou spinale, induit un effet antalgique (Figure 25), sans affecter la locomotion (Figure S1). Ces résultats, en accord avec l'antalgie observée chez les souris Cav3.2^{-/-580} et suite à l'injection intrathécale d'antisens Cav3.2⁵⁸¹, ont confirmé l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception au niveau de ces deux sites. Ces résultats sont à mettre en miroir avec ceux que nous avons également obtenu lors d'une activation supraspinale des canaux Cav3.2 par l'injection i.c.v. de NaSH (Figure 29). Le NaSH est un donneur de H₂S, composé considéré dans de nombreux travaux comme activateur des canaux Cav3.2 par un mécanisme d'oxydo-réduction⁶⁴¹. En totale concordance avec les résultats précédents⁵⁸⁷⁻⁵⁹¹, la modulation positive des canaux Cav3.2 supraspinaux par le NaSH induit un effet hyperalgique chez l'animal dans le test au formol. Ce dernier résultat reste à être complété et vérifié, du fait de la faible spécificité du H₂S vis-à-vis du canal Cav3.2⁶⁴²⁻⁶⁴⁴, mais il semble

corroborer le fait d'une implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans la modulation de la perception douloureuse.

Ces résultats apportent la confirmation du rôle des canaux Cav3.2 dans la nociception et démontrent pour la première fois une implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans la modulation de la perception douloureuse.

Ces données nouvelles posent de nouvelles questions qui restent à élucider. Les canaux Cav3.2 sont exprimés tout au long du système nerveux périphérique et central⁶³⁵. Pour mieux cerner l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception, selon leur localisation, il serait intéressant d'évaluer l'inactivation génétique du gène *CACNA1H* codant pour le canal Cav3.2 spécifiquement au niveau des nocicepteurs (périphérie), de la moelle épinière (spinal) et du cerveau (supraspinal) dans la nociception. Pour cela plusieurs stratégies existent :

1) L'administration d'antagonistes spécifiques Cav3.2 dans ces différents compartiments. Nous avons déjà démontré que l'inhibition des canaux Cav3.2 au niveau supraspinal (TTA-A2) et spinal (TTA-A2 et antisens⁵⁸¹) induisait une antalgie. Leur participation périphérique reste à être évaluée, l'injection de TTA-A2 par voie intraplantaire serait une bonne stratégie pour étudier l'impact de l'inhibition périphérique des canaux Cav3.2 sur la douleur.

2) Différents antagonistes des canaux de type T tels que l'éthosuximide^{591,594}, le mibefradil^{587,588} et le NNC⁵⁹⁰ ont été utilisés pour étudier le rôle de ces canaux, mais aucun d'entre eux n'est très spécifique. Récemment, une nouvelle classe de molécules a été conçue, appelée TTA, qui présente une spécificité majeure pour les canaux de type T^{645,646} et le TTA-A2 est présenté comme l'antagoniste le plus spécifique du canal Cav3.2. Nous avons déjà démontré que son effet sur les canaux Cav3.2 est supérieure à celui sur Cav3.1 et Cav3.3 (EC50 Cav3.1 : 100 nM; Cav3.2 : 9 nM; Cav3.3 : 30 nM)⁵³² et que son effet antalgique (après administration systémique) été perdu chez les souris Cav3.2⁻⁵³². Pour pallier ce biais, l'utilisation de souris *knock-out* conditionnel semble toute désignée. Ces souris ont l'avantage d'être invalidées pour le canal Cav3.2 de manière tissu ou type cellulaire spécifique grâce au système Cre-Lox (Figure 34). Dans ce système, le gène Cav3.2 est « floxé », c'est-à-dire qu'il possède deux sites Lox l'entourant. Ces sites Lox sont des sites de restriction pour l'enzyme Cre-recombinase, qui, en cas de présence dans le tissu pourra « éliminer » le gène cible. Ainsi, l'inactivation génétique spécifique est dépendante de la présence de la Cre-recombinase dans le tissu ou le type cellulaire voulu. Pour sélectionner le tissu ou le type

cellulaire souhaité (par exemple les nocicepteurs), le gène codant la Cre-recombinase est mis sous l'influence d'un promoteur activé spécifiquement dans le tissu ou le type cellulaire ciblé (ici Nav1.8 pour les nocicepteurs). La génération des souris KO conditionnel dans les nocicepteurs se fait par croisement entre les souris Nav1.8-Cre et les souris Cav3.2-Lox. Ainsi, ces souris exprimeront la Cre-recombinase dans les nocicepteurs ce qui invalidera le gène du canal Cav3.2 « floxé ». L'équipe du Dr. Bourinet possède cette souris KO conditionnel dans les nocicepteurs et sont actuellement en train d'étudier son impact sur la nociception.

3) Une dernière stratégie utilisable cette fois pour la partie supraspinale, qui est identique au système Cre-Lox, serait d'utiliser des virus exprimant la Cre-recombinase et de les injecter spécifiquement dans des zones du cerveau de souris Cav3.2-Lox afin d'invalider spécifiquement le canal Cav3.2 dans ces zones. Cette stratégie permettrait d'évaluer le rôle des canaux Cav3.2, exprimés dans diverses zones supraspinales, dans la nociception.

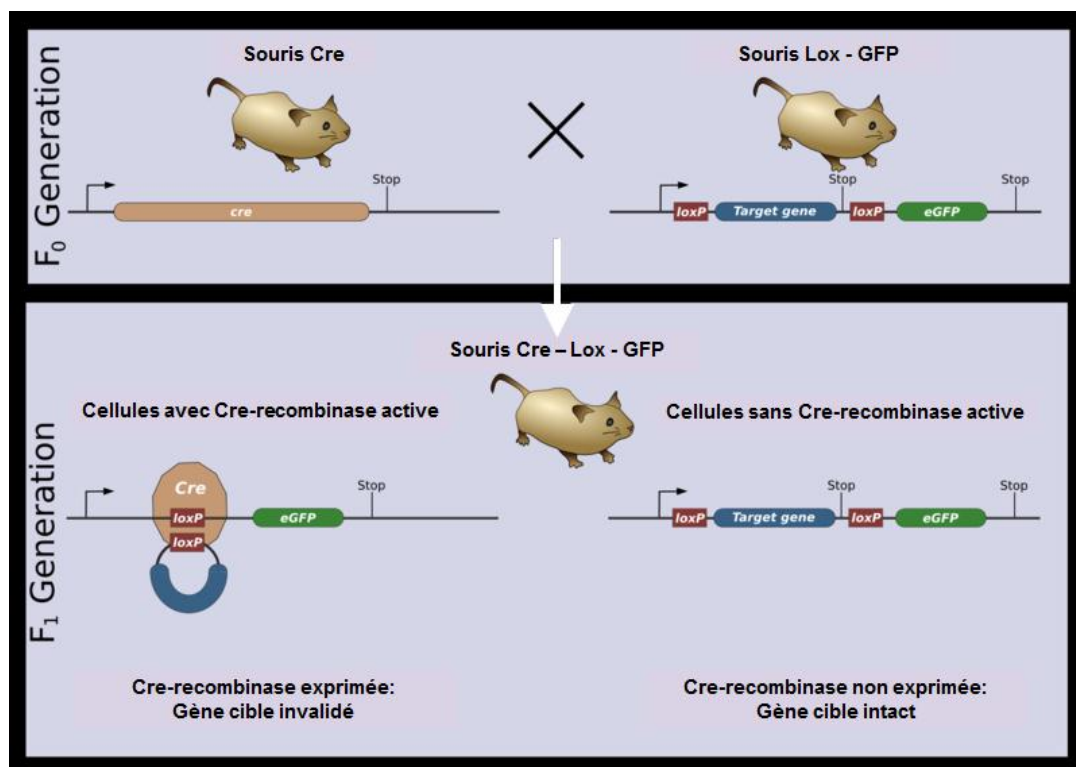


Figure 34 : Représentation simplifiée de la génération de souris knock-out conditionnel (système Cre-Lox).

2. Cav3.2 et paracétamol

La perte de l'effet du paracétamol, ainsi que celui du *p*-aminophénol (Figure 30), chez les souris Cav3.2^{-/-}, tout en étant efficace chez leurs congénères sauvages quelles que soient les conditions expérimentales, suggère que les canaux Cav3.2 sont nécessaires à l'action antalgique du paracétamol non seulement dans la nociception aiguë mais aussi dans une situation inflammatoire. Cette participation pourrait être remise en question en raison de la diminution de la réponse comportementale des souris Cav3.2^{-/-} vis à vis des *stimuli* nocifs, cependant, nous avons démontré à l'aide de la morphine, voire de la dipyrone, qu'une antalgie supplémentaire pouvait se produire chez ces souris. Ainsi, **la perte de l'effet du paracétamol peut clairement être liée à la suppression du canal Cav3.2**. De plus, les effets antalgiques du paracétamol et de la morphine peuvent être clairement distingués. Toutefois, ces résultats ne sont pas informatifs sur la localisation, dans le système nerveux central, des voies impliquées dans l'effet du paracétamol.

Le site d'action du paracétamol est encore un sujet de débat. Certains auteurs ont montré un site d'action périphérique^{98,108,109} tandis qu'une action centrale a été démontrée par d'autres^{96,97,100,103,131,637}. Nous avons déjà démontré que des récepteurs de la moelle épinière (5-HT)¹³¹ et du cerveau (CB1, TRPV1)^{100,131} étaient impliqués dans l'action du paracétamol chez l'animal et éventuellement chez des volontaires sains^{96,97}. Les canaux Cav3.2 sont situés tout au long du système nerveux, notamment au niveau des couches superficielles de la moelle épinière (couches II-III, résultats non publiés, François et coll.)^{494,635} et dans différents noyaux du cerveau : l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le mésencéphale et le cortex⁶³⁵. L'utilisation du TTA-A2 par injections i.c.v. chez des souris Cav3.2^{-/-} nous a confirmé cette notion. Sur la base de ces données, **la perte de l'effet du paracétamol administré par voie orale après l'injection i.c.v. de TTA-A2 démontre une implication des canaux Cav3.2 supraspinaux**, contrairement à ceux de la moelle épinière, comme le montre l'absence d'effet inhibiteur du TTA-A2 sur l'antalgie induite par le paracétamol. Cette démonstration d'un site supraspinal d'action du paracétamol est en accord avec notre précédent travail montrant l'implication des récepteurs supraspinaux TRPV1¹⁰⁰ dans l'antalgie induite par le paracétamol. Il est également en accord avec les résultats obtenus chez des volontaires sains montrant une activation des voies inhibitrices bulbospinales par le paracétamol⁹⁷. Ces résultats confirment une fois de plus que **le paracétamol peut être considéré comme un médicament antalgique à action centrale**. En effet, il semble capable d'agir sur des cibles supraspinales, comme les canaux Cav3.2 et les récepteurs TRPV1, pour, *in fine*, activer les voies bulbospinales inhibitrices, tandis qu'au niveau spinal d'autres

acteurs pourraient être impliqués tels que les récepteurs 5-HT^{98,99,103,136,304,306} ou, comme montré plus récemment, les récepteurs TRPA1 et adénosine A1^{98,101}.

En conclusion, nous venons de démontré l'implication purement centrale d'un nouvel acteur dans l'effet antalgique du paracétamol. Ceci confirme, une fois de plus, le paracétamol comme un antalgique central.

Afin de mieux comprendre l'interaction entre le paracétamol et les canaux Cav3.2, il serait intéressant de visualiser le ou les lieux de cette interaction. Pour cela il faudrait étudier l'expression supraspinale des canaux Cav3.2. Faute d'anticorps anti-Cav3.2 fiables à ce jour, peu d'alternative s'offre à nous. Néanmoins, l'utilisation de souris *knock-in* dite « Cav3.2-GFP » qui possèdent la particularité d'exprimer le canal Cav3.2 couplé à la protéine fluorescente GFP, tout en gardant la fonctionnalité du canal, nous permettrait de visualiser son expression dans n'importe quel tissu. Cette souche de souris nous sera disponible prochainement *via* le Dr. Emmanuel Bourinet. Une autre alternative serait l'hybridation *in situ*, que nous mettons au point actuellement, sachant que cette technique ne montrera que l'expression de l'ARN messager et non de la protéine du canal Cav3.2.

Ensuite, afin de valider d'un point de vue comportemental l'implication de ces zones d'expression du canal Cav3.2 dans la nociception, il serait envisageable d'inhiber le canal Cav3.2 dans les zones d'intérêts, à l'aide d'injection intra-nucléaire de TTA-A2 ou de KO conditionnel (système Cre-Lox, souris ou virus, décrit précédemment).

Parallèlement à l'étude de l'expression du canal Cav3.2, il est primordial d'étudier les zones cérébrales mises en jeu par le paracétamol pour exercer son effet antalgique. Pour répondre à cette question, l'utilisation de la technique d'IRM fonctionnelle chez l'animal et l'Homme est toute désignée. Suite à la découverte des zones mises en jeu, l'évaluation de l'effet antalgique du paracétamol lors du blocage (antagoniste, KO conditionnel) de ces différents acteurs (TRPV1, CB1 et Cav3.2) dans les différentes zones d'intérêt pourrait répondre d'un point de vue comportemental à cette question.

3. Les canaux Cav3.2 et l'AM404

Les résultats antérieurs ont montré que l'action centrale du paracétamol implique son métabolite, le *p*-aminophénol, transformé dans le cerveau en AM404³⁰. Ainsi, nous avons supposé que la relation observée entre le paracétamol et les canaux Cav3.2 serait indirecte et impliquerait

l'AM404, un composé apparenté aux lipoaminoacides. L'implication des canaux Cav3.2 supraspinaux dans l'action antinociceptive de l'AM404 a été montrée *in vivo*. **L'AM404, injecté par voie i.c.v., produit un effet antalgique chez les souris Cav3.2^{+/+} mais pas chez les Cav3.2^{-/-}** (Figure 26) dans les deux tests nociceptifs utilisés. Ces résultats mettent en évidence un lien fonctionnel entre l'AM404 et les canaux Cav3.2, ceci de manière similaire aux observations antérieures faites avec les lipoaminoacides tels que l'anandamide, certains acides gras polyinsaturés ou le N-acyl-éthanolamide. Ces composés sont des bloqueurs des canaux calciques de type T⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹, et plus particulièrement le composé endogène N-arachidonoyl-glycine (NaGly) qui est le plus puissant inhibiteur Cav3.2⁴⁶⁷. Fait intéressant, l'effet antalgique du NaGly chez l'animal est abolie chez les souris Cav3.2^{-/-206,467}. L'ensemble des résultats de ces études montrent que **l'effet antalgique de ces lipoaminoacides s'effectue par une inhibition des canaux Cav3.2**. En est-il de même avec l'AM404 ? L'AM404 induit une inhibition des courants Cav3.2 des neurones *D-Hair* de DRG (Figure 26) qui n'expriment pas les canaux TRPV1⁶⁵⁰. Toutefois, cette **inhibition est faible et partielle** par rapport aux autres inhibitions induites par les lipoaminoacides comme celui que nous décrivions précédemment⁴⁶⁷. Ceci **remet en cause l'implication d'un effet inhibiteur direct de l'AM404 sur les canaux Cav3.2 dans son action antalgique**.

4. Relation fonctionnelle entre canaux Cav3.2 et récepteurs TRPV1

Notre récente démonstration de la nécessité de l'activation des récepteurs TRPV1 supraspinaux par l'AM404 pour que l'action antalgique du paracétamol¹⁰⁰ se manifeste, suggère un lien entre AM404, récepteur TRPV1 et canal Cav3.2. Par conséquent, une inhibition indirecte des canaux Cav3.2 par l'AM404 à travers l'activation des TRPV1 a été soupçonnée. Nous avons d'abord confirmé, par technique d'imagerie calcique, la capacité de **l'AM404 à activer le récepteur TRPV1** comme précédemment démontré par Zygmunt et coll.¹⁴¹. Parallèlement, nous avons mis en évidence le fait que le **p-aminophénol est capable d'activer indirectement le récepteur TRPV1, ceci de manière dépendante de la FAAH** (Figure 27). Ces deux résultats confirment que la métabolisation du p-aminophénol, par la FAAH en AM404, est nécessaire pour activer le récepteur TRPV1.

Ensuite, **la capacité de l'activation des récepteurs TRPV1 à inhiber les canaux Cav3.2** a été démontrée par des expériences d'électrophysiologie *in vitro* en cellules HEK (Figure 27). Dépourvue de tout effet inhibiteur direct sur les canaux Cav3.2, la capsaïcine inhibe fortement les courants Cav3.2 lorsque les cellules ont été co-transfectées avec les canaux Cav3.2 et les récepteurs TRPV1. Ceci démontre la capacité de l'activation des récepteurs TRPV1 à inhiber les

canaux Cav3.2 (Figure 28). Cet **effet est très sensible** puisque l'activité tonique basale des récepteurs TRPV1 est également suffisante pour réduire le courant Cav3.2. Cet effet n'est pas sans rappeler les conclusions décrivant une inhibition des courants de type T par l'activation des TRPV1 dans les neurones sensoriels connus pour exprimer le canal Cav3.2⁵⁹⁷. Nous démontrons ici même ce même constat en prouvant la nécessité de l'expression de ces deux acteurs, probablement situés dans un voisinage proche, pour permettre cette régulation. Surtout, nous montrons que cette inhibition peut être obtenue avec des niveaux physiologiques de calcium extracellulaire, contrairement au précédent rapport de Comunanza et coll.⁵⁹⁷, suggérant que cette modulation est susceptible de se produire *in vivo*. L'hypothèse énoncée pour expliquer le mécanisme impliqué dans cette modulation est **une régulation calcique**. En effet, l'arrivée massive d'ions calcium après activation des récepteurs TRPV1 pourrait inhiber les canaux Cav3.2 à travers l'activation de kinases (pour revue^{569,651}), telles que PTK⁶⁵², PKA⁶⁵³⁻⁶⁵⁵, PKC⁶⁵⁶ et ROCK⁶⁵⁷ et donc, *in fine*, **diminuer l'excitabilité neuronale**.

L'étape suivante a consisté à démontrer ce lien fonctionnel dans la modulation supraspinale de la douleur. L'injection intracérébrale de capsaïcine induit une antalgie chez les souris Cav3.2^{+/-} dans tous les tests nociceptifs. Cet effet n'a pas été observé chez les souris Cav3.2^{-/-}. **Les canaux Cav3.2 sont donc nécessaires à l'effet antalgique des agonistes TRPV1**, ici, la capsaïcine ou l'AM404 administrés par voie i.c.v. Cependant, la réciproque ne s'applique pas, l'action antalgique d'une injection i.c.v. de TTA-A2 reste inchangée chez les souris TRPV1^{-/-}. Pris ensemble, ces résultats démontrent que la capsaïcine et l'AM404 induisent une antalgie par l'inhibition des canaux Cav3.2 dépendante de l'activation supraspinale du TRPV1. Cela explique pourquoi l'effet antinociceptif du paracétamol a été inhibé par l'injection i.c.v. d'antagoniste des récepteurs TRPV1 et d'un inhibiteur Cav3.2 comme le TTA-A2. L'implication des récepteurs TRPV1 supraspinaux est en accord avec la littérature montrant que l'activation du TRPV1 supraspinal induit un effet antalgique (pour revue⁶⁵⁸).

Ainsi, nous avons démontré un lien fonctionnel, in vivo, entre les récepteurs TRPV1 et les canaux calciques Cav3.2 impliqué dans l'antalgie induite par la capsaïcine et le paracétamol.

Le point faisant défaut dans cette étude est l'absence de preuve formelle d'une co-localisation tissulaire et cellulaire des canaux Cav3.2 et TRPV1. Le fait de ne pas avoir à disposition des anticorps fiables (marquages chez les souris KO) ne nous a pas permis de mettre cela en évidence. Nous ne pouvons supposer cela qu'indirectement. En effet, si nous prenons par exemple la PAG, plusieurs études ont montré que les récepteurs TRPV1 étaient exprimés de façon

faible au niveau de la VL-PAG (ventrolatérale-PAG)⁴⁴¹. En ce qui concerne le canal Cav3.2, une expression au niveau de la VL-PAG a également été démontrée soit par hybridation *in situ*^{567,568} soit par immunofluorescence à l'aide de souris *knock-in* Cav3.2-GFP (François et coll., données non publiées). Par extrapolation, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces deux acteurs soient co-exprimés au niveau cellulaire. Les souris *knock-in* Cav3.2-GFP, décrite précédemment, qui nous permettront de visualiser l'expression protéique des canaux Cav3.2 que nous pourrions coupler à la détection de l'expression des récepteurs TRPV1 dans la PAG et le cerveau en général. En attendant d'avoir les outils pour vérifier cette hypothèse, des études de co-hybridation *in situ* sont en cours au laboratoire.

Suite aux résultats montrant que l'effet activateur indirect du *p*-aminophénol sur les récepteurs TRPV1 était dépendant de la FAAH, nous avons supposé une implication de l'AM404. Pour valider cette hypothèse, le dosage de la production d'AM404 suite à l'application de *p*-aminophénol apportera la réponse à cette question. Nous possédons au laboratoire le matériel de spectrophotométrie de masse pour effectuer ce dosage. Un autre point est l'utilisation du PMSF comme inhibiteur de la FAAH. Il a été récemment montré que le PMSF n'était pas spécifique de la FAAH⁶⁵⁹. L'utilisation d'inhibiteur plus spécifique comme l'URB597³⁴⁷ et l'URB937⁶⁶⁰ permettrait de confirmer et valider nos résultats.

Nos résultats ont démontré une relation entre les récepteurs TRPV1 et les canaux Cav3.2. L'hypothèse mécanistique énoncée est une régulation calcique incluant l'action de kinases sur le canal Cav3.2. Pour répondre à cette hypothèse, la même expérience électrophysiologique, ayant montré cette interaction fonctionnelle, devrait être faite en absence de calcium dans le milieu extracellulaire (condition *calcium free*). Si l'absence d'effet sur le courant Cav3.2, suite à l'activation des récepteurs TRPV1, est observée cela validera l'implication du calcium dans ce phénomène. En ce qui concerne la mise en jeu des kinases, l'étude de la phosphorylation du canal Cav3.2 suite à l'activation du récepteur TRPV1 peut répondre à la question. Malheureusement, faute d'anticorps, cette perspective semble lointaine.

5. Canaux Cav3.2 et récepteurs CB1

Au début de mes travaux de thèse, suite à l'observation de l'implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol, nous avons voulu évaluer les relations que pouvait entretenir le canal Cav3.2 avec les deux autres protagonistes, CB1 et TRPV1, précédemment démontré comme indispensables à l'effet du paracétamol. L'orientation première fut la relation avec le récepteur TRPV1 du fait de l'action directe de l'AM404 sur ce récepteur et de l'abolition de

l'action antalgique de l'AM404 chez les souris KO TRPV1¹⁰⁰. Parallèlement à ces travaux, une expérience sur la relation CB1 / Cav3.2 a néanmoins été réalisée. Celle-ci a consisté à évaluer l'effet antalgique de l'ACEA (agoniste CB1) par voie systémique chez les animaux KO Cav3.2 dans le test d'immersion de la queue et le test de von Frey. Dans les deux tests utilisés l'ACEA produit un effet antalgique non retrouvé chez les animaux KO Cav3.2 (Figure 31). **Ce résultat suggère un lien, comme le récepteur TRPV1, entre les canaux Cav3.2 et les récepteurs CB1 dans l'antalgie induite par un agoniste CB1.** Dans la PAG, le TRPV1 et le CB1 travaillent de concert pour induire leurs effets antalgiques lors de leur activation^{230,454}. Le récepteur CB1 semble ainsi sensibiliser le récepteur TRPV1 lui permettant d'être activé par ses agonistes endogènes (endovanilloïdes et endocannabinoïdes). De plus, le canal CB1, *via* son couplage aux protéines Gi/o (pour revue⁶⁶¹), serait capable d'inhiber les canaux de type T si l'on en croit les nombreuses études démontrant un effet inhibiteur des protéines Gi/o sur les canaux de type T^{526,569,657,662}. Ainsi, il ne semble pas si aberrant qu'un lien fonctionnel existe entre les canaux Cav3.2 et le récepteur CB1 dans les mécanismes antalgiques. Néanmoins, il a été montré que l'ACEA n'était pas spécifique du récepteur CB1 et qu'il était capable d'activer les récepteurs TRPV1⁶⁶³ pouvant expliquer son inefficacité chez les KO Cav3.2. Pour répondre à cette interrogation de manière plus probante, l'utilisation d'un agoniste CB1 spécifique, comme le WIN55, 212-2⁶⁶⁴ serait une bonne approche.

Enfin, un point important qui n'a pas encore été évalué mais sur lequel repose une partie de nos hypothèses est la relation CB1 / AM404 et anandamide dans l'effet antalgique du paracétamol. En effet, l'hypothèse avancée, par les études de Mallet et coll.^{100,131}, est un effet inhibiteur de l'AM404 sur la FAAH qui conduirait à une augmentation de taux d'anandamide cérébral ce qui activerait les récepteurs TRPV1 / CB1 et induirait l'effet antalgique du paracétamol. L'inhibition de la FAAH par l'AM404, ainsi que l'augmentation du taux d'anandamide suite à cette inhibition n'est plus à démontrer. Reste à savoir si cela est le cas lors d'une administration systémique de paracétamol. Pour cela, il faudrait doser par spectrophotométrie de masse le taux d'endocannabinoïde cérébral en présence ou en absence de paracétamol. L'augmentation du taux d'endocannabinoïde cérébral suite à l'administration de paracétamol soutiendrait d'autant plus notre hypothèse. Surtout qu'une étude récente a déjà montrée que l'injection systémique d'AM404 induisait une augmentation cérébrale de 2-AG⁶⁶⁵.

6. Canaux Cav3.2 et voies descendantes sérotoninergiques

Suite à l'implication des voies sérotoninergiques descendantes dans l'effet du paracétamol décrite dans la littérature^{97,131}, nous avons évalué l'activation potentielle de cette

voie lors de l'inhibition du canal Cav3.2 supraspinal. Pour cela, nous avons « déplété » la sérotonine systémique par injections répétées de *p*-chlorophenylalanine (PCPA) chez des souris sauvages et l'effet antalgique du TTA-A2 par voie i.c.v. a été évalué chez ces animaux. Le résultat obtenu dans le test au formol montre une perte de l'effet antalgique du TTA-A2 lors d'une déplétion en sérotonine (Figure 32). **Ce résultat suggère que l'effet antalgique induit par l'inhibition des canaux Cav3.2 supraspinaux nécessite les voies sérotoninergiques descendantes.** Ce résultat montre indirectement que les canaux Cav3.2 sont exprimés dans des structures cérébrales reliées aux voies descendantes sérotoninergiques et viens totalement s'imbriquer dans la relation paracétamol et voies sérotoninergiques. Néanmoins, pour valider ce lien, il faudrait compléter ces résultats par l'étude de l'impact du blocage des récepteurs à la sérotonine spinaux sur l'effet antalgique du TTA-A2. Enfin, aucune augmentation de sérotonine spinale, suite à l'administration de paracétamol, n'a été retrouvée⁸³. Malgré cela, il faudrait réitérer un dosage plus précis de la sérotonine (intra- et extracellulaire) suite à l'administration de paracétamol, d'AM404 et de TTA-A2, à l'aide de la technique de microdialyse qui est beaucoup plus fine, afin de valider nos hypothèses.

Quel serait le mécanisme mis en jeu pour activer les voies sérotoninergiques descendantes ?

Question intéressante quand on sait que l'inhibition des canaux Cav3.2 induit une diminution de l'excitabilité neuronale. Par conséquent, comment une inhibition neuronale peut induire une activation d'une zone cérébrale (ici la PAG) ? L'hypothèse que nous allons énoncer repose sur plusieurs études récentes montrant que (Figure 34a, b) :

- 1) A l'état basal, la PAG possède un tonus GABAergique fort⁶⁶⁶, ce qui la garde dans un état d'inhibition ou du moins de non activation.
- 2) L'activation de la PAG par l'activation du récepteur TRPV1 suite à l'injection de capsaïcine dans la VL-PAG induit une production de glutamate et une augmentation de l'activité des cellules OFF de la RVM²²⁹. Ceci laisse supposer que le récepteur TRPV1, au sein de la PAG, est exprimé préférentiellement par les neurones glutamatergiques ;
- 3) l'activation du TRPV1 induit un relargage de glutamate qui va activer les récepteurs postsynaptiques mGluR5⁶⁶⁷ et ceci est inhibé en présence d'un bloqueur des mGluR⁶⁶⁸ ;
- 4) l'activation des mGluR induit un relargage rétrograde de 2-AG dans la fente synaptique qui va venir activer les récepteurs CB1 pré-synaptiques^{667,669-671};

5) l'activation du CB1 pré-synaptique diminue préférentiellement le relargage de GABA dans la fente synaptique pour trois raisons probables : - une plus forte densité de récepteurs CB1 sur les terminaisons inhibitrices (i-CB1) par rapport aux terminaisons excitatrices (e-CB1)⁶⁷² ; - les e-CB1 sont moins sensibles aux endocannabinoïdes que les i-CB1⁶⁷³ ; - la dégradation et la recapture des endocannabinoïdes les empêchent sélectivement d'atteindre les fibres excitatrices⁶⁷⁴.

L'ensemble de ces mécanismes contribuent à la diminution du tonus GABAergique de la PAG et mène à sa désinhibition⁶⁶⁶. L'activation (désinhibition) de la PAG entrainera une activation de la RVM et des voies sérotoninergiques descendantes.

Ainsi, l'activation des neurones de la RVM, suite à l'activation du TRPV1 de la PAG, serait due à une levée d'inhibition par les neurones présynaptiques GABAergiques et à une activation des neurones glutamatergiques (Figure 34a, b).

Maintenant comment pouvons-nous intégrer le canal Cav3.2 dans ce système ?

Nous savons que l'activation du récepteur TRPV1 inhibe le canal Cav3.2, que l'activation du CB1 *via* la protéine Gi/o pourrait inhiber les canaux Cav3.2^{526,569,657,662} et que le 2-AG serait aussi potentiellement capable de le moduler négativement. Nous savons également que les canaux Cav3.2 sont exprimés de manière présynaptique dans la moelle épinière⁵³⁸, donc probablement au niveau cérébral également. Ainsi, si nous supposons que le canal Cav3.2 est préférentiellement exprimé par les neurones présynaptiques GABAergiques, l'activation des récepteurs TRPV1 et CB1, respectivement, par l'AM404 et le 2-AG^{141,667,669-671}, suite à l'administration de paracétamol, vont potentiellement pouvoir inhiber les canaux Cav3.2. Il ne faut pas exclure le fait de la probabilité que l'AM404 et le 2-AG puissent également inhiber directement le canal Cav3.2, sans passer par les récepteurs TRPV1 et CB1. Conjointement, ceci pourrait amener à l'inhibition préférentielle des neurones GABAergique, participant ainsi à la désinhibition de la PAG (Figure 34a, c).

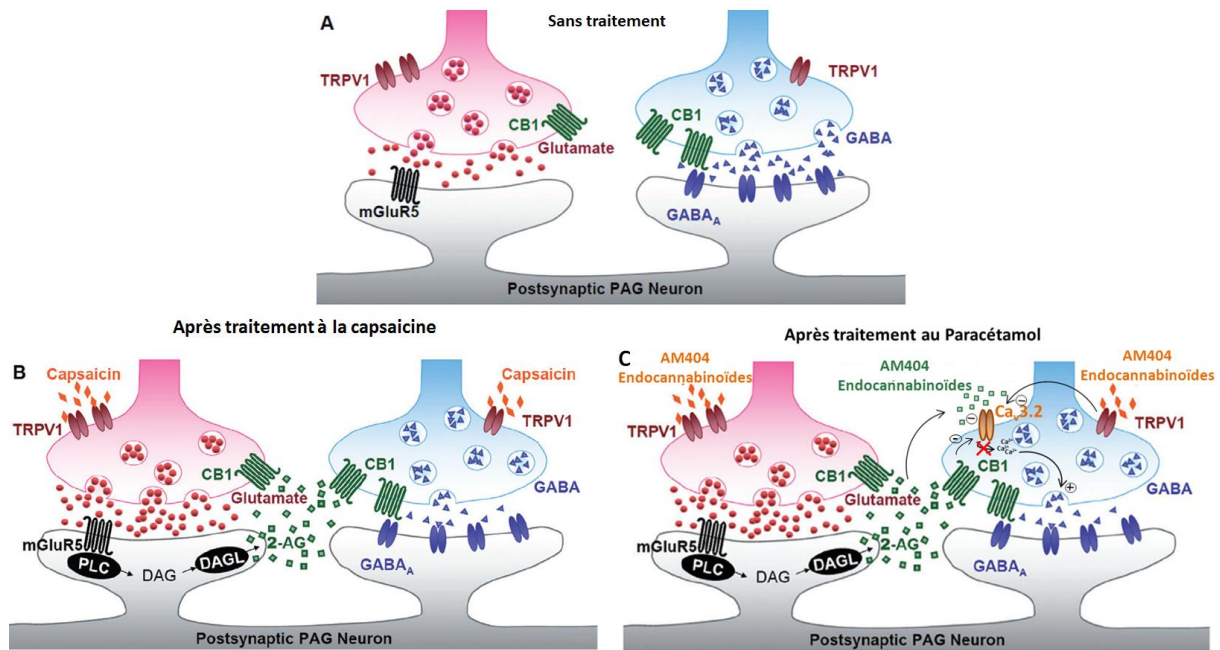


Figure 34: Modèle proposé de la dépression de la transmission GABAergique induite par la capsaïcine et le paracétamol dans la vPAG conduisant finalement à l'activation des voies inhibitrices et diminuant la douleur. Le schéma montre les synapses GABAergiques (à droite) et glutamatergiques (à gauche) dans un neurone de la vPAG avant (A) et après (B) traitement à la capsaïcine ou (C) au paracétamol. La capsaïcine ou l'AM404 et les endocannabinoïdes activent les récepteurs TRPV1 situés sur les terminaisons glutamatergiques pour faciliter la libération de glutamate, qui active ensuite les récepteurs post-synaptiques mGlu5 (mGluR5) et ensuite, couplés par la protéine Gq, stimule la phospholipase C (PLC) pour donner le diacylglycérol (DAG), qui est ensuite déacétylé par la DAG lipase (DAGL) en 2 arachidonolyglycérol (2-AG), un endocannabinoïde. Le 2-AG agit en tant que messager rétrograde pour activer les récepteurs CB1 présynaptiques (CB1) situés sur les terminaisons GABAergiques. Associé à cela, l'activation des récepteurs TRPV1 et CB1 des terminaisons GABAergiques, ainsi que l'action directe des endocannabinoïdes, vont venir inhiber le canal Cav3.2. Pris ensemble, ces mécanismes vont inhiber la libération de GABA. L'inhibition de la transmission GABAergique (désinhibition) dans la vPAG va activer les voies inhibitrices descendantes de la douleur et réduire les réponses nociceptives. Modifié d'après Liao et coll. 2011.

D'autant plus qu'il a été montré une implication des canaux de type T dans le contrôle des neurones GABAergiques au niveau de la PAG⁶⁷⁵.

Dans tous les cas, de nombreuses interrogations persistent et de nombreuses expériences seront nécessaires pour démêler les mécanismes supraspinaux mis en jeu. Et la première chose à faire pour vérifier cette hypothèse serait d'étudier le type de neurones de la PAG exprimant les canaux Cav3.2 : sont-ils glutamatergiques ? GABAergiques ? Les deux ? Expérimentent-ils TRPV1 et CB1 ? Les souris *knock-in* Cav3.2-GFP seront un bon outil pour essayer de répondre à cette question.

7. Canaux Cav3.2 et autres antalgiques

Nous venons de voir que les canaux Cav3.2 participaient à l'effet antalgique du paracétamol, en plus de cela, nous avons évalué l'effet de la morphine sur les animaux invalidés pour le gène *CACNA1H* codant pour le canal Cav3.2. Les résultats obtenus dans diverses modalités

douloureuse et conditions pathologiques ont montré que la morphine maintenait son effet antalgique chez ces souris (Kerckhove et coll. en révision), **laissant supposer une implication des canaux Cav3.2 uniquement dans certains types de mécanismes antalgiques, comme celui du paracétamol**. Pour apporter des arguments supplémentaires à cette hypothèse, l'effet de la dipyrone, un antalgique possédant un mécanisme d'action différent de la morphine et du paracétamol^{**}, a été évalué également chez des souris KO Cav3.2. Dans le test au formol, l'effet antalgique de la dipyrone observé chez les animaux sauvages est retrouvé de manière similaire chez les animaux KO Cav3.2 (Figure 33), ce qui va dans le sens d'une participation des canaux Cav3.2 aux mécanismes d'action spécifiquement à certains types d'antalgiques.

D'autres antalgiques, comme des AINS de référence, serait également à évaluer chez les souris KO Cav3.2.

8. Conclusion

Pour conclure, nous avons identifié les canaux Cav3.2 supraspinaux comme de nouvelles cibles pour l'antalgie induite par le paracétamol. Nous avons placé ces canaux avec deux acteurs précédemment montrés pour être impliqués dans l'action du paracétamol: l'AM404 et les récepteurs TRPV1. Les présents résultats nous ont amené à compléter les événements séquentiels que nous avons précédemment proposés^{100,131} pour expliquer le mécanisme d'action du paracétamol : métabolisme en p-aminophénol (dans le foie) puis en AM404 dans le cerveau (grâce à l'enzyme FAAH) qui induit une activation des récepteurs TRPV1 supraspinaux (liés avec les récepteurs CB1) qui induit à son tour une inhibition des canaux Cav3.2 induisant l'effet antalgique du paracétamol. D'autres études sont nécessaires pour élucider le lien entre l'inhibition des canaux Cav3.2 supraspinaux et l'activation des voies inhibitrices bulbo-spinal impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol^{97,103,131}. Enfin, nous avons mis en évidence les canaux calciques Cav3.2 supraspinaux en tant qu'acteurs importants dans la modulation de la douleur et apparaissent donc comme une cible prometteuse et intéressante pour le traitement de la douleur

^{**} La Dipyrone se comporte comme un AINS mais les mécanismes d'action mis en jeu semblent différents et restent encore flous⁶⁷⁶⁻⁶⁷⁹



Mark Collen

Sacramento, California

"CP III - Trapped In Hell"

plaster with rebar

13 inches long x 5 inches wide x 4 inches deep

There are times when my pain medication stops working and the horrible nerve pain takes over, ripping through my innocent leg. I lay on my bed trapped, trapped by pain. I feel fear, afraid the pain will never cease, afraid I'll go insane. I cry out to God begging for mercy. What have I done to deserve this fate? I feel like an innocent man condemned. I am trapped in a cage of pain, a cage made of rebar. I cannot tolerate it another second. I try a desperate escape by pushing my face through the bars, but I can go no further. I'm trapped in hell.

RESULTATS

ARTICLE 2 :

Cav3.2 calcium channels are involved in
inflammatory pain and associated process

(En rédaction)

VII. **ARTICLE 2 : Cav3.2 channels are involved in inflammatory pain and associated process**

A. INTRODUCTION

La douleur reste le symptôme le plus délétère chez les patients souffrant de douleur inflammatoire chronique comme l'arthrite ou d'importantes lésions post-chirurgicales. La douleur inflammatoire a un impact conséquent, non seulement, sur le bien-être physique et mental des patients mais aussi en termes économiques. L'altération de la qualité de vie est bien reconnue^{602,606} mais les coûts économiques restent significatifs que ce soit directement (p.ex. coût des soins) ou indirectement (p.ex. diminution de la productivité professionnelle⁶⁸⁰ (Source: Datamonitor forecast; MIDAS sales data; IMS Health, March 2010)). La majorité de ces patients rapportent une diminution partielle ou nulle de leur douleur par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ou dans le cas contraire, avec des effets indésirables importants conduisant à une limitation ou à l'arrêt de leur traitement. En effet, les effets bénéfiques de ces médicaments sont contrebalancés, à long terme, par d'importants effets indésirables comme les ulcérations gastriques ou les dysfonctions cardiovasculaires dû à l'action inhibitrice concomitante des fonctions homéostatiques des prostanoides⁶⁸¹⁻⁶⁸³. Ainsi, il est important d'avoir de meilleurs antalgiques pour traiter les symptômes des patients souffrant de douleurs chroniques inflammatoires.

Aujourd'hui, les mécanismes physiopathologiques sous-tendant les phénomènes de douleurs inflammatoires sont bien documentés. Ces phénomènes sont principalement « médiés » par les médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, les prostaglandines et les facteurs de croissance⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶. Les médiateurs pro-inflammatoires sont produits par les cellules épithéliales, les lymphocytes et majoritairement par les macrophages suite à leur activation par un pathogène, des médiateurs pro-inflammatoires ou des molécules antigéniques. Le rôle principal de ces médiateurs est la mise en place et le maintien de la réponse immunitaire mais ils induisent également une sensibilisation des fibres nerveuses afférentes primaires conduisant aux phénomènes d'allodynie et d'hyperalgie observés lors d'une douleur inflammatoire⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶. En effet, les cytokines (bradykinines et interleukines), les prostaglandines (PGE₂) et les facteurs de croissance (TNF- α et NGF) sont capables de sensibiliser les nocicepteurs *via* leurs récepteurs

spécifiques et induire une perception douloureuse exacerbée⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶. Durant les premières étapes de la réaction inflammatoire, les médiateurs pro-inflammatoires modifient la sensibilité de leurs récepteurs et diminuent les seuils d'activation des canaux ioniques, comme le TRPV1, ASIC et P2X exprimés par les nocicepteurs⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶. A long terme, ces changements, incluant des événements transcriptionnels par les cytokines et les facteurs de croissance, résultent en une augmentation de la production de leurs récepteurs, des canaux ioniques et des neurotransmetteurs centraux⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶. Les mécanismes impliqués dans cette réponse biologique sont nombreux et complexes mais, de manière intéressante, tous ces phénomènes font intervenir le calcium.

Les variations de la concentration cytosolique en calcium sont principalement fixées par le potentiel membranaire de repos et l'équilibre des flux calciques par les canaux calciques voltage dépendant⁶⁸⁷⁻⁶⁸⁹. De plus, de nombreux canaux calciques ont été identifiés comme impliqués dans la libération des neurotransmetteurs et les dépolarisations membranaires des neurones⁴⁷⁴. Les canaux calciques voltage dépendant sont divisés en 2 groupes dépendant de leurs seuils d'activation : les canaux de haut seuil (type L, P / Q, N et R) et de bas seuil (type T) d'activation. En comparaison des canaux à haut seuil d'activation, les canaux de type T sont activés pour des potentiels membranaires proches du potentiel de repos et s'inactivent plus rapidement⁴⁷⁴. Trois gènes (*CACNA1G*, *CACNA1H* et *CACNA1I*) codent les canaux de type T respectivement appelés Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3⁴⁷⁴. Les récentes découvertes suggèrent une importance des canaux de type T, et plus particulièrement l'isoforme Cav3.2, dans la nociception périphérique, conduisant à la possibilité que leur modulation soit un potentiel thérapeutique dans le traitement des douleurs aiguës^{532,580} et chroniques^{581,582,584}. Les études de ces 20 dernières années ont bien défini leur rôles fonctionnels dans : les « *low-threshold spikes* », les oscillations de calcium cellulaires, les contractions musculaires, la sécrétion hormonale, la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire^{526,570,690,691}. Les canaux de type T sont maintenant bien connus pour participer à l'activité *pacemaker* cardiaque, à la génération des ondes lentes du sommeil, à l'épilepsie, à la fertilisation, au contrôle du tonus vasculaire, à l'hypertrophie cardiaque et à la nociception. A cause de ces rôles physiologiques, les canaux de type T sont décrits comme d'importantes cibles de régulation neuronales et cardiaques^{692,693}.

