



**HAL**  
open science

## Intérêt des ligands alpha2-delta dans le traitement de la douleur viscérale inflammatoire.

Ludivine Boudieu

► **To cite this version:**

Ludivine Boudieu. Intérêt des ligands alpha2-delta dans le traitement de la douleur viscérale inflammatoire.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM19 . tel-01338322

**HAL Id: tel-01338322**

**<https://theses.hal.science/tel-01338322>**

Submitted on 28 Jun 2016

**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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

Année 2014

UNIVERSITÉ D'Auvergne

N° d'ordre : 19-DOC

*Ecole Doctorale Des Sciences De La Vie Et De La Sante*

## Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR D'UNIVERSITE  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité  
Physiopharmacologie

Soutenue le 14 Novembre 2014

**Ludivine BOUDIEU**

# Intérêt des ligands $\alpha_2\delta$ dans le traitement de la douleur viscérale inflammatoire

Président	Pr. Alain ESCHALIER	Université d'Auvergne, Inserm UMR 1107, Clermont-Ferrand
Membres	Pr. Denis ARDID ( <i>Directeur de thèse</i> ) Dr. Lauriane ULMANN	Université d'Auvergne, Inserm UMR 1107, Clermont-Ferrand Université de Montpellier II, CNRS UMR 5203, Montpellier
Rapporteurs	Pr. Jean Marc SABATE Dr. Laurent DIOP Dr. Nathalie VERGNOLLE	Service d'hépatogastroentérologie, AP-HP Hôpital Louis Mourier, Colombes et Université Paris Diderot, Paris VII Directeur des Affaires Scientifiques et Opérationnelles, ANS Biotech, Riom Université de Toulouse III Paul Sabatier, Inserm UMR 1043, CNRS UMR 5282, Toulouse



*Ecole Doctorale Des Sciences De La Vie Et De La Sante*

**Thèse**

Présentée à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR D'UNIVERSITE  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité  
Physiopharmacologie

Soutenue le 14 Novembre 2014

**Ludivine BOUDIEU**

**Intérêt des ligands  $\alpha_2\delta$  dans le traitement de la  
douleur viscérale inflammatoire**

Président	Pr. Alain ESCHALIER	Université d'Auvergne, Inserm UMR 1107, Clermont-Ferrand
Membres	Pr. Denis ARDID ( <i>Directeur de thèse</i> ) Dr. Lauriane ULMANN	Université d'Auvergne, Inserm UMR 1107, Clermont-Ferrand Université de Montpellier II, CNRS UMR 5203, Montpellier
Rapporteurs	Pr. Jean Marc SABATE Dr. Laurent DIOP Dr. Nathalie VERGNOLLE	Service d'hépatogastroentérologie, AP-HP Hôpital Louis Mourier, Colombes et Université Paris Diderot, Paris VII Directeur des Affaires Scientifiques et Opérationnelles, ANS Biotech, Riom Université de Toulouse III Paul Sabatier, Inserm UMR 1043, CNRS UMR 5282, Toulouse



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier vivement le Professeur Alain Eschalière de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire Neuro-Dol, et ceci dans les meilleures conditions. Je le remercie également d'avoir accepté d'être président de ce jury de thèse.

Je remercie le Docteur Nathalie Vergholle, le Professeur Jean Marc Sabaté et le Docteur Laurent Diop d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie également le Docteur Laurianne Ulmann d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements au Professeur Denis Ardid, pour avoir dirigé et encadré cette thèse. Un grand merci pour la confiance qu'il m'a accordée, pour ses précieux conseils et pour m'avoir transmis une part de ses compétences ainsi que sa rigueur scientifique.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe viscérale, grâce à qui le viscéral commence à se faire une place au laboratoire, et pour toutes ces réunions du mercredi matin (parfois houleuses, parfois juste pour se retrouver, mais toujours au rdv !). Merci à Agathe Gelot pour sa gestion sans faille de notre petite équipe, sa grande disponibilité et pour tout le « non-scientifique », merci beaucoup. Un grand merci à Frédéric Carvalho pour son regard d'expert sur « le viscéral » ! Merci à Fabien Marchand, pour son dynamisme et motivation. Merci à Tanguy Chaumette pour sa bonne humeur (mais pour qui les réunions à 9h, c'est vraiment beaucoup trop tôt !). Un merci tout particulier à Mathieu Meleine, qui a essuyé les difficultés de la mise en place de ce projet au laboratoire, et qui me l'a transmis, voilà 3 ans déjà. Merci aux cliniciens, le Dr. J. Scanzi et le Pr. M. Dapoigny, véritables experts du SII et des MICI. Un grand merci à Julien pour ces précieux conseils lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci à tous pour tout ce que vous m'avez appris et apporté durant ces quelques années. Evidemment un énorme merci à mes 2 co-thésardes, Alison Accarie, compatriote de la première heure à qui je souhaite plein de courage pour la fin qui approche et un énorme merci à Amandine Lashermes, co-bureaute et relève de la « *team viscéral* », qui a su me supporter et m'appuyer durant la rédaction de ce manuscrit (désolée d'avoir tant préoccupé ton esprit !). Un grand merci pour ton aide précieuse, je te souhaite le meilleur pour la suite aussi bien au niveau scientifique que personnel.

Un grand merci à l'équipe de techniciens et d'adjoints techniques Anne-Marie Privat, Claude Vidal, Eric Chapuy, Julie Barbier, Laetitia Prival, Maryse Chalus, Mireille Montbel et Sylvie Renaud, pour votre bonne humeur et votre gentillesse. J'ai évidemment une pensée particulière pour Monique Etienne, qui en plus de m'avoir transmis une partie de son savoir-faire (et je parle naturellement de western blot !), a vraiment été un soutien indispensable durant mes débuts au laboratoire.

## Remerciements

Merci aux « grands », Alice Corteval, Benoît Sion, Carine Chassain, Catherine Rubat-Coudert, Christine Courteix, Christophe Mallet, Claude Dubray, Damien Richard, David Balayssac, Frédéric Libert, Gisèle Pickering, Jérôme Busserolles, Julie Vein, Laurence Daulhac-Terrail (cette parenthèse durant la semaine du cerveau restera un très bon souvenir), Mélina Begou, Nicolas Authier et Youssef Ajssouni.

Merci à tous mes collègues thésards et post-doc', actuels ou passés, Amandine Dupuis, Chouki Chenaf, David Barrière, Diane Lemaire, Jérémy Ferrier, Laura Poupon, Madhy Hamieh, Maïly Devilliers, Nicolas Kerckhove, Romain Dalmann, Simon Loiodice, Stéphane Lolignier, Vanessa Pereira, et Véronique Morel. Avec une pensée particulière pour Anne Sophie Wattiez et Stéphanie Gregoire, qui m'ont initiée aux subtils rouages de ce laboratoire ! Et bien sûr à Leslie Mazuel, un grand merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, cela aura été un réel plaisir de partager ces 3 années avec toi, je te souhaite plein de bonne chose pour la suite !

Merci à Sarah Mountadem, stagiaire modèle avec qui ce fut un réel plaisir de travailler !

Merci également à Céline Silberberg, maître de stage durant mon master 1, elle a su me communiquer sa passion de la recherche et du travail bien fait. En peu de temps j'ai énormément appris grâce à toi.