Dans la nociception, il a été rapporté que l'inhibition génétique ou pharmacologique des canaux de type T réduisait l'hypersensibilité mécanique et thermique induite par une lésion nerveuse périphérique chez le rat^{557,558}. Dans l'étude de Bourinet et coll.⁵⁸¹, seuls les oligonucléotides antisens ciblant l'ARNm Cav3.2 sont efficaces pour diminuer l'hypersensibilité thermique et mécanique dans un modèle de neuropathie chez le rat. De plus, les souris *knock-out* Cav3.2 montrent une diminution de leur perception douloureuse en réponse à des stimulations

aiguës⁵⁸⁰ ou dans divers modèles de douleurs neuropathiques^{581,582,584}, suggérant que les canaux de type T et principalement l'isoforme Cav3.2 sont cruciaux dans la nociception.

Cependant, l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire reste très peu documentée. Seule une étude a démontré que les souris *knock-out* Cav3.2 présentaient une diminution de la perception douloureuse dans la phase 2 du test au formol⁵⁸⁰. Une autre étude a également démontré l'effet antalgique d'un bloqueur de canaux de type T dans le test au formol⁶⁹⁴. Ceci suggérant une potentielle implication de ces canaux dans la douleur inflammatoire. En parallèle, de nombreuses études ont montré que les canaux Cav3.2 participaient aux phénomènes d'exocytose. En effet, l'équipe de Carbone a démontré que l'inhibition des canaux Cav3.2 diminuait l'exocytose des cellules chromaffines^{570,598,600,601}. Ces résultats supposent que les canaux Cav3.2 pourraient posséder les mêmes capacités dans d'autres types cellulaires et potentiellement dans les processus de sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires, qui sont calcium-dépendant.

Dans cette étude, l'implication des canaux Cav3.2 dans les phénomènes inflammatoires et la douleur associée a été étudiée dans le modèle inflammatoire à la carragénine chez des souris déficientes pour le canal Cav3.2. Nous avons démontré que les canaux Cav3.2 participaient activement à la douleur inflammatoire et au développement œdémateux par la modulation de l'activation des macrophages et de la production des médiateurs pro-inflammatoires. **Cette étude met en lumière les canaux Cav3.2 comme une cible potentielle dans le traitement de la douleur et de l'inflammation.**

B. RESULTATS

Les canaux calciques Cav3.2 participent aux phénomènes douloureux associés à l'inflammation tissulaire. Les canaux calciques Cav3.2 sont très impliqués dans la perception douloureuse, dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique^{581,582,584}. En accord avec ces données, la participation des canaux Cav3.2 à la douleur inflammatoire a été évaluée à l'aide de souris invalidées pour le gène CACNA1H codant pour la protéine Cav3.2 (Cav3.2 KO). Deux modèles d'inflammation ont été étudiés, un modèle dit sub-chronique par injection intraplantaire d'une solution de carragénine 3% et un modèle chronique mimant la monoarthrite par injection périarticulaire de CFA. La douleur mécanique et le développement œdémateux sont évalués avant (To, Jo) puis à T2h, 4h, 6h, 8h et 24h ou J7 près l'induction respective de l'inflammation par la

carragénine et le CFA. L'état douloureux est évalué chez des souris Cav3.2 KO et comparé à celui de leur littermates (WT) à l'aide du test de von Frey permettant de mesurer les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie mécanique associés à l'inflammation. Les souris Cav3.2 KO ne développent pas d'allodynie (Figure 35a) ni d'hyperalgie (Figure 35b) tactile en condition inflammatoire contrairement aux souris WT dans le modèle à la carragénine. Des résultats similaires ont été obtenus pour le modèle au CFA (Figure supplémentaire S1 a, b). Pour évaluer l'état inflammatoire des animaux, le développement œdémateux et la production de médiateurs inflammatoires furent observés par mesure au pied à coulisse de la taille de l'œdème (Figure 35c) et par dosage ELISA, au niveau de l'œdème et du plasma des médiateurs pro-inflammatoires (Figure 36). Les résultats obtenus montrent un développement œdémateux présent chez les souris Cav3.2 KO mais diminué d'environ 15% en comparaison aux souris WT (T6h ; Cav3.2 KO : $47,32 \pm 2,78\%$ et WT : $63,07 \pm 5,97\%$ d'augmentation de l'épaisseur de la patte). Des résultats similaires ont été obtenus pour le modèle au CFA (Figure supplémentaire S1 c).

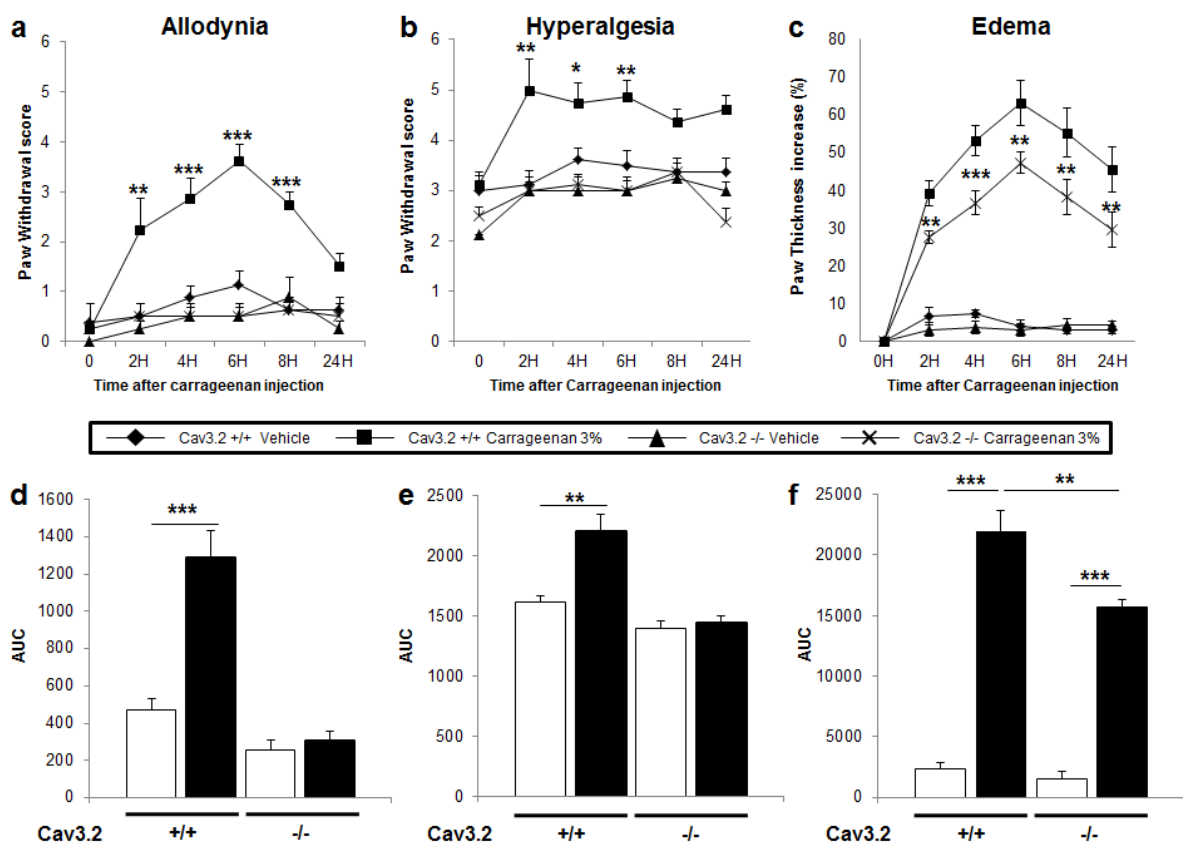


Figure 35: Les canaux calciques Cav3.2 sont impliqués dans le développement des symptômes d'allodynie et d'hyperalgie tactile et de l'œdème associés à l'inflammation. L'impact de l'inactivation du gène codant le canal Cav3.2 sur la douleur inflammatoire (modèle carragénine) et le développement œdémateux a été évalué par le test de von Frey et par mesure de l'œdème chez des animaux *knock-out* Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) et leur littermates sauvages (Cav3.2^{+/+}). L'allodynie et l'hyperalgie tactile ont été respectivement évaluées par les filaments de von Frey exerçant une pression de 0,04 g et 1,4 g. Les mesures ont été effectuées à 0, 2, 4, 6, 8 et 24 h après injection intraplantaire de carragénine 3%. **a)** Allodynie mécanique, **b)** hyperalgie mécanique, **c)** mesure de l'œdème, **d-f)** aires sous la courbe respectivement des figures a, b et c. Les données sont représentées en moyennes (n = 8) ± SEM. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001, en comparaison des groupes véhicules respectifs.

En ce qui concerne la production des médiateurs pro-inflammatoires (il-6, il-1 β , TNF- α et PGE $_2$), en corrélation avec le développement œdémateux et l'état douloureux, les souris Cav3.2 KO présentent une production de ces médiateurs fortement diminuée (T4h après induction de l'inflammation à la carragénine) en comparaison aux animaux WT, que ce soit au niveau systémique pour l'il-6 (Figure 36a) ou tissulaire (Figure 36b) pour tous les médiateurs. Ces résultats suggèrent que les canaux Cav3.2 participent au développement des symptômes douloureux mais, de manière plus intéressante, également à l'état œdémateux et à la production des médiateurs inflammatoires lors d'une inflammation tissulaire, ce qui n'a encore jamais été décrit jusqu'à l'heure actuelle.

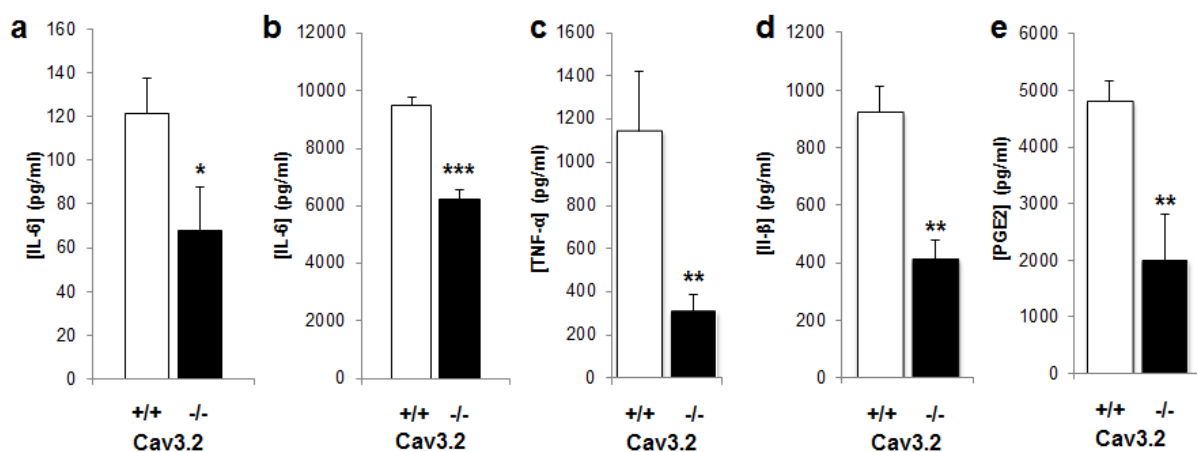


Figure 36 : Les animaux knock-out Cav3.2 produisent moins de médiateurs pro-inflammatoires en réponse à une inflammation. L'impact de l'inactivation du gène codant le canal Cav3.2 sur la production des médiateurs pro-inflammatoires en contexte inflammatoire (modèle carragénine, 4h après induction) a été évalué par dosage ELISA chez des animaux knock-out Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) et leur littermates sauvages (Cav3.2^{+/+}). Les médiateurs pro-inflammatoires ont été dosés au niveau plasmatique pour l'il-6 et au niveau de l'œdème pour l'il-6, le TNF- α , l'il-1 β et la PGE $_2$. a) il-6 plasmatique, b) il-6 œdème, c) TNF- α œdème, d) il-1 β , e) PGE $_2$ œdème. Les données sont représentées en moyennes (n = 8) \pm SEM. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001, en comparaison des groupes Cav3.2^{+/+}.

Les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires participent au développement œdémateux. Suite à l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement œdémateux et la production des médiateurs inflammatoires, les acteurs impliquant les canaux Cav3.2 dans ces processus inflammatoires ont été étudiés. Les acteurs majoritaires impliqués dans le développement de l'œdème et la production de médiateurs pro-inflammatoires sont les cellules immunitaires dont principalement les macrophages. L'expression des canaux Cav3.2 au niveau des macrophages ainsi que l'implication spécifique de ces canaux au niveau des cellules immunitaires dans les phénomènes douloureux et inflammatoires (œdème) ont donc été étudiées. Les résultats obtenus, à partir de culture cellulaire de *bone marrow derived macrophages*

(BMDM), montrent pour la première fois une expression d'ARNm d'un canal voltage dépendant, ici Cav3.2, par ce type cellulaire, ceci étant validé par l'expression nulle chez des BMDM Cav3.2 KO (Figure 37).

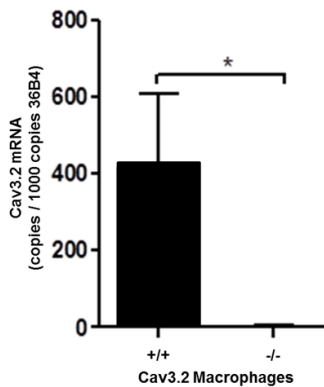


Figure 37 : Les macrophages expriment les canaux calciques Cav3.2. L'étude de l'expression des canaux Cav3.2 dans les macrophages a été effectuée par RT-q-PCR à partir de macrophage dérivés de la moelle osseuse d'animaux Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+}. Les données sont représentées en moyennes (n = 3) ± SEM. *, p < 0,05, en comparaison du groupe Cav3.2^{+/+}.

Ainsi, l'évaluation de l'implication des canaux Cav3.2 spécifiquement au niveau du système immunitaire dans les phénomènes inflammatoires (œdème et douleur) fut faite par la génération de souris chimériques. Ces souris sont soit invalidées pour le gène codant le canal Cav3.2 au niveau du système immunitaire (*Recipient + Donor -*), soit invalidées dans la totalité du corps sauf pour le système immunitaire (*Recipient - Donor +*). L'état douloureux et œdémateux de ces souris chimériques est évalué 4h après l'injection intraplantaire de carragénine. Les résultats obtenus montrent, au niveau de la perception douloureuse, que le fait de rendre fonctionnel les canaux Cav3.2 du système immunitaire chez des souris Cav3.2 KO restaure partiellement les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie mécanique (Figure 38a), alors que curieusement la réciproque n'est pas retrouvée. Ce résultat démontre que les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires sont suffisants mais non essentiels à la génération des symptômes douloureux associés à l'inflammation. En ce qui concerne l'état œdémateux, par la même technique de mesure que précédemment, l'absence des canaux Cav3.2 spécifiquement au niveau immunitaire réduit, de manière équivalente aux souris Cav3.2 KO, le développement œdémateux et, inversement, l'œdème est restauré dans le cas des souris Cav3.2 KO ayant un système immunitaire WT (Figure 38b). Ce dernier résultat démontre une implication des canaux Cav3.2 spécifiquement au niveau immunitaire dans le développement œdémateux (environ 20% de la taille de l'œdème), ceci expliquant le phénotype présenté par les souris Cav3.2 KO en condition inflammatoire.

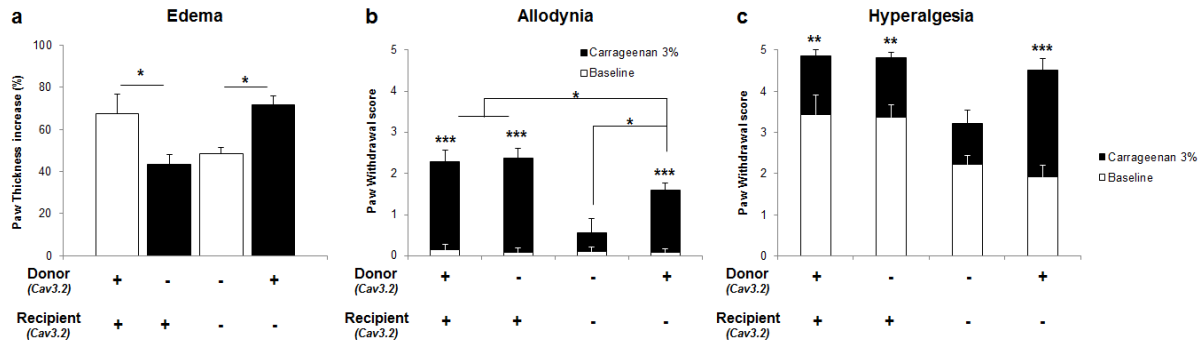


Figure 38 : Les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires participent au développement œdémateux et à la douleur inflammatoire. L'étude de la participation des canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires au développement œdémateux et à l'hypersensibilité mécanique inflammatoire (modèle carragénine), a été permise grâce aux souris chimériques exprimant ou non le canal Cav3.2 au niveau des cellules immunitaires et/ou dans les neurones. La mesure du développement œdémateux et le test de von Frey ont été effectués avant (histogramme blanc) et 4h après injection intraplantaire de carragénine 3% (histogramme noir). **a)** développement œdémateux, **b)** test de von Frey, allodynie (filament de 0,04 g), **c)** test de von Frey, hyperalgie (filament de 1,4 g). Donor : souris donneuse de moelle osseuse, Recipient : souris transplantée ; + = Cav3.2+/+ and - = Cav3.2-/- . Les données sont représentées en moyennes (n = 8) ± SEM. *, p < 0,05 ; **, p < 0,01 ; ***, p < 0,001.

Les canaux calciques Cav3.2 sont essentiels à l'activation des macrophages. A la vue des résultats précédents et le fait que de nombreuses études ont démontré l'implication des canaux Cav3.2 dans les processus de production et d'exocytose des catécholamines⁵⁷⁰, nous nous sommes orientés vers l'hypothèse d'une implication des canaux Cav3.2 dans le phénomène d'activation macrophagique. Par étude *in vitro* sur culture de BMDM, issu d'animaux WT et Cav3.2 KO, l'activation des macrophages a été étudiée par stimulation au LPS (20 ng/ml). Suite à cette stimulation, le dosage par technique ELISA, de la production de médiateurs pro-inflammatoires dans le surnageant de culture a été effectué. Les résultats obtenus, similaires à ceux obtenu *in vivo* dans l'œdème, montrent que les macrophages Cav3.2 KO produisent moins de médiateurs pro-inflammatoires (il-6, il-1 β et TNF- α) en réponse au LPS en comparaison aux macrophages sauvages (Figure 39).

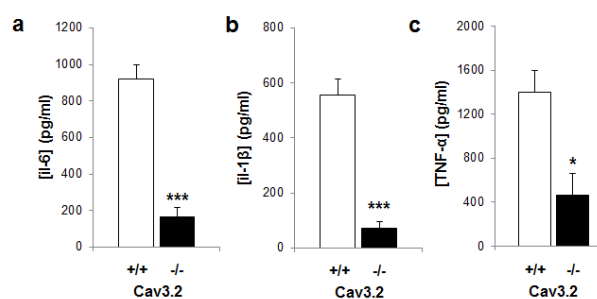


Figure 39 : Les canaux Cav3.2 participent à la production des médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages en réponse au LPS. La participation des canaux Cav3.2 à la production des médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages a été déterminée par dosage ELISA de la production d'il-6, d'il-1 β et de TNF- α dans le milieu de culture des macrophages suite à leur activation. Les macrophages de souris Cav3.2-/- et Cav3.2+/+ d'origine myéloïde ont été activés par contact avec du LPS (20 ng/ml) durant 24h. **a)** il-6, **b)** il-1 β , **c)** TNF- α . Les données sont représentées en moyennes (n = 8) ± SEM. *, p < 0,05 ; ***, p < 0,001, en comparaison des groupes Cav3.2^{+/+}.

Suite à leur activation, l'étude de la morphologie des macrophages, par marquage immunofluorescence de l'actine par la phalloïdine, a montré un gonflement (« *swelling* ») cellulaire des macrophages WT traduisant la forte production cytoplasmique de médiateurs inflammatoires contrairement aux macrophages Cav3.2 KO qui ne présentent aucun signe morphologique d'activation (Figure 40). Ces deux résultats suggèrent une implication des canaux Cav3.2 dans l'activation des macrophages et donc dans la production des médiateurs pro-inflammatoires, en réponse au LPS.

Les canaux Cav3.2 étant des canaux calciques et que le calcium est un élément majeur à l'activation des macrophages, l'étude des influx de calcium intracellulaire par imagerie calcique a été effectuée sur une culture de BMDM Cav3.2 KO et WT, ceci en présence de LPS. Les résultats observés montrent que seulement 6 cellules sur 122 répondent au LPS dans le cas de BMDM Cav3.2 KO contrairement aux WT où 44 cellules sur 127 répondent (Figure 41). Ce dernier résultat traduit l'implication majeure des canaux Cav3.2 dans les influx calciques des macrophages nécessaire à leur activation. Au final, par ces différentes approches, les canaux Cav3.2 semblent être fortement impliqués dans les phénomènes d'activation macrophagique.

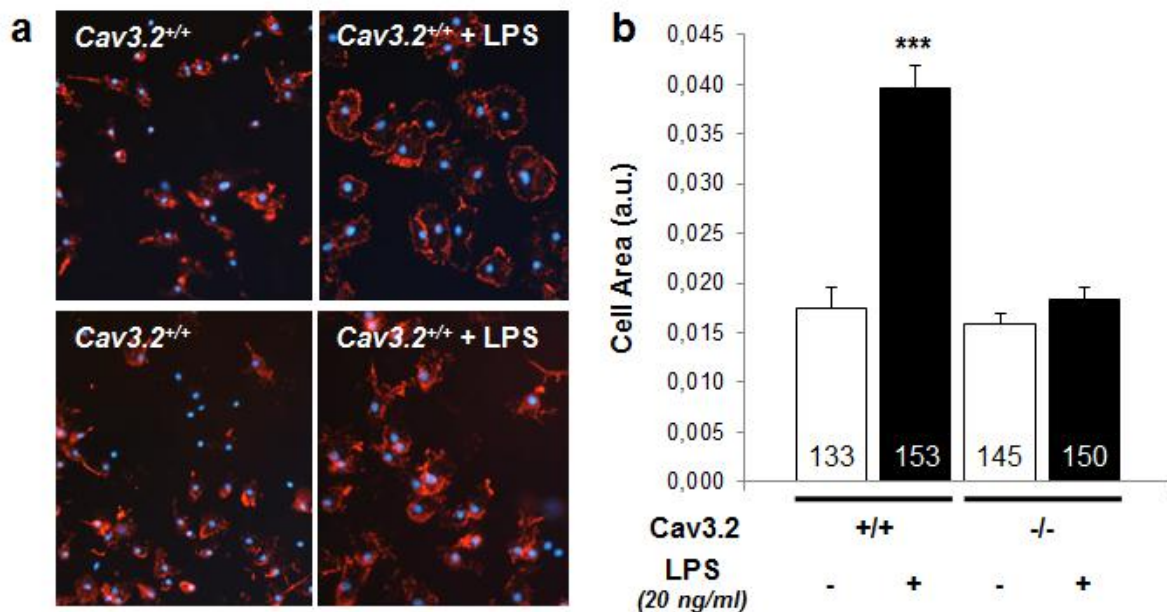


Figure 40: Les canaux Cav3.2 participent à l'activation des macrophages en réponse au LPS. La participation des canaux Cav3.2 à l'activation des macrophages a été déterminée de manière morphologique par immunofluorescence. Les macrophages de souris Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+} d'origine myéloïde ont été activés par contact avec du LPS (20 ng/ml) durant 24h. **a)** La morphologie des macrophages a été étudiée par marquage de l'actine grâce à la toxine phalloïdine (rouge) et du noyau (DAPI, Bleu), **b)** l'aire des cellules a été mesurée et représentée en unité arbitraire (a.u.), le nombre de cellules comptabilisées est représenté en bas des histogrammes. Les données sont représentées en moyennes (n = 3) ± SEM. ***, p < 0,001, en comparaison des groupes sans LPS.

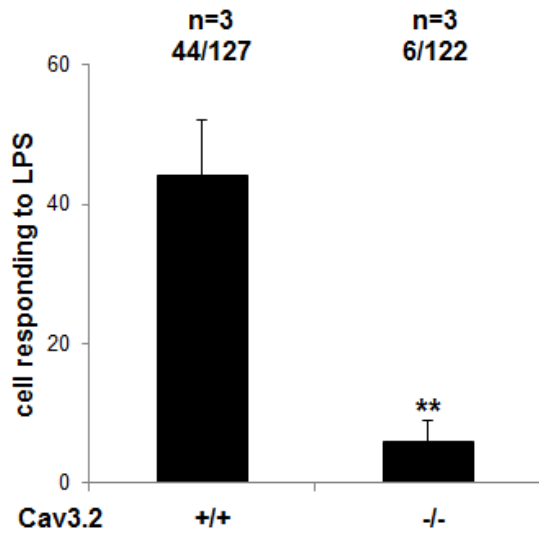


Figure 41: Les canaux Cav3.2 participent à l'entrée de calcium intracellulaire lors de l'activation des macrophages en réponse au LPS. La participation des canaux Cav3.2 aux influx calciques lors de l'activation des macrophages a été évaluée par imagerie calcique sur des macrophages Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+} issus de moelle osseuse et activés par du LPS (20 ng/ml). L'enregistrement des influx calciques ont été effectués pendant 5 min en contact du LPS. Les données sont représentées en moyennes (n = 3) ± SEM. **, p < 0,01, en comparaison du groupe Cav3.2^{+/+}.

C. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

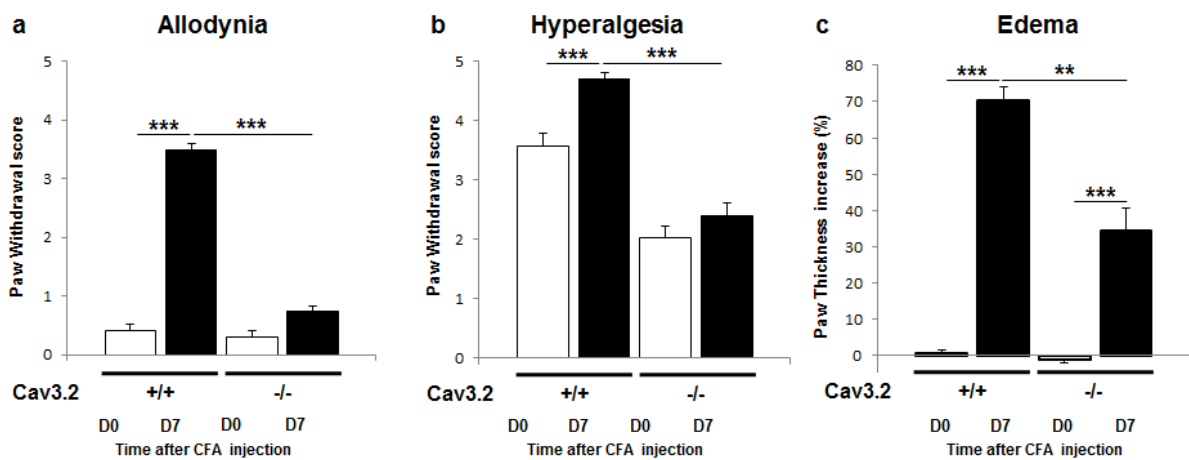


Figure S1: Les canaux calciques Cav3.2 sont impliqués dans le développement des symptômes d'allodynie et d'hyperalgie tactile et de l'œdème associés à l'inflammation chronique. L'impact de l'inactivation du gène codant le canal Cav3.2 sur la douleur inflammatoire chronique (modèle monoarthrite, CFA) et le développement œdémateux ont été évalués par le test de von Frey et par mesure de l'œdème chez des animaux knock-out Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) et leur littermates sauvages (Cav3.2^{+/+}). L'allodynie et l'hyperalgie tactile ont été respectivement évaluées par les filaments de von Frey exerçant une pression de 0,04 g et 1,4 g. Les mesures ont été effectuées à J0 et J7 après injection péri-articulaire de CFA. **a)** Allodynie mécanique, **b)** hyperalgie mécanique, **c)** mesure de l'œdème. Les données sont représentées en moyennes (n = 8) ± SEM. **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

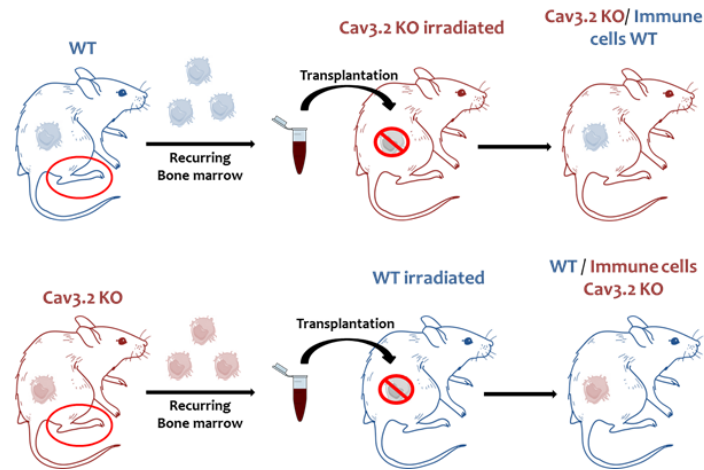


Figure S2 : Génération des souris chimériques.

D. RESULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIES

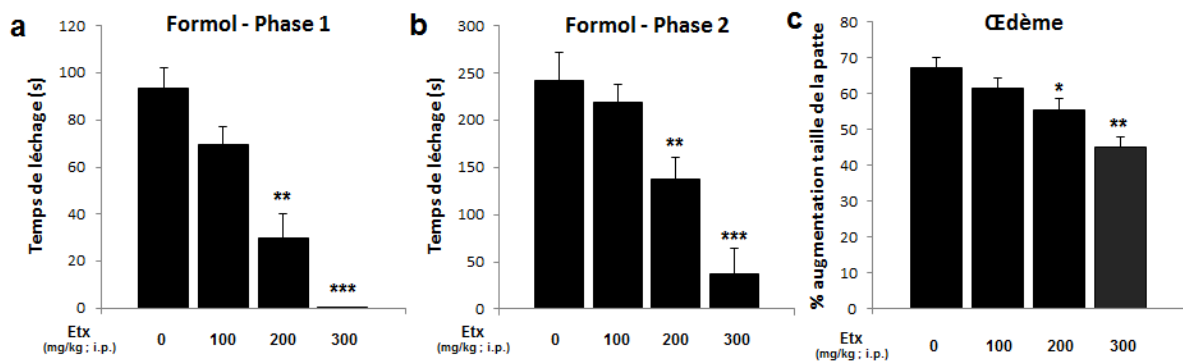


Figure 42: L'éthosuximide induit un effet antalgique et anti-inflammatoire dans le test au formol. L'impact de l'éthosuximide (100, 200 et 300 mg/kg, i.p.) sur la douleur aiguë (phase 1) et inflammatoire (phase 2) et le développement œdémateux (mesure de l'œdème) ont été évalués par le test au formol chez des animaux sauvages. La douleur a été évaluée par le chronométrage du temps de léchage de la patte durant les deux phases typiques de comportement douloureux associées au test du formol (phase 1: 0-5 min et phase 2: 15-40 min). L'injection d'éthosuximide a été effectuée 20 min avant l'injection intraplantaire de formol 2,5%. **a)** phase 1, **b)** phase 2, **c)** mesure de l'œdème (40 min après formol). Les données sont représentées en moyennes \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicules.

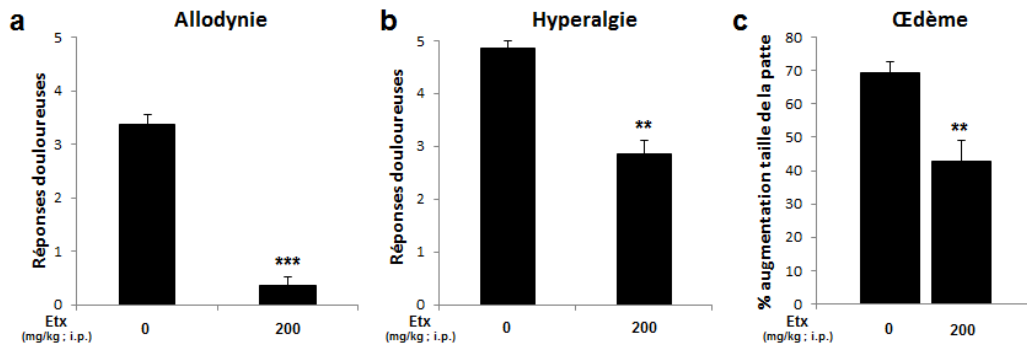


Figure 43: L'éthosuximide induit un effet antalgique et anti-inflammatoire dans le modèle carragénine. L'impact de l'éthosuximide (200 mg/kg, i.p., T30min) sur la douleur inflammatoire sub-chronique (modèle carragénine) et le développement œdémateux ont été évalués par le test de von Frey et par mesure de l'œdème chez des animaux sauvages. L'allodynie et l'hyperalgie tactile ont été respectivement évaluées par les filaments de von Frey exerçant une pression de 0,04 g et 1,4 g. Les mesures ont été effectuées à 4h après injection intraplantaire de carragénine 3%. **a)** Allodynie mécanique, **b)** hyperalgie mécanique, **c)** mesure de l'œdème. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicules.

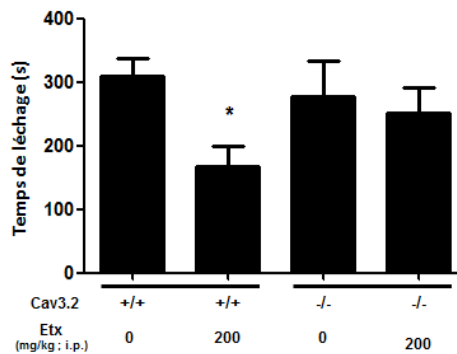


Figure 44: L'effet antinociceptif de l'éthosuximide nécessite les canaux Cav3.2. L'implication des canaux Cav3.2 dans l'action de l'éthosuximide (200 mg/kg, i.p.) sur la douleur a été évalué par le test au formol (phase 2) chez des animaux Cav3.2^{-/-} et Cav3.2^{+/+}. La douleur a été évaluée par le chronométrage du temps de léchage de la patte durant la deuxième phase de comportement douloureux associée au test du formol (phase 2 : 15-40 min). L'injection d'éthosuximide a été effectuée 20 min avant l'injection intraplantaire de formol 2,5%. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM. *, $p < 0,05$; en comparaison des groupes véhicules.

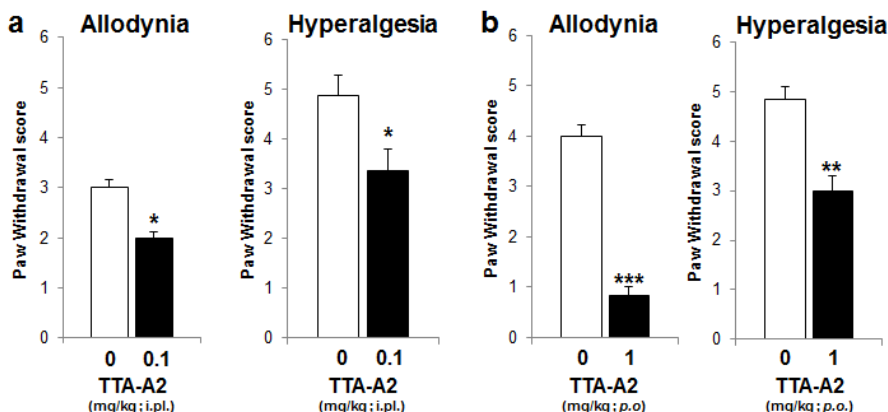


Figure 45: Le TTA-A2 induit un effet antalgique dans le modèle carragénine. L'impact du TTA-A2 (0,1 mg/kg, it.pl. et 1 mg/kg per os, T15min) sur la douleur inflammatoire sub-chronique (modèle carragénine) a été évalué par le test de von Frey chez des animaux sauvages. L'allodynie et l'hyperalgie tactile ont été respectivement évaluées par les filaments de von Frey exerçant une pression de 0,04 g et 1,4 g. Les mesures ont été effectuées à 4h après injection intraplantaire de carragénine 3%. **a)** Effet périphérique, **b)** effet systémique. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicules.

E. MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Les souris knock-out Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}) et leur littermates sauvages (Cav3.2^{+/+}) ont été élevés à l'Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand, France) en conditions environnementales contrôlées (21-22 ° C, 55% d'humidité) et maintenus sous un cycle lumière / obscurité 12/12h. La nourriture et l'eau étaient disponibles ad libitum. Les souris Cav3.2^{-/-} ont été initialement générées par Chen CC et al.⁶³⁹. Pour toutes les expériences, les souris mâles de 20-25g ont été utilisées et euthanasiées par CO₂. Toutes les expériences ont été effectuées avec l'approbation du Comité pour les questions de recherche et d'éthique en expérimentation animale (CEMEA Auvergne; nr: CE 55 - 12, CE 112 - 12, CE 07 - 08) et du Comité d'éthique du IASP.

2. Modèle Carragénine

L'inflammation sub-aiguë de la patte a été induite par une injection intraplantaire de 20 µl de sérum physiologique / 3% λ-carragénine (Sigma-Aldrich, France). Les seuils douloureux de base ont été effectués avant l'injection carragénine. Les tests de comportement ont été réalisés à 2h, 4h, 6h, 8h et 24h, pour les expériences avec les souris Cav3.2^{-/-}, et 4h après l'induction de l'inflammation, pour les souris traitées avec le composé TTA-A2 (Merck laboratoires, Pennsylvanie, USA). Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées 4h après l'injection de carragénine.

3. Test de von Frey

Les souris ont été habituées aux tests avant le jour de l'expérimentation. L'expérimentateur et les administrations des drogues étaient en aveugles vis à vis du génotype des souris et des traitements. L'administration des drogues a été réalisée par une tierce personne que l'expérimentateur. Le jour du test comportemental, les souris sont placées dans des compartiments individuels au-dessus d'une surface métallique grillagée et laissées en acclimatation pendant une heure. Les seuils de réponse nociceptive ont été évalués avec les filaments de von Frey calibrés de 0,04 g et 1,4 g (Bioseb, France). Ces derniers ont été pressés perpendiculairement à cinq reprises contre le milieu patte et maintenus pendant 3 s. Une réponse douloureuse positive a été notée si la patte a été retirée et un score de douleur (0-5) a été déterminé.

4. Culture de macrophages issus de moelle osseuse (BMDM)

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) ont été préparés et cultivés comme décrit précédemment⁶⁹⁵. Brièvement, les fémurs et tibia des souris ont été vidés de leur moelle osseuse avec du milieu DMEM. La suspension cellulaire obtenue a été ensuite mise en culture à hauteur de 10⁶ cellules / ml. Les cellules ont été cultivées et différenciées en BMDM en utilisant un milieu DMEM supplémenté avec 10% SVF, 1% glutamine, 1% antibiotique (néomycine) et 50% de surnageant de culture de cellule L929, contenant le facteur de différenciation macrophagique (M-CSF). Pour les expériences *in vitro*, les BMDM ont été cultivés au moins 5 jours avant d'être stimulés par du LPS en milieu de culture sans SVF.

5. ELISA

Les productions de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et de PGE₂ ont été évaluées par le test ELISA. Tous les kits ELISA sont des kits DUOSET de R & D Systems (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Les tests ont été effectués selon le protocole du fabricant. Les doses minimales détectables étaient de 15.6 pg / ml pour IL-1 β , PGE₂ et l'IL-6 et 31 pg / ml pour TNF- α .

6. Mesure et culture d'œdème

L'évolution de l'œdème de la patte induit par injection intraplantaire de carragénine a été mesurée pendant 24 heures à l'aide d'un pied à coulisse. Pour la mise en culture, l'œdème (30 mg de tissu / souris) a été retiré quatre heures après injection de carragénine et cultivé dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF inactivé à la chaleur, 1% de glutamine et 1% d'antibiotique (néomycine). Après 24h, le milieu est récolté et le surnageant utilisé pour quantifier les facteurs pro-inflammatoires par ELISA.

7. Immunocytochimie

L'Alexa Fluor® 546 Phalloidin et l'anticorps de rat anti-F4/80 de souris ont été utilisés aux dilutions indiquées par les fournisseurs : Phalloidin (5/200, Invitrogen) et F4/80 (1/500, ABD Serotec). Les BMDM ont été étalés sur des lamelles et ont été fixés pendant 5 min avec du paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Après trois lavages en PBS, les cellules ont été incubées 1 h avec du PBS-3%BSA pour la saturation. Les cellules ont été perméabilisées dans du PBS contenant 0,3% de Triton X-100 pendant 15 min à température ambiante et, après lavages, ont été incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps F4/80 dilué dans du PBS-3% BSA. Après trois lavages en PBS, les BMDM ont été incubés pendant 1h avec l'anticorps secondaire approprié. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 20 min avec la toxine Phalloidin dans du PBS-3% BSA. Enfin, les BMDM ont été montées entre lames et lamelles et observés. Les acquisitions d'image ont été réalisées avec l'Axio Scope A1 (Zeiss). La mesure des aires cellulaires a été effectuée par le logiciel ImageJ (National Institutes of Health).

8. Imagerie Calcique

L'effet du traitement au TTA-A2 et l'implication des canaux Cav3.2 sur les concentrations de Ca²⁺ intracellulaire ont été évalués en enregistrant les changements de concentration en Ca²⁺ cytoplasmique en utilisant la sonde fluorescente Fura-2 sur une culture de BMDM purifiés à partir de souris Cav3.2^{-/-} et leur littermates sauvages . Les cellules ont été chargées avec 2 μ M de Fura-2 acetoxyethyl ester (Fura-2/AM, Invitrogen), dans une solution d'enregistrement saline / 0,5% BSA (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM de CaCl₂, MgCl₂ 2 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4). Après une heure d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées trois fois et ensuite stimulées par du LPS ou LPS + TTA-A2. Le système d'imagerie Metafluor (Molecular Devices) a été utilisé pour l'acquisition de la fluorescence et l'analyse des cellules individuelles. La fluorescence détectée avec une caméra CCD sous le contrôle du logiciel Metafluor. Les images ont été acquises toutes les deux secondes.

9. Souris chimériques

Pour la génération de souris chimérique au niveau de la moelle osseuse⁶⁹⁶, des souris Cav3.2^{-/-} et leur littermates (WT) ont été irradiées avec une dose totale de 10 Gy (1Gy / min) par le X-RAD 320 irradiateur

(320kV, 45mA, Precision X-RAY Inc. Brandford-CT) à la plate-forme PAVIRMA (Clermont-Ferrand, France). Les souris ont reçues par la veine de la queue une injection intraveineuse de 100 µl de DMEM avec 10⁷ cellules de moelle osseuse extraites de souris Cav3.2^{+/+} ou Cav3.2^{-/-} immédiatement après l'irradiation (Figure S2). Au cours de deux semaines après l'irradiation, l'eau de consommation des animaux a été complétée avec 2 mg / ml de néomycine. Huit semaines après la transplantation, les souris chimériques ont été utilisées pour les expériences.

10. RT-q-PCR

L'ARN a été isolé en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant, y compris une étape d'incubation à la DNase de 15 min. L'ARN purifié a été quantifié en mesurant l'absorbance 260 nm (A260) avec le spectrophotomètre Epoch® (Biotek) et la qualité a été évaluée par l'analyse des rapports A260/A280 et A260/A230. L'intégrité des échantillons d'ARN a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Avant l'analyse de PCR quantitative, 1 mg d'ARN total a été soumis à une transcription inverse avec MultiScribe™ transcriptase inverse (Applied Biosystems) dans un volume de 20 µl, en utilisant la procédure du fournisseur. La PCR a été effectuée en utilisant un Mastercycler ep realplex (Eppendorf). Tous les échantillons ont été analysés en triple dans un volume final de 6,3 µl contenant 1,3 µl d'ADNc au 1/40^e, amorces à 0,5 µM, 3 mM de MgCl₂ et un mélange réactionnel de LightCycler Fast-Start SYBR Green (Roche), selon le protocole du fabricant. Avant la PCR, une étape d'activation de l'enzyme de 5 minutes a été effectuée à 95°C. Le protocole de la PCR a consisté en 10 s de dénaturation à 95°C, 10 s à la température d'hybridation (62°C) et 10 s d'élongation à 72°C pendant 60 cycles. La température d'hybridation optimale a été déterminée préliminairement par gradient PCR. Les séquences des amorces utilisées étaient les suivantes: ACACAACGTGAGCCTCTCTG (forward) et AGCAGTGTGACCAGGATTCG (reverse) pour Cav3.2 (NM_021415.4, 8,240 bp) et TCCAGGCTTTGGCATCA (forward) et CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA (reverse) pour 36B4 (NM_007475.5, 1,360 bp). La spécificité d'amplification a été évaluée par l'analyse des courbes de fusion et les produits de PCR ont été évalués sur un gel d'agarose à 1,5% pour confirmer la taille des amplicons. Les amorces ont été conçues sur -des séquences d'intron adjacents pour empêcher la contamination génomique. Les quantités relatives d'ADNc de Cav3.2 et 36B4 ont été calculées en fonction du seuil de cycle des échantillons à l'aide d'une courbe de concentration d'étalonnage construite avec une dilution en série 1/10-1/640 d'un mélange d'ADNc total. Pour chaque échantillon, la quantité relative d'ADNc Cav3.2 a été normalisée par la quantité d'ADNc 36B4.