J'ai évidemment une pensée émue pour tous mes amis qui ont su m'écouter, m'encourager et me soutenir durant ces 3 années.

Aux compères de l'IUT (et à leur moitié !), Finou et Nico, même si les subtilités pétrolières clermontoise sont encore une énigme pour la première et que le deuxième a hérité d'un surnom peu flatteur. Notre rituel « apéro...uno ! » restera l'un des meilleurs souvenirs de ma vie étudiante clermontoise. C'est un vrai plaisir de vous avoir gardé comme amis et même si la distance ne facilite pas les choses, j'espère vous compter dans ma vie encore longtemps... A Pauline, qui est devenue une véritable amie, nos cours de zumba et surtout nos longues discussions ont été une échappatoire indispensable durant ces dernières années. On remet sa l'année prochaine (ou pas j'espère ! )??

Aux Chaspu, copains un peu « pervers » de Xav il y a 7 ans, vous êtes aujourd'hui de véritables amis. Avec une pensée spéciale à ceux qui ont partagé notre vie clermontoise pendant quelque temps, Ju et Tib'. Nos apéros hebdomadaires, les afters et autres soirées me manquent souvent depuis que vous êtes partis, même si « notre petit » revient régulièrement visiter sa chambre ! Et bien sûr un immense merci à Thibaut pour le temps qu'il a consacré à la relecture de ce manuscrit.

A Maude et Florian, tellement de chose ont changé depuis 5 ans, le début d'une amitié, un concours réussi, un voyage en Croatie... Durant cette thèse votre soutien aura été des plus précieux, car vous le savez très bien, plus d'une semaine sans vous voir, ce n'est pas possible ! Flo, même si nos longues discussions « boulot » auront agacé notre entourage, ta passion pour la recherche

## Remerciements

m'impressionnera toujours. Maude, quelques mots sur un morceau de papier ne permettront certainement pas de te dire qu'elle amie formidable tu es, mais merci pour tout, merci d'avoir toujours été là pour moi. Une grande et profonde amitié nous lie aujourd'hui, et même si quelque mer et autres pays vont se mettre entre nous, je ne veux pas douter que nous serons toujours là les uns pour les autres.

Evidemment merci à mes parents et mon frère (bien que ce simple mot ne soit pas suffisant pour leur exprimer ma reconnaissance) sans qui je ne serai pas là aujourd'hui ! Les mots manquent souvent aux émotions, mais merci de votre soutien inconditionnel et d'avoir toujours cru en moi...

Et comment remercier correctement en quelques mots l'homme qui m'a apporté un soutien indéfectible durant ces dernières années, qui a toujours cru en moi, et qui, juste par sa présence, a toujours su me redonner le sourire et confiance en moi. Un immense merci pour ta patience et pour toute l'attention que tu me donnes. Merci d'avoir géré le « quotidien » en ce temps de rédaction. Les mots ne suffisent pas pour te dire combien je te remercie...Je sais que je ne suis pas toujours facile à vivre, mais tu as toujours été là, alors pour tous cela et bien plus encore, merci à toi...



MERCI A TOUS

## *Remerciements*

## Résumé

---

Les douleurs abdominales, reflet d'une hypersensibilité viscérale (HSV), sont l'un des premiers motifs de consultation en médecine générale et en gastro-entérologie. Ces douleurs abdominales, généralement passagères, peuvent également être causées par des pathologies sous-jacentes plus graves. Parmi ces maladies sont retrouvés notamment le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII), et les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) qui regroupent la maladie de Crohn (MC) et la RectoColite Hémorragique (RCH).

Bien que le SII et les MICI diffèrent sur de nombreux points, des facteurs communs à ces deux pathologies peuvent contribuer au symptôme majeur de ces maladies, à savoir la douleur abdominale. En effet, les facteurs environnementaux (alimentation, stress, etc.) prennent une part importante dans l'étiologie du SII, mais il s'avère aujourd'hui qu'ils participent également à l'aggravation des symptômes associés aux MICI. De même, si de nombreux polymorphismes génétiques et l'atteinte inflammatoire sont les bases de la physiopathologie des MICI, des études récentes montrent que de telles modifications peuvent également être retrouvées au cours du développement du SII (identification de gène de susceptibilité et présence de micro-inflammation). Enfin, les récentes études menées sur le microbiote intestinal mettent en évidence des perturbations de celui-ci aussi bien chez des patients atteints du SII que de MICI.

Les MICI se caractérisent par des phases d'inflammation sévère au niveau du tube digestif, pour lesquelles la pharmacopée actuelle, qui consiste à réduire cette inflammation, est plutôt satisfaisante. Ces phases sont entrecoupées par des phases dites « de rémission », durant lesquels l'HSV reste un problème chez un grand nombre de patients (environ 38%). Ces douleurs abdominales, diffuses et irradiantes, peuvent être assimilées à celles retrouvées chez les patients atteints du SII (symptômes *SII-like*). La prise en charge thérapeutique de ces douleurs est limitée, puisque basée sur d'anciens médicaments qui présentent un ratio bénéfice/risque faible.

Les antiépileptiques, sont des molécules qui ciblent l'excitabilité neuronale en modulant l'activité des canaux ioniques, de récepteurs ou encore de voies de signalisation intracellulaires. Parmi ces molécules, la gabapentine (GBP) et la prégabaline (PGB) (regroupées sous le terme de gabapentinoïdes) sont des ligands des sous-unités  $\alpha_2\delta$  des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD). Ces ligands  $\alpha_2\delta$  sont actuellement prescrits dans le cadre de douleurs neuropathiques, au même titre que les antidépresseurs, qui sont également utilisés pour le traitement de l'HSV.

Concernant les douleurs d'origine viscérale, les données actuelles concernent uniquement le traitement de l'HSV associée au SII. Deux études cliniques montrent un bénéfice de la GBP ou de la

PGB sur les symptômes associés au SII. Ces données ont également été retrouvées en préclinique sur différents modèles animaux d'HSV non-inflammatoire. De plus, des effets antalgiques de ces molécules ont été mis en évidence sur des modèles de douleur inflammatoire somatique, mais aucune étude ne s'est penchée sur le potentiel effet bénéfique de ces ligands sur des modèles de douleur inflammatoire d'origine viscérale ou chez des patients souffrant de MICI durant les périodes de rémission en particulier.

Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été d'évaluer l'efficacité de la GBP et de la PGB dans un modèle murin de douleur viscérale inflammatoire, comparativement à un modèle non-inflammatoire (induits respectivement par un traitement au Dextran Sulfate Sodium 1% durant 14 jours et par stress néonatal de séparation maternelle). La sensibilité des animaux a été évaluée par le test de distension colorectale (DCR), et a révélé que ces ligands (et particulièrement la PGB), présentaient une meilleure efficacité dans le contexte inflammatoire. Ces données ont conduit à l'évaluation des paramètres inflammatoires (score histologique, dosages de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques et coliques et activité myéloperoxydase). Les résultats obtenus, bien qu'encourageants étaient pour la plupart non significatifs. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il est aujourd'hui admis que ces molécules ont une meilleure efficacité après traitement chronique.