11. Analyses Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et analysées en utilisant le logiciel SigmaStats 3.5. Les données ont été testées pour la normalité et l'égalité des variances. Les mesures ont été comparées par le test de Student (échantillon indépendant) ou par test de Mann-Whitney en cas de données qui ne passaient pas la loi normale ou l'égalité des variances. Les mesures multiples ont été comparées par une ANOVA à deux voies ou par le test de Kruskal-Wallis ou Friedman en cas de données qui n'étaient pas distribuées selon une loi normale. Les comparaisons post hoc ont été réalisées par la méthode de Bonferroni. Les valeurs de p < 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

F. DISCUSSION / PERSPECTIVES

1. Implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire

L'implication des canaux Cav3.2 dans la perception et le développement des douleurs inflammatoires a été évaluée grâce au modèle murin de douleur inflammatoire induite par injection intraplantaire d'une solution de carragénine 3%. Le modèle a été induit chez des souris invalidées pour le gène codant le canal Cav3.2 et leurs congénères sauvages. L'hypersensibilité douloureuse inflammatoire a été évaluée par le test de von Frey à différents temps après induction de l'inflammation.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les animaux sauvages développent les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie tactile, suite à l'injection de carragénine, avec une acmé à 6h. **Les symptômes d'hypersensibilités douloureuses sont totalement absents chez les animaux knock-out Cav3.2** (même résultats obtenu dans le modèle CFA, Figure S1 et lors de l'administration de TTA-A2, Figure 45). Ainsi, les canaux Cav3.2 semblent être cruciaux dans la perception douloureuse en contexte inflammatoire. Ce résultat est en accord avec la littérature qui a montré la forte implication des canaux Cav3.2 dans la perception douloureuse aiguë^{532,580} et chronique neuropathique^{581,582,584}. Comme pour nos résultats, l'inhibition des canaux Cav3.2 (antisens) abolit totalement les symptômes d'hypersensibilité douloureuse associés aux douleurs neuropathiques traumatiques^{581,582} et les souris invalidées pour le canal Cav3.2 ne développent pas ces symptômes d'hypersensibilité dans le cas d'une neuropathie métabolique⁵⁸⁴. L'implication des canaux Cav3.2 dans l'excitabilité neuronale et le relargage des neurotransmetteurs explique sûrement la diminution drastique de la perception douloureuse quel que soit le contexte pathologique. En effet, l'absence des canaux Cav3.2 dans le système nerveux pourrait rendre les neurones moins excitables et moins prompt à répondre aux stimulations algogènes^{522,526}.

Nos résultats confirment l'implication des canaux Cav3.2 dans la perception douloureuse, ceci dans un contexte pathologique nouveau qui est l'inflammation. De ce fait, l'inhibition des canaux Cav3.2 semble être une bonne voie pour de nouvelles thérapeutiques antidouleur.

2. Implication des canaux Cav3.2 dans le développement œdémateux

L'hypersensibilité inflammatoire est induite par les médiateurs pro-inflammatoires libérés par divers types cellulaires (cellules épithéliales, lymphocytes, macrophages) recrutés au site inflammatoire, se traduisant notamment par le développement d'un œdème. La libération de ces médiateurs pro-inflammatoires va venir sensibiliser les nocicepteurs et induire les phénomènes d'hypersensibilités douloureuses (pour revue^{684,685,697}). Du fait du phénotype exhibé par les souris *knock-out Cav3.2* qui ne développent aucun des symptômes d'hypersensibilités douloureuses, nous nous sommes intéressés également aux paramètres inflammatoires (œdème et production des médiateurs pro-inflammatoires) de ces souris. Pour cela, le développement œdémateux a été évalué à différents temps après induction de l'inflammation par la carragénine. Les résultats obtenus montrent **un développement œdémateux chez les animaux sauvages, avec une acmé à 6h, mais qui est diminué ($\approx 20\%$) chez les animaux *knock-out Cav3.2*** (mêmes résultats obtenus dans le modèle CFA, Figure S1). Suite à cette observation, la production des médiateurs inflammatoires, au niveau plasmatique et périphérique (œdème) a été évaluée. Les résultats montrent que la **production des médiateurs pro-inflammatoires (il-6, il-1 β , TNF- α et PGE2) est fortement diminuée chez les animaux *knock-out Cav3.2*** en comparaison d'animaux sauvages.

Ces résultats novateurs montrent pour la première fois une implication de canaux calciques voltage dépendant dans le développement œdémateux et la production des médiateurs pro-inflammatoires.

Ces résultats sont en accord avec une étude plus récente ayant montré que l'inhibition des canaux sodiques voltage dépendant TTX-S par la neurotoxine anntoxine⁶⁹⁸ diminuait l'œdème et la production du médiateur pro-inflammatoire, TNF- α , dans le modèle carragénine⁶⁹⁹.

3. Les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires interviennent dans le développement œdémateux

Les résultats précédents ont montré l'incapacité des souris *knock-out Cav3.2* à produire des médiateurs pro-inflammatoires en contexte inflammatoire. L'impact de cette insuffisance est un œdème moins important et une douleur inflammatoire réduite. Les cellules majoritairement impliquées dans la production des médiateurs pro-inflammatoires et le développement de

l'œdème au niveau périphérique sont les macrophages. Nous avons par conséquent émis l'hypothèse d'une implication des canaux Cav3.2 dans leur activation.

L'expression du canal Cav3.2 dans les macrophages a été montrée par RT-q-PCR à partir d'ARNm de macrophages issus de la moelle osseuse. Suite à la confirmation de la présence des canaux Cav3.2 dans les macrophages, l'évaluation de leur implication spécifique dans le développement œdémateux et la douleur inflammatoire a été étudiée. Le phénotype des animaux *knock-out* Cav3.2 en contexte inflammatoire peut être dû à l'effet conjoint de leur absence au niveau neuronal (effet antinociceptif) et au niveau immunitaire (effet anti-inflammatoire). Pour répondre à cette question et évaluer la part de chacun dans ces phénomènes, une approche innovante fut choisie : la génération de souris chimériques. Les souris chimériques ont la particularité de posséder un génotype différent selon le tissu étudié. Dans notre cas, les souris chimériques expriment soit le canal Cav3.2 uniquement au niveau des cellules immunitaires, soit dans la totalité de l'organisme à l'exception des cellules immunitaires. Ainsi, l'impact de la présence ou non des canaux Cav3.2 spécifiquement dans les cellules immunitaires, incluant les macrophages, sur l'hypersensibilité douloureuse et le développement œdémateux a été possible. Les résultats obtenus dans le modèle carragénine nous montrent que **les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires sont impliqués dans le développement œdémateux et dans une moindre mesure dans l'hypersensibilité douloureuse.** En effet, l'absence des canaux Cav3.2 au niveau des cellules immunitaires réduit le développement œdémateux, à hauteur de 20%, comme observé chez les animaux *knock-out* Cav3.2. De plus, la transplantation de cellules immunitaires exprimant les canaux Cav3.2 chez des animaux *knock-out* Cav3.2 restaure totalement le développement œdémateux, comme observé chez des animaux sauvages. Ainsi, nous avons démontré une implication des canaux Cav3.2 spécifiquement exprimés par les cellules immunitaires dans le développement œdémateux. D'un point de vue douloureux, la réciproque n'est pas observée. En effet, l'absence des canaux Cav3.2 uniquement au niveau des cellules immunitaires ne modifie pas les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie tactiles en conditions inflammatoires. Par contre, les animaux *knock-out* Cav3.2 ayant été transplantés par des cellules immunitaires exprimant le canal Cav3.2 redéveloppent des symptômes d'allodynie et d'hyperalgie tactiles.

Ces résultats pris ensemble montrent que les canaux Cav3.2 exprimés par les cellules immunitaires participent activement au développement œdémateux et sont suffisants, mais néanmoins non primordiaux, à l'induction de l'hypersensibilité douloureuse induite par l'inflammation.

La discordance de résultats observée au niveau de l'hypersensibilité douloureuse peut s'expliquer par plusieurs points :

- 1) la transplantation de cellules immunitaires exprimant le canal Cav3.2 chez l'animal *knock-out* Cav3.2 est suffisante pour permettre une réaction inflammatoire adaptée et par conséquent induire les symptômes d'hypersensibilité associés ;
- 2) l'absence seule des canaux Cav3.2 au niveau des cellules immunitaires n'est pas suffisante pour inhiber l'hypersensibilité douloureuse. D'autres mécanismes peuvent intervenir dans les processus inflammatoires, par exemple, le phénomène d'inflammation neurogène. En effet, l'inflammation neurogène est un processus neuronal qui intervient lors d'une inflammation. Les neurones, suite à leur activation et sensibilisation par les médiateurs pro-inflammatoires locaux, vont produire en réponse des substances algogènes telles que la substance P et le CGRP. Ces deux substances vont activer et sensibiliser les neurones aux alentours du site inflammatoire, participant ainsi aux phénomènes d'extension territoriale et d'hypersensibilité douloureuse associées à l'inflammation. L'absence de retour total de l'hypersensibilité douloureuse chez des animaux *knock-out* Cav3.2 transplantés par des cellules immunitaires exprimant le canal Cav3.2 peut s'expliquer par une absence ou une diminution du phénomène d'inflammation neurogène du fait que l'absence des canaux Cav3.2 au niveau neuronal réduit l'excitabilité neuronale et donc leur réponse aux médiateurs pro-inflammatoires ;
- 3) la dissociation observée entre œdème et douleur n'est pas aberrante. En effet, le robenacoxib (inhibiteur COX-2) induit chez le rat inflammé (modèle carragénine) un effet anti-œdémateux pour des doses de 0,3, 1, 3 et 10 mg/kg alors que les animaux n'ont pas de variations de leur état douloureux, état qui diminue seulement pour une dose 30 mg/kg⁷⁰⁰. Une autre étude a également montré une non-corrélation entre œdème et douleur chez l'animal. Cette étude montre que dans le modèle au formol chez le rat, la solution concentrée à 2,5% de formol induit un comportement douloureux plus important que les solutions à 5 et 10% et que, *a contrario*, la solution à 2,5% induit un œdème plus petit que les autres solutions⁷⁰¹. Enfin, une troisième étude montre les mêmes observations lors de l'utilisation de chlomipramine (antidépresseur et anxiolytique)⁷⁰². Néanmoins, plusieurs études restent à être effectuées pour élucider ces phénomènes.

4. Les canaux Cav3.2 participent à l'activation des macrophages

Suite à ces diverses observations (œdème et production des facteurs pro-inflammatoires diminués, expression du canal Cav3.2 par les macrophages), nous avons émis l'hypothèse d'une

implication des canaux Cav3.2 dans l'activation des macrophages. Pour cela, nous avons évalué l'activation macrophagique par différentes approches : 1) une approche par dosage ELISA des médiateurs pro-inflammatoires produits *in vitro* par des macrophages activés par le LPS ; 2) une approche immunohistochimique par étude de la morphologie (« *swelling* ») des macrophages activés et 3) une approche par imagerie calcique pour l'étude des influx de calcium caractéristiques d'une activation macrophagique. Les résultats obtenus montrent que dans ces trois approches, **l'absence des canaux Cav3.2 diminue drastiquement l'activation des macrophages en réponse au LPS**. En effet, les macrophages *knock-out* Cav3.2 produisent moins de médiateurs pro-inflammatoires, ne montrent aucune morphologie de « *swelling* » caractéristique de leur activation et enfin, ne présentent que peu d'influx calciques en réponse au LPS. Tous ces résultats réunis montrent la nécessité des canaux Cav3.2 à l'activation des macrophages en réponse au LPS.

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans ce phénomène, il serait intéressant d'étudier les voies intracellulaires d'activations des macrophages, dont notamment la voie principale NF κ B- $\text{I}\kappa$ B, qui sont toutes dépendantes de la concentration intracellulaire en calcium. Un autre point à vérifier serait l'expression des récepteurs au LPS (récepteurs *Toll Like Receptor*) dans les macrophages *knock-out* Cav3.2. En effet, il se pourrait que la non-réponse des macrophages face au LPS soit due à l'absence d'expression des récepteurs TLR, phénomène compensatoire dû au *knock-out* ou lors du développement.

Il serait également intéressant de valider la nécessité du calcium à l'activation des macrophages en effectuant la même expérience d'imagerie calcique mais cette fois en milieu « *calcium free* ».

Enfin, pour valider l'implication spécifique des canaux Cav3.2 au niveau des macrophages, une étude de l'expression protéique du canal est à envisager, ainsi que l'utilisation de souris *knock-out* Cav3.2 conditionnel spécifiquement au niveau des macrophages et d'observer leur comportement douloureux en contexte inflammatoire.

Au final, nos résultats ont montré un important potentiel thérapeutique de l'inhibition des canaux Cav3.2 pour le traitement de l'inflammation.

5. Ethosuximide et douleurs inflammatoires

Comme énoncé précédemment, l'éthosuximide est un antiépileptique prescrit pour le traitement des épilepsies de type petit mal. Beaucoup de travaux précliniques ont démontré son

efficacité antalgique sur les douleurs neuropathiques^{556-559,584,591,703}. L'éthosuximide est décrit comme un antagoniste non spécifique des canaux de type T, dont le canal Cav3.2. Nous avons montré précédemment l'implication de ce canal dans la douleur inflammatoire et l'inflammation. De plus, aucune étude n'a évalué son potentiel antalgique dans les douleurs chroniques inflammatoires. De ce fait, nous avons étudié l'effet antalgique et anti-inflammatoire de l'éthosuximide chez l'animal, par les mêmes techniques que précédemment (modèle inflammatoire, von Frey et prise de la taille de l'œdème).

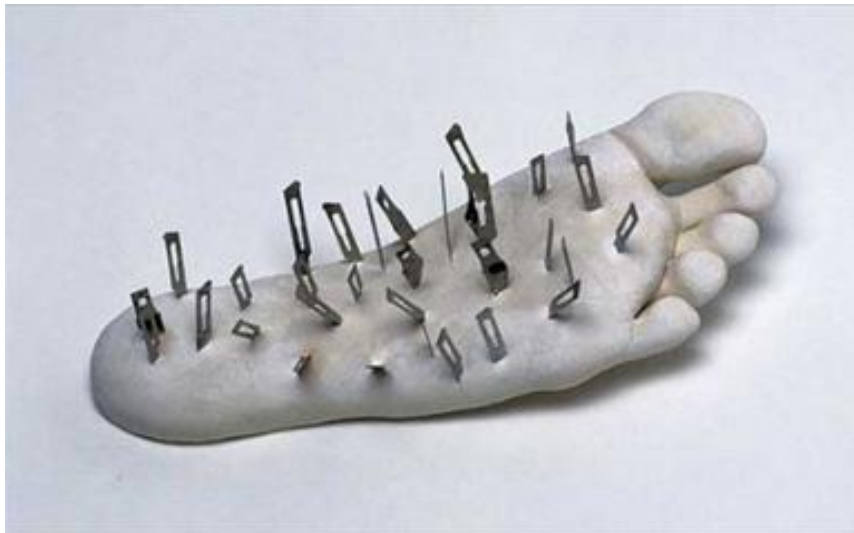
Les résultats obtenus montrent un **effet anti-allodynique et anti-hyperalgique de l'éthosuximide dans 3 modèles de douleur inflammatoire** : subaiguë (formol), subchronique (carragénine) et chronique (CFA, voir projet 3), et ceci pour une dose non sédatrice. L'évaluation du développement œdémateux a également montré un **effet anti-œdémateux de l'éthosuximide**, plus prononcé dans le modèle carragénine.

Ainsi, nous avons montré, pour la première fois, l'efficacité antinociceptive et anti-inflammatoire de l'éthosuximide. Ajouté à son effet bénéfique sur les douleurs neuropathiques, nos résultats confirment le réel potentiel thérapeutique de son utilisation clinique pour le traitement de la douleur chronique.

D'un point de vue mécanistique, la spécificité d'action de l'éthosuximide sur les canaux de type T et plus particulièrement Cav3.2, a été évaluée dans le test au formol chez des animaux knock-out Cav3.2. Les données obtenues ont montré que l'éthosuximide perdait son effet antalgique chez ces animaux. Cela semble supposer que l'effet antalgique de l'éthosuximide passerait spécifiquement par la modulation des canaux Cav3.2. Néanmoins, de plus amples études, dans d'autres modèles inflammatoires, sur le développement œdémateux sont à effectuer.

6. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois une implication des canaux Cav3.2 dans la douleur de type inflammatoire et également dans les processus inflammatoires. Nous avons aussi mis en évidence l'efficacité antinociceptive et anti-inflammatoire de l'éthosuximide sur les douleurs inflammatoires. Nos résultats mettent en lumière l'inhibition des canaux Cav3.2 et l'utilisation de l'éthosuximide comme une nouvelle thérapeutique potentielle dans le traitement des douleurs inflammatoires.



Mark Collen

Sacramento, California

"CP II"

plaster with steel blades

10 inches long x 4 inches wide x 3 inches deep

The sculpture represents suffering from chronic pain.

RESULTATS

ARTICLE 3 :

Canaux calciques de type T et comorbidités
associées à la douleur inflammatoire

(En rédaction)

VIII. ARTICLE 3 : Canaux de type T et comorbidités associées à la douleur inflammatoire.**A. INTRODUCTION**

Pour une grande partie des patients, les douleurs chroniques sont accompagnées d'anxiété et/ou de dépression qui contribuent à une détérioration de leur qualité de vie⁶⁰²⁻⁶⁰⁶. En effet, la prévalence des désordres anxieux chez les patients atteints de douleur chronique s'élève de 20% à 40%, alors qu'ils ne sont que de 7% à 18% dans la population générale^{607,608}. De plus, les signes de dépression chez les patients sont estimés à plus de 50%⁶⁰⁹. Ces patients douloureux présentent ainsi deux à trois fois plus de chance de développer une pathologie de cette nature⁶¹⁰. Ainsi, une prise en charge inadaptée de la douleur peut avoir un impact négatif sur le développement de l'anxiété et de la dépression. Il est à noter également que des patients présentant des troubles anxieux auront un risque plus élevé de développer des douleurs chroniques⁶¹¹.

Les troubles d'anxiété et de dépression sont très fréquents chez les patients douloureux chroniques en condition inflammatoire, telle que l'arthrite^{612,613}. De plus, les symptômes d'anxiété, associé à l'arthrite, ont été démontrés comme amplificateur de la perception douloureuse⁶¹⁴. Ainsi, un maintien mutuel existerait entre douleur inflammatoire chronique et anxiété^{615,616}.

La gestion efficace de la douleur inflammatoire chronique et de ses comorbidités nécessite une combinaison de plusieurs médicaments (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antirhumatismaux, antalgiques, anxiolytiques et antidépresseurs) pour atteindre le niveau souhaité de soulagement de la douleur et de réduction des comorbidités associées (perte de sommeil, anxiété et dépression)⁶¹⁷⁻⁶¹⁹. Néanmoins, la polythérapie comporte le risque d'interactions médicamenteuses et d'effets indésirables^{618,620,621} pouvant diminuer l'efficacité de la gestion de la douleur arthritique⁶¹³. Ainsi, un réel besoin d'innovation thérapeutique est nécessaire pour limiter ces polythérapies et leurs effets indésirables. Ces dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés à l'étude des canaux ioniques dans la nociception pour répondre à cette problématique de santé publique. Récemment, une classe de canaux calciques encore peu étudiée, les canaux calciques de type T, semblent émerger comme une cible prometteuse.

Les canaux calciques de type T possèdent la particularité de s'activer pour de très faibles dépolarisations proches du potentiel membranaire de repos⁵³⁰. Cette capacité leur permet de jouer un rôle dans l'excitabilité neuronale. Ils sont exprimés dans la totalité du système nerveux périphérique et central⁶³⁵. L'isoforme Cav3.2 est la plus exprimée au niveau des neurones des DRG de petits et moyens diamètres et des couches superficielles de la moelle épinière^{571,635}. Partant de ce constat, la communauté scientifique s'est intéressée à son rôle potentiel dans la nociception. Plusieurs études ont démontré le rôle important de l'isoforme Cav3.2 dans la nociception aiguë^{532,580} et chronique neuropathique^{581,582,584}. Actuellement, il n'existe pas d'antagoniste spécifique des canaux calcique de type T. Néanmoins, l'éthosuximide est très largement utilisé comme bloqueur non spécifique dans de nombreuses études. L'éthosuximide produit un effet antalgique chez l'animal en contexte sain⁷⁰⁴ et neuropathique^{556-559,591}. De manière intéressante, l'éthosuximide est commercialisé en Europe en tant qu'antiépileptique pour le traitement des épilepsies de petit mal. Plusieurs antiépileptiques, comme la prégabaline et la gabapentine, sont largement utilisés dans le traitement des douleurs chroniques, comme les douleurs neuropathiques, et de leurs comorbidités associées.

Pour toutes ces raisons, nous avons jugé intéressant d'analyser le phénotype des animaux *knock-out* Cav3.2 et l'effet de l'éthosuximide sur les phénomènes d'anxiété et de dépression liés aux douleurs chroniques inflammatoires.

B. RESULTATS

Pour évaluer l'implication des canaux calciques de type T dans les comorbidités associées aux douleurs inflammatoires chroniques, nous avons en premier lieu étudié l'impact de l'inhibition du canal Cav3.2 par invalidation génique (*knock-out* Cav3.2) ou par un antagoniste spécifique (TTA-A2) sur les composantes d'anxiété et de dépression. Pour cela, trois tests évaluant l'anxiété (« *elevated plus maze* », « *open field* » et « *novelty suppress feeding* » (modalité anxieuse)) (Figure 44) ainsi que trois évaluant la dépression (« *tail suspension* », « *forced swimming* » et « *novelty suppress feeding* » (modalité dépressive)) (Figure 45) ont été effectués chez les animaux en **contexte sain**.

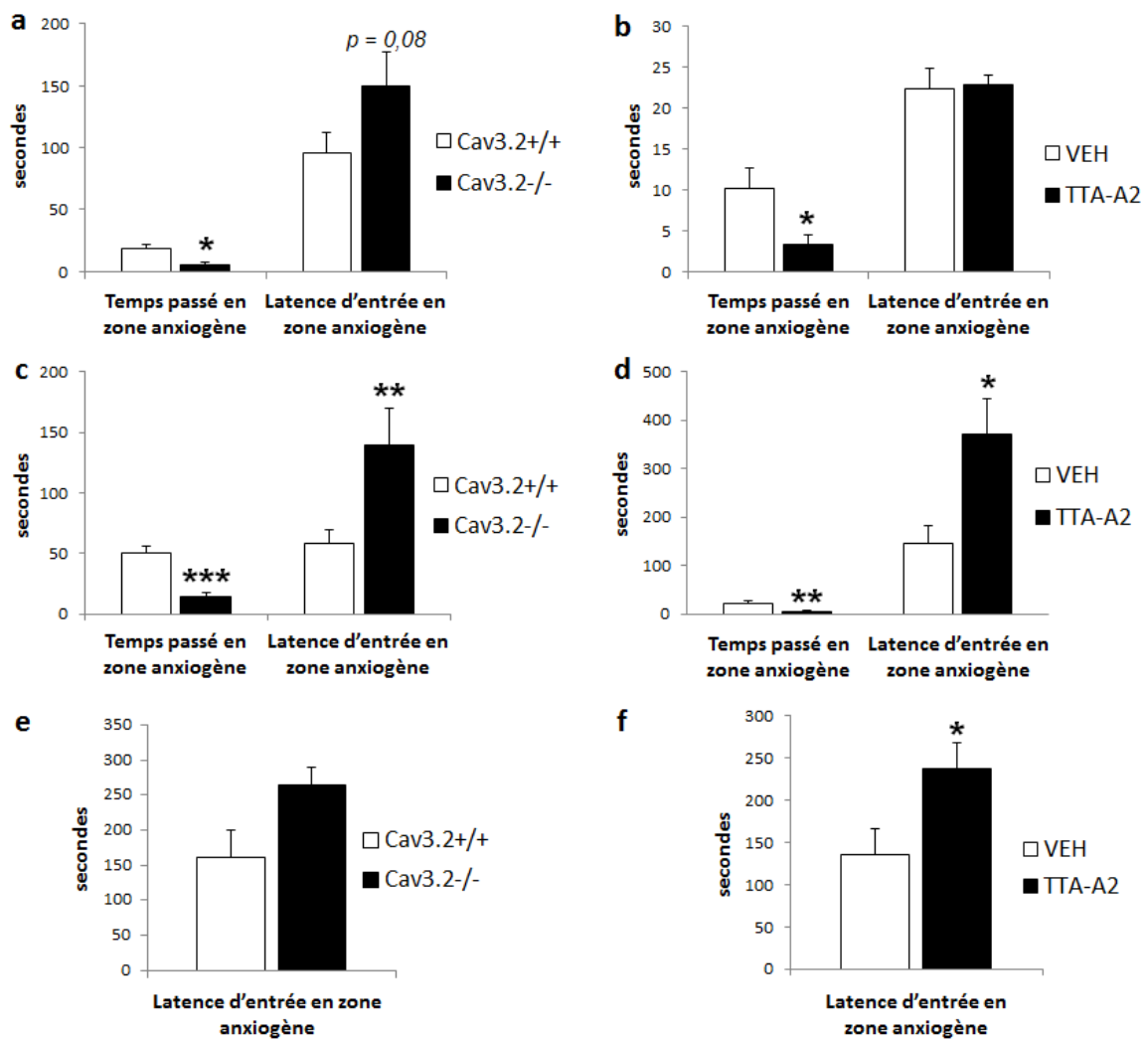


Figure 44 : L'inhibition des canaux Cav3.2 induit un phénotype anxieux. Pour évaluer l'impact de l'inhibition des canaux Cav3.2 chez des souris Cav3.2^{-/-} (a, c, e) ou recevant du TTA-A2 (1 mg/kg, per os, T15min) (b, d, f) sur l'anxiété, les tests « elevated plus maze », « open field » et « novelty suppress feeding » (modalité anxieuse) ont été utilisés. La latence de première entrée en zone anxiogène et le temps total passé en zone anxiogène ont été évalués. a, b) « elevated plus maze » ; c, d) « open field » ; e, f) « novelty suppress feeding ». Les données sont représentées en moyenne ± SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicule (VEH) ou Cav3.2^{+/+}.

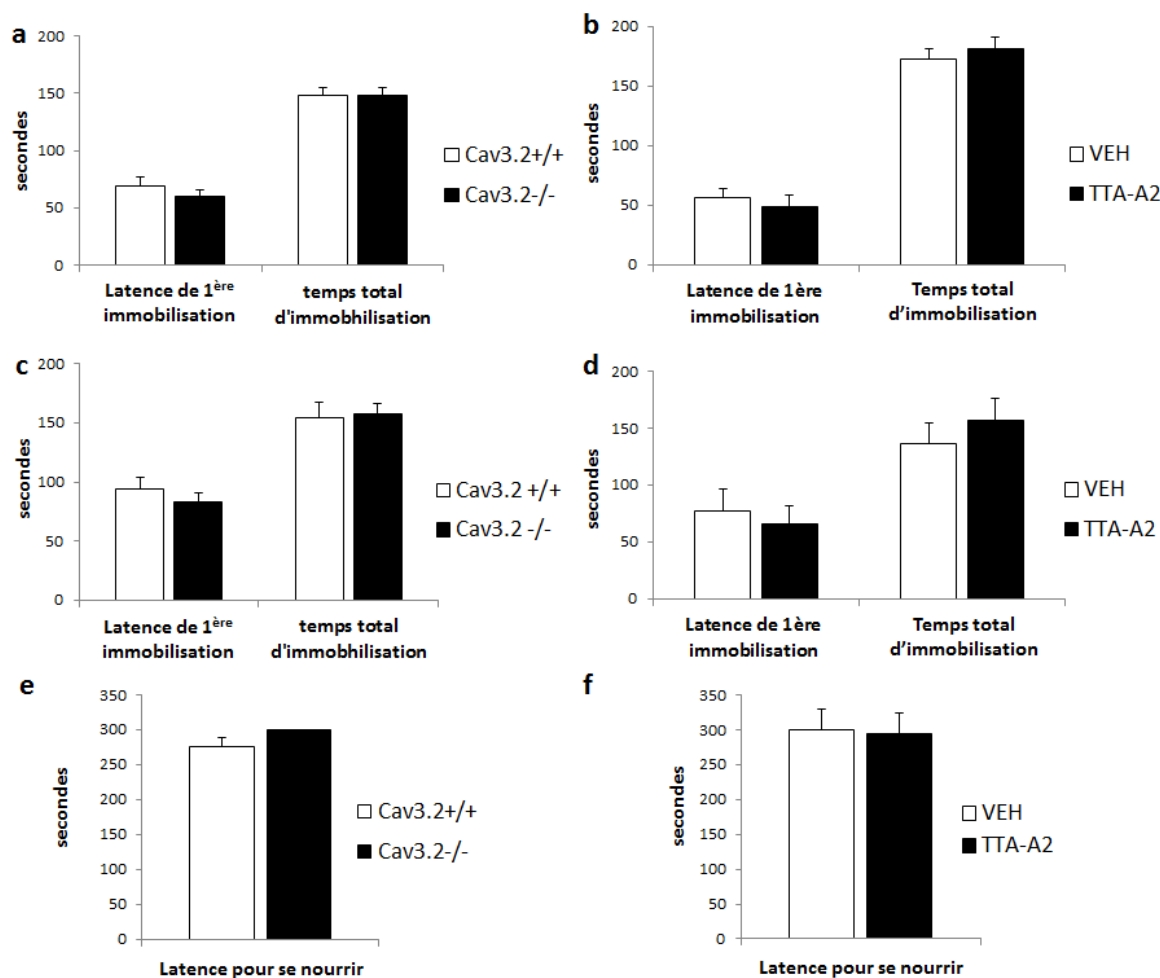


Figure 45: L'inhibition des canaux Cav3.2 n'induit pas de phénomènes de dépression. Pour évaluer l'impact de l'absence des canaux Cav3.2 chez des souris Cav3.2^{-/-} (a, c, e) ou recevant du TTA-A2 (1 mg/kg, per os, T15min) (b, d, f) sur la dépression, les tests « tail suspension », « forced swimming » et « novelty suppress feeding » (modalité dépressive) ont été utilisés. La latence de première immobilisation et le temps total d'immobilité ainsi que la latence pour se nourrir ont été évalués. a, b) « Tail suspension » ; c, d) « forced swimming » ; e, f) « novelty suppress feeding ». Les données sont représentées en moyenne ± SEM en comparaison des groupes véhicule (VEH) ou Cav3.2^{+/+}.

Les souris invalidées pour le gène codant le canal Cav3.2 ne montrent aucune différence concernant la locomotion, les réflexes moteurs ou la force musculaire par rapport à des souris sauvages (Figure supplémentaire S1). Ces résultats sont importants puisqu'en cas d'atteinte locomotrice ou musculaire ou de la réactivité, les tests évaluant l'anxiété ou la dépression (basés sur une réaction locomotrice) n'auraient pas pu être possibles. Les tests évaluant l'anxiété ont montré que les souris Cav3.2^{-/-}, ou recevant du TTA-A2, développaient une anxiété par rapport aux souris sauvages ou recevant du véhicule (Figures 44). *A contrario*, concernant la dépression, les animaux Cav3.2^{-/-} ou recevant du TTA-A2 n'ont pas montré de différence par rapport aux animaux sauvages ou recevant du véhicule (Figures 45). Les animaux Cav3.2^{-/-} présentent ainsi un phénotype anxieux et non dépressif. Ceci est un résultat innovant puisque aucune donnée dans la littérature n'avait encore montré ce phénotype.

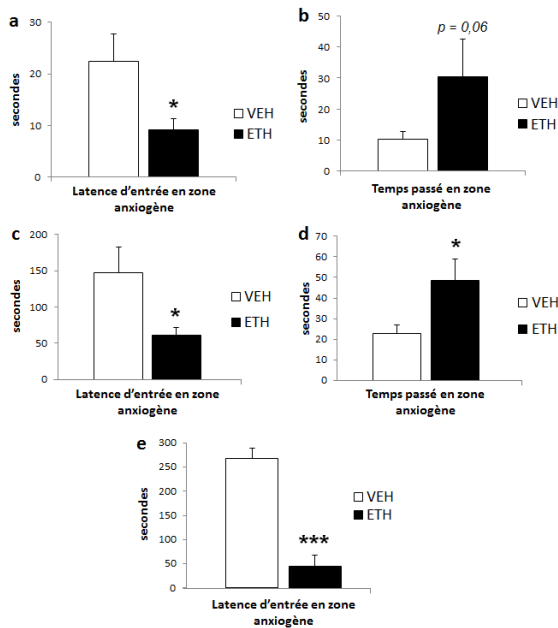


Figure 46 : L'éthosuximide induit un effet anxiolytique chez l'animal sain. Pour évaluer l'impact de l'éthosuximide (ETH, 200 mg/kg, i.p., T30min) sur l'anxiété, les tests « *elevated plus maze* », « *open field* » et « *novelty suppress feeding* » (modalité anxieuse) ont été utilisés. La latence de première entrée en zone anxiogène et le temps total passé en zone anxiogène ont été évalués. **a, b)** « *elevated plus maze* » ; **c, d)** « *open field* » ; **e, f)** « *novelty suppress feeding* ». Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicule (VEH).

Par la suite, nous avons également évalué l'effet de l'éthosuximide cette fois en contexte sain et inflammatoire (modèle CFA). Cela nous a permis de caractériser l'impact de l'éthosuximide sur le développement de l'anxiété et la dépression, suite à une douleur chronique inflammatoire chez l'animal. Pour répondre à cette question, les mêmes tests évaluant l'anxiété (Figures 46 et 49) et la dépression (Figure 47) ont été utilisés en contexte sain (Figures 46 et 47) et inflammatoire (Figure 49). Parallèlement, nous avons également étudié l'effet antalgique de l'éthosuximide sur la douleur inflammatoire (Figure 48).

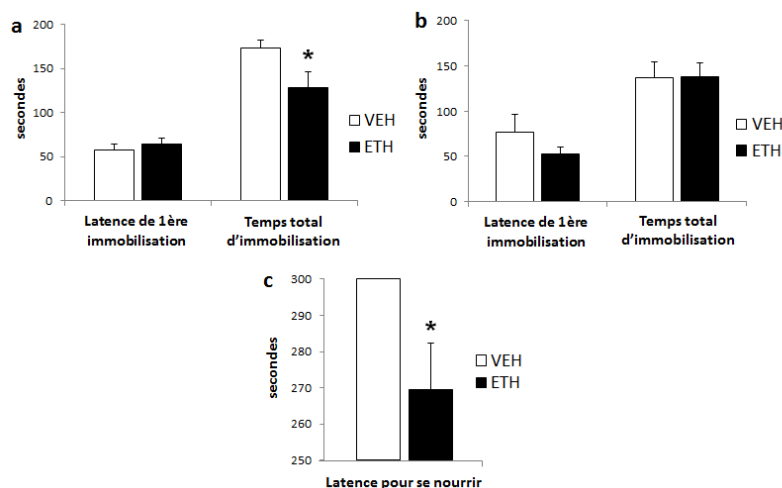


Figure 47 : L'éthosuximide induit un effet antidépresseur chez l'animal sain. Pour évaluer l'impact de l'éthosuximide (ETH, 200 mg/kg, i.p., T30min) sur la dépression, les tests « *tail suspension* », « *forced swimming* » et « *novelty suppress feeding* » (modalité dépressive) ont été utilisés. La latence de première immobilisation et le temps total d'immobilité ainsi que la latence pour se nourrir ont été évaluées. **a)** « *Tail suspension* » ; **b)** « *forced swimming* » ; **c)** « *novelty suppress feeding* ». Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. *, $p < 0,05$, en comparaison des groupes véhicule (VEH).

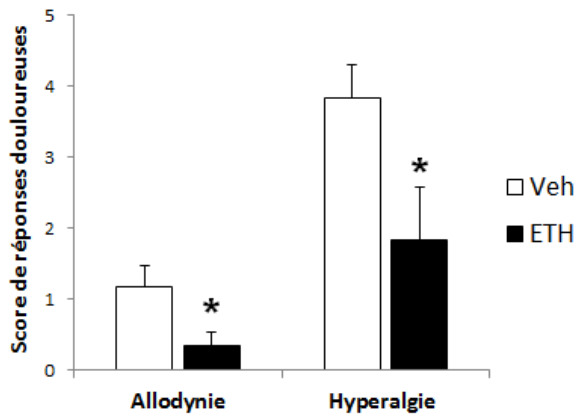


Figure 48 : L'éthosuximide induit un effet anti-allodynique et anti-hyperalgique en contexte inflammatoire. Pour évaluer l'impact de l'éthosuximide (ETH, 200 mg/kg, i.p., T30min) sur la douleur inflammatoire (modèle CFA, 14 jours après injection péri-articulaire de CFA), le test de von Frey a été utilisé pour évaluer les symptômes d'allodynie (filament de 0,04 g) et d'hyperalgie (filament de 1,4 g). Les scores de réponses douloureuses suite aux 5 stimulations mécaniques, pour chaque filament, ont été évalués. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. *, $p < 0,05$, en comparaison des groupes véhicule (VEH).

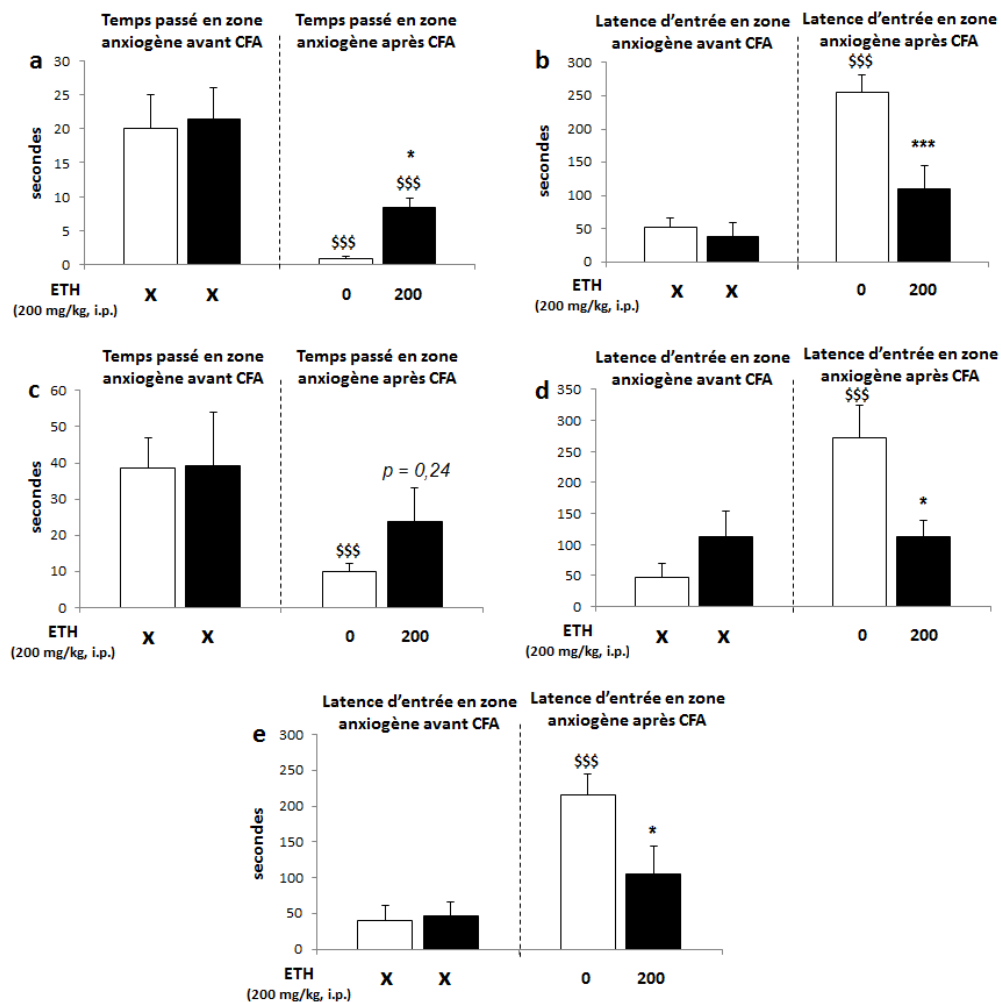


Figure 49 : L'éthosuximide induit un effet anxiolytique chez l'animal en contexte inflammatoire. Pour évaluer l'impact de l'éthosuximide (ETH, 200 mg/kg, i.p., T30min) sur l'anxiété développée lors d'une douleur chronique inflammatoire (modèle CFA, 14 jours après injection péri-articulaire de CFA), les tests « *elevated plus maze* », « *open field* » et « *novelty suppress feeding* » (modalité anxieuse) ont été utilisés. La latence de première entrée en zone anxiogène et le temps total passé en zone anxiogène ont été évalués. **a, b)** « *elevated plus maze* » ; **c, d)** « *open field* » ; **e)** « *novelty suppress feeding* ». Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, en comparaison des groupes véhicule ; \$\$\$, $p < 0,01$, en comparaison des groupes respectifs avant CFA.

Les résultats obtenus montrent que l'éthosuximide, contrairement au souris Cav3.2^{-/-} ou recevant du TTA-A2, induit un effet anxiolytique et antidépresseur que ce soit en contexte sain ou inflammatoire. L'éthosuximide produit également un effet anti-allodynique et anti-hyperalgique lors d'une inflammation chronique (modèle CFA). Les résultats suggèrent que l'éthosuximide agit comme un antalgique, un anxiolytique et un antidépresseur en condition de douleur inflammatoire chronique, ce qui appuie d'autant plus son potentiel thérapeutique dans ce type de douleur.

C. MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Les animaux utilisés pour les expérimentations sont des souris de souche C57BL/6 invalidées pour le gène codant le canal calcique Cav3.2 (Cav3.2^{-/-}), initialement générées par Chen et ses collaborateurs (Chen et coll., 2003) et leurs "littermates" sauvages (Cav3.2^{+/+}). Ce sont des mâles pesant de 25 à 30 g, stabulés dans l'Unité de Stabulation Animale des facultés de Médecine et de Pharmacie, animalerie EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique). Les paramètres environnementaux de la salle de stabulation sont contrôlés (température : 22 ± 2°C, hydrométrie : 50% et éclairage cyclique jour/nuit : 12 heures). Les souris ont un accès libre à l'eau ainsi qu'à la nourriture. L'expérimentation animale est pratiquée selon la législation européenne (Directives du Conseil de l'Europe 86/666g/EEC du 24 novembre 1986) et selon les recommandations éthiques pour l'expérimentation animale de l'IASP. Toutes les procédures ont été approuvées par le Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale-Auvergne (CEMEA-Auvergne).

2. Produits

L'éthosuximide (SigmaAldrich, France), administré par voie intrapéritonéale (i.p.) à la concentration de 200 mg/kg, est reconstitué dans une solution aqueuse de sérum physiologique (NaCl 0,9%).

L'adjuvant complet de Freund (CFA) est constitué de mycobacterium butyricum (DIFCO Laboratories) dissout dans de l'huile de paraffine et dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %). La solution est autoclavée 20 minutes à 120°C.

3. Comportements

a. Modèle monoarthrite (CFA)

Cinq microlitres d'adjuvant complet de Freund (CFA, Difco Laboratories, Detroit, Etats-Unis)⁶⁴⁰ ont été injectés au niveau des deux côtés de l'articulation de la cheville gauche de la souris sous anesthésie brève (halothane/N₂O/O₂). Les seuils de retrait de patte suite à une stimulation thermique et mécanique ont été déterminés avant et 14 jours après l'injection de CFA ou de véhicule.

b. Test de von Frey

Les souris ont été placées dans des compartiments individuels sur le dessus d'une surface grillagée et ensuite laissées en acclimatation pendant une heure avant le test. Les seuils de douleur ont été évalués par le filament von Frey calibré à 1,4 g (Bioseb, France). Ce dernier a été pressé perpendiculairement cinq fois contre le milieu patte et maintenu pendant 3 secondes. Une réponse douloureuse a été notée seulement quand la patte est retirée ou léchée et un score de réponse à la douleur (0-5) est déterminé.

c. Grip test

Un indicateur de force avec une grille métallique carrée spécifique de souris (Bioseb, France) (6 x 6 cm) a été utilisé pour mesurer la force de préhension des membres antérieurs, semblable à Rafael et coll. 2000⁷⁰⁵. Brièvement, les souris ont été soigneusement placées à l'avant de la grille métallique et laissées s'agripper avec les deux pattes de devant. Une fois la prise créée, la force de grip maximum a été enregistré (en grammes). Pour chaque animal, 3 mesures (1 min d'intervalle) ont été prises pour obtenir une valeur moyenne de la force maximale de préhension.

d. Rotarod

Ce test permet d'évaluer la coordination motrice et l'équilibre de l'animal. L'appareil (Bioseb®) comporte un cylindre de 3 cm de diamètre. La latence entre le moment où l'animal est placé sur le cylindre et le moment où il tombe du cylindre est mesurée grâce à un système de bascule qui est actionné lorsque l'animal tombe du cylindre et stoppe le chronomètre.

Ce test comporte une phase de conditionnement/apprentissage précédant le test. Cette phase comporte 3 étapes : 1 minute sur le cylindre arrêté ; 10 minutes de repos, une minute sur le cylindre avec une rotation de 4 RPM ; 10 minutes de repos et une minute sur le cylindre avec une rotation de 4 RPM. Trente minutes après la phase de conditionnement, le test débute : l'animal est déposé sur le cylindre en rotation de 4 RPM et qui accélère progressivement jusqu'à un maximum de 50 RPM (+ 1 RPM toutes les 8 secondes). La durée maximale de l'essai est de 5 minutes. Le deuxième essai est effectué 30 minutes après le premier. La moyenne des 2 temps passés sur le cylindre pour les 2 essais est réalisée.

e. Open field

Le test se compose d'une arène en plastique opaque (46 x 46 x 35 cm) située dans une pièce éclairée de façon homogène. Cette arène est subdivisée en 2 grandes zones virtuelles : le centre (anxiogène) et la périphérie (non anxigène). Le temps passé au centre de l'arène est caractéristique de l'anxiété des animaux. L'animal est placé, seul, dans un angle de l'arène durant une période de 15 minutes. Les déplacements de l'animal sont enregistrés par une caméra et le temps passé dans chaque zone est déterminé grâce au logiciel Ethovision® (Noldus).

f. Elevated plus maze

L'appareil est constitué de 2 bras ouverts (sans paroi latérale, zone anxigène) (38 x 6 cm) et de 2 bras fermés (parois latérales de 17 cm de hauteur, zone non anxigène) perpendiculaires reliés par une plateforme centrale (6 x 6 cm), le tout surélevé par rapport au sol (50 cm). Le test s'effectue dans une pièce éclairée de façon homogène. Le temps passé dans les bras ouverts est caractéristique de l'anxiété des animaux. L'animal est placé seul au centre du labyrinthe la tête en direction d'un bras fermé durant une

période de 5 minutes. Une caméra filme les déplacements de l'animal et le temps passé dans chaque bras est déterminé par le logiciel Ethovision® (Noldus).

g. Tail suspension test

Les animaux sont suspendus par le milieu de la queue par un fil. La latence de première immobilisation ainsi que le temps total d'immobilité sont chronométrés durant 5 minutes. Une latence de première immobilité courte et un temps d'immobilité long sont témoins d'un état dépressif.

h. Forced swimming test

L'animal est placé dans un b cher de 16 cm de diamètre et 25 cm de profondeur rempli avec 10 cm d'eau tiède (22-25 C) pendant 6 minutes. La latence de première immobilisation ainsi que le temps total d'immobilité sont chronométrés. Une latence de première immobilité courte et un temps d'immobilité long sont témoins d'un état dépressif.

i. Novelty suppress feeding test

Ce test induit une situation de motivations conflictuelles chez l'animal, entre celle de se nourrir et la peur de s'aventurer au centre de l'arène fortement éclairé (zone anxiogène). L'animal, privé de nourriture depuis 24 heures, est placé au début de l'expérimentation dans un coin d'une arène de 46 x46 cm face contre la paroi pendant une période de 5 minutes. Au centre de cette arène est placé un ramequin rempli de nourriture qui est éclairé par une lumière forte. Les temps mis par l'animal pour aller manger (paramètre évaluant la dépression) et aller au centre de l'arène (paramètre évaluant l'anxiété) sont mesurés.

4. Analyses Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et analysées en utilisant le logiciel SigmaStats 3.5. Les données ont été testées pour la normalité et l'égalité des variances. Les mesures ont été comparées par le test de Student ( chantillon indépendant) ou par test de Mann-Whitney en cas de données qui ne passaient pas la loi normale ou l'égalité des variances. Les mesures multiples ont été comparées par une ANOVA à deux voies ou par le test de Kruskal-Wallis ou Friedman en cas de données qui n'étaient pas distribuées selon une loi normale. Les comparaisons post hoc ont été réalisées par la méthode de Bonferroni. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

D. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

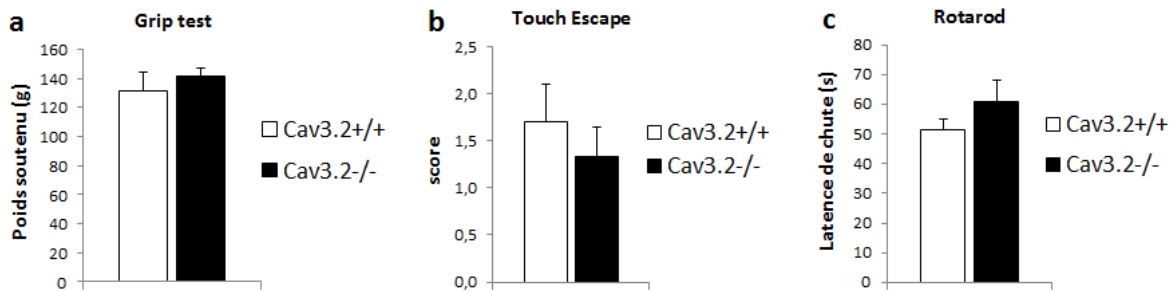


Figure S1: Les animaux *knock-out Cav3.2* ne présentent pas de phénotype anormal. La locomotion et les fonctions réflexes et autonomes ont été évaluées respectivement par le test du (a) rotarod, (b) « touch escape response » et (c) du grip test.

E. DISCUSSION / PERSPECTIVES

Les patients souffrant de douleurs chroniques subissent une altération de leur qualité de vie et sont sujets à des comorbidités telles que l'anxiété ou la dépression⁶⁰²⁻⁶⁰⁶. Malgré le fait que de nombreux symptômes liés à l'anxiété et la dépression chez l'Homme ne soit pas reproductible chez l'animal, de nombreux tests comportementaux sont efficaces dans la prédiction des activités anxiolytique et antidépressive des drogues. Nous avons ici utilisé six de ces tests pour évaluer l'impact de l'inhibition des canaux calciques de type T dans l'anxiété et la dépression, engendrées par une douleur chronique inflammatoire.

1. Implication du canal Cav3.2 dans l'anxiété et la dépression en contexte sain

Les phénomènes d'anxiété et de dépression font intervenir de nombreux systèmes : moteur, sensoriel, immunitaire, cardiovasculaire et bien entendu neuronal. Ceci rend d'autant plus complexe la compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes. D'un point de vue neuronal, de nombreuses structures cérébrales ont été démontrées comme participant à la modulation de l'anxiété et de la dépression. Les principales structures sont l'amygdale, l'hypothalamus, le cortex préfrontal et frontal, le thalamus, le cortex cingulaire, le noyau

accumbens, le septum latéral, la PAG et l'hypothalamus médian (pour revue⁷⁰⁶). Les voies neuronales impliquées dans ces structures et participant à la modulation de l'anxiété et de la dépression sont multiples. Néanmoins, il existe 3 voies principales : GABAergique, monoaminergique et sérotoninergique (pour revue⁷⁰⁶).

Les canaux calciques voltages dépendant à haut seuil d'activation sont connus pour être exprimés dans les structures précédemment citées, où ils participent à la modulation des voies neuronales GABAergiques, monoaminergiques et sérotoninergiques⁷⁰⁷⁻⁷¹³. Ces résultats ont été corrélés *in vivo* par l'action anxiolytique des inhibiteurs calciques, tels que la prégabaline et la gabapentine chez l'Homme⁷¹⁴⁻⁷¹⁶. Peu d'études se sont intéressées aux canaux calciques de type T dans les phénomènes d'anxiété et de dépression. Pourtant, ils sont largement exprimés dans les structures cérébrales impliquées⁶³⁵. De plus, deux études ont démontré un lien entre dépression⁷¹⁷, réponse au stress⁷¹⁸ et canaux calciques de type T. Le manque d'information sur l'implication des canaux de type T et plus spécifiquement des canaux Cav3.2 dans la modulation de l'anxiété et de la dépression nous ont poussé à réaliser cette étude.

Les premiers résultats que nous avons obtenu montrent que **les souris invalidées pour le gène codant le canal Cav3.2 ou recevant du TTA-A2 (antagoniste Cav3.2) présentent une forte anxiété** en comparaison de leurs congénères sauvages ou recevant du véhicule. Ces données confirment pour la première fois, d'un point de vue comportemental, l'implication des canaux de type T (Cav3.2) dans la modulation de l'anxiété. *A contrario*, **aucun effet sur la dépression** n'a été observé.

De plus amples études restent néanmoins à être effectuées pour démêler les mécanismes mettant en jeu les canaux Cav3.2 dans les phénomènes d'anxiété. Nous savons, suite à l'étude de Talley et coll.⁶³⁵, que les canaux Cav3.2 sont exprimés dans de nombreuses structures impliquées dans la modulation de l'anxiété. Il serait intéressant de valider, d'un point de vue protéique, l'expression du canal Cav3.2 (souris Cav3.2-GFP) dans ces différentes zones. De plus, deux études ont montré une implication des canaux Cav3.2 dans la transmission GABAergique au niveau spinal^{538,719}. Par conséquent, l'étude de la modulation des voies neuronales supraspinales (GABAergiques, monoaminergiques, sérotoninergiques), impliqués dans la modulation de l'anxiété, suite à un stress chez les animaux *knock-out* Cav3.2 en comparaison à des animaux sauvages semblent être une voie intéressante pour répondre aux mécanismes neuronaux mettant en jeu les canaux Cav3.2 dans l'anxiété.

2. Effet anxiolytique et antidépresseur de l'éthosuximide en contexte inflammatoire

Les antiépileptiques, tels que la prégabaline et la gabapentine, sont décrits comme possédant un effet antalgique en contexte de douleurs chroniques et un effet bénéfique sur les comorbidités (anxiété, dépression) associées. L'éthosuximide, un antiépileptique ne possédant pas le même mécanisme d'action que la prégabaline et la gabapentine, n'a fait l'œuvre d'aucune étude sur son potentiel antinociceptif, anxiolytique et antidépresseur dans le cadre des douleurs chroniques inflammatoires. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'éthosuximide sur l'anxiété et la dépression associées à une douleur inflammatoire chronique, grâce au modèle de monoarthrite induit par l'injection péri-articulaire de CFA. Ce modèle possède l'avantage de présenter une douleur inflammatoire chronique et de développer des symptômes relatifs à l'anxiété et la dépression⁷²⁰. Uniquement la stratégie pharmacologique a été appliquée ici puisque les animaux invalidés pour le gène codant le canal calcique Cav3.2 ne développent aucune douleur inflammatoire et donc aucun symptôme associé (voir projet 2).

L'évaluation de l'anxiété et de la dépression par différents tests a montré **un effet anxiolytique et antidépresseur de l'éthosuximide** en contexte sain (Figures 46 et 47) et anxiolytique en contexte inflammatoire (Figures 49). De plus, **l'éthosuximide induit un effet anti-allodynique et anti-hyperalgique dans le modèle CFA**. Ces résultats démontrent que l'éthosuximide, comme d'autres antiépileptiques, est capable d'induire non seulement un **effet antalgique mais également anxiolytique et antidépresseur** en contexte douloureux. Cela rend l'éthosuximide très intéressant pour le traitement des douleurs chroniques et les comorbidités associées. De plus, plusieurs études ont démontré l'effet antinociceptif de l'éthosuximide en contexte neuropathique^{556-559,591}. Ainsi, pour compléter et confirmer ces résultats, l'étude de l'effet anxiolytique et antidépresseur de l'éthosuximide sur les douleurs neuropathiques reste à être effectuée.

Cependant, l'inhibition pharmacologique des canaux calciques de type T par l'éthosuximide entraîne sur l'anxiété un effet opposé à celui observé avec les animaux *knock-out* Cav3.2 ou recevant du TTA-A2. Ces différences peuvent s'expliquer par les phénomènes de compensation qui se mettent en place lors d'une inactivation génétique. En effet, des modifications se traduisant par l'augmentation ou la diminution de l'expression d'autres gènes durant le développement embryonnaire peuvent être observées et par conséquent faire varier le comportement ou la physiologie de l'animal. Par exemple, dans le cas des souris *knock-out* Cav3.2,

une compensation par les membres Cav3.1 et Cav3.3 peut être envisagée. Un autre point, plus facile à vérifier, pouvant expliquer les résultats discordants est la non spécificité de l'éthosuximide vis-à-vis du canal Cav3.2. En effet, l'éthosuximide est présenté comme un inhibiteur non spécifique des canaux calciques de type T. Ainsi, l'éthosuximide peut potentiellement agir sur les deux autres membres des canaux de type T : Cav3.1 et Cav3.3. En effet, l'éthosuximide possède une IC₅₀ de 3 µmol/l et de 51 µmol/l respectivement pour Cav3.1 et Cav3.3 alors qu'elle est de 23,7 µmol/l pour Cav3.2^{635,721}. De plus, les canaux Cav3.1 sont les canaux de type T prédominants dans les neurones thalamiques⁶³⁵, et sont proposés comme cible thérapeutique de l'éthosuximide dans le traitement des crises d'épilepsies de petit mal^{631,722}. Pour valider cette hypothèse, l'effet sur l'anxiété de l'éthosuximide doit être évalué chez les animaux *knock-out* Cav3.2. Enfin, si l'on s'intéresse un peu plus en détail à l'étude de Talley et coll.⁶³⁵, on s'aperçoit que l'expression des canaux de type T varie dans les structures cérébrales selon le membre étudié. Ainsi, dans les zones cérébrales impliquées dans l'anxiété, le canal Cav3.1 est majoritairement plus exprimé que les autres membres (Cav3.2 et Cav3.3) (Tableau 5). Ceci pourrait expliquer l'effet opposé de l'éthosuximide, qui pourrait mobiliser le canal Cav3.1 dans son effet anxiolytique. Le phénotypage des souris *knock-out* Cav3.1 et l'effet de l'éthosuximide, chez ces souris, sur la dépression et l'anxiété serait une bonne piste pour y répondre.

Enfin, comme pour les souris *knock-out* Cav3.2, l'étude des mécanismes mis en jeu dans l'effet anxiolytique et antidépresseur de l'éthosuximide en contexte de douleurs chroniques, pourrait être évalué par l'étude de la modulation des voies neuronales impliquées dans ces phénomènes (GABAergique, monoaminergique, sérotoninergique) ainsi que par l'étude, par exemple, de la neurogénèse hippocampique dans un contexte dépressif⁷²³, comme cela a été fait pour le canal potassique *Trek-1*⁷²⁴.

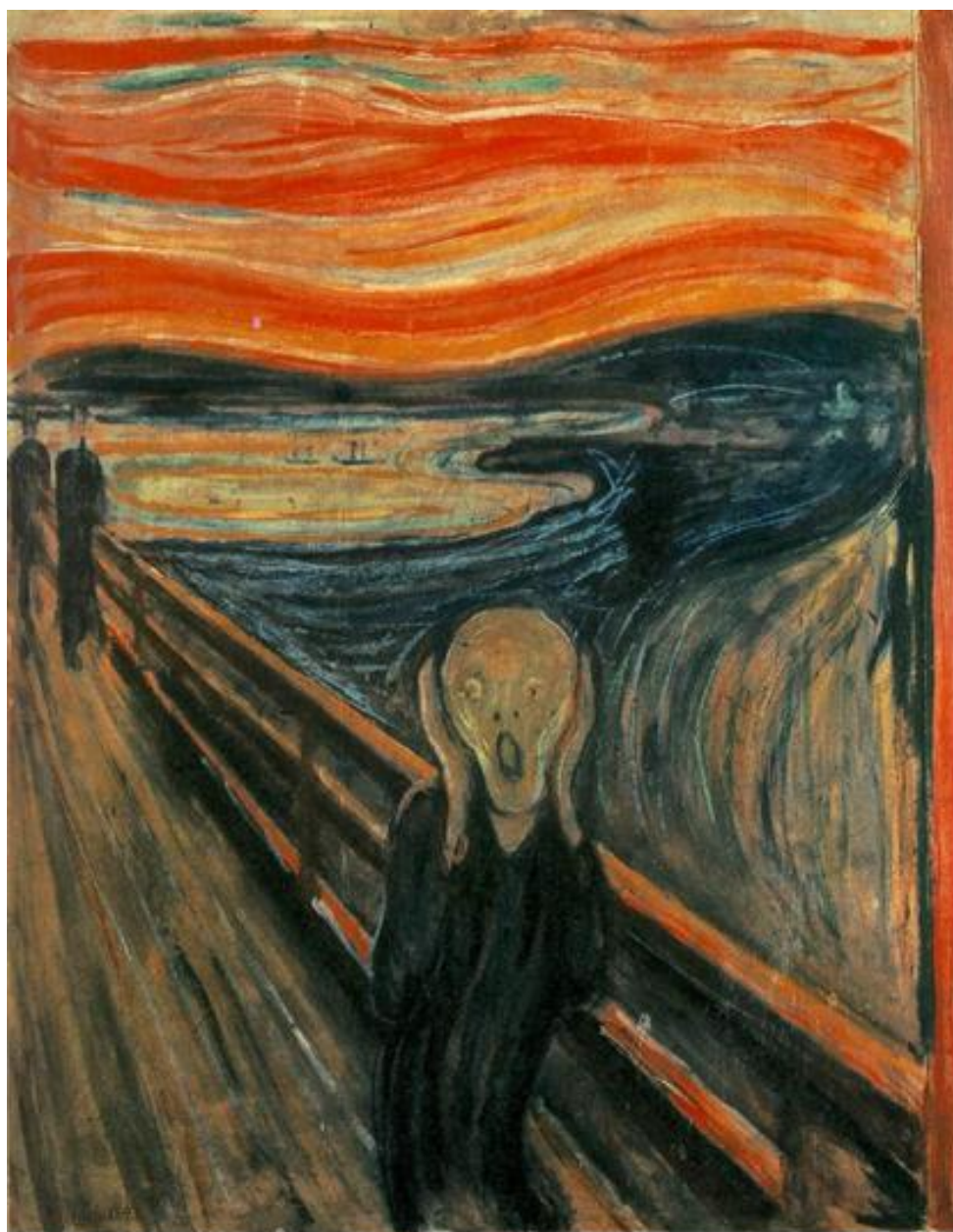
Tableau 5 : Tableau représentatif de l'expression des canaux de type T dans les zones cérébrales impliquées dans l'anxiété et la dépression. ++++ = très forte expression ; +++ = forte expression ; ++ = expression modérée ; + = faible expression ; - = pas d'expression. D'après Talley et coll. 1999.

Zones cérébrales	Cav3.1	Cav3.2	Cav3.3
Hippocampe (CA1-3 et gyrus denté)	++	++++	++
Cortex Préfrontal et frontal	+++	+	+
Amygdale	+++	++	+
Thalamus	+++	+	+
Cortex cingulaire	+++	-	+
Accumbens	-	++	+
Septum latéral	++	-	-
PAG	++	+	-
Hypothalamus médian	+++	++	+

Il faut noter également que l'anxiété et la dépression ne sont pas les seuls symptômes de comorbidités, la dégradation de la qualité du sommeil en fait également partie et tiens une part importante dans la dégradation de la qualité de vie des patients. L'étude de l'efficacité de l'éthosuximide sur la qualité du sommeil est à envisager.

3. Conclusion

Notre étude a démontré pour la première fois le potentiel thérapeutique de l'éthosuximide dans le traitement des comorbidités (anxiété et dépression) associées aux douleurs chroniques inflammatoires.



Edvard Munch

« Le cri » (fin du 19^e siècle)

Le tableau exprime la douleur, la peur, l'effroi. La figure du personnage est triste. Les couleurs du tableau sont sombres et le décor derrière est triste, et terne.

PROJET CLINIQUE EDONOT:

Ethosuximide et DOuleur Neuropathique
d'Origine Traumatique

**IX. PROJET CLINIQUE EDONOT: Ethosuximide et DOuleur Neuropathique d'Origine
Traumatique**



**Evaluation de l'efficacité de l'éthosuximide dans le traitement de
douleurs neuropathiques d'origine traumatique**

Essai thérapeutique pilote, multicentrique, randomisé, en double aveugle, contrôlé versus homéopathie

Titre abrégé : EDONOT

Version : 1 en date du :

Code promoteur : N° EudraCT ou n° d'enregistrement ANSM :

PROMOTEUR: C.H.U. de Clermont-Ferrand 58 Rue de Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand	
Investigateur coordonnateur : Pr Claude DUBRAY CPC / CIC - Inserm 501 CHU Gabriel-Montpied, 63000 Clermont-Ferrand claude.dubray@udamail.fr 04 73 17 84 12	
Co-Investigateurs :	
Pr. Alain ESCHALIER UMR INSERM / Uda 1107 NEURO-DOL CHU Gabriel-Montpied, Service de Pharmacologie- Toxicologie 63000 Clermont-Ferrand	Dr.Christian DUALE CPC - CIC / Inserm-501 - Bât3C UMR INSERM / Uda 1107 NEURO-DOL CHU Gabriel-Montpied, 63000 Clermont-Ferrand
Dr. Pascale PICARD CETD, CHU Gabriel-Montpied, 63000 Clermont-Ferrand	Dr. Jean-Bernard CAILLET CETD, Hôpital Neurologique, 69500 Bron
Dr. Laurent BALP Centre Hospitalier, 39016 Lons Le Saunier	Dr. Gérard MICK Centre Hospitalier, 38506 Voiron
Dr. Eric SALVAT CETD, Hôpital Civil, 67091 Strasbourg	Dr. Julien NIZARD CETD, Hôpital Laënnec, 44093 Nantes
Méthodologiste / Statisticien :	Collaborateurs scientifiques :
Bruno PEREIRA DRCI, CHU de Clermont-Ferrand 63000 Clermont-Ferrand	Chouki CHENAF / Dr. Christophe MALLET / Nicolas KERCKHOVE/ Dr. Frédéric LIBERT / Dr. Damien RICHARD UMR Inserm / Uda 1107 NEURO-DOL CHU Gabriel-Montpied, Service de Pharmacologie 63000 Clermont-Ferrand
Lieux de réalisation de l'étude : CPC / CIC - Inserm-501 / CETD Clermont-Ferrand, Bron, Voiron, Nantes, Strasbourg, Lons Le Saunier	

A. RESUME

TITRE DE L'ÉTUDE :

Évaluation de l'efficacité de l'éthosuximide dans le traitement des douleurs neuropathiques d'origine traumatique.

Etude pilote, multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée versus homéopathie.

CONTEXTE :

La douleur demeure le symptôme le plus délétère pour les patients souffrant de syndrome douloureux neuropathique. Un pourcentage important de ces patients déclarent n'avoir que peu ou pas de soulagement avec les antalgiques courants, spécifiques ou non à la douleur neuropathique.

BUT DE L'ÉTUDE :

Evaluer l'efficacité antalgique et sur la qualité de vie de l'éthosuximide, ajouté au traitement de fond, chez des patients douloureux neuropathiques d'origine traumatique.

DESCRIPTION DE L'ÉTUDE :

Essai thérapeutique pilote multicentrique évaluant l'efficacité de l'éthosuximide chez les patients douloureux neuropathiques. Ils seront traités pendant 42 jours soit par l'éthosuximide soit par le sirop homéopathique inactif sur la douleur.

NOMBRE DE CENTRES : 6 centres investigateurs dont 1 centre coordonnateur

Centres investigateurs :

CPC / CIC – Inserm-501 / CETD de Clermont-Ferrand ; CETD de Bron ; CETD de Voiron ; CETD de Lons Le Saunier ; CETD de Strasbourg, CETD de Nantes

Centre coordonnateur :

CPC / CIC – Inserm-501 / CETD de Clermont-Ferrand

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE :

Objectif principal :

Evaluation de l'efficacité antalgique de l'éthosuximide chez des patients douloureux neuropathiques d'origine traumatique.

Objectifs secondaires :

Impact de l'éthosuximide sur la douleur neuropathique, la qualité de vie, l'endormissement, le sommeil et de l'impression globale des patients vis-à-vis du traitement.

CRITÈRES D'ÉVALUATION :

Critère principal :

Différence (Δ) entre la moyenne de l'intensité douloureuse médiane évaluée quotidiennement par une ENS lors des 7 derniers jours précédant le début de l'étude (J0) et la visite de fin d'étude (J+42) : $\Delta = \text{score ENS (J0)} - \text{score ENS (J+42)}$

Critères secondaires :

- Evaluation quotidienne de la douleur moyenne et maximale ressentie par ENS,
- Evaluation de la douleur neuropathique par les questionnaires QEDN et QCD,
- Evaluation de la qualité de vie des patients par le questionnaire MOS-SF 12,
- Evaluation de la qualité de sommeil par le questionnaire de Leeds,
- Evaluation quotidienne de la qualité du sommeil et d'endormissement par ENS,
- Evaluation de l'impression globale des patients sur le traitement par le questionnaire PGIC.

CRITÈRES D'INCLUSION :

- Age \geq 18 ans,
- Neuropathie traumatique ou post-chirurgicale hors amputations avec DN4 \geq 4 et critères IASP positifs,
- ENS Douleur \geq 4,
- ALAT, ASAT, PAL, GGT normale, créatinine $< 133 \mu\text{mol/L}$, hémocrite $> 38\%$,
- Patients affiliés au régime de la Sécurité Sociale française,
- Patients dont le consentement libre et éclairé a été recueilli.

CRITÈRES DE NON INCLUSION :

- Grossesse ou allaitement,
- Neuropathie diabétique, post-zostérienne, cancéreuse ou chimio-induite,
- Patients avec une intolérance au glucose,
- Antécédents médicaux et chirurgicaux incompatibles avec l'étude,
- Antécédents de maladies rénales, hépatiques,
- Dépendance à l'alcool et/ou aux stupéfiants,

- Prise d'antiépileptiques de la famille des carboxamides, et éthosuximide
- Usage de millepertuis,
- Allergie aux succinimides (éthosuximide, méthsuximide, phensuximide),
- Troubles psychotiques,
- Patients épileptiques,
- Patients en période d'exclusion, ou total d'indemnités autorisées dépassé,
- Patients bénéficiant d'une mesure de protection légale (curatelle, tutelle...).

NOMBRE DE SUJETS NÉCESSAIRE :

Le nombre de sujets nécessaire sera de 200 patients avec une puissance de 80% ($\alpha = 0,05$ bilatérale; $\beta = 0,20$, $\delta = 1,0$; $\sigma = 2,5$) et considérant les sorties d'étude à hauteur d'environ 10%, nous prévoyons de présélectionner 220 patients^{628,725}, soit 110 patients par groupe.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE :

Recrutement

Les patients suivis dans leur centre référent pour le traitement de la douleur sont sélectionnés par les médecins du centre. Le médecin investigateur les contactera afin de leur présenter le but de l'étude et prendre rendez-vous pour l'inclusion.

Visite d'Inclusion (J-6)

- Accueil au centre investigateur par l'investigateur,
- Explications de l'étude (objectifs, organisation, contraintes, questionnaires),
- Signature du consentement,
- Examen clinique pour évaluation de la douleur neuropathique DN4 et critères IASP 2011 positifs,
- Prélèvement sanguin (NFS, ALAT, ASAT, PAL, GGT, créatinine, β -HCG),
- Remplissage des questionnaires (Leeds, MOS SF-12, QEDN, QCD, DN4),
- Remise du traitement et des documents annexes (carnet de suivi, EIG...)

Début d'étude (J0)

- Sept jours plus tard (J0), appel du patient pour quantifier l'intensité moyenne de sa douleur ressentie au cours des 7 derniers jours à l'aide d'une échelle numérique simple (ENS).
- Inclusion ou non et rappel des détails de l'étude.
- Randomisation

Période de J0 à J+42 : Ambulatoire à domicile

- Prise du traitement (2 prises journalières pendant les repas) selon posologie croissante,
- Remplissage quotidien du carnet de suivi (douleur, endormissement/sommeil et EI),
- Appel téléphonique tous les 4 jours par l'ARC rattaché au projet pour recueil des EI, et rappel de la posologie.

Visite de suivi à J+42 et fin d'étude

- Accueil du patient au centre investigateur par l'ARC,
- Restitution des unités thérapeutiques vides et non finies,
- Entretien avec l'investigateur et restitution du carnet de suivi,
- Evaluation de la douleur moyenne au cours des 7 derniers jours par ENS et examen clinique,
- Remplissage des questionnaires (QEDN, QCD, MOS SF-12, Leeds et PGIC),
- Prélèvement sanguin pour dosage de l'éthosuximide,
- Fin de l'étude.

B. RATIONNEL DE L'ETUDE / JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE

1. Dernier état des connaissances scientifiques

Introduction

Actuellement, il est établi que les canaux calciques dépendant du voltage modulent la perception douloureuse du fait d'une influence sur la transmission et l'excitabilité neuronales. Dans le passé, l'attention s'est portée sur la modulation des canaux calciques à haut seuil d'activation. Plus récemment, un intérêt scientifique s'est révélé vis-à-vis des canaux à bas seuils d'activation dits canaux de type T. Les données de la littérature démontrent une implication importante de ces canaux dans la physiologie de la nociception.

Les traitements antalgiques disponibles restent inefficaces chez certains patients présentant des douleurs chroniques (neuropathiques, inflammatoires) et induisent souvent des effets indésirables délétères. Ainsi, l'utilisation clinique d'inhibiteurs sélectifs des canaux de type T pourrait non seulement aider au développement de nouvelles thérapies pour le traitement des douleurs neuropathique, dont la prévalence est estimée à 5-8%⁷²⁶⁻⁷³², mais également avoir un impact pharmaco-économique du fait du

faible prix de vente de leur inhibiteur actuellement disponible, le Zarontin® (7,52 Euros pour 200 ml de sirop à 250 mg / 5 ml).

Canaux de type T et douleur

Les canaux calciques dépendant du voltage sont classés en deux grandes familles sur la base du potentiel de membrane⁴⁷⁰ : les canaux à haut seuil d'activation et les canaux à bas seuil d'activation. Le clonage de la sous-unité alpha-1 des canaux de type T a démontré l'existence d'au moins 3 sous-types : alpha-1G (Cav3.1)⁵¹⁸, alpha-1H (Cav3.2)⁵¹⁹ et alpha-1I (Cav3.3)⁵²⁰. Ces canaux calciques possèdent une unique propriété en termes d'excitabilité neuronale^{526,690}. Les canaux de type T peuvent être activés par une faible dépolarisation de la membrane cellulaire. Au niveau des neurones, cette capacité leur confère une implication dans différents processus neurophysiologiques : initiation de bouffées de potentiels d'action, entrée intracellulaire de calcium, libération de neurotransmetteurs, amplification des faibles signaux dendritiques.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont identifié diverses fonctions des canaux de type T, notamment leur implication dans la nociception, ainsi que la contribution de ces canaux dans le développement des douleurs aiguës et neuropathiques^{581,703}. L'inhibition de ces canaux par diverses stratégies expérimentales (génétique et pharmacologique) induit un effet antalgique pour différents types de modalités douloureuses et dans divers contextes pathologiques, les composés utilisés pour étudier les canaux de type T étant l'éthosuximide⁷²² et le mibéfradil⁷³³. Actuellement, seul l'éthosuximide est utilisé en clinique, dont l'indication thérapeutique est le traitement des épilepsies de type Petit Mal Absences.

2. Etat des lieux des connaissances sur l'expérimentation préclinique

Ethosuximide et douleurs neuropathiques

L'éthosuximide est utilisé en clinique dans le cadre du traitement des épilepsies de type Petit Mal Absences, mais, à ce jour, ne possède pas d'indication dans le traitement de la douleur. Considérant le rôle des canaux calciques de type T, plusieurs études se sont intéressées à l'effet de l'éthosuximide sur la douleur, notamment la douleur neuropathique. Ainsi, plusieurs études précliniques ont montré que cette molécule produisait un effet antalgique important et réduisait les symptômes douloureux liés à ce type de douleur suggérant l'importance des canaux de type T dans l'initiation et le maintien de la douleur neuropathique.

Neuropathies traumatiques

L'éthosuximide possède une propriété antalgique modérée chez des rats sains⁶³⁴ mais supprime complètement les symptômes douloureux de type neuropathique induits par ligature du nerf sciatique chez le rat⁵⁵⁷. Dans le modèle animal de neuropathie traumatique induite par ligature du nerf spinal, Dogrul et coll. ont démontré que l'injection systémique d'éthosuximide supprimait également les symptômes douloureux de type neuropathique chez le rat⁵⁵⁷.

Neuropathie chimio-induite (par agent anticancéreux)

De nombreux médicaments cytotoxiques sont susceptibles d'induire des douleurs neuropathiques, ce qui limite leur utilisation en chimiothérapie anticancéreuse. Flatters et Bennett ont montré que l'injection systémique d'éthosuximide soulageait l'allodynie mécanique et thermique au froid chez des rats ayant reçu un traitement par anticancéreux (paclitaxel ou vincristine)⁵⁵⁶. Des résultats similaires ont été constatés dans le modèle de neuropathie induit par l'oxaliplatine⁵⁵⁹. De plus, l'utilisation chronique d'éthosuximide dans ce type de modèle n'induit pas de phénomène de tolérance.

Neuropathie diabétique

Actuellement, aucune étude préclinique n'a évalué le bénéfice potentiel de l'utilisation de l'éthosuximide dans le cadre de la neuropathie diabétique, modèle de référence des essais cliniques. En revanche, deux études précliniques ont montré une relation entre canaux de type T (Cav3.2) et neuropathie diabétique. En effet, les animaux *knock-out* pour Cav3.2⁵⁸⁴ ou recevant des RNA antisens anti-Cav3.2⁵⁸² ne développent pas d'allodynie ni d'hyperalgie induite par une neuropathie diabétique.

Synthèse

Ainsi, les bloqueurs des canaux de type T possèdent un intérêt majeur pour le développement de nouveaux traitements symptomatiques de la douleur neuropathique. Il est particulièrement intéressant de noter qu'en Europe, ce type de médicament est disponible sur le marché et qu'il est assorti d'une très bonne tolérance clinique.

Il est important de mentionner que malgré toutes ces données précliniques, aucune étude clinique n'a été publiée à ce jour concernant l'efficacité antalgique de l'éthosuximide chez des patients présentant des douleurs neuropathiques. **Les arguments précliniques d'efficacité antalgique et l'absence d'évaluation clinique constituent le rationnel pour conduire un premier essai thérapeutique pilote visant à évaluer le bénéfice potentiel de l'utilisation de l'éthosuximide dans la prise en charge de la douleur neuropathique. La démonstration d'une efficacité clinique permettrait d'enrichir la palette thérapeutique.**

Exposé des hypothèses et des objectifs

La douleur demeure le symptôme le plus délétère pour les patients souffrant d'un syndrome douloureux neuropathique. De nombreux patients présentant une douleur neuropathique déclarent peu ou pas de soulagement avec les antalgiques disponibles actuellement.

Sur la base d'arguments précliniques robustes, le blocage des canaux calciques de type T par l'éthosuximide pourrait permettre de réduire des symptômes douloureux neuropathiques. Ceci constitue l'hypothèse de la présente étude.

L'objectif de l'étude sera d'évaluer l'efficacité de l'éthosuximide, administré en ajout au traitement en cours de la douleur neuropathique, sur les symptômes douloureux et la qualité de vie chez des patients présentant des douleurs neuropathiques d'origine traumatique, comparativement à un groupe contrôle.

3. Retombées attendues

Cette étude devrait permettre:

- d'apporter une confirmation (ou non) des données précliniques sur le potentiel antalgique obtenue.
- si tel est le cas, les résultats de cet essai clinique permettraient :
 - d'enrichir la palette thérapeutique du traitement des douleurs neuropathiques, avec une nouvelle molécule ayant un mécanisme d'action original
 - de poursuivre les recherches pour ouvrir l'utilisation de cette molécule vers d'autres types de douleurs réfractaires aux traitements habituels
 - de potentiellement réduire le coût du traitement de la douleur neuropathique chez les patients répondeurs

C. MEDICAMENT A L'ETUDE

1. Description du traitement

Zarontin® (Pfizer): le principe actif est l'éthosuximide. C'est un antiépileptique, inhibiteur des canaux de type T. Il vise à faire disparaître les crises d'épilepsie ou au moins à les diminuer en fréquence ou en intensité. Il est actif sur les absences (petit mal) et utilisé seul ou en association avec un autre antiépileptique, dans le traitement des épilepsies généralisées.

Stodal® (Laboratoire Boiron): sirop homéopathique indiqué dans le traitement de la toux des laboratoires Boiron.

Dans cette étude, le choix du sirop homéopathique comme « placebo » est justifié par plusieurs arguments :

- Il possède les mêmes caractéristiques que le Zarontin® : forme pharmaceutique sirop, flacon de même couleur et de même volume, même godet doseur. Ces similitudes sont fondamentales pour respecter le double aveugle.

- C'est un traitement qui ne possède aucune indication dans la prise en charge de la douleur.

C'est un produit traditionnellement utilisé dans le traitement de la toux. Il s'agit d'un traitement homéopathique et, de ce point de vu, comme l'attestent de nombreuses revues cliniques internationales de référence, son efficacité est superposable à celle d'un placebo⁷³⁴⁻⁷³⁶. Par conséquent, il est légitime d'utiliser ce produit en tant que placebo inactif sur la douleur.

- Néanmoins, si selon certaines convictions, le produit homéopathique possède un effet thérapeutique, cela augmentera la rigueur de notre analyse de l'effet de l'éthosuximide en cas de résultats positifs significatifs.

2. Posologie, modalités d'administration et durée du traitement

Groupe Éthosuximide : Le produit utilisé est le Zarontin® 250 mg / 5 ml – sirop. Il sera administré tous les jours en deux prises matin et soir durant les repas pendant 42 jours. Selon le RCP, la posologie sera augmentée très progressivement de 250 mg (5 ml) tous les 4 jours jusqu'à atteinte de la posologie efficace se situant à 20 mg / kg / jour soit 1500 mg / jour. Tous les patients devront impérativement suivre cette posologie même en cas d'apparition d'effets indésirables mineurs ou d'effets positifs.

Administration : sirop par voie orale à l'aide d'un godet-doseur gradué à 2,5 ml, 5 ml, 10 ml et 15 ml. Durée du traitement : 42 jours.

Prise par palier : 500 mg / j pendant 4 jours, 750 mg / j pendant 4 jours, 1000 mg / j pendant 4 jours, 1250 mg / j pendant 4 jours, 1500 mg / j pendant 22 jours (fin de l'étude).

Palier 1 : 10 ml de Zarontin® (500 mg / jour) pendant 4 jours à prendre en deux prises :

- le matin 5 ml de Zarontin® 250 mg / 5 ml ; - le soir 5 ml de Zarontin® 250 mg / 5 ml

Palier 2 : 15 ml de Zarontin® (750 mg / jour) pendant 4 jours à prendre en deux prises :

- le matin 7,5 ml de Zarontin® 250 mg / 5 ml ; - le soir 7,5 ml de Zarontin® 250 mg / 5 ml

Palier 3 : 20 ml de Zaronin[®] (1000 mg / jour) pendant 4 jours à prendre en deux prises :

- le matin 10 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml ; - le soir 10 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml

Palier 4 : 25 ml de Zaronin[®] (1250 mg / jour) pendant 4 jours à prendre en deux prises :

- le matin 12,5 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml ; - le soir 12,5 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml

Palier 5 : 30 ml de Zaronin[®] (1500 mg / jour) pendant 4 jours à prendre en deux prises :

- le matin 15 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml ; - le soir 15 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml

Plateau : 30 ml de Zaronin[®] (1500 mg / jour) pendant 22 jours à prendre en deux prises :

- le matin 15 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml ; - le soir 15 ml de Zaronin[®] 250 mg / 5 ml

Groupe homéopathie : Produit utilisé : Stodal[®], sirop homéopathique indiqué pour le traitement de la toux des laboratoires Boiron. Pris durant la totalité de l'étude, soit 42 jours, avec les modalités d'administration équivalentes au groupe Éthosuximide.



Gaspare Traversi

« L'operazione chirurgica » (18^e siècle)

The wounded man, restrained and suffering on his own, grimaces with pain. A change in self-perceived role identity might be help him endure the awful procedure because a particular role identity elicits particular emotions, altering the quality and the intensity of the pain perception.

CONCLUSION GENERALE

X. CONCLUSION GENERALE

Mes travaux de thèse ont démontré trois choses :

- 1) Le canal calcique Cav3.2, connu pour son implication dans la perception douloureuse, est également impliqué dans le mécanisme d'action du paracétamol pour permettre son effet antalgique. L'étude des mécanismes biologiques impliquant les canaux Cav3.2 dans l'effet du paracétamol a montré que seuls les canaux Cav3.2 au niveau cérébral étaient mobilisés et qu'ils agissaient de concert avec les récepteurs TRPV1. Indirectement, nous avons aussi démontré l'implication des canaux Cav3.2 cérébraux dans la modulation de la perception douloureuse.*
- 2) L'effet antalgique de l'inhibition des canaux Cav3.2 a été montré dans les douleurs aiguës et neuropathiques. Ici, nous avons démontré son rôle dans les douleurs inflammatoires. De manière plus intéressante, nous avons montré que l'inhibition des canaux Cav3.2 induisait également un effet anti-inflammatoire passant par l'inhibition de l'activation des macrophages se traduisant par un développement œdémateux et une production des médiateurs pro-inflammatoires diminués.*
- 3) L'éthosuximide, un antiépileptique commercialisé sous le nom de Zarontin®, est prescrit pour le traitement des épilepsies de petit mal. Son efficacité antinociceptive a été démontrée dans les douleurs chroniques neuropathiques chez l'animal. Néanmoins, aucune étude clinique n'a évalué cet effet antinociceptif sur des patients douloureux chroniques. De plus, aucune étude ne s'est intéressée à son efficacité antinociceptive dans les douleurs chroniques inflammatoires. Partant de ce constat et suite à nos études, nous avons démontré l'effet antinociceptif de l'éthosuximide sur les douleurs inflammatoires et également un effet anti-inflammatoire. De plus, nous avons montré un effet bénéfique sur les comorbidités associées aux douleurs inflammatoires (anxiété et dépression).*

En conclusion, tous ces résultats ont mis en lumière le potentiel thérapeutique fort de l'inhibition des canaux Cav3.2, et plus largement des canaux calciques de type T, pour le traitement de la douleur. S'appuyant sur les données précliniques et sur la chance de posséder sur le marché un inhibiteur des canaux de type T (éthosuximide), nous avons entrepris la mise en place d'une étude clinique évaluant l'efficacité antalgique de l'éthosuximide chez des patients neuropathiques douloureux chroniques. Une seconde étude clinique verra le jour également sur l'évaluation de l'efficacité antalgique de l'éthosuximide chez des patients présentant des douleurs ostéoarticulaires de type arthrose et arthrite.