Le deuxième objectif de cette thèse a été de mesurer le potentiel anti-inflammatoire des ligands  $\alpha_2\delta$  lors d'injections chroniques, sur modèle d'HSV inflammatoire (DSS 1%). En plus de l'effet antihyperalgique, ces molécules diminuent significativement tous les marqueurs inflammatoires qui ont été évalués. Cet effet anti-inflammatoire a ensuite été confirmé sur un autre modèle de douleur viscérale inflammatoire, le modèle de cystite induit au cyclophosphamide (CYP), mais également *in vitro* sur des cultures primaires de macrophages péritonéaux (PEC) et sur une lignée de cellules épithéliales murines immortalisées (MODE-K). La meilleure efficacité des ligands  $\alpha_2\delta$  dans le modèle d'HSV inflammatoire (par rapport au modèle au non-inflammatoire) peut donc s'expliquer par une potentialisation de l'effet antalgique de ces molécules par leur effet anti-inflammatoire.

Enfin, dans un troisième temps s'est posée la question des mécanismes intracellulaires pouvant sous-tendre cet effet anti-inflammatoire. Des études récentes ont montré, *in vitro*, que les ligands  $\alpha_2\delta$  pouvaient interagir avec la voie de signalisation intracellulaire NF- $\kappa$ B (voie majeure de l'inflammation). De plus, une autre étude a montré que les concentrations en calcium intracellulaire étaient un élément majeur de l'activation de cette voie de signalisation. Ainsi l'hypothèse émise est qu'en se fixant aux sous-unités  $\alpha_2\delta$ , les gabapentinoïdes entraînaient une diminution de l'activité de canaux calciques voltage-dépendants associés à ces sous-unités. Ceci a pu être confirmé *in vitro*, puisque des diminutions des concentrations en calcium intracellulaire ont été mises en évidence sur des cultures de PEC suite à un traitement aux gabapentinoïdes. De plus, une moindre activation de la

voie NF- $\kappa$ B a pu être démontrée *in vitro* et *in vivo* après traitement à la PGB. Ces molécules ont également montré la capacité à bloquer l'augmentation de l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 induite par une HSV inflammatoire (au niveau colique ou vésical). Enfin, une surexpression de cette sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 a pu être mise en évidence sur des biopsies coliques de patients atteints du SII, confirmant ainsi l'intérêt clinique de l'utilisation des gabapentinoïdes.

En conclusion, ces travaux de thèse ont montré le potentiel antalgique des ligands  $\alpha_2\delta$  au niveau viscéral dans différents contextes inflammatoires (colite et cystite). De plus, ces molécules ont montré la capacité à réduire l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 des canaux calciques voltage-dépendants, permettant ainsi de limiter l'augmentation des concentrations en calcium intracellulaires. La baisse intracellulaire de calcium permet alors une moindre activation de la voie NF- $\kappa$ B, et donc une diminution de la transcription de ces gènes cibles (tels que ceux codant pour les cytokines pro-inflammatoires). De plus, ces ligands  $\alpha_2\delta$  entraînent une diminution de la sensibilisation des fibres afférentes primaires, principalement grâce à la diminution des flux calciques. Enfin ces mécanismes périphériques sont transposables au niveau du SNC, puisque la barrière hémato encéphalique est perméable aux ligands  $\alpha_2\delta$ , et que leur action au niveau central est plus largement décrite. Ainsi, la diminution de la transmission de l'influx nerveux, couplée à une diminution de la réponse inflammatoire, confère à ces molécules un fort pouvoir antalgique en condition inflammatoire. Il serait maintenant intéressant de tester l'efficacité de ces molécules chez des patients souffrant du SII présentant une micro-inflammation et chez les patients en phase de rémission de MICI.

**Mots-Clés :** Douleur viscérale, hypersensibilité colique, inflammation, ligands  $\alpha_2\delta$ , Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, NF- $\kappa$ B, Syndrome de l'Intestin Irritable.

## Abstract

---

Abdominal pain, which can reflect visceral hypersensitivity (VHS), is one of the primary reasons for consultations in general medicine and gastroenterology. These abdominal pain, usually transient, can also be caused by more serious underlying pathologic conditions, such as irritable bowel syndrome (IBS) and chronic inflammatory bowel disease (IBD), which include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).

Although IBS and IBD differ on many points, common factors to these two conditions may contribute to the major symptoms of these intestinal disorders, the abdominal pain. Indeed, environmental factors (diet, stress) play an important part in the etiology of IBS, but it turns out today that they are also involved in the worsening of symptoms associated with IBD. Similarly, if many genetic polymorphisms and inflammatory disorders are the basis of the IBD pathogenesis, recent studies show that such changes can also be found in the development of IBS (identification of susceptibility gene and the presence of micro-inflammation). Finally, recent studies on intestinal microbiota reveal some disturbances, called dysbiosis, as well in IBS or IBD patients.

Inflammatory bowel disease is characterized by short phases of severe intestinal inflammation, for which the current pharmacopoeia consisting of reducing this inflammation is rather satisfactory. These phases are interspersed with so-called "remission" phase, during which the VHS remains a problem for many patients (about 38%). These abdominal, diffuse and radiating pain can be similar to the one observed in IBS patients. The therapeutic management of this pain is limited, as it is based on old drugs that are of low benefit / risk ratio.

Antiepileptics are molecules that target neuronal excitability by modulating the activity of ion channels, receptors or intracellular signaling pathways. Among these molecules, gabapentin (GBP) and pregabalin (PGB) (grouped under the term gabapentinoids) are ligands of the  $\alpha_2\delta$  subunit for voltage gated calcium channel (VGCC). These  $\alpha_2\delta$  ligands are currently prescribed for neuropathic pain, as well as antidepressants, which are also used for the treatment of VHS.

About visceral pain, current data only relate to the treatment of VHS associated with IBS. Two clinical studies show a profit of GBP or PGB on symptoms associated with IBS. These data have also been found in preclinical animal models of various non-inflammatory VHS. In addition, the analgesic effects of these molecules is been highlighted on somatic inflammatory pain models, but no study is looking into the potential beneficial effect of these ligands on models of inflammatory visceral pain or in patients with IBD.

The first aim of this work was therefore to evaluate the effectiveness of GBP and PGB in a mouse model of inflammatory visceral pain compared to a non-inflammatory model (induced by treatment with DSS 1% respectively during 14 days and neonatal maternal separation stress). The sensitivity of the animals was evaluated by the test of colorectal distension (CRD), and found that these ligands (particularly PGB), showed better efficacy in inflammatory conditions. These data led to the evaluation of the inflammatory parameters (histological score, plasma assays and proinflammatory cytokines and colonic myeloperoxidase activity). The results, while promising, were not significantly different between PGB-treated and untreated mice. This can be explained by the fact that it is now accepted that these molecules have a better efficacy after chronic treatment.

The second objective of this PhD was to measure the anti-inflammatory potential of  $\alpha_2\delta$  ligands after repeated injection on inflammatory VHS model (DSS 1%). In addition to the antihyperalgesic effect, these molecules significantly decreased all assessed inflammatory markers. This anti-inflammatory effect was then confirmed with another model of inflammatory visceral pain model, a cystitis model induced with cyclophosphamide (CYP), but also *in vitro* on primary cultures of peritoneal exudate cells (PECs) and an immortalized epithelial murine cell line (MODE-K). The best efficiency of  $\alpha_2\delta$  ligands in the inflammatory VHS model (compared to non-inflammatory VHS model) can be explained by an analgesic effect potentiation of these molecules thanks to their anti-inflammatory effect.

Finally, the third goal of this work has been to investigate the question of intracellular mechanisms that may underlie this anti-inflammatory effect. Recent *in vitro* studies have shown that  $\alpha_2\delta$  ligands could interact with NF- $\kappa$ B intracellular signaling pathway (the major inflammatory pathway). In addition, another study showed that the intracellular calcium concentration was a major element for the activation of this signaling pathway. Thus, we hypothesized that, binding  $\alpha_2\delta$  subunits, gabapentinoids induced a decrease in the activity of voltage-gated calcium channels associated with these subunits. This could be confirmed *in vitro*, since decreases in intracellular calcium concentrations were identified on PECs following gabapentinoids treatment. Furthermore, reduced activation of the NF- $\kappa$ B pathway has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* after PGB treatment. These molecules have also shown the ability to block the increase expression of the  $\alpha_2\delta$ -1 subunit to the membrane associated with inflammatory VHS (at the bladder or colon level). Finally, overexpression of this  $\alpha_2\delta$ -1 subunit could be detected on colonic biopsies of IBS patients, confirming the clinical relevance of using gabapentinoids.

In conclusion, this PhD showed the potential analgesic effect of  $\alpha_2\delta$  ligands at the visceral level in different inflammatory conditions (colitis and cystitis). In addition, these molecules have shown

the ability to reduce the expression at the membrane of the  $\alpha_2\delta$ -1 subunit, thus limiting the increase in intracellular calcium concentration. The intracellular calcium decrease then induces a reduced activation of NF- $\kappa$ B pathway, and thus a reduction in transcription of its target genes (such as those encoding pro-inflammatory cytokines). Moreover, these  $\alpha_2\delta$  ligands lead to decreased sensitization of primary afferent fibers, mainly due to the decrease in calcium influx. Finally, these peripheral mechanisms can be transposed to the CNS, since the blood-brain barrier is permeable to  $\alpha_2\delta$  ligands, and their action at the central level is more widely reported. Thus, the decrease transmission of nerve impulses, coupled with a decrease in the inflammatory response, gives these molecules a strong analgesic power in inflammatory condition. It would now be interesting to test the effectiveness of such molecules in patients suffering from IBS and presenting a micro- inflammation or in IBD patients in remission.

**Keywords :**  $\alpha_2\delta$  ligands, colonic hypersensitivity, inflammation, Inflammatory Bowel Disease, Irritable Bowel Syndrome, NF- $\kappa$ B pathway, visceral pain.

## Contributions Scientifiques

---

### Liste des publications :

■ *Blocking of NF- $\kappa$ B activation by  $\alpha_2\delta$  ligands reduces colonic inflammatory-associated hypersensitivity in mice*

Meleine M\*, Boudieu L\*, Gelot A, Muller E, Sielberberg C, Ulmann L, Rassendren F, Theodorou V, Carvalho F, Ardid D.

Article soumis (Annexe 3)

■ *Targeting Ca<sub>v</sub>3.2 calcium channels to treat inflammation and related pain*

Kerckove N, Boudieu L, Bourdier J, François A, Carvalho F, Ardid D, Bourinet E, Eschalier A, Mallet C.

Article soumis (Annexe 4)

### Liste des communications :

■ *Potential interest of  $\alpha_2\delta$ -1 ligands in the treatment of visceral inflammatory-associated Hypersensitivity*

Boudieu L, Meleine M, Carvalho FA, Gelot A, Ardid D.

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Bordeaux (2014)

■ *Gabapentinoïds and Visceral Pain*

Boudieu L, Meleine M, Carvalho FA, Gelot A, Ardid D.

Xème symposium National du Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, Montpellier (2014)

■ *Les ligands  $\alpha_2\delta$ 1 présentent-ils un intérêt dans le traitement de la douleur viscérale ?*

Boudieu L, Meleine M, Carvalho FA, Muller E, Gelot A, Ardid D.

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Grenoble (2013)

■ *Développement de modèles murins d'hypersensibilité colique et exploration de nouvelles pistes thérapeutiques : Effet des Ligands  $\alpha_2\delta$*

Meleine M, Boudieu L, Carvalho FA, Muller E, Gelot A, Ardid D.

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Clermont-Ferrand, France (2012)

■ *Implication des canaux calciques voltage-dépendants  $Ca_v3.2$  dans l'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire.*

Boudieu L, Meleine M, Chretien E, Gelot A, Ardid D

Journée de la recherche – IFR79 Santé Auvergne, Clermont-Ferrand, France (2011)

### **Liste des posters :**

■ *Chronic treatment with  $\alpha_2\delta-1$  ligand reduces colonic inflammation and inflammatory-associated hypersensitivity in mice. (Sélection Prix Poster)*

Boudieu L, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Carvalho FA, Ardid D.

United European Gastroenterology Week (UEGW), Berlin, Allemagne (2013)

■  *$Ca_v3.2$  T-type calcium channels and inflammatory pain*

Kerckhove N, Boudieu L, Carvalho F, Alloui A, Uebele V, Renger J, Gelot A, Bourinet E, Mallet C, Eschalier A.

Congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique (P2T), Anger, France (2013)

■ *Alpha 2 Delta ( $\alpha_2\delta$ ) ligands are more effective to decrease inflammatory than non inflammatory colonic hypersensitivity in mice.*

Boudieu L, Meleine M, Carvalho FA, Muller E, Silberberg C, Gelot A, Ardid D.

14th World Congress on Pain, Milan, Italie (2012)

■ *Implication des canaux calciques voltage-dépendants  $Ca_v3.2$  dans l'hypersensibilité inflammatoire colique.*

Boudieu L, Meleine M, Chretien E, Gelot A, Ardid D.

4<sup>ème</sup> journée scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France (2011)

### **Enseignement et encadrement :**

■ *Enseignante contractuelle à l'Institut Universitaire de Technologie(IUT)*

Travaux pratiques de biologie moléculaire (64h par an, durant 3 ans)

■ *Encadrant de stages*

Amandine Lashermes (Master1) ; Maud Target (3<sup>ème</sup> année de Licence), Sarah Mountadem (2<sup>ème</sup> année d'IUT) et Floriane Serre (2<sup>ème</sup> année de BTS)

*\*Sommaire*

*\*Liste des abréviations*

*\*Liste des figures et tableaux*

*\*Préambule*



## Sommaire

---

Liste des abréviations.....	6
Liste des figures et tableaux.....	8
Préambule.....	11
<b>Revue Bibliographique.....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre A : Hypersensibilité viscérale et pathologies coliques .....</b>	<b>15</b>
A.I : Les pathologies coliques .....	15
A.I.a. Définition, épidémiologie, symptômes et diagnostic .....	15
A.I.a.1 : Le Syndrome de l'Intestin Irritable : SII .....	15
A.I.a.2 : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : MICI.....	18
A.I.c. Etiologie et facteurs de prédispositions .....	20
A.I.c.1 : Le syndrome de l'Intestin Irritable : SII.....	21
A.I.c.2 : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : MICI.....	24
A.II : Hypersensibilité colique : acteurs et mécanismes .....	29
A.II.a. Introduction.....	29
A.II.b : Acteurs potentiellement impliqués dans l'hypersensibilité viscérale .....	31
A.II.b.1 : Modifications de la flore commensale.....	31
A.II.b.2. Perturbation de la barrière épithéliale .....	32
A.II.b.3 : Les médiateurs de la réponse inflammatoire et des phénomènes de sensibilisation périphérique .....	35
A.II.b.4 : Les cellules du système immunitaire .....	39
A.II.c : Mécanismes de l'hypersensibilité viscérale .....	45
A.II.c.1. Récepteurs et canaux ioniques .....	45
A.II.c.2. Innervation .....	49
A.III : Les traitements.....	54
A.III.a. Les traitements des symptômes associés au SII.....	54
A.III.a.1 : Les traitements non pharmacologiques.....	54
A.III.a.2 : Les traitements pharmacologiques du transit intestinal, du ballonnement et de la distension .....	55
A.III.a.3 : Les traitements pharmacologiques de l'hypersensibilité viscérale .....	58
A.III.a.4 : Les molécules en cours de développement .....	59
A.III.b. Les traitements des symptômes associés aux MICI .....	60