ANNEXES

XI. ANNEXES

ANNEXE 1 : ARTICLE 1

Title: Cav3.2 calcium channels: the key protagonist of the supraspinal effect of acetaminophen.

N. Kerckhove^{a,b}, C. Mallet^{a,b}, A. François^{d,e,f,g}, M. Boudes^h, J. Chemin^{d,e,f,g}, T. Voets^h, E. Bourinet^{d,e,f,g}, A. Alloui^{a,b}, A. Eschalier^{a,b,c}

Author affiliation:

(a) Clermont Université, Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France, (b) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1107 NEURO-DOL, Clermont-Ferrand, France (c) Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France, (d) Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, France, (e) CNRS UMR5203, Montpellier, France, (f) INSERM, U661, Montpellier, France, (g) IFR3 Universités Montpellier I&II, Montpellier, France, (h) Laboratory of Ion Channel Research, Department of Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium.

Corresponding author: Alain Eschalier, alain.eschalier@udamail.fr, +33 (0)4 73 17 82 30, fax: +33 (0)4 73 27 71 62

ABSTRACT

To exert analgesic action, acetaminophen requires complex metabolism to produce a brain specific lipoaminoacid compound, AM404, which targets central TRPV1 receptors. Lipoaminoacids are also known to induce analgesia through T-type channel inhibition (Cav3.2). In this study we show that the antinociceptive effect of acetaminophen is lost in mice when supraspinal Cav3.2 channels are inhibited. Therefore, we hypothesized a relationship between supraspinal Cav3.2 and TRPV1, via AM404, which mediates the analgesic effect of acetaminophen. AM404 is able to activate TRPV1 and weakly inhibits Cav3.2. Interestingly, activation of TRPV1 induces a strong inhibition of Cav3.2 current. Supporting this, intracerebroventricular administration of AM404 or capsaicin produces antinociception that is lost in Cav3.2^{-/-} mice. Our study, for the first time, (1) provides a molecular mechanism for the supraspinal antinociceptive effect of acetaminophen, (2) identifies the relationship between TRPV1 and Cav3.2 and (3) discloses supraspinal Cav3.2 inhibition as a potential pharmacological strategy to alleviate pain.

INTRODUCTION

Acetaminophen (acetyl-*para*-aminophenol; AcAP), is a widely used analgesic and antipyretic agent. Nevertheless, its analgesic mechanism remains elusive and its metabolism is complex. Several studies on AcAP metabolites have largely focused on their toxic actions, notably by hepatotoxic compounds like *p*-benzoquinone (*p*-BQ) and *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine (NAPQI). Recently, we have proposed that a new metabolic pathway, previously described by Högestätt et al.³⁰, would be involved in its analgesic action. AcAP is metabolized to *p*-aminophenol, which is itself metabolized in the brain by the fatty acid amide hydrolase (FAAH) to *N*-(4-hydroxyphenyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide (AM404), which is able to induce analgesia¹⁰⁰. Interestingly, this active metabolite is structurally related to lipoaminoacids, a new class of signaling molecules involved in pain modulation^{206,215}.

Members of the lipoaminoacid family, such as anandamide (*N*-arachidonoyl ethanolamide) and 2-AG (2-arachidonylglycerol), interact with several targets including cannabinoid^{204,313} and TRPV1 receptors^{141,206,312}, two main actors involved in pain modulation and in the analgesic action of AcAP^{100,131}. But interestingly, lipoaminoacids are also able to strongly inhibit T-type calcium channels, especially the Cav3.2 member, an effect which mediates their analgesic property⁴⁶⁷.

T-type calcium channels have the exclusive characteristic to be activated by weak depolarization close to the resting membrane potential conferring them a role of cell excitability modulator⁵²⁶. In the central nervous system, T-type calcium channels participate in epilepsy^{631,632}, spontaneous firing⁵²⁶, slow-wave sleep⁶³³ and pain perception^{580,581,634}. Three T-type calcium channels, Cav3.1, Cav3.2, and Cav3.3, have been described⁵²⁶. Among them, Cav3.2 channels are expressed in small and medium-diameter neurons of the dorsal root ganglion (DRG), in the dorsal horn superficial laminæ and in several brain structures⁵⁶⁷. In naive and neuropathic animals, we have shown that Cav3.2 inhibition by antagonists or oligonucleotide antisenses reduced nociceptive reactions and hyperalgesia, respectively^{532,581}. Finally, Cav3.2 knock-out mice display severe impairment in pain perception in several pain tests confirming the strong role of this channel in nociception⁵⁸⁰.

Considering that the AM404 lipoaminoacid was the active metabolite of AcAP³⁰ and that lipoaminoacids were able to inhibit Cav3.2 channels, which modulate nociception and pain⁴⁶⁷, we hypothesized that Cav3.2 channels could be involved in the mechanism of the analgesic action of AcAP. In this study, we have investigated the involvement of Cav3.2 channels in this effect using genetic (Cav3.2 knock-out mice) and pharmacological (Cav3 antagonist, TTA-A2) strategies in rodents submitted to various nociceptive tests and pathological conditions.

Interestingly, Zygmunt et al.¹⁴¹ have shown that AM404 is also a TRPV1 agonist. We previously demonstrated that brain TRPV1 was an essential actor for the analgesic action of acetaminophen¹⁰⁰. The suspected dual involvement of brain TRPV1 receptor and Cav3.2 channels in AcAP action lets us investigate

the interaction between these two protagonists. This potential interaction was studied with a behavioral approach by using genetically modified mice (Cav3.2 or TRPV1 knock-out mice) and a pharmacological strategy (TTA-A2). We have also used electrophysiological and calcium imaging technics to investigate the mechanism of the functional interaction between Cav3.2 channels and TRPV1 receptors.

Overall, our results demonstrate, for the first time, that the supraspinal Cav3.2 T-type calcium channel works with TRPV1 receptor to support the analgesic action of AcAP and consequently highlights them as potential targets for the development of new analgesics.

RESULTS

Acetaminophen fails to produce an analgesic effect in Cav3.2 knock-out mice. A single dose of acetaminophen (AcAP, 200 mg/kg *per os*) or vehicle (saline) was administered in Cav3.2 knock-out mice (*Cav3.2^{-/-}*) and their littermates (*Cav3.2^{+/+}*). Different pain tests, using the three fundamental stimuli (thermal, chemical and mechanical), were used in naive animals: tail immersion at 46°C, formalin (2.5%, phase 1: 0-5 min and phase 2: 15-40 min) and von Frey tests. In *Cav3.2^{+/+}* mice, acetaminophen (AcAP) increased the tail withdrawal latency in the tail immersion test (vehicle: 7.69 ± 0.60 s and AcAP: 16.04 ± 0.49 s; $P < 0.001$) (Fig. 1a). Moreover, acetaminophen decreased the paw withdrawal incidence (PWR) in the von Frey test (vehicle: 3.38 ± 0.18 PWR and AcAP: 2.57 ± 0.20 PWR; $P < 0.01$) (Fig. 1b) and the licking time of the first phase (vehicle: 135 ± 11 s and AcAP: 72 ± 12 s; $P < 0.001$) and the second phase (vehicle: 241 ± 31 s and AcAP: 61 ± 18 s; $P < 0.001$) of the formalin test (Fig. 1c). In the same tests performed in *Cav3.2^{-/-}* mice, acetaminophen was not able to modify scores obtained in control animals demonstrating that the analgesic action of acetaminophen was abolished when the Cav3.2 channel was deleted (Fig. 1a, b and c). A similar result was obtained in a model of inflammatory pain induced by a peri-articular injection of Complete Freund Adjuvant in the left hindpaw (CFA model). Both thermal (vehicle: 3.88 ± 0.23 s and AcAP: 10.03 ± 0.75 s; $P < 0.05$) (Fig. 1d) and mechanical hyperalgesia (vehicle: 4.5 ± 0.19 PWR and AcAP: 2.13 ± 0.48 PWR; $P < 0.01$) (Fig. 1e) were reduced by acetaminophen in *Cav3.2^{+/+}*, while it did not produce any effect in *Cav3.2^{-/-}* mice.

As previously shown⁵⁸⁰, deletion of the Cav3.2 channel attenuates reactions to several noxious stimuli (here mainly heat and mechanical ones) (Fig. 1). Thus, the analgesic effect of acetaminophen might be masked by the *Cav3.2^{-/-}* mouse hypoalgesic phenotype, introducing a bias in our experiments. We thus verified whether another analgesic drug (morphine, 2 mg/kg *s.c.*) could be effective in *Cav3.2^{-/-}* mice. In accordance with the literature^{467,636}, morphine produced a significant analgesic effect in *Cav3.2^{-/-}* mice in all tests used (Fig. 1) either in naive mice (tail immersion, von Frey and formalin tests) or in the CFA model (paw immersion and von Frey tests).

All these findings identify the novel role of Cav3.2 calcium channels in supporting the analgesic action of acetaminophen.

Supraspinal Cav3.2 calcium channels are needed for acetaminophen-induced analgesia. No consensus is fully established concerning the site of action of acetaminophen. Even if some authors have indicated a peripheral action site^{98,108,109}, we and others developed evidence for a central action site^{96,97,100,103,131,637}. With that in mind, we hypothesized that supraspinal Cav3.2 calcium channels would be involved in the analgesic effect of acetaminophen. Recently, a new class of T-type antagonists (TTA family) has been discovered⁵⁶¹ and which includes TTA-A2, currently the most specific compound⁵³². The influence of TTA-A2, administered by intracerebroventricular (i.c.v.) route, on the effect of acetaminophen or morphine was assessed in order to determine the involvement of supraspinal Cav3.2 calcium channels in their analgesic action in both naive mice and in an inflammatory context (CFA model). The first observation was that TTA-A2 (12 µg, i.c.v.) injection induced an antinociceptive effect in the first phase (vehicle: 109 ± 8 s and TTA-A2: 72 ± 7 s; $P < 0.01$) and the second phase (vehicle: 193 ± 18 s and TTA-A2: 93 ± 20 s; $P < 0.01$) of the formalin test (Fig. 2a) and in the von Frey test (vehicle: 3.9 ± 0.4 PWR and TTA-A2: 2.6 ± 0.2 PWR; $P < 0.01$) (Fig. 2b) without inducing a sedative effect (Supplementary Fig. S1). This result indicates, for the first time, that the inhibition of supraspinal Cav3.2 calcium channels can specifically reduce the reaction to noxious stimuli. Secondly, in mice submitted to the formalin (Fig. 2a) or the von Frey (Fig. 2b) tests, co-administration of TTA-A2 (i.c.v.) and acetaminophen (200 mg/kg, *p.o.*) produced an effect not significantly different compared to the effect of acetaminophen or TTA-A2 alone (Fig. 2a). On the contrary, co-administration of TTA-A2 (i.c.v.) and morphine (1 mg/kg, *s.c.*) produced a significantly more pronounced analgesic action than the effect of the same drugs administered alone (Fig. 2a, b). These results show that supraspinal Cav3.2 calcium channels are involved in the analgesic action of acetaminophen, yet they are not involved in morphine analgesic action.

In parallel, specific action of TTA-A2 on Cav3.2 subtype channels was tested by assessing the analgesic effect of TTA-A2 i.c.v.-injected in *Cav3.2*^{-/-} mice in the formalin test. No analgesic action of TTA-A2 was observed in the first phase (vehicle: 68 ± 9 s and TTA-A2: 56 ± 14 s) nor in the second phase (vehicle: 106 ± 12 s and TTA-A2: 109 ± 23 s) (Supplementary fig. S2), confirming the specific action of this compound on Cav3.2.

Cav3.2 calcium channels are also expressed in the spinal cord⁵⁶⁷ and acetaminophen-induced analgesia involves spinal actors^{97,101,306}. A possible involvement of the spinal Cav3.2 calcium channels in acetaminophen action has been investigated by assessing its analgesic action in wild type mice submitted to the formalin test and treated with TTA-A2 (12 µg, *i.t.*). TTA-A2 induced an analgesic effect in the first phase (vehicle: 106 ± 12 s and TTA-A2: 65 ± 9 s, $P < 0.001$) and the second phase (vehicle: 255 ± 19 s and TTA-A2: 119 ± 29 s, $P < 0.001$) of the formalin test (Fig. 2c). Interestingly, co-administration of TTA-A2 (12

µg, i.t.) and acetaminophen (200 mg/kg, *p.o.*) induced a significantly higher analgesic effect than both drugs administered alone. The same result was found with morphine (1 mg/kg, *s.c.*) and TTA-A2 (12 µg, i.t.) co-administration (Fig. 2c). This experiment demonstrated that spinal Cav3.2 channels are not involved in acetaminophen (or morphine-) induced analgesia.

All together, these results demonstrate that supraspinal but not spinal Cav3.2 channels are essential for the analgesic effect of acetaminophen. Moreover, they show that specific supraspinal or spinal inhibition of Cav3.2 calcium channels induce analgesia.

AM404, the active metabolite of acetaminophen, required Cav3.2 channels to mediate its analgesic effect. A new acetaminophen metabolism pathway was recently discovered³⁰. After oral ingestion, acetaminophen is metabolized to p-aminophenol in the liver. This compound is associated in brain with arachidonic acid by the fatty-acid-amine-hydrolase (FAAH) enzyme which gives rise to AM404. AM404 has been shown to mediate the analgesic effect of acetaminophen¹³¹ and belongs to the endocannabinoid family, that includes, anandamide which activates TRPV1 receptors⁴⁵⁹ and inhibits Cav3.2 calcium currents⁴⁶⁷. To demonstrate the potential link between AM404 and Cav3.2 calcium channels *in vivo*, the analgesic effect of AM404 (2 µg, i.c.v.) was assessed in *Cav3.2^{-/-}* and *Cav3.2^{+/+}* mice. AM404 injection induced an analgesic effect in *Cav3.2^{+/+}* mice in the first phase of the formalin test (vehicle: 85 ± 10 s and AM404: 47 ± 10 s; *P* < 0.01) (Fig. 3a) and in the von Frey test, 7 days after peri-articular CFA injection (vehicle: 4.86 ± 0.14 PWR and AM404: 2.75 ± 0.31 PWR; *P* < 0.01) (Fig. 3b). In the same tests, no analgesic action of i.c.v. administered AM404 was observed in *Cav3.2^{-/-}* mice (Fig. 3).

We further examined in DRG neurons the action of AM404 on Cav3.2 current in a whole-cell patch clamp method. Contrary to acetaminophen and p-aminophenol which did not inhibit Cav3.2 current, AM404 weakly inhibits Cav3.2 current, with a high EC₅₀ = 13.67 µM (Fig. 3c), compared to the antagonist, TTA-A2 (EC₅₀ = 8.99 nM)⁵³². These results demonstrate a weak inhibitory action of AM404 on Cav3.2 calcium channels.

TRPV1 receptor and Cav3.2 channel: evidence of a functional relationship. As previously evoked, AM404 is also known as a TRPV1 agonist¹⁴¹. In a previous study, we demonstrated that acetaminophen, *via* AM404, activated supraspinal TRPV1 receptors to induce its analgesic effect¹⁰⁰. Using a calcium imaging method on HEK cells transfected with or without the TRPV1 receptor, we showed that AM404 (10 µM) induced a large intracellular calcium increase dependent on the TRPV1 receptor (Fig. 4a). AM404 (10 µM) was as efficient as capsaicin (0.5 µM) and elicited a response in all capsaicin responding cells. In these experimental conditions, we further demonstrated that p-aminophenol (10 µM) induced a calcium mobilization, albeit much smaller and slower than AM404 or capsaicin (Fig. 4b). This effect resulted from the action of locally produced AM404 (transformation of p-aminophenol by HEK expressed FAAH). Indeed effect of p-aminophenol application was lost after a treatment with a FAAH inhibitor (PMSF, 10 µM; Fig. 4b). As for

direct application of exogenous AM404, the observed intracellular calcium mobilization depends on TRPV1, as demonstrated by the use of the TRPV1 antagonist (capsazepin, CAPZ, 20 μ M; Fig. 4b, SI 3) or the lack of response in cells that were not transfected with the TRPV1 receptor (Fig. 4b). These experiments confirm that AM404 is able to activate TRPV1 receptors and that, as suggested by our previous *in vivo* results¹⁰⁰, p-aminophenol needs to be metabolized by FAAH (into AM404) in order to activate these receptors.

The fact that TRPV1 receptors and Cav3.2 channels were involved in the action of acetaminophen and its active metabolite, AM404, led us to investigate a putative functional link between them. For that purpose, the effect of brain TRPV1 activation was studied using capsaicin injection (Cap, 10 μ g i.c.v.) in *Cav3.2^{-/-}* and *Cav3.2^{+/+}* mice via the formalin and von Frey tests in naive mice and in the CFA-model. We first demonstrated that the analgesic effect of capsaicin involved TRPV1 receptors by showing its total inhibition by the specific antagonist, capsazepin (CAPZ, 10 μ g i.c.v.) (Fig. S4). Then, while in *Cav3.2^{+/+}* mice, a supraspinal injection of capsaicin elicited an analgesic effect in the first (vehicle: 88 \pm 9 s and Cap: 42 \pm 13 s, $P < 0.01$) and second phase (vehicle: 231 \pm 24 s and Cap: 127 \pm 30 s, $P < 0.05$) of the formalin test (Fig. 5a) and in the von Frey test (vehicle: 4.86 \pm 0.14 PWR and Cap: 2.5 \pm 0.46 PWR, $P < 0.01$) (Fig. 5b) we showed that capsaicin (10 μ g i.c.v.) had no effect in *Cav3.2^{-/-}* mice (Fig. 5a,b). Conversely, the analgesic effect of i.c.v. administered TTA-A2 was maintained in TRPV1 knock-out mice (*TRPV1^{-/-}*) in the first (vehicle: 92 \pm 11 s and TTA-A2: 34 \pm 7 s, $P < 0.001$) and second (vehicle 145 \pm 17 s and TTA-A2: 58 \pm 9 s, $P < 0.01$) phases of the formalin test (Fig. 5c). Taken together, these results revealed that the analgesic effect induced by an activation of supraspinal TRPV1 receptors needs Cav3.2 calcium channels and suggests that these two protagonists could be involved sequentially. Indeed both the analgesic effect of capsaicin lost in *Cav3.2^{-/-}* mice and the maintained effect of TTA-A2 in *TRPV1^{-/-}* mice suggests that Cav3.2 would be located downstream of TRPV1 and inhibited after TRPV1 activation, e.g. by AM404.

Accordingly, *in vitro* we used HEK cells stably expressing recombinant Cav3.2 channels and transfected with or without TRPV1 to test the effects of Cav3.2 activation. Currents were recorded from a holding potential of -75mV in order to be close to the normal resting potentials of neurons. This maintains the T-type channels in a partially inactivated state that is often preferentially sensitive to pharmacological modulations^{467,532}. Furthermore, we used a voltage ramp protocol (-75 to +75mV) to visualize concurrently the current/voltage relationships of expressed Cav3.2 and TRPV1 (when co-expressed). In these conditions, capsaicin has a limited and fully reversible inhibitory effect on Cav3.2 channel activity in the absence of co-expressed TRPV1 (Fig. 5d). In contrast, when TRPV1 channels are co-expressed, Cav3.2 mediated currents are potently inhibited by capsaicin application (Fig. 5e). Furthermore, the inhibition was almost irreversible even upon capsaicin washout. Since TRPV1 activity masks Cav3.2 currents during capsaicin application, it was not possible to plot the T-type current amplitude during the drug application. In contrast, TRPV1 activation led to a linear current/voltage relationship and augmentation of inward and outward currents at

-75 and +75mV (presented in supplementary Fig S5). It shows that capsaicin evokes a current only when TRPV1 is expressed. Pooled experiments showed that capsaicin mediated Cav3.2 inhibition depends on TrpV1 activation (Fig. 5f). In high TRPV1 expressing cells, TRPV1 has a tonic activity that was evident from recordings just after establishment of whole cell recording. In these cells, Cav3.2 activity was undetectable suggesting their tonic inhibition by basal TRPV1 activity in the cell culture incubator.

DISCUSSION

Using different in vitro (patch clamp, calcium imaging) and in vivo (different pain tests and models) experiments with a rigorous methodology (blind experiments by the same experimenter, randomized treatments, method of equal blocks to limit uncontrollable environmental factors), we demonstrated that: 1) supraspinal Cav3.2 channels are involved in acetaminophen analgesic action; 2) supraspinal Cav3.2 channels modulate pain perception and 3) a functional relationship between TRPV1 receptors and Cav3.2 channels mediates the analgesic action of acetaminophen.

The loss of acetaminophen effect in *Cav3.2*^{-/-} mice, while effective in wild-type littermates regardless of the experimental conditions, suggests that Cav3.2 channels are needed for the analgesic action of acetaminophen not only in acute nociception but also in inflammatory situations. This involvement might be questioned due to the reduced response of *Cav3.2*^{-/-} to noxious stimuli, however, we have demonstrated by using morphine that an additional analgesia could happen in these mice. Thus the loss of the acetaminophen effect can clearly be linked to Cav3.2 channel deletion and, acetaminophen and morphine mediated analgesia can be clearly distinguished. However these results are not informative in localizing, within the CNS, the channels involved in the effect of acetaminophen.

The site of action of acetaminophen is still a matter of debate. Some authors showed a peripheral action site^{98,108,109} while central one was shown by others^{96,97,100,103,131,637}. We previously demonstrated that spinal¹³¹ and brain¹⁰⁰ receptors were involved in the action of acetaminophen in animals and possibly in healthy volunteers too⁹⁶. Cav3.2 channels are widely located in the body. Notably, Cav3.2 channels are expressed in the spinal cord^{494,567} and in different nuclei in the brain: hypothalamus, thalamus, amygdala, hippocampus, midbrain, and cortex⁵⁶⁷. Various T-type channel antagonists such as ethosuximide^{591,594}, mibefradil^{587,588}, NNC⁵⁹⁰ have been used to explore the role of these channels but none of them are highly specific. Recently, a new class of molecules has been designed, called TTA compounds, which presents major specificity for T-type channels^{645,646} and a body of evidence placed TTA-A2 as the most specific antagonist of Cav3.2 subtype channels. We previously demonstrated that its effect on T-type channels was greater on Cav3.2 than on Cav3.1 and Cav3.3 (EC₅₀ Cav3.1: 100 nM ; Cav3.2: 9 nM ; Cav3.3: 30 nM)⁵³² and that its analgesic effect (after systemic administration) was lost in *Cav3.2*^{-/-} mice⁵³². Using i.c.v. injections we confirmed this notion here and moreover we further show that Cav3.2 inhibition in the CNS mediates

analgesic effects. Based on this data, the loss of an effect of orally administered acetaminophen after i.c.v. injection of TTA-A2 demonstrated an involvement of supraspinal Cav3.2 channels but not spinal channels, as shown by the lack of an occluding effect of i.t. TTA-A2 on acetaminophen-induced analgesia. This demonstration of a supraspinal site of action of acetaminophen agrees with our previous work showing the involvement of supraspinal TRPV1¹⁰⁰ receptors in acetaminophen-induced analgesia. It also agrees with results obtained in healthy volunteers showing an activation of inhibitory bulbospinal pathways by acetaminophen⁹⁷. These results confirm once again that acetaminophen can be considered as a centrally acting analgesic drug. It is able to act on supraspinal targets, among them Cav3.2 channels and TRPV1 receptors, to activate inhibitory bulbo-spinal pathways, while at the spinal level other actors could be involved such as 5-HT receptors^{98,99,103,136,304,306} or as more recently shown, TRPA1 and A1 adenosine receptors^{98,101}.

Incidentally, it is interesting to note that TTA-A2, administered alone either supra-spinally or spinally, induced analgesia, without affecting locomotion. These results, in line with the analgesia observed in *Cav3.2*^{-/-} mice (present and Choi et al. study⁵⁸⁰), confirmed that Cav3.2 calcium channels are tonically involved in nociception at these two sites to modulate pain.

Regarding the mechanism of the supraspinal involvement of Cav3.2 by acetaminophen, previous results have shown that the central action of acetaminophen involves metabolites³⁰, namely p-aminophenol, transformed in the brain into AM404. Thus, we hypothesized that the observed relationship between acetaminophen and Cav3.2 channels is indirect through AM404, a lipoaminoacid related compound³⁰. The involvement of supraspinal Cav3.2 channels in the AM404 antinociceptive action was shown *in vivo*. AM404, i.c.v.-injected, produced an analgesic effect in *Cav3.2*^{+/+} but not in *Cav3.2*^{-/-} mice in the two tests used. These results demonstrate a functional link between AM404 and Cav3.2 channels, which has been similarly shown for lipoaminoacids such as anandamide, some polyunsaturated fatty acids or N-acyl ethanolamide, which are T-type calcium channel blockers⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹, and for endogenous N-arachidonoyl glycine (NAGly) a more potent Cav3.2 inhibitor⁴⁶⁷. Interestingly, NAGly promotes an analgesic effect in animals^{206,467} which is abolished in *Cav3.2*^{-/-} mice⁴⁶⁷, suggesting that an inhibition of Cav3.2 could support its analgesic effect. The same mechanism can be evoked for AM404. Indeed, AM404 induced an inhibition of native Cav3.2 mediated T-type currents in D-hair DRG neuron subtypes that do not express TRPV1 channels. However, this inhibition was weak and partial compared to other lipoaminoacid mediated inhibition such as one that we previously described with NAGly⁴⁶⁷, which questions the involvement of this direct inhibitory effect in the analgesic action of AM404 observed *in vivo*.

Our recent demonstration that AM404-induced activation of brain TRPV1 channels was needed for the analgesic action of acetaminophen¹⁰⁰ suggested a link between AM404, TRPV1 and Cav3.2. Accordingly, an indirect inhibition of Cav3.2 channels by AM404 through its activation of TRPV1 was suspected. We first

confirmed, using a calcium imaging assay, the ability of AM404 to activate TRPV1 as previously demonstrated by Zygmunt et al.¹⁴¹. The ability of TRPV1 activation to inhibit Cav3.2 channels was then demonstrated with electrophysiology experiments *in vitro* in HEK cells. Devoid of any direct inhibitory effect on Cav3.2 channels, capsaicin strongly inhibited Cav3.2 currents when cells were co-transfected with the channels and TRPV1 receptors, which demonstrated the ability of TRPV1 activation to inhibit Cav3.2 channels. This effect is very sensitive since the basal tonic activity of TRPV1 was also effective in reducing Cav3.2. This effect is reminiscent of findings in rat sensory neurons, known to express Cav3.2, describing an inhibition of T-type currents by TRPV1 mediated action⁵⁹⁷. We similarly demonstrate this pathway here by demonstrating the minimal necessity of the two channels being expressed together, likely located in a close vicinity, to observe the regulation. Importantly, we further show that this inhibition can be obtained with physiological levels of extracellular calcium, in contrary to the previous report from Comunanza et al.⁵⁹⁷, suggesting that this modulation is likely to occur *in vivo*. The hypothesis stated to explain the mechanism involved in this modulation is a calcium regulation. Indeed, massive influx of calcium ions after TRPV1 activation could inhibit Cav3.2 channels through the activation of kinases (for review⁶⁵¹), such as PTK⁶⁵², PKA⁶⁵³⁻⁶⁵⁵, PKC⁶⁵⁶ and ROCK⁶⁵⁷ and therefore decrease neuronal excitability.

The next step was to demonstrate this functional link in pain supraspinal modulation. Intracerebroventricular injection of capsaicin induced analgesia in *Cav3.2*^{+/+} mice in all the nociceptive tests. This effect was not observed in *Cav3.2*^{-/-} mice. Cav3.2 channels are thus needed for the analgesic effect of the TRPV1 agonists, capsaicin or AM404. However, the reciprocal does not apply, the analgesic action of i.c.v.-injected TTA-A2 was unchanged in *TRPV1*^{-/-} mice compared to littermates. Taken together, these results demonstrate that the agonist of TRPV1 and AM404 induces analgesia through a supraspinal TRPV1-dependent Cav3.2 current inhibition. That explains why the antinociceptive effect of acetaminophen was inhibited both by i.c.v. TRPV1 receptor antagonist¹⁰⁰ and the Cav3.2 inhibitor TTA-A2. The involvement of supraspinal TRPV1 receptors are in line with literature showing that activation of brain TRPV1 induces an analgesic effect (for review⁶⁵⁸).

Thus, we have demonstrated a functional link, *in vivo*, between TRPV1 receptors and Cav3.2 calcium channels that is implicated in capsaicin- or acetaminophen-induced analgesia.

To conclude, we have identified brain Cav3.2 channels as a novel targets for the analgesia induced by acetaminophen. We positioned these channels with two actors previously shown to be involved in the action of acetaminophen: AM404, its bioactive metabolite, and TRPV1 receptors. The present results led us to complete the sequential events we previously proposed^{100,131} to explain the mechanism of action of acetaminophen: metabolism of p-aminophenol (in the liver) and AM404 in brain (thanks to FAAH) which induces an activation of brain TRPV1 (linked with CB1 receptors) which in turn induces a Cav3.2 inhibition presently shown to participate in the analgesic effect of acetaminophen. Further studies are needed to

elucidate the link between brain Cav3.2 inhibition and activation of inhibitory bulbospinal pathways involved in the analgesic effect of acetaminophen^{97,103,131}. Finally, we highlighted supraspinal Cav3.2 calcium channels as an important actor for pain modulation which appears as a promising and interesting target for the treatment of pain.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Cav3.2 knock-out mice (*Cav3.2*^{-/-}, 20-25 g, male), TRPV1 knock-out mice (*TRPV1*^{-/-}, 20-25 g, male), originally generated by Chen CC et al.⁶³⁹ and Caterina et al.⁴²⁸ respectively, and their wild type littermates (*Cav3.2*^{+/+}, *TRPV1*^{+/+}, 20-25 g, male) were used. All animals and experiments were performed with approval by the Committee for Research and Ethical Issues of the IASP and the Institutional Ethic Committee for animal experiments (CEMEA Auvergne; nr: CE 53 - 12, CE 112 - 12, CE 24 - 11, CE 13 - 10). Animals were housed under controlled environmental conditions (21 - 22°C; 55% humidity) and kept under a 12/12h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Animals were euthanized by cervical dislocation or CO₂.

Behavioral Studies. Animals were habituated to the testing environment before baseline testing. The experimenter and drug administration were blinded to the genotype of the mice and the treatments. Drug administration was performed a person other than the experimenter.

Tail and paw immersion tests. Mice were habituated to handling for three days a week prior to testing. The mouse tail or paw was immersed in warm water (46°C). Latency to respond to the heat stimulus with a tail or paw vigorous flexion were measured three times and averaged. The cutoff time was 30 seconds, after which the tail was removed from the bath regardless of response.

Formalin test. Mice were allowed to acclimate to a Plexiglas chamber (30 cm x 30 cm x 30 cm) for at least 30 minutes before testing. Formalin (20 µl, 2.5% formalin in saline) was injected into the plantar surface of one hind paw. Spontaneous pain behavior (licking) was recorded during the two typical nociceptive phases: from 0 to 5 min (phase I) and from 15 to 40 min (phase II) after formalin injection as previously described¹⁰⁰. For AM404 experiments, only phase 1 was studied due to the fast degradation of AM404¹⁰⁰.

Von Frey test. Mice were placed in individual compartments on top of a wire surface and allowed to acclimatize for one hour before testing. Withdrawal thresholds were assessed with the 1.4 g calibrated von Frey filament (Bioseb, France). The latter was pressed perpendicularly five times against the mid paw and held for 3 seconds. A positive response was noted if the paw was withdrawn or licked and a pain response score (from 0 to 5) was determined.

Monoarthritis Induction. Five microliters of complete Freund adjuvant (CFA, DIFCO Laboratories, Detroit, USA)⁶⁴⁰ was injected into both sides of the left ankle joint of mice under brief halothane/N₂O/O₂ anesthesia. Thermal and mechanical paw thresholds were determined before and 7 days after CFA or vehicle injection.

Electrophysiology

Cell culture and electrophysiological recordings. Lumbar DRGs with attached roots were dissected from adult male C57BL/6J mice and single cell suspension was obtained following an enzymatic and mechanical dissociation. Whole cell patch-clamp recordings were performed 3–28 h after plating on medium sized DRG neurons with a “rosette” phenotype as previously described⁵³². For recording calcium current, the extracellular solution contained (in mM): 2 CaCl₂, 100 TEACl, 2 NaCl, 1 MgCl₂, 40 Choline Cl, 5 Glucose, 5 4AP (pH to 7,4 with TEAOH~330 mOsm). Pipettes with a resistance of 1-1.5 Mohm were filled with an internal solution containing (in mM): 110 CsCl, 3 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, 0,6 GTP (pH to 7,4

with CsOH, ~300 mOsm). All recordings were filtered at 5 kHz using an Axopatch 200B amplifier (Axon instrument). Data was recorded using a pClamp10 (Axon Instrument) and Graphpad Prism software.

HEK cells stably expressing the human Cav3.2 sequence were used as previously described⁵³² and were transfected with GFP alone or with a mix of TRPV1 and GFP expression plasmids using JetPEI.

Calcium imaging. Human embryonic kidney cells, HEK293T, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) human serum, 2 mM L-glutamine, 2 units/ml penicillin and 2 mg/ml streptomycin at 37°C in a humidity controlled incubator with 10% CO₂. HEK293T cells were transiently transfected with human TRPV1 using Mirus TransIT-293 (Mirus Corporation; Madison, WI, USA). To determine if the cells were transfected, capsaicin (1 μM) was used at the end of each experiment. Cells which did not-respond to capsaicin were used as controls.

Cells were loaded with 2 μM Fura-2 acetoxymethyl ester for 30 minutes at 37°C. The intracellular concentration was monitored as the ratio of fluorescence signals measured upon alternating illumination at 340 and 380 nm, using an MT-10 illumination system and the Cell[^]M software (Olympus). Bath solution contained (in mM) 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 10 HEPES, 10 D-Glucose, pH = 7.4 buffered with NaOH.

As HEK cells express FAAH, an enzyme⁴⁹⁴ which degrades AM404, the experiments of figure 4a have been performed in the presence of a FAAH inhibitor (PMSF, 10μM).

Statistical Analysis. Data is expressed as mean ± SEM and recorded using SigmaStats 3.5 software. Data was tested for normality and for equal variance. Multiple measurements were compared by one-way or two-way ANOVA or by Kruskal-Wallis test in the case of data that was not normally distributed. The post hoc comparisons were performed by the Bonferroni method. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. V. Uebele (Merck and Co., Inc.) for the TTA-A2 molecule, to Dr. K. Campbell for the Cav3.2 KO mice, and to Dr. Perez Reyez for the Cav3.2 stable cell line and cDNA. This work was supported in by Grants from the Research Foundation Flanders (FWO) Grants G0565.07 and G0686.09 and the Research Council of KULeuven Grants GOA 2009/07, EF/95/010 and TRPLe, the ANR (ANR-09-MNPS-037), the Institut UPSA de la Douleur and the AFM (AFM-12-PainT). M. Boudes is a Marie Curie experienced researcher. N. Kerckhove is supported by fellowships from the European Fund for Regional Economic Development (FEDER) and regional council of Auvergne. A. François is supported by fellowships from the French ministry of research and education the AFM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: NK CM AF MB AE EB. Performed the experiments: NK AF MB EB. Analyzed the data: NK CM AF EB MB AA. Wrote the paper: NK CM TV MB EB AE

ADDITIONAL INFORMATION

The authors declare that no competing financial interests concerning this work.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1 | Acetaminophen fails to induce analgesic effect in Cav3.2 knock-out. The analgesic effect of acetaminophen (AcAP, 200 mg/kg *per os*) was assessed in: (a) tail immersion, (b, e) von Frey, (c) formalin and (d) paw immersion tests in Cav3.2 knock-out (*Cav3.2^{-/-}*) and their wild-type littermates (*Cav3.2^{+/+}*). Tail, paw immersion and von Frey tests were performed 45 minutes after acetaminophen or morphine administration and 20 minutes before formalin injection. For the inflammatory pain model, a monoarthritic model was induced by a peri-articular injection of CFA in the hindpaw. Paw immersion and von Frey tests were performed at day 7 after CFA injection and 45 minutes after drug administration. Baselines were performed at Day 0 and Day 7 before drug injections (data not shown). Morphine (Mor, 2 mg/kg *subcutaneous*) groups have been used as positive control groups. In all tests and conditions, acetaminophen lacks its analgesic effect in *Cav3.2^{-/-}* mice. Data is presented as mean SEM (n = 6–8). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; compared to vehicle groups.

Figure 2 | Supraspinal Cav3.2 channels are involved in acetaminophen analgesic effect. The supraspinal Cav3.2 calcium channels involvement in acetaminophen was investigated specifically by Cav3.2 block in brain (a, b) and spinal cord (c). TTA-A2 intracerebroventricular (i.c.v.) or intrathecal (i.t.) injections were performed and challenged with acetaminophen analgesic effect. TTA-A2 (5 µg/2 µl i.c.v. and 5 µg/5 µl i.t.), acetaminophen (AcAP; 200 mg/kg *p.o.*), morphine (Mor; 1 mg/kg *s.c.*) and co-administrations effect were assessed in: (a, c) formalin and (b) von Frey tests. These tests were performed 20 and 45 minutes after drugs injections, respectively. TTA-A2, AcAP and Mor produced analgesia in formalin and von Frey tests. TTA-A2 + AcAP co-administrations did not display a greater analgesic effect than AcAP when TTA-A2 i.c.v. injection was performed whereas i.t. injection did. TTA-A2 + Mor co-administration compared to Mor elicits a stronger analgesic effect in TTA-A2 i.c.v. and i.t. injections. Data is presented as mean SEM (n = 6–8). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001 compared to vehicle group; †, *P* < 0.05; ††, *P* < 0.01; †††, *P* < 0.001 compared to TTA-A2 + Mor co-administration group.

Figure 3 | Cav3.2 calcium channels are inhibited by AM404 and essential for AM404-induced analgesia. AM404 and Cav3.2 calcium channels relationship was assessed by *in vitro* (whole cell patch clamp) and *in vivo* (formalin and von Frey test) approaches. In behaviors tests, the AM404 analgesic effect (2 µg/2 µl i.c.v.) was assessed in (a) formalin phase 1 and (b) von Frey tests in *Cav3.2^{-/-}* and *Cav3.2^{+/+}* mice. These tests were performed 10 minutes after AM404 injection. In all tests, AM404 failed to produce analgesia in *Cav3.2^{-/-}* while it was effective in *Cav3.2^{+/+}* mice. (c) Dose-response curve of AM404 in Cav3.2 current (n = 6–8, open diamonds). Currents were elicited by a depolarization at -30 mV (200 ms duration) applied every 5 s from -75 mV. AM404 is able to partially and weakly inhibit Cav3.2 currents (EC 50 = 13.67 µM). Acetaminophen (filled circle) and p-aminophenol (filled square) are almost inactive in similar conditions (inhibition at 100 µM: 8 ± 2% and 10.5 ± 2.5% for AcAP and P-aminophenol respectively). Data is presented as mean SEM (n = 6–8). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01 compared to vehicle groups.

Figure 4 | AM404 and FAAH dependent metabolism of p-aminophenol are TRPV1 activators. (a) Time course of intracellular calcium elevation in HEK cells transfected with (black traces, n=18) or without (gray traces, n = 17) TRPV1 receptors showing that application of capsaicin (0.5µM) or AM404 (10 µM) elicits elevations of intracellular calcium mediated by TRPV1 activation. PMSF was applied in all experiments to block the degradation of AM404 by FAAH. These experiments were performed in the presence of 10 µM PMSF. Intracellular calcium elevation upon application of 50 µM ATP at the end of the protocol shows that

all the cells (Control and TRPV1 transfected) were effectively loaded with the Fura2 calcium sensitive probe. (b) Application of p-aminophenol evokes Fura2 340/380 ratio in HEK293 cells expressing TRPV1, but not in untransfected cells or in the presence of the FAAH antagonist, PMSF (10 μ M).

Figure 5 | Relationship between Cav3.2 channel and TRPV1 receptor. The capsaicin analgesic effect (Cap, 10 μ g/2 μ l i.c.v.) was assessed in (a) formalin (2.5%) and (b) von Frey tests in *Cav3.2*^{-/-} and *Cav3.2*^{+/+} mice. TTA-A2 analgesic effect (5 μ g/2 μ l i.c.v.) was assessed in (c) formalin test in TRPV1 knock-out mice (*TRPV1*^{-/-}) and their wild type littermates (*TRPV1*^{+/+}). These tests were performed 10 minutes after Cap or TTA-A2 injection. In all tests, Cap failed to produce analgesia in *Cav3.2*^{-/-} while it was effective in *Cav3.2*^{+/+} mice. TTA-A2 kept its analgesic effect in *TRPV1*^{-/-} mice. (d) Representative Cav3.2 current traces evoked by 200 ms depolarization ramps from -75mV to +75mV, under control conditions (black trace) and during the washout of 1 μ M capsaicin (gray trace) on a typical HEK cell expressing Cav3.2 alone. Evolution of the maximal inward current evoked by the depolarizing ramp during the time course of the experiment is plotted on the bottom part. The time points labeled as (1) and (2) correspond to the upper control and wash traces respectively. (e) Same representation as in (d) for a typical HEK cell expressing Cav3.2 and TRPV1. Note that in this case the Cav3.2 mediated current is nearly abolished after capsaicin stimulation of TRPV1. (f) Mean Cav3.2 inhibition mediated after 1 μ M capsaicin application when TRPV1 is coexpressed (black bar) or not (open bar). Data is presented as mean SEM (n = 6–8). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ compared to vehicle groups (behavior) or with or without TRPV1 (electrophysiology).