A.III.b.1 : Les traitements non pharmacologiques .....	60
A.III.b.2 : Les traitements pharmacologiques.....	61
A.III.b.3 : La chirurgie.....	64
A.III.b.4 : Les molécules en cours de développement.....	65
<b>Chapitre B : Intérêt de la modulation de la sous-unité <math>\alpha_2\delta</math> .....</b>	<b>66</b>
B.I : Généralités sur la sous-unité $\alpha_2\delta$ .....	66
B.I.a. Rappel sur les canaux calciques voltage-dépendants $Ca_v$ .....	66
B.I.a.1 Généralités .....	66
B.I.a.2 Description .....	67
B.I.b. La sous-unité $\alpha_2\delta$ .....	71
B.I.b.1 Structure de la sous-unité $\alpha_2\delta$ .....	71
B.I.b.2 Fonction de la sous-unité $\alpha_2\delta$ .....	71
B.I.b.3. Distribution et couplage des sous-unités $\alpha_2\delta$ .....	72
B.II : Intérêt de la modulation fonctionnelle des $Ca_v$ par le blocage de la sous-unité $\alpha_2\delta$ .....	73
B.II.a : Expression des $Ca_v$ et hypersensibilité .....	73
B.II.a.1 Effet de l'hypersensibilité sur l'expression des $Ca_v$ .....	74
B.II.a.2 Effet de la modulation des $Ca_v$ sur l'hypersensibilité .....	75
B.II.b : Effet de l'hypersensibilité sur l'expression des sous-unités $\alpha_2\delta$ .....	78
B.II.c : Effet de la modulation des sous-unités $\alpha_2\delta$ sur l'hypersensibilité .....	79
B.II.b.1 : Modulation génétique des sous-unités $\alpha_2\delta$ .....	79
B.II.b.2 Modulation pharmacologique de la sous-unité $\alpha_2\delta$ par les gabapentinoïdes.....	81
<b>Chapitre C : Objectifs .....</b>	<b>87</b>
<b>Données expérimentales.....</b>	<b>89</b>
<b>Chapitre A : Effets des ligands <math>\alpha_2\delta</math> dans des modèles de douleur viscérales non-inflammatoire et inflammatoire .....</b>	<b>91</b>
A.I : Modèle d'HSC non inflammatoire et effet des ligands $\alpha_2\delta$ .....	91
A.I.a Description du modèle d'HSC non-inflammatoire induit par stress néonatal.....	91
A.I.b. : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur la réponse à la distension colrectale dans un modèle d'HSC non-inflammatoire .....	92
A.II : Modèle d'HSC inflammatoire et effet des ligands $\alpha_2\delta$ .....	93
A.II.a : Description du modèle d'HSC inflammatoire induit par le DSS .....	93
A.II.c : Effet de la PGB sur la réponse à la DCR .....	93
<b>Chapitre B : Effet des ligands <math>\alpha_2\delta</math> sur les paramètres inflammatoires .....</b>	<b>95</b>

B.I : Evaluation de l'effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans le modèle d'HSC inflammatoire.....	95
B.I.a Effet de l'injection aiguë de ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans un modèle DSS.....	95
B.I.b Effet d'injections chroniques de ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans un modèle DSS.....	96
B.I.b.1. Présentation du protocole et résultats de la DCR.....	96
B.I.b.2. Effets d'injections chronique de PGB sur les paramètres inflammatoires .....	97
B.II : Validation de l'effet anti-inflammatoire de la PGB sur un autre modèle de douleur viscérale inflammatoire : la cystite.....	102
B.II.a : Présentation du modèle et résultats comportementaux.....	102
B.II.a.1 : Présentation du modèle .....	102
B.II.a.b : Effet de l'injection de PGB sur l'hypersensibilité vésicale induite par le CYP .....	103
B.II.b : Les paramètres inflammatoires .....	103
B.II.b.1 : Les paramètres anatomiques.....	104
B.II.b.2 : Les marqueurs inflammatoires .....	104
B.III : Validation cellulaire.....	106
B.III.a : Présentation des cultures cellulaires.....	106
B.III.b : Dosage de cytokines.....	106
<b>Chapitre C : Etude du mécanisme d'action des ligands <math>\alpha_2\delta</math>.....</b>	<b>108</b>
C.I : Introduction.....	108
C.I.a : Revue bibliographique.....	108
C.I.a.1 : Effet anti-inflammatoire des gabapentinoïdes, un début d'explication ? .....	108
C.I.a.2 : Généralités sur la voie NF- $\kappa$ B .....	109
C.I.b : Hypothèse de travail .....	111
C.II : Localisation de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 .....	111
C.III : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur les concentrations en calcium intracellulaire.....	112
C.VI : Influence des ligands $\alpha_2\delta$ sur l'activité de la voie NF- $\kappa$ B.....	113
<b>Chapitre D : Validation clinique.....</b>	<b>116</b>
D.I. Introduction .....	116
D.II. Analyses des biopsies.....	116
<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>117</b>
<b>Chapitre A : Effets antinociceptifs des ligands <math>\alpha_2\delta</math> .....</b>	<b>119</b>
A.1 Observations comportementales.....	119

A.2 Modulation de la transmission nociceptive par les ligands $\alpha_2\delta$ .....	121
A.2.a. Action des ligands $\alpha_2\delta$ sur les fibres afférentes primaires.....	121
A.2.b. Action des ligands $\alpha_2\delta$ au niveau spinal.....	122
A.2.c. Action des ligands $\alpha_2\delta$ au niveau supraspinal .....	123
<b>Chapitre B : Effets anti-inflammatoires des ligands <math>\alpha_2\delta</math>.....</b>	<b>126</b>
B.1 Observations <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	126
B.1.a. Données <i>in vivo</i> .....	126
B.1.b. Données <i>in vitro</i> .....	127
B.2 La voie NF- $\kappa$ B .....	129
B.3 Protocoles cliniques .....	130
B.3.a : Protocole clinique n°1 .....	130
B.3.2 : Protocole clinique n°2 .....	132
<b>Chapitre C : Mécanismes d'action des ligands <math>\alpha_2\delta</math> .....</b>	<b>133</b>
C.1 Effets des ligands $\alpha_2\delta$ sur les concentrations en calcium intracellulaire .....	133
C.2 Effet des gabapentinoïdes sur l'expression membranaire de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 .....	135
C.3 Ligands $\alpha_2\delta$ et sous unités $\alpha_1$ .....	137
C.4 Ligands $\alpha_2\delta$ et sous-unité $\alpha_2\delta$ -2 .....	137
<b>Chapitre D : Conclusion générale .....</b>	<b>139</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>141</b>
<b>Chapitre A : Tests comportementaux .....</b>	<b>143</b>
A.I : Evaluation de la sensibilité colique : test de distension colorectale.....	143
A.I.a. Implantation des électrodes .....	143
A.I.b. Distension ColoRectale : DCR.....	144
A.II. : Evaluation de la douleur vésicale référée : Von Frey.....	145
A.III : Evaluation de l'activité locomotrice : Actimétrie.....	146
<b>Chapitre B : Evaluation de l'inflammation .....</b>	<b>146</b>
B.I : Score DAI : <i>Disease Activity Index</i> .....	146
B.II : <i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i> : ELISA .....	147
B.III : Dosage de l'activité enzymatique de la myéloperoxydase .....	148
B.IV : Analyse histologique .....	148
B.IV.a : Fixation des tissus .....	148
B.IV.b : Inclusion et coupe des tissus .....	148
B.IV.c : Coloration Hématoxyline / Eosine.....	149