FIGURES

Figure-1
(ESCHALIER)

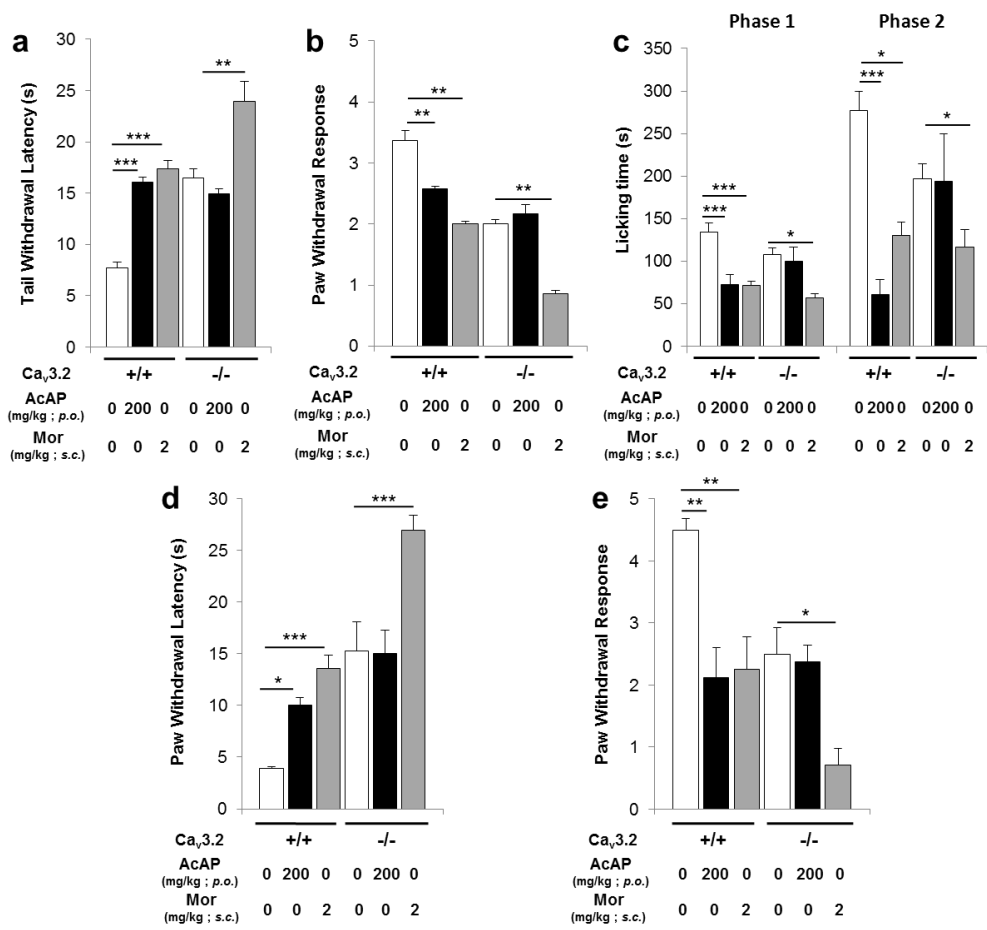
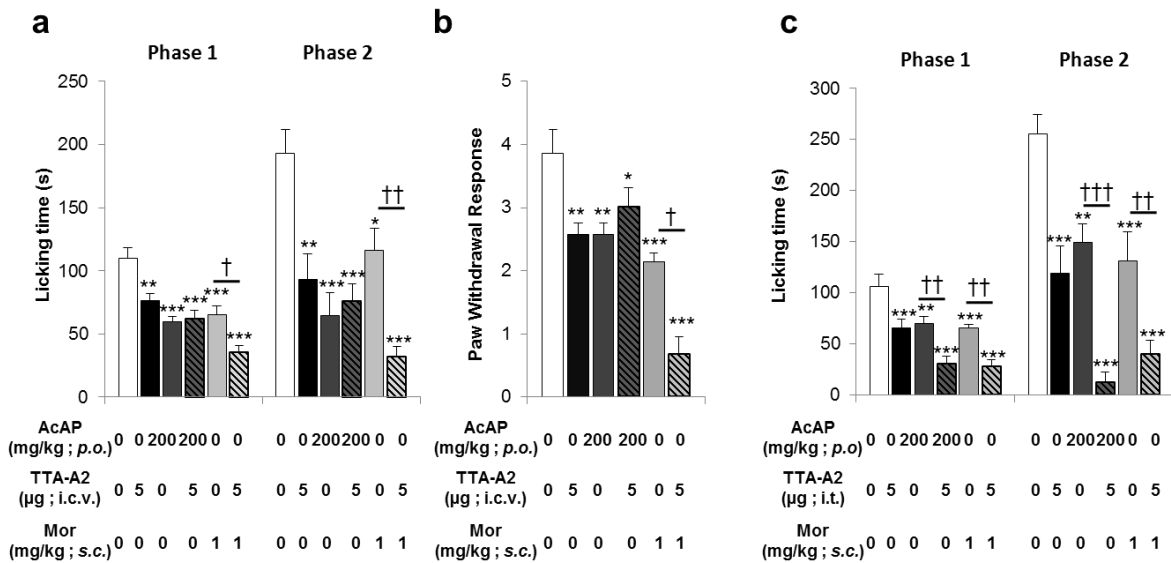
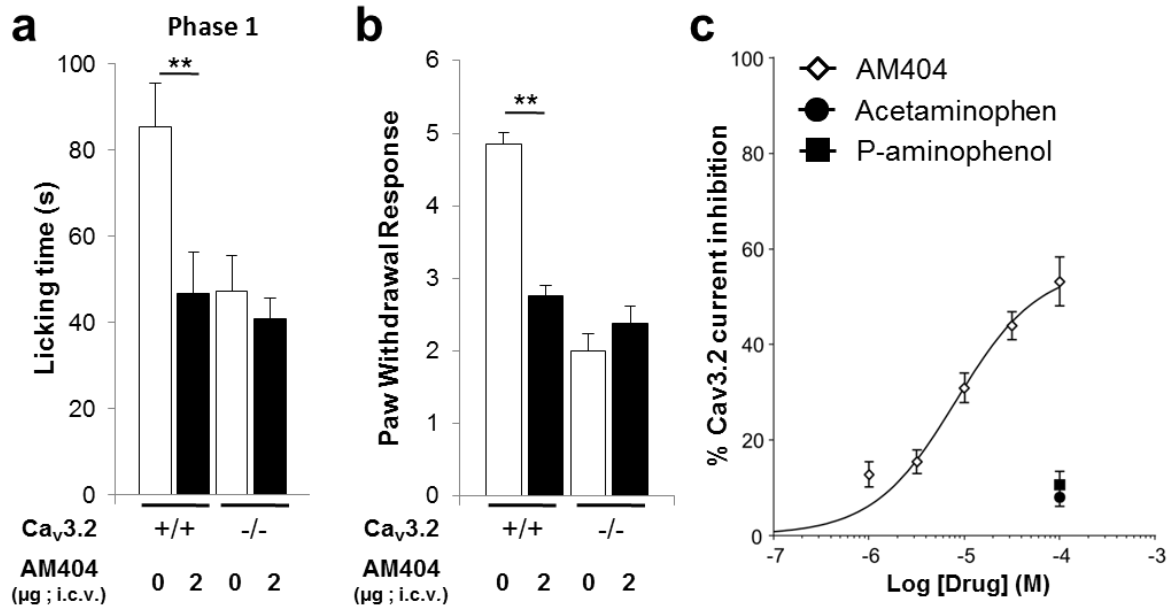


Figure-2
(ESCHALIER)



**Figure-3
(ESCHALIER)**



**Figure-4
(ESCHALIER)**

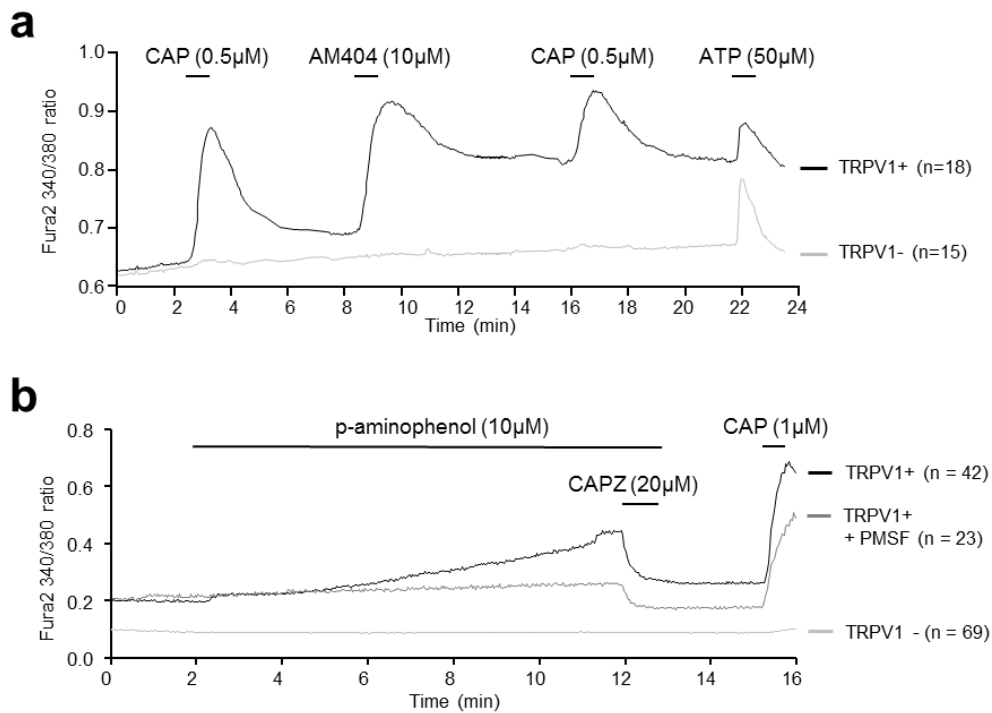
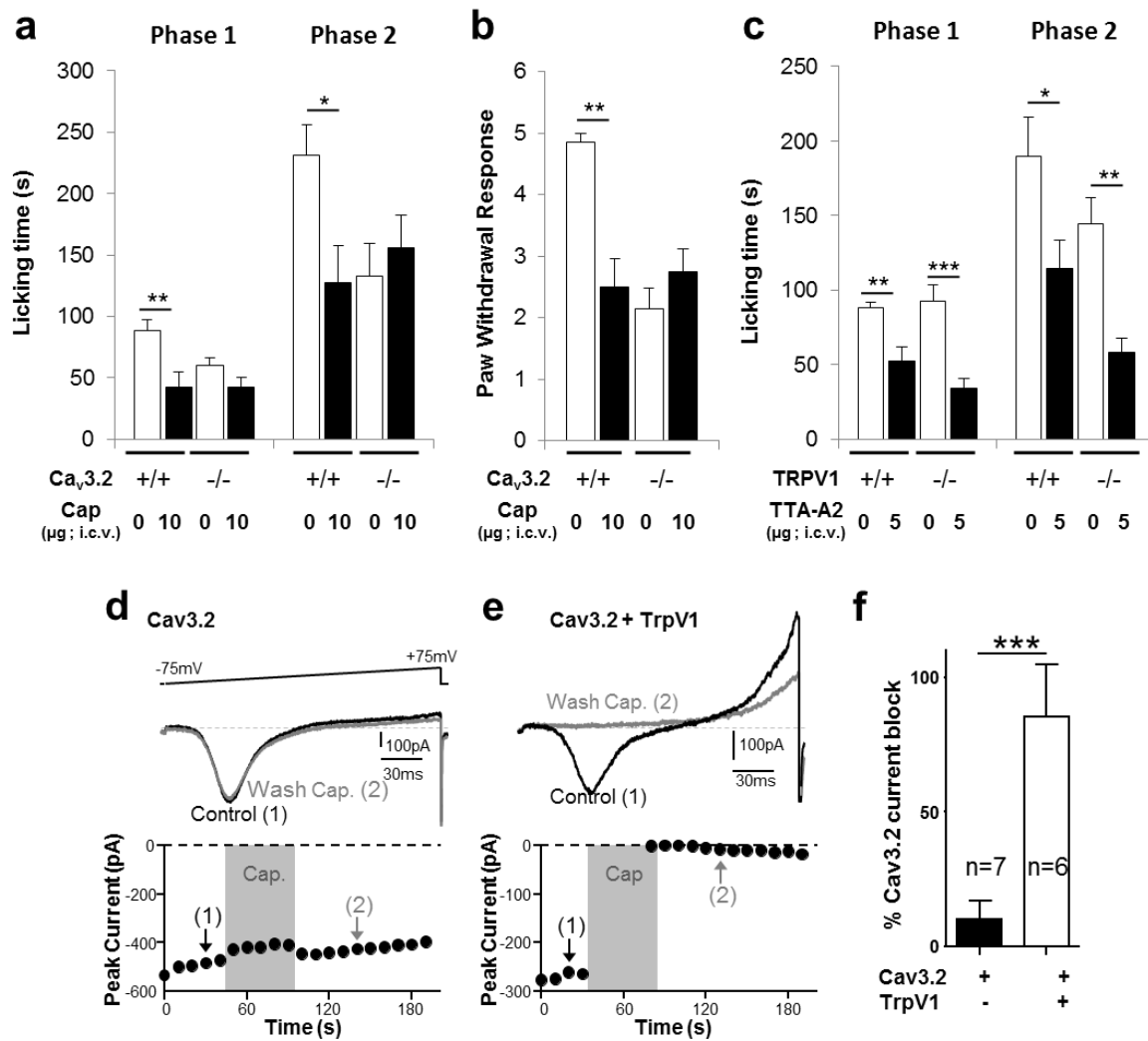
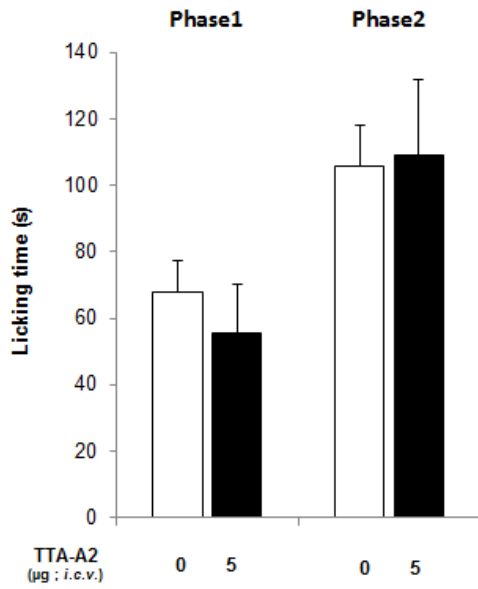
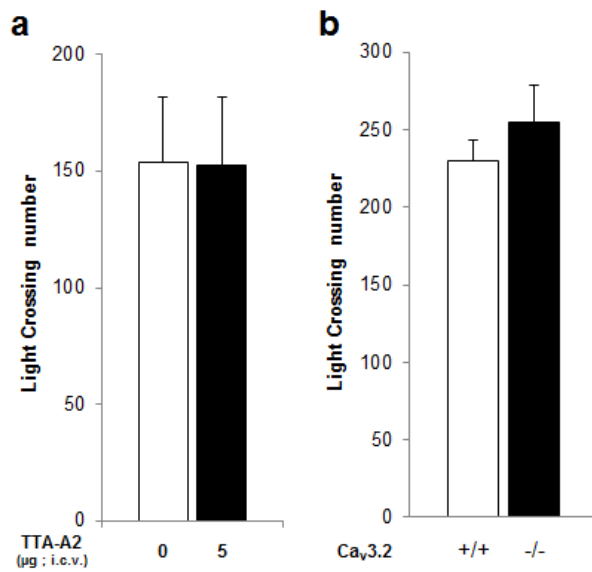


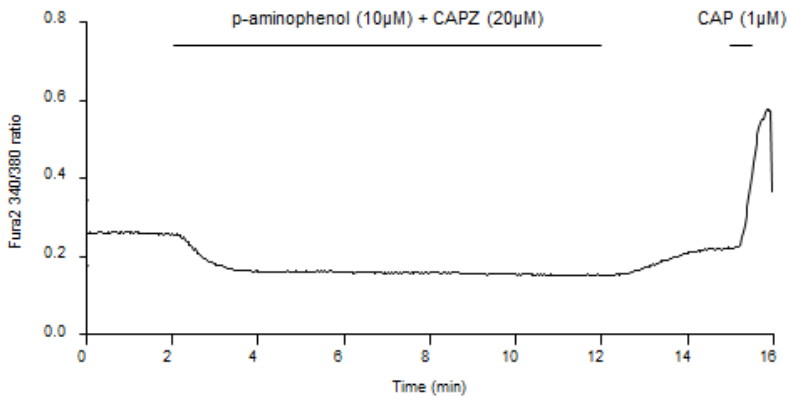
Figure-5
(ESCHALIER)



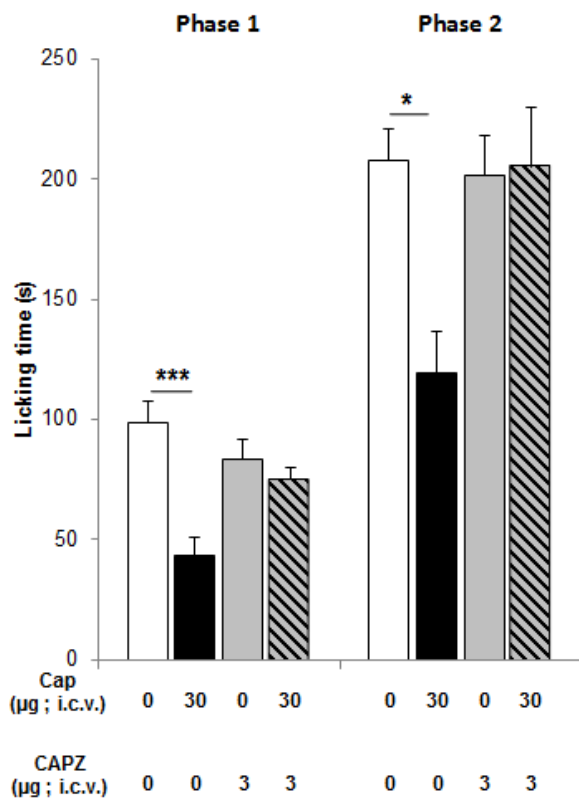
Supplementary informations

Supplementary Figure-S1
(ESCHALIER)Supplementary Figure-S2
(ESCHALIER)

Supplementary Figure-S3 (ESCHALIER)



Supplementary Figure-S4 (ESCHALIER)



Supplementary Figure-S5 (ESCHALIER)

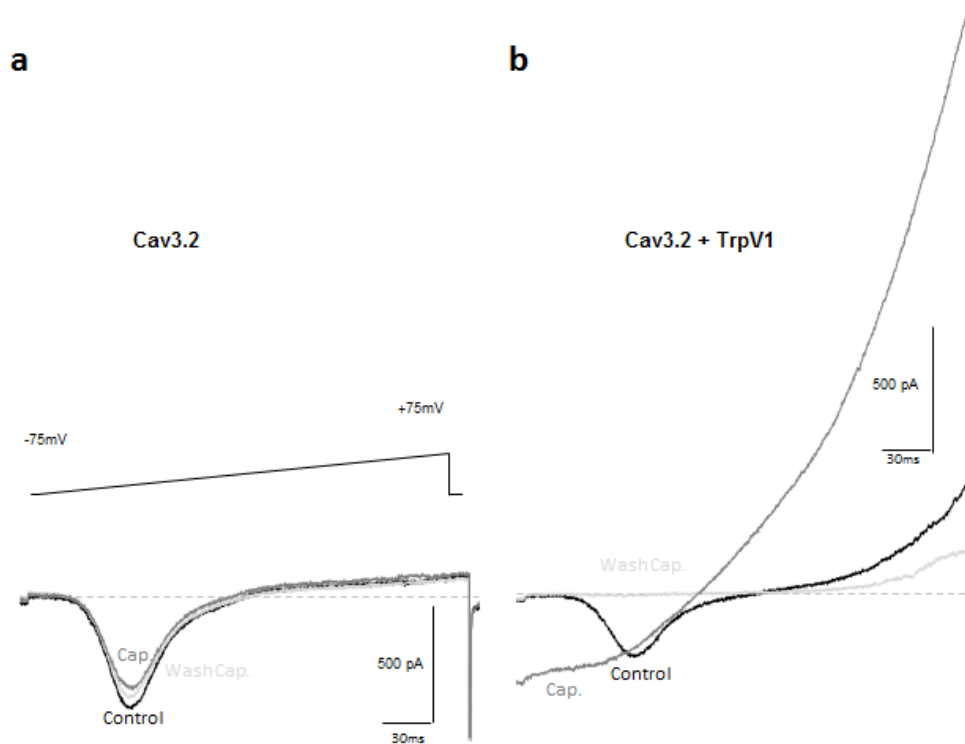


Figure S1 | Cav3.2 blocks by TTA-A2 or in Cav3.2^{-/-} mice do not display a sedative effect. To verify the potential sedative effect of the supraspinal administration of TTA-A2 or of the Cav3.2 knock-out, an actimetry test was performed (a) in mice receiving TTA-A2 and (b) in Cav3.2^{-/-} mice. In both cases, block of Cav3.2 channels does not induce a sedative effect. Data is presented as mean SEM (n = 6–8).

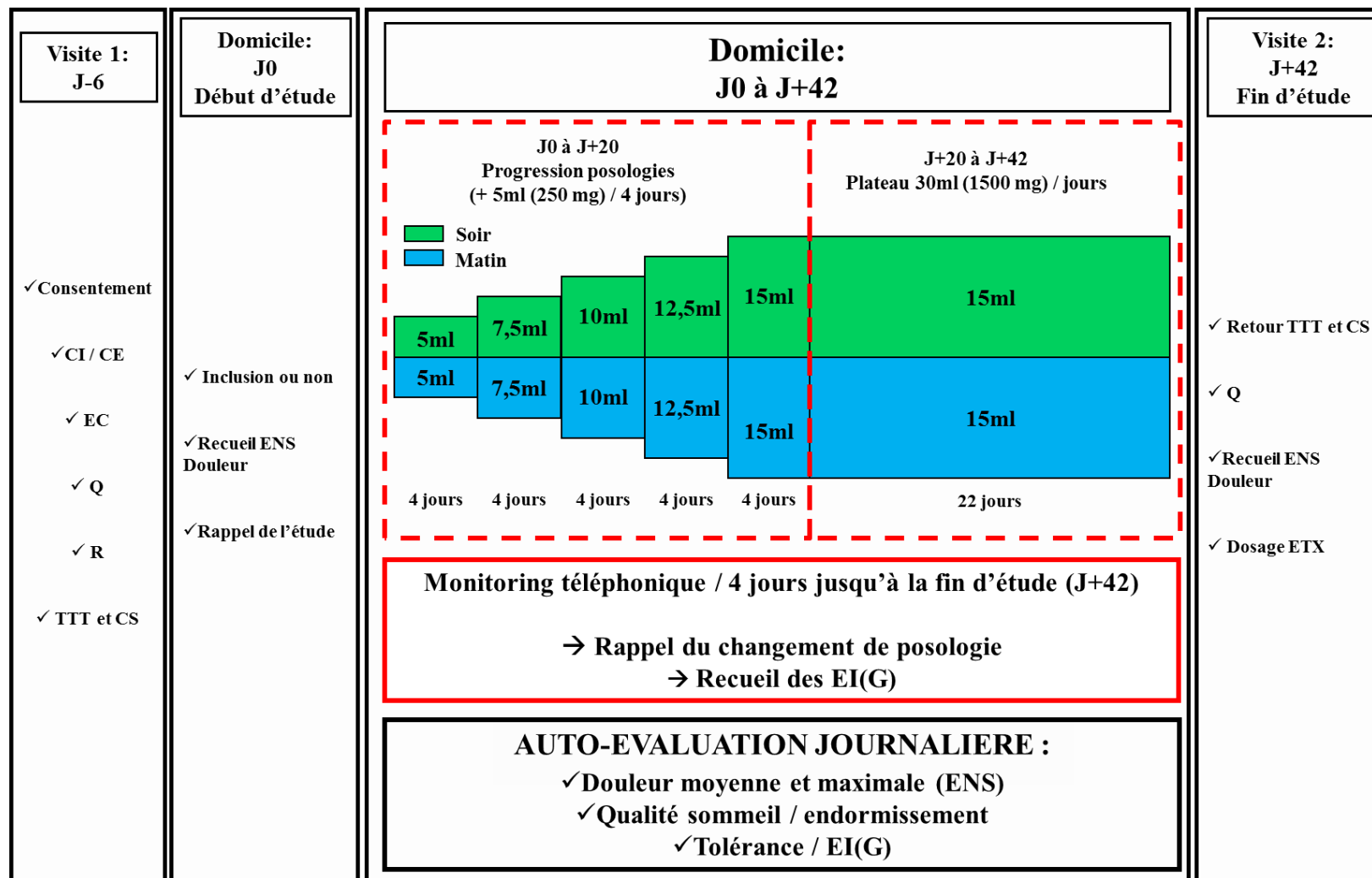
Figure S2 | Supraspinal TTA-A2-induced analgesia acts specifically throughout Cav3.2 channels. To verify the specificity of TTA-A2 to the Cav3.2 channels, the formalin test was performed in Cav3.2^{-/-} mice with or without injection of TTA-A2 (5 µg/2 µl i.c.v.). Consistent with our previous results¹⁹, TTA-A2 does not display an analgesic action in Cav3.2^{-/-} mice. Data is presented as mean SEM (n = 6–8).

Figure S3 | Intracellular calcium influx induced by p-aminophenol is TRPV1 dependent. To verify the specificity of action of the metabolites of p-aminophenol in TRPV1 receptor, calcium imaging in HEK293 cells expressing TRPV1 was performed with p-aminophenol (10 µM) and capsazepin (20 µM). TRPV1 activation by the metabolites of p-aminophenol is inhibited in the presence of capsazepin.

Figure S4 | Supraspinal Capsaicin-induced analgesia is TRPV1 dependent. To verify the specificity of capsaicin to TRPV1 in brain, the formalin test was performed in mice receiving capsaicin (30 µg/2 µl i.c.v.) with or without capsazepin (3 µg/2 µl i.c.v.). Specific block of TRPV1 by capsazepin inhibits capsaicin-induced analgesia. Data is presented as mean SEM (n = 6–8). *, P < 0.05; ***, P < 0.001 compared to vehicle group.

Figure S5 | Capsaicin evokes TRPV1 mediated currents only in cells transfected with TRPV1. (a) Representative current traces evoked by 200 ms depolarization ramps from -75mV to +75mV, under control conditions (control trace) and during application of 1 μ M capsaicin (Cap. trace) and in the washout of 1 μ M capsaicin (Wash Cap. trace) on a typical HEK cell expressing Cav3.2 alone (same cell as in figure 5d). (b) Identical representation for a typical HEK cell expressing Cav3.2 and TRPV1 (same cell as in figure 5e). Note that capsaicin evokes a typical current-voltage relation with inward currents below zero mV and large outward currents at positive potentials.

ANNEXE 2 : SCHEMA DE L'ETUDE CLINIQUE EDONOT



CI/ CE: critères d'inclusion/exclusion; EC: examen clinique; Q: questionnaires; R: randomisation; TTT: traitement; CS: carnet de suivi; ETX: éthosuximide

ANNEXE 3 : TABLEAU DES EVALUATIONS POUR UN SUJET

Visites	Visite d'information	Inclusion	Période de traitement	Visite de fin d'étude
Jour	J-6	J0	J0 à J+42	J+42
Lieu	Centres	Ambulatoire	Ambulatoire	Centres
Signature formulaire de consentement	+			
Examen clinique	+			
Remplissage des questionnaires : - Leeds, SF12, QEDN, QCD	+			+
Remise des traitement pour 42 jours Ethosuximide ou sirop homéopathique	+*			
Remise du cahier de suivi journalier de la Douleur, du sommeil et de la prise d'antalgique	+			
Vérification critères inclusion et exclusion	+	+		
Moyenne intensité douloureuse durant les 7 derniers jours (ENS): Critère d'évaluation principal		+		+
Contact téléphonique – recueil EI(G)	+**		+**	+**
Cotation journalière de la douleur (ENS), qualité de sommeil / endormissement et EI(G)			+	
Retour du produit à l'essai utilisé et/ou non utilisé				+
Retour du cahier de suivi journalier				+
Recueil des EI(G) et des traitements concomitants				+
Prélèvement sanguin	+			+

*Administration des produits à l'étude :

Ethosuximide : 500 mg/jour en 4 jours; 750 mg/jour en 4 jours ; 1000 mg/jour en 4 jours ; 1250 mg/jour en 4 jours et 1500 mg/jour en 4 jours puis durant 22 jours.

Sirop homéopathique : Même posologie que l'Ethosuximide.

** Contacts téléphoniques tous les 4 jours (à chaque augmentation de dose) à partir de J0 (inclus) idem pour le recueil d'effets indésirables survenus



ANNEXE 4 : CARNET DE SUIVI

exemple: **Date** __/__/__ (Jour 0) **Code sujet:**
10 ml de sirop (5 ml le matin, 5 ml le soir durant les repas)

SOMMEIL / ENDORMISSEMENT
(au matin)



Qualité du sommeil:

Indiquez si vous avez bien ou mal dormi, en entourant un chiffre, à l'aide de l'échelle numérique allant de « 0 » pour une qualité de sommeil très mauvaise à « 10 » pour une qualité de sommeil excellente.

 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 
 Très mauvais Excellent

Qualité d'endormissement:



Indiquez si vous vous êtes endormi facilement ou difficilement, en entourant un chiffre, à l'aide de l'échelle numérique allant de « 0 » pour une qualité d'endormissement très mauvaise à « 10 » pour une qualité d'endormissement excellente.

 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 
 Très mauvais Excellent

DOULEUR
(au soir)



Douleur moyenne ressentie dans la journée:

Indiquez votre douleur moyenne ressentie tout au long de la journée en entourant un chiffre sur l'échelle numérique allant de « 0 » pour une douleur inexistante à « 10 » pour une douleur insupportable.

 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 
 Douleur Inexistante Douleur Insupportable

Douleur maximale ressentie dans la journée:

Indiquez votre douleur maximale ressentie dans la journée en entourant un chiffre sur l'échelle numérique allant de « 0 » pour une douleur inexistante à « 10 » pour une douleur insupportable.

 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 
 Douleur Inexistante Douleur Insupportable

Effets indésirables: _____

Autres commentaires (oubli du traitement, traitements supplémentaires...): _____

ANNEXES 5 : ABREVIATIONS

2-AG : 2-ArachidonoylGlycerol	NAGly : N-ArachydonoylGlycine
5,7-DHT : 5,7-DiHydroxyTryptamine	NAPE-PLD : N-Acyl PhosphatidylEthanolamine-spécifique Phospholipase D
5-HT : 5-HydroxyTriptamine (sérotonine)	NAPQL : N-Acetyl-P-BenzoQuinone Imine
AArG : 1-Acyl-2-ArachidonoylGlycérol	NArPE : N-arachidonoylPhosphatidylEthanolamine
ABHD4 : α, β -Hydrolase 4	Nav : canaux sodiques
ACEA : Arachidonyl-2'-ChloroEthylAmide, CB1 activateur	NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens	p.o. : per os
AM251 : CB1 inhibiteur	P2X : Purinergic receptor 2X
AM404 : N-arachidonoylaminophenol	p38 : protein 38
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	PA : Potentiel d'Action
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	PAG : PeriAqueductal Gray
AMT : Anandamide Membrane Transporter	PCPA : Para-ChloroPhenylAlanine
ARC : Assistant en Recherche Clinique	PF-04457845 : FAAH inhibiteur
ASIC : Acid Sensing Ionic Channel	PGE2 : ProstaGlandine E2
BHE : Barrière Hématoc Encéphalique	PGs : Prostaglandines
Cav : canaux calciques	PLCβ : PhosphoLipase C β
CB1/2 : Récepteurs aux cannabinoïdes 1 et 2	PMSE : PhenylMethaneSulfonylFluoride, FAAH inhibiteur
CCI : Chronic Constriction Injury	PPARγ et α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ et α
CETD : Centre d'Etude et de Traitement de la Douleur	PPSE : Potentiel PostSynaptique Excitateur
CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide	PPSI : Potentiel PostSynaptique Inhibiteur
CIC : Centre d'Investigation Clinique	PTPN22 : Protéine Tyrosine Phosphatase N22
COX : CycloOXYgénase	QCD : Questionnaire Concis Douleur
DAGLα / β : DiAcylGlycérol Lipase α / β	QEDN : Questionnaire Evaluant les Douleurs Neuropathiques
DRGs : Dorsal Root Ganglions	RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
EDONOT : Ethosuximide et DOuleur Neuropathique d'Origine Traumatique	RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
El(G) : Evénements Indésirables (Graves)	RT-Q-PCR : Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
ENS : Echelle Numérique Simple	RTX : ResiniferaToXin
ERK1 et 2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2	RVM : Rostro Ventral Medulla
FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase	SB705498 : TRPV1 inhibiteur
FAPs : Fibres Afférentes Primaires	SN / SNC : Système Nerveux / Système Nerveux Central
FDA : Food and Drug Administration	SNARE : Soluble NSF Attachment Protein REceptor
FR122047 : COX-1 inhibiteur	SNI : Sciatic Nerve Injury
GABA : Gamma-AminoButyric Acid	SNL : Sciatic Nerve Ligature
GDE1 : Glycérophospho-DiEstérase 1	SR141716A : Rimonabant, CB1 inhibiteur
GPR55 : G Protein-coupled Receptor 55	TBX2 : ThromBoXane 2
HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide	Tmax : Temps maximal d'effet
HEK : Human Embryonic Kidney	TRP : Transient Receptor Potential
HVA : High Voltage Activated	TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrin
i.c.v. : intracérébroventriculaire	TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1
i.p. : intrapéritonéale	TRPM : Transient Receptor Potential Melastatin
i.v. : intraveineuse	TRPML : Transient Receptor Potential MucoLipin
IASP : International Association for the Study of Pain	TRPP : Transient Receptor Potential Polycystin
IBS : Irritable Bowel Syndrom	TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloïde
JNK : c-Jun N-terminal Kinases	TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloïde 1
JZL184 : MAGL inhibiteur	TTAs : T Type Antagonist
KO : Knock-Out	TTX : TétrodoToXine
Kv : canaux potassiques	URB597 : FAAH inhibiteur
LPS : LipoPolySaccharide	URB602 : MAGL inhibiteur
LTM : Long Term Memory	WAY100635 : 5-HT1A inhibiteur
LVA : Low Voltage Activated	WIN55,212-2 : CB1 activateur
lysoPLD : LysoPhosphoLipase-D	WOMAC : Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index
MAGL : MonoAcylGlycerol Lipase	WT : Wild Type
MAPK : Mitogen- Activated Protein Kinases	$\Delta 9$-THC : $\Delta 9$ -TétraHydroCannabinol
ME : Moelle Epinière	
MOS-SF12 : Medical Outcome Study Short Form12	
NADA : N-ArachidonoylDopAmine	
NAEA : N-ArachydonoylEthanolAmine	

REFERENCES

XII. REFERENCES

1. Burgess, G. & Williams, D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J. Clin. Invest.* **120**, 3753–3759 (2010).
2. Fournier, J. [Alcaloids discovery, markers for the history of organic chemistry]. *Rev. Hist. Pharm.* **49**, 315–332 (2001).
3. Morse, H. N. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **11**, 232–233 (1878).
4. Prescott, L. F. Analgesic nephropathy: a reassessment of the role of phenacetin and other analgesics. *Drugs* **23**, 75–149 (1982).
5. BRODIE, B. B. & AXELROD, J. The fate of acetanilide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **94**, 29–38 (1948).
6. Clissold, S. P. Paracetamol and phenacetin. *Drugs* **32 Suppl 4**, 46–59 (1986).
7. Oscier, C. D. & Milner, Q. J. W. Peri-operative use of paracetamol. *Anaesthesia* **64**, 65–72 (2009).
8. Bradley, N. Naming of drugs. BMJ should use ‘paracetamol’ instead of ‘acetaminophen’ in its index. *BMJ* **313**, 689 (1996).
9. Tanne, J. Paracetamol causes most liver failure in UK and US. *BMJ* **332**, 628–0 (2006).
10. Bernal, W. *et al.* Outcome after wait-listing for emergency liver transplantation in acute liver failure: a single centre experience. *J. Hepatol.* **50**, 306–313 (2009).
11. Larson, A. M. *et al.* Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatol. Baltim. Md* **42**, 1364–1372 (2005).
12. Rowden, A. K., Norvell, J., Eldridge, D. L. & Kirk, M. A. Updates on acetaminophen toxicity. *Med. Clin. North Am.* **89**, 1145–1159 (2005).
13. Larson, A. M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin. Liver Dis.* **11**, 525–548, vi (2007).
14. Nguyen, G. C., Sam, J. & Thuluvath, P. J. Hepatitis C is a predictor of acute liver injury among hospitalizations for acetaminophen overdose in the United States: a nationwide analysis. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 1336–1341 (2008).
15. Villa, A., Cochet, A. & Guyodo, G. [Poison episodes reported to French poison control centers in 2006]. *Rev. Prat.* **58**, 825–831 (2008).
16. Adnet, F., Atout, S., Galinski, M. & Lapostolle, F. Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France = Changing pattern of dmg poisonings in France. *Réanimation* **14**, 721–726 (2005).
17. Bannwarth, B. *et al.* Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous dose of propacetamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **34**, 79–81 (1992).
18. Depré, M. *et al.* Tolerance and pharmacokinetics of propacetamol, a paracetamol formulation for intravenous use. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **6**, 259–262 (1992).
19. Grattan, T. *et al.* A five way crossover human volunteer study to compare the pharmacokinetics of paracetamol following oral administration of two commercially available paracetamol tablets and three development tablets containing paracetamol in combination with sodium bicarbonate or calcium carbonate. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **49**, 225–229 (2000).
20. Rygnestad, T., Zahlsen, K. & Samdal, F. A. Absorption of effervescent paracetamol tablets relative to ordinary paracetamol tablets in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 141–143 (2000).
21. Bannwarth, B. & Péhourcq, F. [Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues]. *Drugs* **63 Spec No 2**, 5–13 (2003).

22. Rawlins, M. D., Henderson, D. B. & Hijab, A. R. Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **11**, 283–286 (1977).
23. Davis, M., Labadarios, D. & Williams, R. S. Metabolism of paracetamol after therapeutic and hepatotoxic doses in man. *J. Int. Med. Res.* **4**, 40–45 (1976).
24. Steventon, G. B., Mitchell, S. C. & Waring, R. H. Human metabolism of paracetamol (acetaminophen) at different dose levels. *Drug Metabol. Drug Interact.* **13**, 111–117 (1996).
25. Corcoran, G. B., Mitchell, J. R., Vaishnav, Y. N. & Horning, E. C. Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol. Pharmacol.* **18**, 536–542 (1980).
26. Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y. & Nelson, S. D. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1327–1331 (1984).
27. Bessems, J. G. & Vermeulen, N. P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* **31**, 55–138 (2001).
28. Raucy, J. L., Lasker, J. M., Lieber, C. S. & Black, M. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 270–283 (1989).
29. Patten, C. J. *et al.* Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 511–518 (1993).
30. Högestätt, E. D. *et al.* Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **280**, 31405–31412 (2005).
31. Dart, R. C. & Bailey, E. Does therapeutic use of acetaminophen cause acute liver failure? *Pharmacotherapy* **27**, 1219–1230 (2007).
32. Rumack, B. H. & Matthew, H. Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics* **55**, 871–876 (1975).
33. Gemborys, M. W., Mudge, G. H. & Gribble, G. W. Mechanism of decomposition of N-hydroxyacetaminophen, a postulated toxic metabolite of acetaminophen. *J. Med. Chem.* **23**, 304–308 (1980).
34. Prescott, L. F. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs* **25**, 290–314 (1983).
35. Linden, C. H. & Rumack, B. H. Acetaminophen overdose. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **2**, 103–119 (1984).
36. Prescott, L. F. Paracetamol, alcohol and the liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**, 291–301 (2000).
37. Rumack, B. H. Acetaminophen hepatotoxicity: the first 35 years. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **40**, 3–20 (2002).
38. Hinson, J. A., Reid, A. B., McCullough, S. S. & James, L. P. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metab. Rev.* **36**, 805–822 (2004).
39. Vale, J. A. & Proudfoot, A. T. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* **346**, 547–552 (1995).
40. Benson, G. D. Acetaminophen in chronic liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **33**, 95–101 (1983).
41. Rexrode, K. M. *et al.* Analgesic use and renal function in men. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **286**, 315–321 (2001).
42. Benson, G. D., Koff, R. S. & Tolman, K. G. The therapeutic use of acetaminophen in patients with liver disease. *Am. J. Ther.* **12**, 133–141 (2005).
43. Wrights, N. & Prescott, L. F. Potentiation by previous drug therapy of hepatotoxicity following paracetamol

- overdosage. *Scott. Med. J.* **18**, 56–58 (1973).
44. McClain, C. J., Kromhout, J. P., Peterson, F. J. & Holtzman, J. L. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by alcohol. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **244**, 251–253 (1980).
45. Wootton, F. T. & Lee, W. M. Acetaminophen hepatotoxicity in the alcoholic. *South. Med. J.* **83**, 1047–1049 (1990).
46. Collins, C. & Starmer, G. A. A review of the hepatotoxicity of paracetamol at therapeutic or near-therapeutic dose levels, with particular reference to alcohol abusers. *Drug Alcohol Rev.* **14**, 63–79 (1995).
47. Schueler, L. & Harper, J. L. Acetaminophen toxicity: report of case and review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **53**, 1208–1212 (1995).
48. Zimmerman, H. J. & Maddrey, W. C. Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatol. Baltim. Md* **22**, 767–773 (1995).
49. Prescott, L. F. & Critchley, J. A. Drug interactions affecting analgesic toxicity. *Am. J. Med.* **75**, 113–116 (1983).
50. Lauterburg, B. H. & Velez, M. E. Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut* **29**, 1153–1157 (1988).
51. Kenny, J. F., Pollack, M., Rothman, R., Flynn, M. & Ortiz, M. T. Routine screening for acetaminophen (APAP) toxicity of patients requesting alcohol detoxification. *J. Stud. Alcohol* **60**, 139–140 (1999).
52. Kuffner, E. K. *et al.* Effect of maximal daily doses of acetaminophen on the liver of alcoholic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Intern. Med.* **161**, 2247–2252 (2001).
53. Blantz, R. C. Acetaminophen: acute and chronic effects on renal function. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **28**, S3–6 (1996).
54. Graham, G. G., Graham, R. I. & Day, R. O. Comparative analgesia, cardiovascular and renal effects of celecoxib, rofecoxib and acetaminophen (paracetamol). *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1063–1075 (2002).
55. Kleinman, J. G., Breitenfeld, R. V. & Roth, D. A. Acute renal failure associated with acetaminophen ingestion: report of a case and review of the literature. *Clin. Nephrol.* **14**, 201–205 (1980).
56. Cobden, I., Record, C. O., Ward, M. K. & Kerr, D. N. Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* **284**, 21–22 (1982).
57. Carpenter, H. & Mudge, G. Acetaminophen nephrotoxicity: studies on renal acetylation and deacetylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 161–7 (1981).
58. Newton, J. F., Pasino, D. A. & Hook, J. B. Acetaminophen nephrotoxicity in the rat: quantitation of renal metabolic activation in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**, 39–46 (1985).
59. Emeigh Hart, S. G. *et al.* Evidence against deacetylation and for cytochrome P450-mediated activation in acetaminophen-induced nephrotoxicity in the CD-1 mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**, 1–15 (1991).
60. Mugford, C. A. & Tarloff, J. B. The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* **93**, 15–22 (1997).
61. Mitchell, J. R. *et al.* Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 185–194 (1973).
62. Bernheim, F. & Bernheim, M. L. THE ACTION OF P-AMINOPHENOL ON TISSUE OXIDATIONS. *Science* **86**, 197 (1937).
63. Newton, J. F., Kuo, C. H., Gemborys, M. W., Mudge, G. H. & Hook, J. B. Nephrotoxicity of p-aminophenol, a

- metabolite of acetaminophen, in the fischer 344 rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **65**, 336–344 (1982).
64. Sandler, D. P. *et al.* Analgesic use and chronic renal disease. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1238–1243 (1989).
65. Perneger, T. V., Whelton, P. K. & Klag, M. J. Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin, and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1675–1679 (1994).
66. Fored, C. M. *et al.* Acetaminophen, aspirin, and chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1801–1808 (2001).
67. García Rodríguez, L. A. & Hernández-Díaz, S. Relative risk of upper gastrointestinal complications among users of acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Epidemiol. Camb. Mass* **12**, 570–576 (2001).
68. Rahme, E., Pettitt, D. & LeLorier, J. Determinants and sequelae associated with utilization of acetaminophen versus traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs in an elderly population. *Arthritis Rheum.* **46**, 3046–3054 (2002).
69. Chichmanian, R. M., Taillan, B., Fuzibet, J. G., Vinti, H. & Dujardin, P. [Agranulocytosis caused by paracetamol: a case, with positive readministration]. *Ann. Médecine Interne* **140**, 332–333 (1989).
70. Bougie, D. & Aster, R. Immune thrombocytopenia resulting from sensitivity to metabolites of naproxen and acetaminophen. *Blood* **97**, 3846–3850 (2001).
71. Pernerstorfer, T. *et al.* Acetaminophen has greater antipyretic efficacy than aspirin in endotoxemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 51–57 (1999).
72. Temple, A. R. Pediatric dosing of acetaminophen. *Pediatr. Pharmacol. New York N* **3**, 321–327 (1983).
73. Walson, P. D., Galletta, G., Braden, N. J. & Alexander, L. Ibuprofen, acetaminophen, and placebo treatment of febrile children. *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 9–17 (1989).
74. Walson, P. D. *et al.* Comparison of multidose ibuprofen and acetaminophen therapy in febrile children. *Am. J. Dis. Child. 1960* **146**, 626–632 (1992).
75. Aronoff, D. M. & Neilson, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. *Am. J. Med.* **111**, 304–315 (2001).
76. Dey, P. K., Feldberg, W., Gupta, K. P., Milton, A. S. & Wendlandt, S. Further studies on the role of prostaglandin in fever. *J. Physiol.* **241**, 629–646 (1974).
77. Li, S. *et al.* Acetaminophen: antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. *Prostaglandins Other Lipid Mediat. Prostaglandins & other lipid mediators*, 89–99 (2008).
78. Feldberg, W., Gupta, K. P., Milton, A. S. & Wendlandt, S. Effect of bacterial pyrogen and antipyretics on prostaglandin activity in cerebrospinal fluid of unanaesthetized cats. *Br. J. Pharmacol.* **46**, 550P–551P (1972).
79. Ayoub, S. *et al.* Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11165–9 (2004).
80. Van Tittelboom, T. & Govaerts-Lepicard, M. Hypothermia: an unusual side effect of paracetamol. *Vet. Hum. Toxicol.* **31**, 57–59 (1989).
81. Fraga, D., Zanoni, C., Rae, G., Parada, C. & Souza, G. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. *Br. J. Pharmacol. British journal of pharmacology*, 1494–501 (2009).
82. Spooner, J. B. & Harvey, J. G. The history and usage of paracetamol. *J. Int. Med. Res.* **4**, 1–6 (1976).
83. Courade, J., Caussade, F., Martin, K. & Besse..., D. Effects of acetaminophen on monoaminergic systems in the rat