B.IV.d : Analyses des images et score histologique .....	149
<b>Chapitre C : Analyse protéique .....</b>	<b>150</b>
C.I Extraction protéique et Western Blot .....	150
C.I.a : Extraction protéique totale .....	150
C.I.b : Extraction protéique différentielle.....	150
C.I.c : Dosage et dénaturation des protéines .....	151
C.I.d : Western Blot .....	151
C.I.e : Destripping .....	152
C.II : Immunohistochimie .....	152
<b>Chapitre D : Cultures Cellulaires.....</b>	<b>153</b>
D.I : Les macrophages péritonéaux : <i>Peritoneal exudates cells</i> : PEC's.....	153
D.I.a : Mise en culture .....	153
D.I.b : Traitements.....	153
D.I.c : Imagerie calcique .....	153
D.II : Les MODE-K.....	154
<b>Chapitre E : Analyses Statistiques.....</b>	<b>154</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>155</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>157</b>
Evaluation de l'impact moteur de prégabaline par le test d'actimétrie .....	157
<b>Annexe 2.....</b>	<b>158</b>
Modèle chronique de cystite et évaluation de l'effet antinociceptif de la prégabaline par le test de Von Frey abdominal .....	158
A.I : Effets de l'injection chronique de PGB sur l'HS viscérale induite par le CYP .....	158
A.II : Paramètres inflammatoires.....	159
<b>Annexe 3 : Article 1 .....</b>	<b>161</b>
Blocking of NF- $\kappa$ B Activation By $\alpha$ 2 $\delta$ Ligands Reduces C $\delta$ lonic Inflammatory-Associated Hypersensitivity in Mice. ....	161
<b>Annexe 4 : Article 2 .....</b>	<b>173</b>
Targeting Cav3.2 calcium channels to treat inflammation and related pain .....	173
<b>Glossaire.....</b>	<b>187</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>193</b>

## Liste des Abréviations

---

5-ASA	acide -5-aminosalicylique	<b>E</b>	
5-HT	5-hydroxytryptamine	ECC	Cellule entérochromaffine
6-MP	6-mercaptopurine	ECCO	<i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>
<b>A</b>		ECP	Protéines Cationiques de l'Eosinophile
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>	EDN	Neurotoxine Dérivée de l'Eosinophile
Ac	Anticorps	EPO	Peroxydase de l'Eosinophile
AINS	Anti-inflammatoire Non Stéroïdien	<b>F</b>	
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	FMT	Transplantation de Microbiote Fécal
ASIC	<i>Acid-Sensing Ion Channel</i>	FODMAP	<i>Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, And Polyols</i>
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	<b>G</b>	
ARNsi	Acide RiboNucléique interférent ( <i>small interfering</i> )	GBP	Gabapentine
ATC	Antidépresseur tricyclique	GCC	Guanylate Cyclase de type C
AZA	Azathioprine	GIQLI	<i>Gastro-intestinal Quality of Life Index</i>
<b>B</b>		GMPC	Guanosine Monophosphate cyclique
BCG	Bacille de Calmette et Guérin	GRD	Ganglions Rachidiens Dorsaux
BCR	Récepteur des Cellules B	<b>H</b>	
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	HS	Hypersensibilité
<b>C</b>		HSC	Hypersensibilité Colique
Ca <sub>v</sub>	Canaux calcique voltage-dépendants	HSV	Hypersensibilité Viscérale
CCI	<i>Chronic Constriction Injury</i>	HVA	<i>High Voltage Activated</i>
CCK	Cholecystokinine	<b>I</b>	
CCVD	Canaux Calcique Voltage-Dépendants	Ig	Immunoglobuline
CD	Cellule Dendritique	IkBa	Inhibitor of $\kappa$ Ba
CEACAM6	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6</i>	IKK	IkB Kinase
CFA	<i>Compleat Freund's Adjuvant</i>	IL-x	Interleukine-x
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	ip.	Intra péritonéale
COX-2	Cyclo-Oxygénase-2	IRSS	Inhibiteur Spécifique de la Recapture de la Sérotonine
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène	<b>K</b>	
CSD	<i>Chemosensory-like Domains</i>	KO	<i>Knockout</i>
CYP	Cyclophosphamide	k <sub>v</sub>	Canaux potassique voltage-dépendants
<b>D</b>		<b>L</b>	
Da	Dalton	LCN-2	Lipocaline-2
DAI	<i>Disease Activity Index</i>	LIE	Lymphocytes Intra-Epithéliaux
DBTC	Dibutyltin dichloride	LPS	Lipopolisaccharide
DCR	Distension Colorectale	LT	Lymphocyte T
DO	Densité Optique	LVA	<i>Low Voltage Activated</i>
DSS	Dextran Sulfate Sodium		

**M**

MEp	Moelle Epinière
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MIDAS	<i>Metal Ion-Dependent Adhesion Site</i>
MODE-K	<i>Murine duodenal epithelial cell clone K</i>
MPO	Myéloperoxydase

**N**

NANC	Non Adrénergique Non Cholinergique
Na <sub>v</sub>	Canaux sodiques voltage-dépendants
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKA	Neurokinine A
NKB	Neurokinine B
NK	Cellule <i>Natural Killer</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLR	<i>NOD-Like-Receptor</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
NO	<i>Nitric Oxyde</i>
NOD2	<i>Nucleotide Oligomerisation Domain 2</i>
NOS	<i>Nitric Oxyde Synthase</i>
NT	Neurotrophine

**P**

PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PAR	Récepteur à activité protéase
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PEC's	<i>Peritoneal exudates cells</i>
PG	Prostaglandine
PGB	Prégabaline
PKC	Protéine kinase C

**R**

RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
ROR	Rougeole-Oreillons-Rubéole

**S**

sc.	Sous cutanée
SERT	<i>Serotonin Transporter</i>
SII	Syndrome de l'Intestin Irritable
SII-C	Syndrome de l'Intestin Irritable à dominance Constipatoire
SII-D	Syndrome de l'Intestin Irritable à dominance Diarrhéique
SII-M	Syndrome de l'Intestin Irritable Mixte
SII-PI	Syndrome de l'intestin Irritable Post-Infectieux
SNL	<i>Sciatic Nerve Ligation</i>
SNE	Système Nerveux Entérique
SOCC	<i>Store-Operated Calcium Channel</i>
SP	Substance P