- central nervous system. (2001). doi:10.1007/s002100100484
84. Anderson, B. J., Holford, N. H., Woollard, G. A. & Chan, P. L. Paracetamol plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **46**, 237–243 (1998).
 85. De Lange, E. C., Danhof, M., de Boer, A. G. & Breimer, D. D. Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res.* **666**, 1–8 (1994).
 86. Kumpulainen, E. *et al.* Paracetamol (acetaminophen) penetrates readily into the cerebrospinal fluid of children after intravenous administration. *Pediatrics* **119**, 766–771 (2007).
 87. Pelissier, T., Alloui, A., Paeile, C. & Eschalièr, A. Evidence of a central antinociceptive effect of paracetamol involving spinal 5HT₃ receptors. *Neuroreport* **6**, 1546–1548 (1995).
 88. Hunskaar, S., Berge, O. G. & Hole, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav. Brain Res.* **21**, 101–108 (1986).
 89. Miranda, H. F., Lopez, J., Sierralta, F., Correa, A. & Pinardi, G. NSAID antinociception measured in a chemical and a thermal assay in mice. *Pain Res. Manag. J. Can. Pain Soc. J. Société Can. Pour Trait. Douleur* **6**, 190–196 (2001).
 90. Bonnefont, J., Chapuy, E., Clottes, E., Alloui, A. & Eschalièr, A. Spinal 5-HT_{1A} receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of paracetamol, venlafaxine and 5-HT. *Pain Pain*, 482–90 (2005).
 91. Piletta, P., Porchet, H. C. & Dayer, P. [Central analgesic effect of paracetamol]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **120**, 1950–1951 (1990).
 92. Piletta, P., Porchet, H. C. & Dayer, P. Central analgesic effect of acetaminophen but not of aspirin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **49**, 350–354 (1991).
 93. Björkman, R., Hallman, K. M., Hedner, J., Hedner, T. & Henning, M. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain* **57**, 259–264 (1994).
 94. Hunskaar, S., Fasmer, O. B. & Hole, K. Acetylsalicylic acid, paracetamol and morphine inhibit behavioral responses to intrathecally administered substance P or capsaicin. *Life Sci.* **37**, 1835–1841 (1985).
 95. Tjølsen, A., Lund, A. & Hole, K. Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* **193**, 193–201 (1991).
 96. Pickering, G. *et al.* Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin. Pharmacol. Ther. Clinical pharmacology and therapeutics*, 371–8 (2006).
 97. Pickering, G., Estève, V., Lorient, M.-A., Eschalièr, A. & Dubray, C. Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin. Pharmacol. Ther. Clinical pharmacology and therapeutics*, 47–51 (2008).
 98. Liu, J., Reid, A. R. & Sawynok, J. Antinociception by systemically-administered acetaminophen (paracetamol) involves spinal serotonin 5-HT₇ and adenosine A₁ receptors, as well as peripheral adenosine A₁ receptors. *Neurosci. Lett.* (2013). doi:10.1016/j.neulet.2012.12.052
 99. Dogrul, A. *et al.* Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **677**, 93–101 (2012).
 100. Mallet, C. *et al.* TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS ONE* **5**, (2010).
 101. Andersson, D. *et al.* TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Δ(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat.*

- Commun. Nature communications*, 551 (2011).
102. Sawynok, J. & Reid, A. R. Caffeine inhibits antinociception by acetaminophen in the formalin test by inhibiting spinal adenosine A₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 248–254 (2012).
103. Bonnefont, J., Alloui, A., Chapuy, E., Clottes, E. & Eschalier, A. Orally administered paracetamol does not act locally in the rat formalin test: evidence for a supraspinal, serotonin-dependent antinociceptive mechanism. *Anesthesiology* **99**, 976–981 (2003).
104. Abbott, F. V. & Hellemans, K. G. Phenacetin, acetaminophen and dipyrrone: analgesic and rewarding effects. *Behav. Brain Res.* **112**, 177–186 (2000).
105. Ahn, D. K. *et al.* Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects on inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. *Pain* **132**, 23–32 (2007).
106. Rezende, R. *et al.* Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyrrone in a rat model of inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol. British journal of pharmacology*, 760–8 (2008).
107. Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B. & Correa, F. M. Blockade of central and peripheral generation of prostaglandins explains the antialgic effect of aspirin like drugs. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **30**, 133–140 (1978).
108. Dani, M., Guindon, J., Lambert, C. & Beaulieu, P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*, 214–5 (2007).
109. Moore, U. J., Seymour, R. A. & Rawlins, M. D. The efficacy of locally applied aspirin and acetaminophen in postoperative pain after third molar surgery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **52**, 292–296 (1992).
110. Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A. & Scott, K. F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* (2013). doi:10.1007/s10787-013-0172-x
111. Prescott, L. F. Paracetamol: past, present, and future. *Am. J. Ther.* **7**, 143–147 (2000).
112. Zhang, W., Jones, A. & Doherty, M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 901–907 (2004).
113. Wegman, A., van der Windt, D., van Tulder, M., Stalman, W. & de Vries, T. Nonsteroidal antiinflammatory drugs or acetaminophen for osteoarthritis of the hip or knee? A systematic review of evidence and guidelines. *J. Rheumatol.* **31**, 344–354 (2004).
114. Israel, F. J., Parker, G., Charles, M. & Reymond, L. Lack of benefit from paracetamol (acetaminophen) for palliative cancer patients requiring high-dose strong opioids: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Pain Symptom Manage.* **39**, 548–554 (2010).
115. Christo, P. J. & Mazloomdoost, D. Cancer pain and analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1138**, 278–298 (2008).
116. Fletcher, D., Benoist, J. M., Gautron, M. & Guilbaud, G. Isobolographic analysis of interactions between intravenous morphine, propacetamol, and diclofenac in carrageenin-injected rats. *Anesthesiology* **87**, 317–326 (1997).
117. Remy, C., Marret, E. & Bonnet, F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br. J. Anaesth.* **94**, 505–513 (2005).
118. Ali, M. & Khan, F. A. Comparison of analgesic effect of tramadol alone and a combination of tramadol and paracetamol in day-care laparoscopic

- surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* **26**, 475–479 (2009).
119. Hiller, A., Silvanto, M., Savolainen, S. & Tarkkila, P. Propacetamol and diclofenac alone and in combination for analgesia after elective tonsillectomy. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **48**, 1185–1189 (2004).
120. Brodner, G. *et al.* Efficacy of intravenous paracetamol compared to dipyron and parecoxib for postoperative pain management after minor-to-intermediate surgery: a randomised, double-blind trial. *Eur. J. Anaesthesiol.* **28**, 125–132 (2011).
121. Lee, C. *et al.* A comparison of the efficacy and safety of nonsteroidal antiinflammatory agents versus acetaminophen in the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* **51**, 746–754 (2004).
122. Daniels, S. E., Goulder, M. A., Aspley, S. & Reader, S. A randomised, five-parallel-group, placebo-controlled trial comparing the efficacy and tolerability of analgesic combinations including a novel single-tablet combination of ibuprofen/paracetamol for postoperative dental pain. *Pain* **152**, 632–642 (2011).
123. Chaparro, L. E., Wiffen, P. J., Moore, R. A. & Gilron, I. Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* **7**, CD008943 (2012).
124. Filitz, J. *et al.* Supra-additive effects of tramadol and acetaminophen in a human pain model. *Pain* **136**, 262–270 (2008).
125. Miranda, H. F., Noriega, V. & Prieto, J. C. Previous administration of naltrexone did not change synergism between paracetamol and tramadol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **102**, 72–76 (2012).
126. Capici, F. *et al.* Randomized controlled trial of duration of analgesia following intravenous or rectal acetaminophen after adenotonsillectomy in children. *Br. J. Anaesth.* **100**, 251–255 (2008).
127. Prior, M. J., Lavins, B. J. & Cooper, K. A randomized, placebo-controlled trial of acetaminophen extended release for treatment of post-marathon muscle soreness. *Clin. J. Pain* **28**, 204–210 (2012).
128. Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature. New Biol.* **231**, 232–235 (1971).
129. Flower, R. J. & Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* **240**, 410–411 (1972).
130. Hanel, A. M. & Lands, W. E. Modification of anti-inflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3307–3311 (1982).
131. Mallet, C. *et al.* Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain Pain*, 190–200 (2008).
132. Ouellet, M. & Percival, M. D. Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 273–280 (2001).
133. Schildknecht, S., Daiber, A., Ghisla, S., Cohen, R. A. & Bachschmid, M. M. Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 215–224 (2008).
134. Bonnefont, J. *et al.* Acetaminophen recruits spinal p42/p44 MAPKs and GH/IGF-1 receptors to produce analgesia via the serotonergic system. *Mol. Pharmacol. Molecular pharmacology*, 407–15 (2007).
135. Libert, F. *et al.* Acetaminophen: a central analgesic drug that involves a spinal tropisetron-sensitive, non-5-HT(3) receptor-mediated effect. *Mol. Pharmacol.* **66**, 728–734 (2004).
136. Alloui, A. *et al.* Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an

- inflammatory pain model in rats. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*, 71–7 (2002).
137. Girard, P., Pansart, Y., Coppé, M.-C., Niedergang, B. & Gillardin, J.-M. Modulation of paracetamol and nefopam antinociception by serotonin 5-HT(3) receptor antagonists in mice. *Pharmacology* **83**, 243–246 (2009).
138. Sandrini, M., Pini, L. A. & Vitale, G. Differential involvement of central 5-HT1B and 5-HT3 receptor subtypes in the antinociceptive effect of paracetamol. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **52**, 347–352 (2003).
139. Hama, A. & Sagen, J. Cannabinoid receptor-mediated antinociception with acetaminophen drug combinations in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Neuropharmacology Neuropharmacology*, 758–66
140. Ottani, A., Leone, S., Sandrini, M., Ferrari, A. & Bertolini, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **531**, 280–281 (2006).
141. Zygmunt, P. M., Chuang, H., Movahed, P., Julius, D. & Högestätt, E. D. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **396**, 39–42 (2000).
142. De Petrocellis, L., Bisogno, T., Davis, J. B., Pertwee, R. G. & Di Marzo, V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.* **483**, 52–56 (2000).
143. Lee, K.-S., Huang, Y.-H. & Yen, C.-T. Periaqueductal gray stimulation suppresses spontaneous pain behavior in rats. *Neurosci. Lett.* **514**, 42–45 (2012).
144. Lee, B. H., Park, S. H., Won, R., Park, Y. G. & Sohn, J. H. Antiallodynic effects produced by stimulation of the periaqueductal gray matter in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **291**, 29–32 (2000).
145. Gray, B. G. & Dostrovsky, J. O. Descending inhibitory influences from periaqueductal gray, nucleus raphe magnus, and adjacent reticular formation. I. Effects on lumbar spinal cord nociceptive and nonnociceptive neurons. *J. Neurophysiol.* **49**, 932–947 (1983).
146. Lin, Q., Peng, Y. & Willis, W. D. Glycine and GABAA antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Res.* **654**, 286–302 (1994).
147. Gao, K., Kim, Y. H. & Mason, P. SEROTONERGIC pontomedullary neurons are not activated by antinociceptive stimulation in the periaqueductal gray. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 3285–3292 (1997).
148. Waters, A. J. & Lumb, B. M. Inhibitory effects evoked from both the lateral and ventrolateral periaqueductal grey are selective for the nociceptive responses of rat dorsal horn neurones. *Brain Res.* **752**, 239–249 (1997).
149. Odeh, F. & Antal, M. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1275–1286 (2001).
150. Lakos, S. & Basbaum, A. I. An ultrastructural study of the projections from the midbrain periaqueductal gray to spinally projecting, serotonin-immunoreactive neurons of the medullary nucleus raphe magnus in the rat. *Brain Res.* **443**, 383–388 (1988).
151. Reichling, D. B. & Basbaum, A. I. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J. Comp. Neurol.* **302**, 370–377 (1990).
152. Cameron, A. A., Khan, I. A., Westlund, K. N. & Willis, W. D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a *Phaseolus vulgaris*-

- leucoagglutinin study. II. Descending projections. *J. Comp. Neurol.* **351**, 585–601 (1995).
153. Bajic, D. & Proudfit, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *J. Comp. Neurol.* **405**, 359–379 (1999).
154. Basbaum, A. I. & Fields, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 309–338 (1984).
155. Jones, S. L. & Gebhart, G. F. Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha 2-adrenoceptors. *Brain Res.* **364**, 315–330 (1986).
156. el-Yassir, N. & Fleetwood-Walker, S. M. A 5-HT₁-type receptor mediates the antinociceptive effect of nucleus raphe magnus stimulation in the rat. *Brain Res.* **523**, 92–99 (1990).
157. Alhaider, A. A. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: involvement of supraspinal 5-HT₂ receptors in nociceptive transmission. *Brain Res.* **543**, 335–340 (1991).
158. Mason, P. Central mechanisms of pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 436–441 (1999).
159. Clark, F. M. & Proudfit, H. K. Projections of neurons in the ventromedial medulla to pontine catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *Brain Res.* **540**, 105–115 (1991).
160. Honoré, P., Buritova, J. & Besson, J. M. Aspirin and acetaminophen reduced both Fos expression in rat lumbar spinal cord and inflammatory signs produced by carrageenin inflammation. *Pain* **63**, 365–375 (1995).
161. Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S. & Hayaishi, O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* **251**, 2629–2636 (1976).
162. Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**, 33157–33160 (1996).
163. Marnett, L. J. & Kalgutkar, A. S. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 465–469 (1999).
164. Breder, C. D., Dewitt, D. & Kraig, R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **355**, 296–315 (1995).
165. Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A. & Worley, P. F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371–386 (1993).
166. Andreasson, K. I. *et al.* Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 8198–8209 (2001).
167. Robak, J., Wieckowski, A. & Gryglewski, R. The effect of 4-acetamidophenol on prostaglandin synthetase activity in bovine and ram seminal vesicle microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 393–396 (1978).
168. Harvison, P. J. *et al.* Acetaminophen and analogs as cosubstrates and inhibitors of prostaglandin H synthase. *Chem. Biol. Interact.* **64**, 251–266 (1988).
169. Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J. & Vane, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11693–11697 (1993).
170. Kis, B., Snipes, J., Simandle, S. & Busija, D. Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, R897–902 (2005).

171. Swierkosz, T. A. *et al.* Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **8**, BR496–503 (2002).
172. Boutaud, O., Aronoff, D. M., Richardson, J. H., Marnett, L. J. & Oates, J. A. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7130–7135 (2002).
173. Engström Ruud, L. *et al.* Acetaminophen reduces lipopolysaccharide-induced fever by inhibiting cyclooxygenase-2. *Neuropharmacology* **71**, 124–129 (2013).
174. Greco, A., Ajmone-Cat, M., Nicolini, A., Sciulli, M. & Minghetti, L. Paracetamol effectively reduces prostaglandin E2 synthesis in brain macrophages by inhibiting enzymatic activity of cyclooxygenase but not phospholipase and prostaglandin E synthase. *J. Neurosci. Res. Journal of neuroscience research*, 844–52 (2003).
175. Levine, L. Stimulated release of arachidonic acid from rat liver cells by celecoxib and indomethacin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **65**, 31–35 (2001).
176. Cushman, D. W. & Cheung, H. S. Effect of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **424**, 449–459 (1976).
177. Van Dyke, K., Sacks, M. & Qazi, N. A new screening method to detect water-soluble antioxidants: acetaminophen (Tylenol) and other phenols react as antioxidants and destroy peroxy-nitrite-based luminol-dependent chemiluminescence. *J. Biolumin. Chemilumin.* **13**, 339–348 (1998).
178. Nam, T.-G. *et al.* Pyridine and pyrimidine analogs of acetaminophen as inhibitors of lipid peroxidation and cyclooxygenase and lipoxygenase catalysis. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 5103–5112 (2009).
179. Ayoub, S. S., Joshi, A., Chol, M., Gilroy, D. W. & Seed, M. P. Inhibition of the diclofenac-induced cyclooxygenase-2 activity by paracetamol in cultured macrophages is not related to the intracellular lipid hydroperoxide tone. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **25**, 186–190 (2011).
180. Gühring, H. *et al.* A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*, 153–63 (2002).
181. Lucas, R., Warner, T. D., Vojnovic, I. & Mitchell, J. A. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 635–637 (2005).
182. Markey, C. M., Alward, A., Weller, P. E. & Marnett, L. J. Quantitative studies of hydroperoxide reduction by prostaglandin H synthase. Reducing substrate specificity and the relationship of peroxidase to cyclooxygenase activities. *J. Biol. Chem.* **262**, 6266–6279 (1987).
183. Van Dalen, C. J., Winterbourn, C. C., Senthilmohan, R. & Kettle, A. J. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* **275**, 11638–11644 (2000).
184. Kulmacz, R. J. & Wang, L. H. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **270**, 24019–24023 (1995).
185. Seegers, A. J., Jager, L. P., Zandberg, P. & van Noordwijk, J. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of non-narcotic analgesic drug mixtures in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* **251**, 237–254 (1981).
186. Lewis, A. J., Nelson, D. J. & Sugrue, M. F. On the ability of prostaglandin E1, and arachidonic acid to modulate experimentally induced oedema in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* **55**, 51–56 (1975).
187. Rainsford, K. D. & Whitehouse, M. W. Paracetamol [acetaminophen]-induced

- gastrotoxicity: revealed by induced hyperacidity in combination with acute or chronic inflammation. *Inflammopharmacology* **14**, 150–154 (2006).
188. Bianchi, M. & Panerai, A. E. The dose-related effects of paracetamol on hyperalgesia and nociception in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 130–132 (1996).
189. Boardman, P. L. & Hart, F. D. Clinical measurement of the anti-inflammatory effects of salicylates in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* **4**, 264–268 (1967).
190. Ring, E. F., Collins, A. J., Bacon, P. A. & Cosh, J. A. Quantitation of thermography in arthritis using multi-isothermal analysis. II. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on the thermographic index. *Ann. Rheum. Dis.* **33**, 353–356 (1974).
191. Crook, D., Collins, A. J., Bacon, P. A. & Chan, R. Prostaglandin synthetase activity from human rheumatoid synovial microsomes. Effect of 'aspirin-like' drug therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **35**, 327–332 (1976).
192. Robinson, D. R., McGuire, M. B., Bastian, D., Kantrowitz, F. & Levine, L. The effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin production by rheumatoid synovial tissue. *Prostaglandins Med.* **1**, 461–477 (1978).
193. Seppälä, E., Laitinen, O. & Vapaatalo, H. Comparative study on the effects of acetylsalicylic acid, indomethacin and paracetamol on metabolites of arachidonic acid in plasma, serum and urine in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **3**, 265–269 (1983).
194. Bippi, H. & Frölich, J. C. Effects of acetylsalicylic acid and paracetamol alone and in combination on prostanoid synthesis in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **29**, 305–310 (1990).
195. Skjelbred, P., Album, B. & Lokken, P. Acetylsalicylic acid vs paracetamol: effects on post-operative course. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **12**, 257–264 (1977).
196. Skjelbred, P. & Løkken, P. Paracetamol versus placebo: effects on post-operative course. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **15**, 27–33 (1979).
197. Skoglund, L. A., Eidsaunet, W. & Pettersen, N. The anti-oedematous efficacy of oxindanac equals that of paracetamol in acute postoperative inflammation; are weak cyclooxygenase inhibitors more effective than strong inhibitors? *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **9**, 371–375 (1989).
198. Bjørnsson, G. A., Haanaes, H. R. & Skoglund, L. A. Naproxen 500 mg bid versus acetaminophen 1000 mg qid: effect on swelling and other acute postoperative events after bilateral third molar surgery. *J. Clin. Pharmacol.* **43**, 849–858 (2003).
199. Bjørnsson, G. A., Haanaes, H. R. & Skoglund, L. A. A randomized, double-blind crossover trial of paracetamol 1000 mg four times daily vs ibuprofen 600 mg: effect on swelling and other postoperative events after third molar surgery. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 405–412 (2003).
200. Lyrtzis, C., Natsis, K., Papadopoulos, C., Noussios, G. & Papathanasiou, E. Efficacy of paracetamol versus diclofenac for Grade II ankle sprains. *Foot Ankle Int. Am. Orthop. Foot Ankle Soc. Swiss Foot Ankle Soc.* **32**, 571–575 (2011).
201. Grøn, K., Drvota, V. & Vesterqvist, O. Pronounced reduction of in vivo prostacyclin synthesis in humans by acetaminophen (paracetamol). *Prostaglandins* **37**, 311–315 (1989).
202. Lee, Y.-S. *et al.* Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation. *Pain* **129**, 279–286 (2007).
203. Hinz, B. & Brune, K. Antipyretic analgesics: nonsteroidal antiinflammatory drugs, selective COX-2 inhibitors, paracetamol and pyrazolinones. *Handb. Exp. Pharmacol. Handbook of experimental pharmacology*, 65–93 (2007).

204. Devane, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–1949 (1992).
205. Huang, S. M. *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8400–8405 (2002).
206. Huang, S. M. *et al.* Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J. Biol. Chem.* **276**, 42639–42644 (2001).
207. Janusz, J. M. *et al.* Vanilloids. 1. Analogs of capsaicin with antinociceptive and antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.* **36**, 2595–2604 (1993).
208. Melck, D. *et al.* Unsaturated long-chain N-acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): vanilloid receptor ligands that inhibit anandamide-facilitated transport and bind to CB1 cannabinoid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 275–284 (1999).
209. Haller, V. L., Cichewicz, D. L. & Welch, S. P. Non-cannabinoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **546**, 60–68 (2006).
210. Watson, S. J., Benson, J. A., Jr & Joy, J. E. Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 547–552 (2000).
211. Nerlich, A. G., Parsche, F., Wiest, I., Schramel, P. & Löhrs, U. Extensive pulmonary haemorrhage in an Egyptian mummy. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **427**, 423–429 (1995).
212. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647 (1964).
213. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
214. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).
215. Beltramo, M. *et al.* Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**, 1094–1097 (1997).
216. Giuffrida, A., Rodriguez de Fonseca, F., Nava, F., Loubet-Lescoulié, P. & Piomelli, D. Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404. *Eur. J. Pharmacol.* **408**, 161–168 (2000).
217. Szallasi, A. & Di Marzo, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* **23**, 491–497 (2000).
218. Fegley, D. *et al.* Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8756–8761 (2004).
219. Appendino, G. & Szallasi, A. Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. *Life Sci.* **60**, 681–696 (1997).
220. Hergenbahn, M., Kusumoto, S. & Hecker, E. Diterpene esters from ‘Euphorbium’ and their irritant and cocarcinogenic activity. *Experientia* **30**, 1438–1440 (1974).
221. Szolcsányi, J. & Jancsó-Gábor, A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung.* **25**, 1877–1881 (1975).
222. Szolcsányi, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* **73**, 251–259 (1977).
223. Martin, H. A., Basbaum, A. I., Kwiat, G. C., Goetzl, E. J. & Levine, J. D. 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).
224. Lamotte, R. H. Psychophysical and neurophysiological studies of chemically induced cutaneous pain and itch. The case of the missing nociceptor. *Prog. Brain Res.* **74**, 331–335 (1988).
225. Holzer, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **298**, 3–16 (1991).
226. Szallasi, A. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **629**, 1–68 (1995).
227. Szallasi, A. *et al.* Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.* **703**, 175–183 (1995).
228. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
229. Starowicz, K. *et al.* Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 13739–49 (2007).
230. Maione, S. *et al.* Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 969–82 (2006).
231. Walker, J., Huang, S., Strangman, N., Tsou, K. & Sañudo-Peña, M. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 12198–203 (1999).
232. Di Marzo, V. Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat. Neurosci.* **14**, 9–15 (2011).
233. De Novellis, V. *et al.* Type I and II metabotropic glutamate receptors modulate periaqueductal grey glycine release: interaction between mGlu2/3 and A1 adenosine receptors. *Neuropharmacology* **43**, 1061–1069 (2002).
234. Walker, J. M. & Huang, S. M. Endocannabinoids in pain modulation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**, 235–242 (2002).
235. Eide, P. K. & Hole, K. Different role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. *Neuropharmacology* **30**, 727–731 (1991).
236. Shyu, K. W., Lin, M. T. & Wu, T. C. Possible role of central serotonergic neurons in the development of dental pain and aspirin-induced analgesia in the monkey. *Exp. Neurol.* **84**, 179–187 (1984).
237. Pini, L. A., Sandrini, M. & Vitale, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **308**, 31–40 (1996).
238. Törk, I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **600**, 9–34; discussion 34–35 (1990).
239. Kwiat, G. C. & Basbaum, A. I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosens. Mot. Res.* **9**, 157–173 (1992).
240. Millan, M. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* **Progress in neurobiology**, 355–474 (2002).
241. Ruda, M. A. Spinal dorsal horn circuitry involved in the brain stem control of nociception. *Prog. Brain Res.* **77**, 129–140 (1988).

242. Barbaro, N. M., Hammond, D. L. & Fields, H. L. Effects of intrathecally administered methysergide and yohimbine on microstimulation-produced antinociception in the rat. *Brain Res.* **343**, 223–229 (1985).
243. Oliveras, J. L., Bourgoin, S., Hery, F., Besson, J. M. & Hamon, M. The topographical distribution of serotonergic terminals in the spinal cord of the cat: biochemical mapping by the combined use of microdissection and microassay procedures. *Brain Res.* **138**, 393–406 (1977).
244. Ruda, M. A., Bennett, G. J. & Dubner, R. Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Prog. Brain Res.* **66**, 219–268 (1986).
245. Zhuo, M. & Gebhart, G. F. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J. Neurophysiol.* **78**, 746–758 (1997).
246. Watkins, L. R. *et al.* Neurocircuitry of conditioned inhibition of analgesia: effects of amygdala, dorsal raphe, ventral medullary, and spinal cord lesions on antianalgesia in the rat. *Behav. Neurosci.* **112**, 360–378 (1998).
247. Wei, F., Ren, K. & Dubner, R. Inflammation-induced Fos protein expression in the rat spinal cord is enhanced following dorsolateral or ventrolateral funiculus lesions. *Brain Res.* **782**, 136–141 (1998).
248. Behbehani, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* **46**, 575–605 (1995).
249. Lima, D. & Almeida, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog. Neurobiol.* **66**, 81–108 (2002).
250. Reynolds, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* **164**, 444–445 (1969).
251. Mayer, D. J. Analgesia produced by electrical stimulation of the brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **8**, 557–564 (1984).
252. Young, R. F. & Brechner, T. Electrical stimulation of the brain for relief of intractable pain due to cancer. *Cancer* **57**, 1266–1272 (1986).
253. Li, Y. Q., Rao, Z. R. & Shi, J. W. Collateral projections from the midbrain periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus and nucleus accumbens in the rat. A fluorescent retrograde double-labelling study. *Neurosci. Lett.* **117**, 285–288 (1990).
254. Fields, H. L., Heinricher, M. M. & Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 219–245 (1991).
255. Fields, H. L., Basbaum, A. I., Clanton, C. H. & Anderson, S. D. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res.* **126**, 441–453 (1977).
256. Behbehani, M. M. & Fields, H. L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Res.* **170**, 85–93 (1979).
257. Gebhart, G. F., Sandkühler, J., Thalhammer, J. G. & Zimmermann, M. Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation. *J. Neurophysiol.* **50**, 1446–1459 (1983).
258. Sandkühler, J. & Gebhart, G. F. Relative contributions of the nucleus raphe magnus and adjacent medullary reticular formation to the inhibition by stimulation in the periaqueductal gray of a spinal nociceptive reflex in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res.* **305**, 77–87 (1984).
259. Akil, H. & Mayer, D. J. Antagonism of stimulation-produced analgesia by p-CPA, a serotonin synthesis inhibitor. *Brain Res.* **44**, 692–697 (1972).
260. Aimone, L. D. & Gebhart, G. F. Stimulation-produced spinal inhibition

- from the midbrain in the rat is mediated by an excitatory amino acid neurotransmitter in the medial medulla. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **6**, 1803–1813 (1986).
261. Cheng, Z. F., Fields, H. L. & Heinricher, M. M. Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res.* **375**, 57–65 (1986).
262. Yaksh, T. L. & Tyce, G. M. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res.* **171**, 176–181 (1979).
263. Hammond, D. L., Tyce, G. M. & Yaksh, T. L. Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *J. Physiol.* **359**, 151–162 (1985).
264. Yaksh, T. L. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res.* **160**, 180–185 (1979).
265. Yaksh, T. L., DuChateau, J. C. & Rudy, T. A. Antagonism by methysergide and cinanserin of the antinociceptive action of morphine administered into the periaqueductal gray. *Brain Res.* **104**, 367–372 (1976).
266. Akil, H. & Liebeskind, J. C. Monoaminergic mechanisms of stimulation-produced analgesia. *Brain Res.* **94**, 279–296 (1975).
267. Oliveras, J. L., Redjemi, F., Guilbaud, G. & Besson, J. M. Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior central nucleus of the raphe in the cat. *Pain* **1**, 139–145 (1975).
268. Basbaum, A. I., Clanton, C. H. & Fields, H. L. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J. Comp. Neurol.* **178**, 209–224 (1978).
269. Fields, H. L. & Basbaum, A. I. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **40**, 217–248 (1978).
270. Levy, R. A. & Proudfit, H. K. Analgesia produced by microinjection of baclofen and morphine at brain stem sites. *Eur. J. Pharmacol.* **57**, 43–55 (1979).
271. Sessle, B. J. & Hu, J. W. Raphe-induced suppression of the jaw-opening reflex and single neurons in trigeminal subnucleus oralis, and influence of naloxone and subnucleus caudalis. *Pain* **10**, 19–36 (1981).
272. Jensen, T. S. & Yaksh, T. L. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. *Brain Res.* **363**, 99–113 (1986).
273. Mason, P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 737–777 (2001).
274. Schmauss, C., Hammond, D. L., Ochi, J. W. & Yaksh, T. L. Pharmacological antagonism of the antinociceptive effects of serotonin in the rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* **90**, 349–357 (1983).
275. Rivot, J. P., Chaouch, A. & Besson, J. M. Nucleus raphe magnus modulation of response of rat dorsal horn neurons to unmyelinated fiber inputs: partial involvement of serotonergic pathways. *J. Neurophysiol.* **44**, 1039–1057 (1980).
276. Yeziarski, R. P., Wilcox, T. K. & Willis, W. D. The effects of serotonin antagonists on the inhibition of primate spinothalamic tract cells produced by stimulation in nucleus raphe magnus or periaqueductal gray. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **220**, 266–277 (1982).
277. Ren, K. & Dubner, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain* **100**, 1–6 (2002).
278. Vanegas, H. & Schaible, H.-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **46**, 295–309 (2004).
279. Ossipov, M., Dussor, G. & Porreca, F. Central modulation of pain. *J. Clin.*

- Invest. The Journal of clinical investigation*, 3779–87 (2010).
280. Porreca, F., Ossipov, M. H. & Gebhart, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* **25**, 319–325 (2002).
281. Zhuo, M. & Gebhart, G. F. Characterization of descending facilitation and inhibition of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *J. Neurophysiol.* **67**, 1599–1614 (1992).
282. Urban, M. O. & Gebhart, G. F. Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* **78**, 1550–1562 (1997).
283. Urban, M. O. & Smith, D. J. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 580–586 (1993).
284. Fields, H. L., Bry, J., Hentall, I. & Zorman, G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **3**, 2545–2552 (1983).
285. Fields, H. L., Malick, A. & Burstein, R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* **74**, 1742–1759 (1995).
286. Morgan, M. M. & Fields, H. L. Pronounced changes in the activity of nociceptive modulatory neurons in the rostral ventromedial medulla in response to prolonged thermal noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* **72**, 1161–1170 (1994).
287. Bederson, J. B., Fields, H. L. & Barbaro, N. M. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. *Somatosens. Mot. Res.* **7**, 185–203 (1990).
288. Urban, M. O. & Gebhart, G. F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7687–7692 (1999).
289. Gao, K. & Mason, P. Serotonergic Raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not ON or OFF cells. *J. Neurophysiol.* **84**, 1719–1725 (2000).
290. Gao, K. & Mason, P. Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells. *J. Comp. Neurol.* **439**, 426–439 (2001).
291. Zhang, L., Sykes, K. T., Buhler, A. V. & Hammond, D. L. Electrophysiological heterogeneity of spinally projecting serotonergic and nonserotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* **95**, 1853–1863 (2006).
292. Humphrey, P. P., Hartig, P. & Hoyer, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 233–236 (1993).
293. Hoyer, D. *et al.* International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**, 157–203 (1994).
294. Boess, F. G. & Martin, I. L. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* **33**, 275–317 (1994).
295. Uphouse, L. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 679–698 (1997).
296. Barnes, N. M. & Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**, 1083–1152 (1999).
297. Bardin, L., Bardin, M., Lavarenne, J. & Eschaliier, A. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp. Brain Res.* **113**, 81–87 (1997).
298. Xu, W., Qiu, X. C. & Han, J. S. Serotonin receptor subtypes in spinal antinociception in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 1182–1189 (1994).
299. Hylden, J. L. & Wilcox, G. L. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and

- inhibition of a spinal action of substance P. *Life Sci.* **33**, 789–795 (1983).
300. Alloui, A., Pelissier, T., Dubray, C., Lavarenne, J. & Eschalier, A. Tropicisetron inhibits the antinociceptive effect of intrathecally administered paracetamol and serotonin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **10**, 406–407 (1996).
301. Yaksh, T. L. & Wilson, P. R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 446–453 (1979).
302. Marlier, L., Teilhac, J. R., Cerruti, C. & Privat, A. Autoradiographic mapping of 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT₂ receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.* **550**, 15–23 (1991).
303. Thor, K. B., Nickolaus, S. & Helke, C. J. Autoradiographic localization of 5-hydroxytryptamine_{1A}, 5-hydroxytryptamine_{1B} and 5-hydroxytryptamine_{1C/2} binding sites in the rat spinal cord. *Neuroscience* **55**, 235–252 (1993).
304. Courade, J., Chassaing, C., Bardin, L., Alloui, A. & Eschalier, A. 5-HT receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of acetaminophen in rats. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*, 1–7 (2001).
305. Tiippana, E., Hamunen, K., Kontinen, V. & Kalso, E. The effect of paracetamol and tropisetron on pain: experimental studies and a review of published data. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **112**, 124–131 (2013).
306. Pelissier, T. *et al.* Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: in vivo and in vitro evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 8–14 (1996).
307. Raffa, R. B. & Codd, E. E. Lack of binding of acetaminophen to 5-HT receptor or uptake sites (or eleven other binding/uptake assays). *Life Sci.* **59**, PL37–40 (1996).
308. Pini, L., Vitale, G., Ottani, A. & Sandrini, M. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 934–40 (1997).
309. Chen, C. & Bazan, N. G. Acetaminophen modifies hippocampal synaptic plasticity via a presynaptic 5-HT₂ receptor. *Neuroreport* **14**, 743–747 (2003).
310. Sugiura, T. *et al.* 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 58–64 (1996).
311. Bisogno, T. *et al.* N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J.* **351 Pt 3**, 817–824 (2000).
312. De Petrocellis, L. & Di Marzo, V. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium* **45**, 611–624 (2009).
313. Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778 (1997).
314. Bisogno, T. *et al.* Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 377–380 (1999).
315. Kurahashi, Y., Ueda, N., Suzuki, H., Suzuki, M. & Yamamoto, S. Reversible hydrolysis and synthesis of anandamide demonstrated by recombinant rat fatty-acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 512–515 (1997).
316. Basavarajappa, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept. Lett.* **14**, 237–246 (2007).
317. Di Marzo, V. *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691 (1994).

318. Cadas, H., di Tomaso, E. & Piomelli, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 1226–1242 (1997).
319. Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. & Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 3934–3942 (1996).
320. Gao, Y. *et al.* Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 2017–2024 (2010).
321. Day, T. A., Rakhshan, F., Deutsch, D. G. & Barker, E. L. Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1369–1375 (2001).
322. Fasia, L., Karava, V. & Siafaka-Kapadai, A. Uptake and metabolism of [3H]anandamide by rabbit platelets. Lack of transporter? *Eur. J. Biochem. FEBS* **270**, 3498–3506 (2003).
323. Glaser, S. T. *et al.* Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4269–4274 (2003).
324. Kaczocha, M., Hermann, A., Glaser, S. T., Bojesen, I. N. & Deutsch, D. G. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **281**, 9066–9075 (2006).
325. Felder, C. C., Dickason-Chesterfield, A. K. & Moore, S. A. Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Mol. Interv.* **6**, 149–161 (2006).
326. Moore, S. A. *et al.* Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17852–17857 (2005).
327. Ligresti, A. *et al.* Exploiting nanotechnologies and TRPV1 channels to investigate the putative anandamide membrane transporter. *PLoS One* **5**, e10239 (2010).
328. Ligresti, A. *et al.* Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem. J.* **380**, 265–272 (2004).
329. Deutsch, D. G. *et al.* The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **276**, 6967–6973 (2001).
330. Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S. & Gertsch, J. Evidence for Bidirectional Endocannabinoid Transport across Cell Membranes. *J. Biol. Chem.* **287**, 34660–34682 (2012).
331. Fu, J. *et al.* A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 64–69 (2012).
332. Lang, W. *et al.* Substrate specificity and stereoselectivity of rat brain microsomal anandamide amidohydrolase. *J. Med. Chem.* **42**, 896–902 (1999).
333. Jonsson, K. O., Vandevoorde, S., Lambert, D. M., Tiger, G. & Fowler, C. J. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 1263–1275 (2001).
334. Siegmund, S. V. *et al.* Fatty acid amide hydrolase determines anandamide-induced cell death in the liver. *J. Biol. Chem.* **281**, 10431–10438 (2006).
335. Gervasi, M. G. *et al.* Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. *PLoS One* **6**, e16993 (2011).
336. Capasso, R. *et al.* Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* **129**, 941–951 (2005).
337. Frider, E. Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**, 221–233 (2002).
338. Lambert, D. M. & Di Marzo, V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid

- amides cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.* **6**, 757–773 (1999).
339. Romero, J., Hillard, C. J., Calero, M. & Rábano, A. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **100**, 85–93 (2002).
340. Glaser, S. T., Gatley, S. J. & Gifford, A. N. Ex vivo imaging of fatty acid amide hydrolase activity and its inhibition in the mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 1088–1097 (2006).
341. Otrubova, K., Ezzili, C. & Boger, D. L. The discovery and development of inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4674–4685 (2011).
342. Cravatt, B. *et al.* Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9371–6 (2001).
343. Lichtman, A. H., Shelton, C. C., Advani, T. & Cravatt, B. F. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* **109**, 319–327 (2004).
344. McKinney, M. K. & Cravatt, B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 411–432 (2005).
345. Cravatt, B. F. *et al.* Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10821–10826 (2004).
346. Huggins, J. P., Smart, T. S., Langman, S., Taylor, L. & Young, T. An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *PAIN* **153**, 1837–1846 (2012).
347. Kathuria, S. *et al.* Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* **9**, 76–81 (2003).
348. Gkini, E., Anagnostopoulos, D., Mavri-Vavayianni, M. & Sifaka-Kapadai, A. Metabolism of 2-acylglycerol in rabbit and human platelets. Involvement of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase. *Platelets* **20**, 376–385 (2009).
349. Hohmann, A. G. *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **435**, 1108–1112 (2005).
350. Kinsey, S. G., Long, J. Z., Cravatt, B. F. & Lichtman, A. H. Fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors produce anti-allodynic effects in mice through distinct cannabinoid receptor mechanisms. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **11**, 1420–1428 (2010).
351. Kinsey, S. G. *et al.* Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 902–910 (2009).
352. McPartland, J. M., Matias, I., Di Marzo, V. & Glass, M. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* **370**, 64–74 (2006).
353. Mechoulam, R., Fride, E. & Di Marzo, V. Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **359**, 1–18 (1998).
354. Bisogno, T. *et al.* Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 845–852 (2001).
355. Zygmunt, P. M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457 (1999).
356. Jordt, S.-E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265 (2004).
357. Watanabe, H. *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic

- acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434–438 (2003).
358. O'Sullivan, S. E., Tarling, E. J., Bennett, A. J., Kendall, D. A. & Randall, M. D. Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 824–831 (2005).
359. Rockwell, C. E., Snider, N. T., Thompson, J. T., Vanden Heuvel, J. P. & Kaminski, N. E. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol.* **70**, 101–111 (2006).
360. Sun, Y., Alexander, S. P. H., Kendall, D. A. & Bennett, A. J. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1095–1097 (2006).
361. Herkenham, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **11**, 563–583 (1991).
362. Herkenham, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1932–1936 (1990).
363. Hohmann, A. G. & Herkenham, M. Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci. Lett.* **252**, 13–16 (1998).
364. Hohmann, A. G. & Herkenham, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* **92**, 1171–1175 (1999).
365. Hohmann, A. G. & Herkenham, M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* **90**, 923–931 (1999).
366. Tsou, K. *et al.* Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett. Neuroscience letters*, 137–40 (1998).
367. Glass, M., Dragunow, M. & Faull, R. L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* **77**, 299–318 (1997).
368. Mailleux, P., Parmentier, M. & Vanderhaeghen, J. J. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci. Lett.* **143**, 200–204 (1992).
369. Freund, T. F., Katona, I. & Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* **83**, 1017–1066 (2003).
370. Bouaboula, M. *et al.* Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem. FEBS* **214**, 173–180 (1993).
371. Galiègue, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem. FEBS* **232**, 54–61 (1995).
372. Gérard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* **279** (Pt 1), 129–134 (1991).
373. Kunos, G. *et al.* The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chem. Phys. Lipids* **121**, 45–56 (2002).
374. Pertwee, R. G., Fernando, S. R., Nash, J. E. & Coutts, A. A. Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2199–2205 (1996).
375. Ishac, E. J. *et al.* Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2023–2028 (1996).
376. Dewey, W. L. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **38**, 151–178 (1986).
377. Melvin, L. S., Johnson, M. R., Harbert, C. A., Milne, G. M. & Weissman, A. A

- cannabinoid derived prototypical analgesic. *J. Med. Chem.* **27**, 67–71 (1984).
378. Melvin, L. S. *et al.* Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol. Pharmacol.* **44**, 1008–1015 (1993).
379. D'Ambra, T. E. *et al.* Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* **35**, 124–135 (1992).
380. Howlett, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 161–202 (2002).
381. Pacher, P., Bátkai, S. & Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 389–462 (2006).
382. Pertwee, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* **76**, 1307–1324 (2005).
383. Schlicker, E. & Kathmann, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 565–572 (2001).
384. Felder, C. C. *et al.* Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**, 443–450 (1995).
385. Mackie, K. & Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3825–3829 (1992).
386. Ikeda, S. R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255–258 (1996).
387. Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. & Mitchell, R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **15**, 6552–6561 (1995).
388. Bouaboula, M. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* **312** (Pt 2), 637–641 (1995).
389. Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S. H. & Davis, R. J. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* **359**, 133–136 (1995).
390. Liu, J. *et al.* Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **346** Pt 3, 835–840 (2000).
391. Derkinderen, P., Ledent, C., Parmentier, M. & Girault, J. A. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J. Neurochem.* **77**, 957–960 (2001).
392. Gómez Del Pulgar, T., De Ceballos, M. L., Guzmán, M. & Velasco, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 36527–36533 (2002).
393. Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A. & Guzmán, M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Pharmacol.* **58**, 814–820 (2000).
394. Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gómez del Pulgar, T., Velasco, G. & Guzmán, M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1385–1392 (2002).
395. Davis, M. I., Ronesi, J. & Lovinger, D. M. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 48973–48980 (2003).
396. Sánchez, C. *et al.* The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the

- adaptor protein fan. *Mol. Pharmacol.* **59**, 955–959 (2001).
397. Compton, D. R. *et al.* Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 218–226 (1993).
398. Martin, B. R. *et al.* Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **40**, 471–478 (1991).
399. Schmeling, W. T. & Hosko, M. J. Hypothermic effects of intraventricular and intravenous administration of cannabinoids in intact and brainstem transected cats. *Neuropharmacology* **19**, 567–573 (1980).
400. Compton, D. R., Gold, L. H., Ward, S. J., Balster, R. L. & Martin, B. R. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 1118–1126 (1992).
401. Lichtman, A. H., Cook, S. A. & Martin, B. R. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 585–593 (1996).
402. Rawls, S. M., Cabassa, J., Geller, E. B. & Adler, M. W. CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1ij]quinolin-6-one]-induced hypothermia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 963–968 (2002).
403. McGregor, I. S., Issakidis, C. N. & Prior, G. Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **53**, 657–664 (1996).
404. Sulcova, E., Mechoulam, R. & Fride, E. Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**, 347–352 (1998).
405. Crawley, J. N. *et al.* Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**, 967–972 (1993).
406. Pertwee, R. G. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 3353–3363 (2012).
407. Martín-Sánchez, E., Furukawa, T. A., Taylor, J. & Martin, J. L. R. Systematic review and meta-analysis of cannabis treatment for chronic pain. *Pain Med. Malden Mass* **10**, 1353–1368 (2009).
408. Lucas, P. Cannabis as an adjunct to or substitute for opiates in the treatment of chronic pain. *J. Psychoactive Drugs* **44**, 125–133 (2012).
409. Grotenhermen, F. & Müller-Vahl, K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Dtsch. Ärzteblatt Int.* **109**, 495–501 (2012).
410. McGeeney, B. E. Hallucinogens and cannabinoids for headache. *Headache* **52 Suppl 2**, 94–97 (2012).
411. Johnson, J. R. *et al.* Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. *J. Pain Symptom Manage.* **39**, 167–179 (2010).
412. Johnson, J. R., Lossignol, D., Burnell-Nugent, M. & Fallon, M. T. An Open-Label Extension Study to Investigate the Long-Term Safety and Tolerability of THC/CBD Oromucosal Spray and Oromucosal THC Spray in Patients With Terminal Cancer-Related Pain Refractory to Strong Opioid Analgesics. *J. Pain Symptom Manage.* (2012). doi:10.1016/j.jpainsymman.2012.07.014
413. Jochimsen, P. R., Lawton, R. L., VerSteeg, K. & Noyes, R., Jr. Effect of benzopyranoperidine, a delta-9-THC

- congener, on pain. *Clin. Pharmacol. Ther.* **24**, 223–227 (1978).
414. Staquet, M., Gantt, C. & Machin, D. Effect of a nitrogen analog of tetrahydrocannabinol on cancer pain. *Clin. Pharmacol. Ther.* **23**, 397–401 (1978).
415. Nurmikko, T. J. *et al.* Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain* **133**, 210–220 (2007).
416. Abrams, D. I. *et al.* Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology* **68**, 515–521 (2007).
417. Wilsey, B. *et al.* A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **9**, 506–521 (2008).
418. Ware, M. A. *et al.* Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **182**, E694–701 (2010).
419. Svendsen, K. B., Jensen, T. S. & Bach, F. W. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ* **329**, 253 (2004).
420. Wade, D. T., Robson, P., House, H., Makela, P. & Aram, J. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin. Rehabil.* **17**, 21–29 (2003).
421. Berman, J. S., Symonds, C. & Birch, R. Efficacy of two cannabis based medicinal extracts for relief of central neuropathic pain from brachial plexus avulsion: results of a randomised controlled trial. *Pain* **112**, 299–306 (2004).
422. Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Friede, T. & Young, C. A. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* **65**, 812–819 (2005).
423. Fitzcharles, M.-A., McDougall, J., Ste-Marie, P. A. & Padjen, I. Clinical implications for cannabinoid use in the rheumatic diseases: potential for help or harm? *Arthritis Rheum.* **64**, 2417–2425 (2012).
424. Blake, D. R., Robson, P., Ho, M., Jubbs, R. W. & McCabe, C. S. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **45**, 50–52 (2006).
425. Skrabek, R. Q., Galimova, L., Ethans, K. & Perry, D. Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **9**, 164–173 (2008).
426. Ostefeld, T. *et al.* A randomized, controlled study to investigate the analgesic efficacy of single doses of the cannabinoid receptor-2 agonist GW842166, ibuprofen or placebo in patients with acute pain following third molar tooth extraction. *Clin. J. Pain* **27**, 668–676 (2011).
427. Levine, J. D. & Alessandri-Haber, N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 989–1003 (2007).
428. Caterina, M. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306–319 (2000).
429. Szolcsányi, J. in *Pyretics Antipyretics* (Milton, A. S.) **60**, 437–478 (Springer Berlin Heidelberg, 1982).
430. Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. & Szolcsányi, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **31**, 138–151 (1967).
431. Szolcsányi, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* **38**, 377–384 (2004).
432. Bode, A. M. & Dong, Z. The two faces of capsaicin. *Cancer Res.* **71**, 2809–2814 (2011).