**T**

Tc	Lymphocyte T cytotoxique
TCR	Récepteur des Cellules T
Th	Lymphocyte T <i>helper</i>
Threg	Lymphocyte T <i>helper</i> régulateur
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNBS	acide 2,4,6-tri-nitro-benzène-sulfonique.
TRP	<i>Tansient Receptor Potential</i>

**V**

VMR	<i>Visceromotor response</i>
VWA	<i>von Willebrand factor A</i>

**W**

WDR	<i>Wide Dynamic Range</i>
-----	---------------------------

**Z**

ZO	<i>Zonula Occludens</i>
----	-------------------------

## Liste des Figures et Tableaux

---

Figure 1 : Impact du Syndrome de l'Intestin Irritable sur la qualité de vie. ....	16
Figure 2 : Représentation spatio-temporelle de la composition bactérienne du tractus gastro-intestinal.....	23
Figure 3 : Facteurs impliqués dans le Syndrome de l'intestin irritable .....	24
Figure 4 : Gènes portant des <i>loci</i> de susceptibilité pour les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin... ..	25
Figure 5 : Phylum bactériens identifiés dans le microbiote humain .....	28
Figure 6 : Physiopathologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. ....	29
Figure 7 : Structure de la paroi intestinale .....	30
Figure 8 : Composition cellulaire de la barrière épithéliale intestinale .....	32
Figure 9 : Trois familles de jonctions intra-épithéliales. ....	33
Figure 10 : Représentation schématique des cellules et médiateurs de la réponse inflammatoire, de leurs récepteurs cibles. ....	35
Figure 11 : Médiateurs de la réponse inflammatoire .....	36
Figure 12 : Activation de la réponse immunitaire .....	40
Figure 13 : Cellules du système immunitaire (inné et adaptatif) et dérèglement dans le cadre de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) : maladie de Crohn ( <i>Crohn's Disease</i> ) et rectocolite hémorragique ( <i>Ulcerative colitis</i> ).....	43
Figure 14 : Activation des récepteurs et des canaux, <i>via</i> les médiateurs inflammatoires, conduisant à une activation des nocicepteurs .....	45
Figure 15 : Innervation neurale intrinsèque et extrinsèque et niveaux de contrôle de la fonction gastro-intestinale. ....	50
Figure 16 : Structure des canaux calcique voltage-dépendants. ....	68
Figure 17 : Vue d'ensemble de l'effet des sous-unités auxiliaires $\alpha_2\delta$ et $\beta$ sur le recyclage des canaux calciques voltage-dépendants CCVD. ....	71
Figure 18 : Rôle de la sous-unité $\alpha_2\delta-1$ dans la synaptogenèse excitatrice. ....	72
Figure 19 : Distribution et rôles des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) au niveau neuronal.....	73
Figure 20 : Site de fixation des ligands $\alpha_2\delta-1$ sur les canaux calciques de type L .....	85
Figure 21 : Efficacité de la prégabaline (a.) et de la gabapentine (b.) chez des animaux neuropathiques (CCI) sauvages (côlonne de gauche) et R217A (côlonne de droite). ....	85
Figure 22 : Effet de la GBP sur le recyclage des canaux calciques voltage-dépendants. ....	86
Figure 23 : Modèle d'HSC non inflammatoire : protocole d'induction du modèle et d'évaluation de la sensibilité .....	91
Figure 24 : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur l'hypersensibilité colique non inflammatoire.....	92
Figure 25 : Modèle d'HSC inflammatoire : protocole d'induction du modèle et d'évaluation de la sensibilité. ...	93
Figure 26 : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur l'hypersensibilité colique inflammatoire. ....	94
Figure 27 : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur l'IL-6 plasmatique dans le modèle d'HSC induite par le DSS. ....	95

Figure 28 : Modèle d’HSC induit au DSS1% et protocole d’administration de la PGB .....	96
Figure 29 : Effet de la PGB sur l’HSC inflammatoire.....	96
Figure 30 : Evaluation de l’état général des animaux par mesure du score DAI ( <i>Disease Activity Index</i> ).....	97
Figure 31 : Effet d’un traitement chronique à la PGB sur un marqueur précoce d’inflammation, la lipocaline-2 (LCN-2), dans le modèle DSS d’HSC.....	98
Figure 32 : Evaluation des modifications anatomiques induites par le DSS. ....	99
Figure 33 : Effet d’un traitement chronique à la PGB sur les paramètres inflammatoires coliques dans le modèle d’HSC induit par le DSS.....	100
Figure 35 : Effet d’un traitement chronique à la PGB sur un paramètre inflammatoire systémique dans le modèle d’HSC induite par le DSS.....	101
Figure 34 : Examen et score histologique des côlons. ....	101
Figure 36 : Modèle de cystite induit par le cyclophosphamide et protocole d’administration de la PGB.....	102
Figure 37 : Effet de la PGB sur l’hypersensibilité mécanique dans un modèle de cystite induit par le cyclophosphamide. ....	103
Figure 38 : Effet de la PGB sur les paramètres anatomiques dans le modèle d’HSV induite par le CYP.....	104
Figure 39 : Effet de la PGB sur les paramètres inflammatoires tissulaires et plasmatiques dans le modèle d’HSV induite par le CYP. ....	105
Figure 40 : Effet de la PGB sur la production de cytokines IL-6 et KC dans 2 types de cellules stimulées au LPS. ....	106
Figure 41 : Voies d’activation du complexe NF-κB. ....	110
Figure 42 : Effet de la PGB sur la localisation de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 dans un modèle d’HSC induit au DSS. ....	112
Figure 43 : Effet de la PGB sur la réponse calcique de macrophages péritonéaux stimulés au LPS .....	113
Figure 44 : Effet de la PGB sur l’expression protéique d’IκB $\alpha$ et sur la phosphorylation de p65 dans deux modèles d’hypersensibilité viscérale inflammatoire. ....	114
Figure 45 : Effet de la PGB sur l’activation par le LPS de la voie NF-κB.....	115
Figure 46 : Analyse semi-quantitative par Western Blot de l’expression de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 sur des biopsies coliques de patients atteints du SII et de patients sains. ....	116
Figure 47 : Effets comportementales des ligands $\alpha_2\delta$ .....	121
Figure 48 : Immunomarquage de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 sur une coupe sagittale de cerveau de rat. ....	124
Figure 49 : Etudes des voies nerveuses potentiellement impliquées dans le mécanisme d’action des ligands $\alpha_2\delta$ . ....	125
Figure 50 : Dosage semi-quantitatif de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1 sur différents tissus, par Western Blot. ....	127
Figure 51 : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur la réponse inflammatoire .....	128
Figure 52 : La prégabaline (PGB) et la (GBP) inhibent l’activation de la voie NF-κB induite par la substance P en prévenant la dégradation du facteur IκB $\alpha$ et la localisation nucléaire du facteur de transcription p65. ....	129
Figure 53 : Rationnel des deux projets cliniques découlant de ces travaux de thèse.....	130
Figure 54 : Organigramme du projet clinique n°1.....	131
Figure 55 : Hypothèse du mécanisme d’action des ligands $\alpha_2\delta$ .....	134