433. Buck, S. H. & Burks, T. F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.* **38**, 179–226 (1986).
434. Hautkappe, M. *et al.* Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. *Clin. J. Pain* **14**, 97–106 (1998).
435. Derry, S., Lloyd, R., Moore, R. A. & McQuay, H. J. Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* CD007393 (2009). doi:10.1002/14651858.CD007393.pub2
436. Sasamura, T. & Kuraishi, Y. Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* **80**, 275–280 (1999).
437. Bölcseki, K. *et al.* Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* **117**, 368–376 (2005).
438. Caterina, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R64–76 (2007).
439. Helliwell, R. J. *et al.* Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci. Lett.* **250**, 177–180 (1998).
440. Tominaga, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–543 (1998).
441. Cavanaugh, D. J. *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 5067–5077 (2011).
442. Mezey, E. *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3655–3660 (2000).
443. Sharif Naeini, R., Witty, M.-F., Séguéla, P. & Bourque, C. W. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nat. Neurosci.* **9**, 93–98 (2006).
444. Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C. & Kuraishi, Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**, 2045–2048 (1998).
445. Tóth, A. *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **135**, 162–168 (2005).
446. Martinez-Garcia, C. *et al.* Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes. *Histol. Histopathol.* (2013).
447. Lee, H. & Caterina, M. J. TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **451**, 160–167 (2005).
448. Gavva, N. R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 550–557 (2008).
449. Hori, T. Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmacol. Ther.* **26**, 389–416 (1984).
450. Cristino, L. *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience Neuroscience*, 1405–15 (2006).
451. Roberts, J. C., Davis, J. B. & Benham, C. D. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* **995**, 176–183 (2004).
452. Menigoz, A. & Boudes, M. The Expression Pattern of TRPV1 in Brain. *J. Neurosci.* **31**, 13025–13027 (2011).
453. Caterina, M. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.*

- Annual review of neuroscience**, 487–517 (2001).
454. Kawahara, H., Drew, G., Christie, M. & Vaughan, C. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol. British journal of pharmacology*, 1214–22 (2011).
455. Wong, G. Y. & Gavva, N. R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res. Rev.* **60**, 267–277 (2009).
456. Attal, N. *et al.* EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* **17**, 1113–e88 (2010).
457. Chizh, B. A. *et al.* The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* **132**, 132–141 (2007).
458. Jordt, S.-E. & Julius, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to ‘hot’ chili peppers. *Cell* **108**, 421–430 (2002).
459. Smart, D. *et al.* The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* **129**, 227–230 (2000).
460. Smart, D. & Jerman, J. C. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 134 (2000).
461. Sprague, J., Harrison, C., Rowbotham, D. J., Smart, D. & Lambert, D. G. Temperature-dependent activation of recombinant rat vanilloid VR1 receptors expressed in HEK293 cells by capsaicin and anandamide. *Eur. J. Pharmacol.* **423**, 121–125 (2001).
462. Roberts, L. A., Christie, M. J. & Connor, M. Anandamide is a partial agonist at native vanilloid receptors in acutely isolated mouse trigeminal sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 421–428 (2002).
463. Jerman, J. C. *et al.* Comparison of effects of anandamide at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors. *Br. J. Anaesth.* **89**, 882–887 (2002).
464. Price, T. J., Patwardhan, A., Akopian, A. N., Hargreaves, K. M. & Flores, C. M. Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid–vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonoyl-2-chloroethylamide. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 1118–1130 (2004).
465. Sagar, D. R. *et al.* TRPV1 and CB1 receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 175–184 (2004).
466. Hsu, C.-C. *et al.* N-arachidonoyl dopamine sensitizes rat capsaicin-sensitive lung vagal afferents via activation of TRPV1 receptors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **167**, 323–332 (2009).
467. Barbara, G. *et al.* T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 13106–13114 (2009).
468. Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J. & Lory, P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* **20**, 7033–7040 (2001).
469. Yu, F. H. & Catterall, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2004**, re15 (2004).
470. Catterall, W. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Annual review of cell and developmental biology*, 521–55 (2000).
471. Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**, 770–775 (1987).

472. Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749–753 (1987).
473. Pongs, O. *et al.* Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **7**, 1087–1096 (1988).
474. Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003947 (2011).
475. FATT, P. & KATZ, B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* **120**, 171–204 (1953).
476. Kostyuk, P. G. Calcium channels in cellular membranes. *J. Mol. Neurosci. MN* **2**, 123–141 (1990).
477. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C. L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**, 1305–1355 (2011).
478. Jammes, F., Hu, H.-C., Villiers, F., Bouten, R. & Kwak, J. M. Calcium-permeable channels in plant cells. *FEBS J.* **278**, 4262–4276 (2011).
479. Carbone, E. & Lux, H. D. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* **46**, 413–418 (1984).
480. Flockerzi, V. *et al.* Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* **323**, 66–68 (1986).
481. Leung, A. T., Imagawa, T. & Campbell, K. P. Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 7943–7946 (1987).
482. Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. & Catterall, W. A. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5478–5482 (1987).
483. Tanabe, T. *et al.* Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313–318 (1987).
484. Arikath, J. & Campbell, K. P. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 298–307 (2003).
485. Davies, A. *et al.* Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 220–228 (2007).
486. Bourinet, E. *et al.* Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 407–415 (1999).
487. Hans, M. *et al.* Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels. *Biophys. J.* **76**, 1384–1400 (1999).
488. Ertel, E. A. *et al.* Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533–535 (2000).
489. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**, C1–14 (1983).
490. Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P. & Franzini-Armstrong, C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **107**, 2587–2600 (1988).
491. Marcantoni, A. *et al.* L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium* **42**, 397–408 (2007).
492. Kollmar, R., Montgomery, L. G., Fak, J., Henry, L. J. & Hudspeth, A. J. Predominance of the alpha1D subunit in L-type voltage-gated Ca²⁺ channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14883–14888 (1997).

493. Knirsch, M. *et al.* Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 6442–6451 (2007).
494. Nowycky, M. C., Fox, A. P. & Tsien, R. W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440–443 (1985).
495. Scroggs, R. S. & Fox, A. P. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Physiol.* **445**, 639–658 (1992).
496. Murakami, M. *et al.* Distribution of various calcium channel alpha(1) subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of omega-conotoxin SVIB in mice. *Brain Res.* **903**, 231–236 (2001).
497. Fossat, P. *et al.* Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 1073–1085 (2010).
498. Favereaux, A. *et al.* Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J.* **30**, 3830–3841 (2011).
499. Verma, D., Gupta, Y. K., Parashar, A. & Ray, S. B. Differential expression of L- and N-type voltage-sensitive calcium channels in the spinal cord of morphine+nimodipine treated rats. *Brain Res.* **1249**, 128–134 (2009).
500. Sudhof, T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509–547 (2004).
501. Takahashi, T. & Momiyama, A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**, 156–158 (1993).
502. Zucker, R. S. & Regehr, W. G. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 355–405 (2002).
503. Wheeler, D. B., Randall, A. & Tsien, R. W. Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 2226–2237 (1996).
504. Westenbroek, R., Hoskins, L. & Catterall, W. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 6319–30 (1998).
505. Qian, J. & Noebels, J. L. Presynaptic Ca²⁺ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 3721–3728 (2001).
506. Wu, L. G. & Saggau, P. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 645–654 (1994).
507. Dittman, J. S., Kreitzer, A. C. & Regehr, W. G. Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 1374–1385 (2000).
508. Li, Y., Wu, Y. & Zhou, Y. Modulation of inactivation properties of CaV2.2 channels by 14-3-3 proteins. *Neuron* **51**, 755–771 (2006).
509. Adams, P. J. *et al.* Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18694–18699 (2010).
510. Mochida, S. Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity. *Neurosci. Res.* **70**, 16–23 (2011).
511. Bao, J., Li, J. & Perl, E. Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 8740–50 (1998).
512. Matthews, E. & Dickenson, A. Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel

- blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*, 141–9 (2001).
513. Heinke, B., Balzer, E. & Sandkühler, J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 103–111 (2004).
514. Evans, A. R., Nicol, G. D. & Vasko, M. R. Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res.* **712**, 265–273 (1996).
515. Saegusa, H. *et al.* Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6132–6137 (2000).
516. Matthews, E. A., Bee, L. A., Stephens, G. J. & Dickenson, A. H. The Cav2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 3561–3569 (2007).
517. Fang, Z. *et al.* Molecular basis of Ca(v)2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. *J. Biol. Chem.* **282**, 4757–4764 (2007).
518. Perez-Reyes, E. *et al.* Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **Nature**, 896–900 (1998).
519. Cribbs, L. *et al.* Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ. Res. Circulation research*, 103–9 (1998).
520. Lee, J. H. *et al.* Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 1912–1921 (1999).
521. Chemin, J., Monteil, A., Bourinet, E., Nargeot, J. & Lory, P. Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys. J.* **80**, 1238–1250 (2001).
522. Perez-Reyes, E. Molecular characterization of T-type calcium channels. *Cell Calcium* **40**, 89–96 (2006).
523. Swayne, L. & Bourinet, E. Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 459–66 (2008).
524. Mittman, S., Guo, J. & Agnew, W. S. Structure and alternative splicing of the gene encoding alpha1G, a human brain T calcium channel alpha1 subunit. *Neurosci. Lett.* **274**, 143–146 (1999).
525. Senatore, A. & Spafford, J. D. Gene transcription and splicing of T-type channels are evolutionarily-conserved strategies for regulating channel expression and gating. *PLoS One* **7**, e37409 (2012).
526. Perez-Reyes, E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117–161 (2003).
527. Leuranguer, V., Bourinet, E., Lory, P. & Nargeot, J. Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* **37**, 701–708 (1998).
528. Pragnell, M. *et al.* Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67–70 (1994).
529. Lambert, R. C. *et al.* T-type Ca²⁺ current properties are not modified by Ca²⁺ channel beta subunit depletion in nodosus ganglion neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 6621–6628 (1997).
530. Chemin, J. *et al.* Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability. *J. Physiol.* **540**, 3–14 (2002).
531. McRory, J. E. *et al.* Molecular and functional characterization of a family of

- rat brain T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 3999–4011 (2001).
532. Francois, A. *et al.* State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* **154**, 283–293 (2013).
533. Kozlov, A. S. *et al.* Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels lead to differential Ca²⁺ entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 4149–4158 (1999).
534. Monteil, A. *et al.* Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 6090–6100 (2000).
535. Astori, S. *et al.* The Ca(V)3.3 calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13823–13828 (2011).
536. Steriade, M., McCormick, D. A. & Sejnowski, T. J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* **262**, 679–685 (1993).
537. Huang, Z. *et al.* Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat. Neurosci.* **Nature neuroscience**, 478–86 (2011).
538. Jacus, M. O., Uebele, V. N., Renger, J. J. & Todorovic, S. M. Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 9374–9382 (2012).
539. Hagiwara, S., Ozawa, S. & Sand, O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* **65**, 617–644 (1975).
540. Zamponi, G. W., Bourinet, E. & Snutch, T. P. Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J. Membr. Biol.* **151**, 77–90 (1996).
541. Todorovic, S. M. & Jevtovic-Todorovic, V. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br J Pharmacol* **163**, 484–495 (2011).
542. Traboulsie, A. *et al.* Subunit-specific modulation of T-type calcium channels by zinc. *J. Physiol.* **578**, 159–171 (2007).
543. Hagen, N. A. *et al.* A multicentre open-label safety and efficacy study of tetrodotoxin for cancer pain. *Curr. Oncol.* **18**, e109–e116 (2011).
544. Adams, M. E. Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* **43**, 509–525 (2004).
545. Bowersox, S. S. & Luther, R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* **36**, 1651–1658 (1998).
546. Prommer, E. Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs Today Barc. Spain 1998* **42**, 369–378 (2006).
547. Chuang, R., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E. & Swartz, K. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* **Nature neuroscience**, 668–74 (1998).
548. Sidach, S. & Mintz, I. Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 2023–34 (2002).
549. Lee, W. *et al.* Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 9500–9 (2009).
550. Tanaka, H. *et al.* The R(-)-enantiomer of efonidipine blocks T-type but not L-type calcium current in guinea pig ventricular myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* **96**, 499–501 (2004).
551. Akaike, N. *et al.* Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth

- muscle cells in primary culture. *J. Physiol.* **416**, 141–160 (1989).
552. Bezprozvanny, I. & Tsien, R. W. Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol. Pharmacol.* **48**, 540–549 (1995).
553. Jiménez, C. *et al.* Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology* **39**, 1–10 (2000).
554. Lory, P. & Chemin, J. Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 717–722 (2007).
555. Moosmang, S., Haider, N., Brüderl, B., Welling, A. & Hofmann, F. Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Circ. Res.* **98**, 105–110 (2006).
556. Flatters, S. J. L. & Bennett, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* **109**, 150–161 (2004).
557. Dogrul, A. *et al.* Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain Pain*, 159–68 (2003).
558. Hamidi, G. A. *et al.* Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 260–264 (2012).
559. Kawashiri, T. *et al.* L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* **8**, 7 (2012).
560. Shipe, W. D. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca²⁺ channel antagonist. *J. Med. Chem.* **51**, 3692–3695 (2008).
561. Uebele, V. N. *et al.* Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists. *Cell Biochem. Biophys.* **55**, 81–93 (2009).
562. Dreyfus, F. M. *et al.* Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 99–109 (2010).
563. Choe, W. *et al.* TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Mol. Pharmacol. Molecular pharmacology*, 900–10 (2011).
564. Errington, A. C., Renger, J. J., Uebele, V. N. & Crunelli, V. State-dependent firing determines intrinsic dendritic Ca²⁺ signaling in thalamocortical neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 14843–14853 (2010).
565. Boehme, R., Uebele, V. N., Renger, J. J. & Pedroarena, C. Rebound excitation triggered by synaptic inhibition in cerebellar nuclear neurons is suppressed by selective T-type calcium channel block. *J. Neurophysiol.* **106**, 2653–2661 (2011).
566. Bender, K. J., Uebele, V. N., Renger, J. J. & Trussell, L. O. Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *J. Physiol.* **590**, 109–118 (2012).
567. Talley, E. M. *et al.* Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 1895–1911 (1999).
568. McCarthy, M. Allen Brain Atlas maps 21,000 genes of the mouse brain. *Lancet Neurol.* **5**, 907–908 (2006).
569. Yunker, A. Modulation and pharmacology of low voltage-activated ('T-Type') calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr. Journal of bioenergetics and biomembranes*, 577–98 (2003).
570. Carbone, E., Giacippoli, A., Marcantoni, A., Guido, D. & Carabelli, V. A new role for T-type channels in fast 'low-

- threshold' exocytosis. *Cell Calcium* **40**, 147–154 (2006).
571. Lambert, R. C. *et al.* Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 8605–8613 (1998).
572. Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R. & Sandkühler, J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* **299**, 1237–1240 (2003).
573. Ryu, P. D. & Randic, M. Low- and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* **63**, 273–285 (1990).
574. Shin, J.-B., Martinez-Salgado, C., Heppenstall, P. A. & Lewin, G. R. A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 724–730 (2003).
575. Wang, R. & Lewin, G. The Cav3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors. *J. Physiol. The Journal of physiology*, 2229–43 (2011).
576. Dubreuil, A.-S. *et al.* Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 8480–4 (2004).
577. Schroeder, J. E., Fischbach, P. S. & McCleskey, E. W. T-type calcium channels: heterogeneous expression in rat sensory neurons and selective modulation by phorbol esters. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **10**, 947–951 (1990).
578. Todorovic, S. M. & Jevtovic-Todorovic, V. The role of T-type calcium channels in peripheral and central pain processing. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **5**, 639–653 (2006).
579. Coste, B., Crest, M. & Delmas, P. Pharmacological dissection and distribution of Na_v1.9, T-type Ca²⁺ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. *J. Gen. Physiol. The Journal of general physiology*, 57–77 (2007).
580. Choi, S. *et al.* Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)_{3.2} T-type channels. *Genes Brain Behav.* **6**, 425–431 (2007).
581. Bourinet, E. *et al.* Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J. The EMBO journal*, 315–24 (2005).
582. Messinger, R. *et al.* In vivo silencing of the Ca(V)_{3.2} T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain Pain*, 184–95 (2009).
583. Marger, F. *et al.* T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11268–11273 (2011).
584. Latham, J. *et al.* Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes Diabetes*, 2656–65 (2009).
585. Todorovic, S. M. *et al.* Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* **31**, 75–85 (2001).
586. Nelson, M. T., Joksovic, P. M., Perez-Reyes, E. & Todorovic, S. M. The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type Ca²⁺ channel-dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 8766–8775 (2005).
587. Maeda, Y. *et al.* Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* **142**, 127–132 (2009).
588. Takahashi, T. *et al.* Upregulation of Ca(v)_{3.2} T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of

- neuropathic pain. *Pain* **150**, 183–191 (2010).
589. Matsunami, M. *et al.* Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* **Gut**, 751–61 (2009).
590. Okubo, K. *et al.* Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1738–1743 (2012).
591. Okubo, K. *et al.* Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* **Neuroscience**, 148–56 (2011).
592. Wen, X.-J. *et al.* The roles of T-type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. *Pharmacology* **85**, 295–300 (2010).
593. Shin, H.-S., Cheong, E.-J., Choi, S., Lee, J. & Na, H. S. T-type Ca²⁺ channels as therapeutic targets in the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 33–41 (2008).
594. Chen, W.-K. *et al.* Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 10360–8 (2010).
595. Weiss, N. *et al.* A Ca(v)3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J. Biol. Chem.* **The Journal of biological chemistry**, 2810–8 (2012).
596. Ku, W. & Schneider, S. P. Multiple T-type Ca²⁺ current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration. *J. Neurophysiol.* **106**, 2486–2498 (2011).
597. Comunanza, V., Carbone, E., Marcantoni, A., Sher, E. & Ursu, D. Calcium-dependent inhibition of T-type calcium channels by TRPV1 activation in rat sensory neurons. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **462**, 709–722 (2011).
598. Giancippoli, A. *et al.* Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys. J.* **90**, 1830–1841 (2006).
599. Carabelli, V. *et al.* Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J. Physiol.* **584**, 149–165 (2007).
600. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V. & Carbone, E. Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca²⁺ -dependence. *Eur. Biophys. J. EBJ* **36**, 753–762 (2007).
601. Mahapatra, S. *et al.* Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* **51**, 321–330 (2012).
602. Conrad, R., Wegener, I., Geiser, F. & Kleiman, A. Temperament, character, and personality disorders in chronic pain. *Curr. Pain Headache Rep.* **17**, 318 (2013).
603. Gallagher, R. M., Moore, P. & Chernoff, I. The reliability of depression diagnosis in chronic low back pain. A pilot study. *Gen. Hosp. Psychiatry* **17**, 399–413 (1995).
604. Von Korff, M. & Simon, G. The relationship between pain and depression. *Br. J. Psychiatry. Suppl.* 101–108 (1996).
605. Meyer-Rosberg, K. *et al.* Peripheral neuropathic pain—a multidimensional burden for patients. *Eur. J. Pain* **5**, 379–389 (2001).
606. Giesecke, T. *et al.* The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. *Arthritis Rheum.* **52**, 1577–1584 (2005).
607. Kessler RC, C. W. PRevalence, severity, and comorbidity of 12-month dsm-iv disorders in the national comorbidity

- survey replication. *Arch. Gen. Psychiatry* **62**, 617–627 (2005).
608. Twillman, R. K. Mental disorders in chronic pain patients. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **21**, 13–19 (2007).
609. Dworkin, R. H. & Gitlin, M. J. Clinical aspects of depression in chronic pain patients. *Clin. J. Pain* **7**, 79–94 (1991).
610. Demyttenaere, K. *et al.* Mental disorders among persons with chronic back or neck pain: results from the World Mental Health Surveys. *Pain* **129**, 332–342 (2007).
611. Sareen, J., Cox, B. J., Clara, I. & Asmundson, G. J. G. The relationship between anxiety disorders and physical disorders in the U.S. National Comorbidity Survey. *Depress. Anxiety* **21**, 193–202 (2005).
612. Culpepper, L. Generalized Anxiety Disorder and Medical Illness. *J. Clin. Psychiatry* **70**, 20–24 (2009).
613. Keefe, F. J., Rumble, M. E., Scipio, C. D., Giordano, L. A. & Perri, L. M. Psychological aspects of persistent pain: current state of the science. *J. Pain* **5**, 195–211 (2004).
614. Vaerøy, H., Tanum, L., Bruaset, H., Mørkrid, L. & Førre, O. Symptoms of depression and anxiety in functionally disabled rheumatic pain patients. *Nord. J. Psychiatry* **59**, 109–113 (2005).
615. Sharp, T. J. & Harvey, A. G. Chronic pain and posttraumatic stress disorder: mutual maintenance? *Clin. Psychol. Rev.* **21**, 857–877 (2001).
616. Isik, A., Koca, S. S., Ozturk, A. & Mermi, O. Anxiety and depression in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **26**, 872–878 (2007).
617. Devane, C. L., Chiao, E., Franklin, M. & Kruep, E. J. Anxiety disorders in the 21st century: status, challenges, opportunities, and comorbidity with depression. *Am. J. Manag. Care* **11**, S344–353 (2005).
618. Scott, D. L., Wolfe, F. & Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **376**, 1094–1108 (2010).
619. Nicolson, S. E., Caplan, J. P., Williams, D. E. & Stern, T. A. Comorbid Pain, Depression, and Anxiety. *Harv. Rev. Psychiatry* **17**, 407–420 (2009).
620. Megarbane, B., Gueye, P. & Baud, F. [Interactions between benzodiazepines and opioids]. *Ann. Médecine Interne* **154 Spec No 2**, S64–72 (2003).
621. Devulder, J., Richarz, U. & Nataraja, S. H. Impact of long-term use of opioids on quality of life in patients with chronic, non-malignant pain. *Curr. Med. Res. Opin.* **21**, 1555–1568 (2005).
622. McWilliams, L. A., Goodwin, R. D. & Cox, B. J. Depression and anxiety associated with three pain conditions: results from a nationally representative sample. *Pain* **111**, 77–83 (2004).
623. Gettings, L. Psychological well-being in rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Musculoskeletal Care* **8**, 99–106 (2010).
624. Dooley, D. J., Taylor, C. P., Donevan, S. & Feltner, D. Ca²⁺ channel $\alpha 2\delta$ ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 75–82 (2007).
625. Quintero, J. E., Dooley, D. J., Pomerleau, F., Huettl, P. & Gerhardt, G. A. Amperometric measurement of glutamate release modulation by gabapentin and pregabalin in rat neocortical slices: role of voltage-sensitive Ca²⁺ $\alpha 2\delta$ -1 subunit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 240–245 (2011).
626. Sills, G. J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 108–113 (2006).
627. Dauri, M. *et al.* Gabapentin and pregabalin for the acute post-operative pain management. A systematic-narrative review of the recent clinical evidences. *Curr. Drug Targets* **10**, 716–733 (2009).
628. Van Seventer, R. *et al.* Pregabalin in the treatment of post-traumatic peripheral neuropathic pain: a randomized double-blind trial. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* **17**, 1082–1089 (2010).

629. Fuzier, R. *et al.* Adverse drug reactions to gabapentin and pregabalin: a review of the French pharmacovigilance database. *Drug Saf. Int. J. Med. Toxicol. Drug Exp.* **36**, 55–62 (2013).
630. Finnerup, N. B., Sindrup, S. H. & Jensen, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* **150**, 573–581 (2010).
631. Kim, D. *et al.* Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* **31**, 35–45 (2001).
632. Becker, A. J. *et al.* Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 13341–13353 (2008).
633. Lee, J., Kim, D. & Shin, H.-S. Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18195–18199 (2004).
634. Todorovic, S., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S., Perez-Reyes, E. & Zorumski, C. Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Mol. Pharmacol.* **Molecular pharmacology**, 603–10 (2001).
635. Talley, E. M. *et al.* Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 1895–1911 (1999).
636. Orestes, P. *et al.* Free radical signalling underlies inhibition of Cav3.2 T-type calcium channels by nitrous oxide in the pain pathway. *J. Physiol.* **589**, 135–148 (2011).
637. Crawley, B. *et al.* Acetaminophen prevents hyperalgesia in central pain cascade. *Neurosci. Lett. Neuroscience letters*, 50–3 (2008).
638. Okamoto, Y. *et al.* Mammalian cells stably overexpressing N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D exhibit significantly decreased levels of N-acylphosphatidylethanolamines. *Biochem. J.* **389**, 241–247 (2005).
639. Chen, C.-C. *et al.* Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* **302**, 1416–1418 (2003).
640. Butler, S., Godefroy, F., Besson, J. & Weil-Fugazza, J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain Pain*, 73–81 (1992).
641. Kawabata, A. *et al.* Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain Pain*, 74–81 (2007).
642. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16**, 1792–1798 (2002).
643. Tang, G., Wu, L., Liang, W. & Wang, R. Direct Stimulation of KATP Channels by Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide in Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1757–1764 (2005).
644. Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C. & Roth, S. H. Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 109–134 (1992).
645. Reger, T. S. *et al.* Pyridyl amides as potent inhibitors of T-type calcium channels. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 1692–1696 (2011).
646. Uebele, V. *et al.* Antagonism of T-type calcium channels inhibits high-fat diet-induced weight gain in mice. *J. Clin. Invest. The Journal of clinical investigation*, 1659–67 (2009).
647. Chemin, J., Nargeot, J. & Lory, P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **282**, 2314–2323 (2007).
648. Danthi, S. J., Enyeart, J. A. & Enyeart, J. J. Modulation of native T-type calcium channels by omega-3 fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 485–493 (2005).
649. Talavera, K., Staes, M., Janssens, A., Droogmans, G. & Nilius, B. Mechanism of

- arachidonic acid modulation of the T-type Ca²⁺ channel α 1G. *J. Gen. Physiol.* **124**, 225–238 (2004).
650. Martinez-Salgado, C. *et al.* Stomatin and Sensory Neuron Mechanotransduction. *J. Neurophysiol.* **98**, 3802–3808 (2007).
651. Zhang, Y., Jiang, X., Snutch, T. P. & Tao, J. Modulation of low-voltage-activated T-type Ca(2+) channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1550–1559 (2013).
652. Huh, S.-U., Kang, H.-W., Park, J.-Y. & Lee, J.-H. Regulation of CA(v)3.2 Ca²⁺ channel activity by protein tyrosine phosphorylation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 365–368 (2008).
653. Kawai, F., Kurahashi, T. & Kaneko, A. Adrenaline enhances odorant contrast by modulating signal encoding in olfactory receptor cells. *Nat. Neurosci.* **2**, 133–138 (1999).
654. Wang, F. *et al.* Neuromedin U inhibits T-type Ca²⁺ channel currents and decreases membrane excitability in small dorsal root ganglia neurons in mice. *Cell Calcium* **49**, 12–22 (2011).
655. Zhang, L. *et al.* Alpha-cobratoxin inhibits T-type calcium currents through muscarinic M4 receptor and Go-protein $\beta\gamma$ subunits-dependent protein kinase A pathway in dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* **62**, 1062–1072 (2012).
656. Buisson, B. *et al.* A G protein is involved in the angiotensin AT₂ receptor inhibition of the T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 1670–1674 (1995).
657. Iftinca, M. *et al.* Regulation of T-type calcium channels by Rho-associated kinase. *Nat. Neurosci.* **10**, 854–860 (2007).
658. Palazzo, E., Rossi, F. & Maione, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol. Cell. Endocrinol. Molecular and cellular endocrinology*, S79–83 (2008).
659. Wiley, J. L. *et al.* Influence of phenylmethylsulfonyl fluoride on anandamide brain levels and pharmacological effects. *Life Sci.* **67**, 1573–1583 (2000).
660. Clapper, J. *et al.* Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat. Neurosci. Nature neuroscience*, 1265–70 (2010).
661. Turu, G. & Hunyady, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocrinol. Journal of molecular endocrinology*, 75–85 (2010).
662. Huc, S. *et al.* Regulation of T-type calcium channels: signalling pathways and functional implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 947–952 (2009).
663. Baker, C. L. & McDougall, J. J. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 1361–1367 (2004).
664. Kuster, J. E., Stevenson, J. I., Ward, S. J., D’Ambra, T. E. & Haycock, D. A. Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 1352–1363 (1993).
665. Wiskerke, J. *et al.* Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 407–417 (2012).
666. Behbehani, M. M., Jiang, M. R., Chandler, S. D. & Ennis, M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* **40**, 195–204 (1990).
667. Liao, H.-T., Lee, H.-J., Ho, Y.-C. & Chiou, L.-C. Capsaicin in the periaqueductal gray induces analgesia via metabotropic glutamate receptor-mediated endocannabinoid retrograde disinhibition. *Br. J. Pharmacol. British journal of pharmacology*, 330–45 (2011).
668. Palazzo, E. *et al.* Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced

- antinociception. *Neuropharmacology* **Neuropharmacology**, 319–26 (2001).
669. Drew, G., Mitchell, V. & Vaughan, C. Glutamate spillover modulates GABAergic synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey via metabotropic glutamate receptors and endocannabinoid signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 808–15 (2008).
670. Drew, G. M., Lau, B. K. & Vaughan, C. W. Substance P drives endocannabinoid-mediated disinhibition in a midbrain descending analgesic pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 7220–7229 (2009).
671. Mitchell, V., Kawahara, H. & Vaughan, C. Neurotensin inhibition of GABAergic transmission via mGluR-induced endocannabinoid signalling in rat periaqueductal grey. *J. Physiol. The Journal of physiology*, 2511–20 (2009).
672. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **89**, 309–380 (2009).
673. Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **29**, 729–738 (2001).
674. Hentges, S. T., Low, M. J. & Williams, J. T. Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 9746–9751 (2005).
675. Park, C. *et al.* T-type channels control the opioidergic descending analgesia at the low threshold-spiking GABAergic neurons in the periaqueductal gray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14857–62 (2010).
676. Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Utzmann, R. & Schnitzler, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflamm. Res.* **44**, 423–433 (1995).
677. Shimada, S. G., Otterness, I. G. & Stitt, J. T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. *Agents Actions* **41**, 188–192 (1994).
678. Lorenzetti, B. B. & Ferreira, S. H. Mode of analgesic action of dipyrone: Direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* **114**, 375–381 (1985).
679. Rogosch, T. *et al.* Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 101–107 (2012).
680. Lensinck, M.-L. B. *et al.* Consequences of inflammatory arthritis for workplace productivity loss and sick leave: a systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 493–505 (2013).
681. Kearney, P. M. Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **332**, 1302–1308 (2006).
682. Samad, T. A., Saperstein, A. & Woolf, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol. Med.* **8**, 390–396 (2002).
683. Allison, M. C., Howatson, A. G., Torrance, C. J., Lee, F. D. & Russell, R. I. Gastrointestinal Damage Associated with the Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N. Engl. J. Med.* **327**, 749–754 (1992).
684. Basbaum, A., Bautista, D., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **127**, 267–84 (2009).
685. Julius, D. & Basbaum, A. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **402**, 203–10 (2001).

686. Kidd, B. L. & Urban, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* **87**, 3–11 (2001).
687. Welsh, D. G., Nelson, M. T., Eckman, D. M. & Brayden, J. E. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J. Physiol.* **527**, 139–148 (2000).
688. Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T. & Brayden, J. E. Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. *Circ. Res.* **90**, 248–250 (2002).
689. Knot, H. J. & Nelson, M. T. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J. Physiol.* **508**, 199–209 (1998).
690. Huguenard, J. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **Annual review of physiology**, 329–48 (1996).
691. Lory, P., Bidaud, I. & Chemin, J. T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* **40**, 135–146 (2006).
692. Sekiguchi, F. *et al.* AKAP-dependent sensitization of Ca(v) 3.2 channels via the EP (4) receptor/cyclic AMP pathway mediates prostaglandin E (2) -induced mechanical hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* (2012). doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02174.x
693. Li, Y. *et al.* β -Adrenergic Stimulation Increases Cav3.1 Activity in Cardiac Myocytes through Protein Kinase A. *PLoS ONE* **7**, e39965 (2012).
694. Lee, M. J. *et al.* KST5468, a new T-type calcium channel antagonist, has an antinociceptive effect on inflammatory and neuropathic pain models. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **97**, 198–204 (2010).
695. Gersuk, G. M., Razai, L. W. & Marr, K. A. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J. Immunol. Methods* **329**, 157–166 (2008).
696. Carvalho, F. A., Aitken, J. D., Gewirtz, A. T. & Vijay-Kumar, M. TLR5 activation induces secretory interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage. *Mucosal Immunol.* **4**, 102–111 (2011).
697. Millan, M. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* **Progress in neurobiology**, 1–164 (1999).
698. You, D. *et al.* The first gene-encoded amphibian neurotoxin. *J. Biol. Chem.* **284**, 22079–22086 (2009).
699. Wei, L. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory effects of the amphibian neurotoxin, anntoxin. *Biochimie* **93**, 995–1000 (2011).
700. King, J. N. *et al.* Preclinical pharmacology of robenacoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **32**, 1–17 (2009).
701. Lee, I. O. & Jeong, Y. S. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. *J. Korean Med. Sci.* **17**, 81–85 (2002).
702. Bianchi, M., Sacerdote, P. & Panerai, A. E. Chlomipramine differently affects inflammatory edema and pain in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **48**, 1037–1040 (1994).
703. Barton, M., Eberle, E. & Shannon, H. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur. J. Pharmacol.* **European journal of pharmacology**, 79–85 (2005).
704. Todorovic, S. M., Meyenburg, A. & Jevtovic-Todorovic, V. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res.* **951**, 336–340 (2002).
705. Rafael, J. A., Nitta, Y., Peters, J. & Davies, K. E. Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on Dmd mdx and Dmd mdx3cv dystrophin-deficient mice. *Mamm. Genome* **11**, 725–728 (2000).

706. Millan, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* **70**, 83–244 (2003).
707. Harvey, J., Wedley, S., Findlay, J. D., Sidell, M. R. & Pullar, I. A. omega-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology* **35**, 385–392 (1996).
708. Chen, Y., Yao, Y. & Penington, N. J. Effect of pertussis toxin and N-ethylmaleimide on voltage-dependent and -independent calcium current modulation in serotonergic neurons. *Neuroscience* **111**, 207–214 (2002).
709. Kitayama, M. *et al.* Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K(+)-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. Involvement of voltage-sensitive Ca(2+) channels and GABA(A) receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**, 246–253 (2002).
710. Dooley, D. J., Donovan, C. M. & Pugsley, T. A. Stimulus-dependent modulation of [(3)H]norepinephrine release from rat neocortical slices by gabapentin and pregabalin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 1086–1093 (2000).
711. Dooley, D. J., Mieske, C. A. & Borosky, S. A. Inhibition of K(+)-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci. Lett.* **280**, 107–110 (2000).
712. Katagiri, H., Kagaya, A., Nakae, S., Morinobu, S. & Yamawaki, S. Modulation of serotonin_{2A} receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **25**, 1269–1281 (2001).
713. Fink, K. *et al.* Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* **42**, 229–236 (2002).
714. Kasper, S. *et al.* Efficacy of pregabalin and venlafaxine-XR in generalized anxiety disorder: results of a double-blind, placebo-controlled 8-week trial. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **24**, 87–96 (2009).
715. Rickels, K. *et al.* Pregabalin for treatment of generalized anxiety disorder: a 4-week, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of pregabalin and alprazolam. *Arch. Gen. Psychiatry* **62**, 1022–1030 (2005).
716. Pande, A. C. *et al.* Treatment of social phobia with gabapentin: a placebo-controlled study. *J. Clin. Psychopharmacol.* **19**, 341–348 (1999).
717. Llinás, R. R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E. & Mitra, P. P. Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 15222–15227 (1999).
718. Tao, J. *et al.* Activation of corticotropin-releasing factor receptor 1 selectively inhibits CaV3.2 T-type calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1596–1609 (2008).
719. Aptel, H. *et al.* The Cav3.2/alpha1H T-type Ca²⁺ current is a molecular determinant of excitatory effects of GABA in adult sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **36**, 293–303 (2007).
720. Parent, A. J. *et al.* Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav. Brain Res.* **229**, 160–167 (2012).
721. Todorovic, S. M. & Lingle, C. J. Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* **79**, 240–252 (1998).
722. Coulter, D. A., Huguenard, J. R. & Prince, D. A. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann. Neurol.* **25**, 582–593 (1989).
723. Santarelli, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the

- behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805–809 (2003).
724. Heurteaux, C. *et al.* Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* **9**, 1134–1141 (2006).
725. Dworkin, R. H. *et al.* Interpreting the clinical importance of treatment outcomes in chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **9**, 105–121 (2008).
726. Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B. & Touboul, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* **136**, 380–387 (2008).
727. Dieleman, J. P., Kerklaan, J., Huygen, F. J. P. M., Bouma, P. A. D. & Sturkenboom, M. C. J. M. Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain* **137**, 681–688 (2008).
728. Gustorff, B. *et al.* Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **52**, 132–136 (2008).
729. Lecomte, F. *et al.* Prevalence of neuropathic pain in emergency patients: an observational study. *Am. J. Emerg. Med.* **29**, 43–49 (2011).
730. Pérez, C., Saldaña, M. T., Navarro, A., Vilardaga, I. & Rejas, J. Prevalence and characterization of neuropathic pain in a primary-care setting in Spain: a cross-sectional, multicentre, observational study. *Clin. Drug Investig.* **29**, 441–450 (2009).
731. Torrance, N., Smith, B. H., Bennett, M. I. & Lee, A. J. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **7**, 281–289 (2006).
732. Toth, C., Lander, J. & Wiebe, S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. *Pain Med. Malden Mass* **10**, 918–929 (2009).
733. Mishra, S. K. & Hermsmeyer, K. Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ. Res.* **75**, 144–148 (1994).
734. Jonas, W. B., Kaptchuk, T. J. & Linde, K. A critical overview of homeopathy. *Ann. Intern. Med.* **138**, 393–399 (2003).
735. Linde, K. & Jonas, W. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? *Lancet* **366**, 2081–2082; author reply 2083–2086 (2005).
736. Shang, A. *et al.* Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy. *Lancet* **366**, 726–732 (2005).