Figure 56 : Modèle structurel de la sous-unité $\alpha_2\delta$ -1. ....	136
Figure 57 : Mécanismes d'action des ligands $\alpha_2\delta$ .....	138
Figure 58 : Exemple de résultats du test de Von Frey selon le principe de <i>up and down</i> .....	145
Figure 59 : Impact d'un traitement chronique à la PGB sur l'activité locomotrice des animaux.....	157
Figure 60 : Modèle de cystite induit par le cyclophosphamide et protocole d'administration de la PGB.....	158
Figure 61 : Effet de la PGB sur la sensibilité mécanique évalué par le test de Von Frey abdominal dans un modèle chronique de cystite induit par le cyclophosphamide. ....	159
Tableau 1 : Classifications de Vienne et de Montréal pour la MC et la RCH.....	19
Tableau 2 : Résumé des différents rôles du microbiote intestinal.....	23
Tableau 3 : Molécules en cours d'essai pour le traitement du SII. <a href="http://clinicaltrials.gov">clinicaltrials.gov</a> .....	59
Tableau 4 : Molécules en cours de développement pour les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin	65
Tableau 5 : Caractéristiques des canaux calciques voltage-dépendants. ....	67
Tableau 6 : Caractéristiques des sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants .....	69
Tableau 7 : Couplage des sous-unités auxiliaires $\beta$ , $\gamma$ et $\alpha_2\delta$ aux sous-unités principales des canaux calciques voltage-dépendants .....	70
Tableau 8 : Modification de l'expression des canaux calciques voltage-dépendants et de leurs sous-unités auxiliaires en condition d'hypersensibilité d'origine inflammatoire et somatique. ....	75
Tableau 9 : Récapitulatif de l'impact des modulations génétiques et pharmacologiques des canaux calciques voltage-dépendants et de la sous-unité auxiliaire $\beta$ sur différentes modalités douloureuses. ....	78
Tableau 10 : Modification d'expression des sous-unités auxiliaires $\alpha_2\delta$ en condition de douleur inflammatoire ou neuropathique .....	79
Tableau 11 : Impact de la modulation génétique ou pharmacologique des sous-unités $\alpha_2\delta$ sur la nociception .	81
Tableau 12 : Table d'évaluation du score de maladie, DAI <i>Disease Activity Index</i> .....	146
Tableau 13 : Score histologique .....	149

## Préambule

---

« **Toute douleur qui n'aide personne est absurde** »

La Condition humaine (1933), Malraux, éd. Gallimard

Comme le résume cet écrivain et aventurier français, la douleur n'est de raison d'être que si elle est bénéfique pour l'Homme. En effet la douleur aiguë, bien qu'associée à une expérience émotionnelle désagréable, permet à l'organisme de maintenir son intégrité. Pour cela, de nombreux systèmes sont mis en place permettant la transduction du message nociceptif de la périphérie aux structures du système nerveux central où aura lieu l'intégration cognitive et émotionnelle de la douleur. Ainsi en condition physiologique, la douleur, dans sa fonction de système d'alarme, permet de se protéger vis-à-vis d'une agression.

Cette douleur, normalement rapide et transitoire, peut devenir chronique et perdre sa fonction de protection de l'organisme. Ces douleurs chroniques peuvent être ressenties en cas de lésion ou de maladie affectant le système somatosensoriel (douleur neuropathique), ou en cas de réaction inflammatoire prolongée, entraînant une hyperexcitabilité des fibres afférentes primaires. Si les douleurs chroniques d'origine somatique sont très étudiées depuis de nombreuses années, ce n'est pas le cas en ce qui concerne les douleurs d'origine viscérale. En effet, la spécificité de ces douleurs est qu'elles sont diffuses et irradiantes, touchent des structures internes, et impliquent une innervation particulière portée par le système nerveux entérique. Tous ces éléments rendent donc leurs études plus complexes et expliquent le manque de données dont nous disposons actuellement.

Les douleurs coliques sont certainement les douleurs viscérales les plus fréquemment rencontrées en clinique et sont le signe d'une hypersensibilité colique (HSC). Cette HSC chronique est le symptôme majeur de plusieurs pathologies, parmi lesquelles on peut noter les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (regroupées sous l'acronyme MICI) et le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII). La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI. Ces pathologies ont la particularité d'évoluer par cycle, avec des phases de poussée inflammatoire entrecoupées de phases de rémission. Bien que l'importance de l'inflammation soit clairement établie dans ces MICI, la cause de cette dernière n'est pas définie à l'heure actuelle (malgré les avancées récentes en matière de génie génomique mettant en lumière l'importance des facteurs génétiques). Le SII, sous-famille des troubles fonctionnels intestinaux (TFI), est caractérisé par une absence de lésion au niveau de la muqueuse, chez des patients présentant pourtant une HSC et de nombreux troubles du transit. L'origine de ce syndrome n'est pas élucidée, même si les facteurs environnementaux semblent avoir une place importante dans l'étiologie de

cette maladie. Malgré des différences notables entre MICI et SII, la douleur viscérale associée à l'HSC est un symptôme majeur et commun à ces pathologies. La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la description de ces pathologies, et plus particulièrement aux acteurs et mécanismes pouvant être responsables de cette HSC.

Si la prise en charge thérapeutique est relativement satisfaisante durant les phases inflammatoires de MICI, l'arsenal thérapeutique dont disposent les praticiens pour traiter l'HSC durant les phases de rémission ou chez les patients atteints du SII, demeure insuffisant. En effet, certains patients ne répondent pas aux traitements antalgiques classiques, qui par ailleurs ne présentent pas un ratio bénéfice/risque optimal. La pharmacopée actuellement utilisée pour soulager les patients atteints de MICI ou du SII sera détaillée en fin de première partie et mettra ainsi en lumière la nécessité d'innovation thérapeutique pour soulager ces patients.

C'est dans ce cadre là, que la deuxième partie de cette thèse s'attardera sur les sous-unités  $\alpha_2\delta$  des canaux calciques voltage-dépendants et sur l'intérêt de leur modulation par les gabapentinoïdes en cas d'HSC.

**« La douleur qui persiste au delà de sa fonction de système d'alarme d'une lésion tissulaire est certes un défi pour la victime, la société et la médecine, mais ne doit plus être considérée comme une fatalité »**

Les douleurs rebelles (1993), Dr. Yves Lazorthes, éd. Maloine

# Revue Bibliographique

*\*Chapitre A*

*Hypersensibilité viscérale et pathologies coliques*

*\*Chapitre B*

*Intérêt de la modulation de la sous-unité  $\alpha_2\delta$*



## Chapitre A : Hypersensibilité viscérale et pathologies coliques

L'hypersensibilité colique est principalement causée par deux types de pathologies chroniques qui diffèrent par leur nature anatomo-pathologique. D'une part, le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) dans lequel aucune atteinte structurelle ni inflammatoire n'est présente et, d'autre part, les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) qui se caractérisent par des atteintes inflammatoires de la muqueuse colique. Ce premier chapitre bibliographique est consacré aux descriptions de ces deux pathologies (épidémiologie, étiologie, symptômes, diagnostic et traitements) et tente de mettre en évidence des mécanismes communs à l'origine de l'hypersensibilité viscérale retrouvée dans le SII et les MICI.

### A.I : Les pathologies coliques

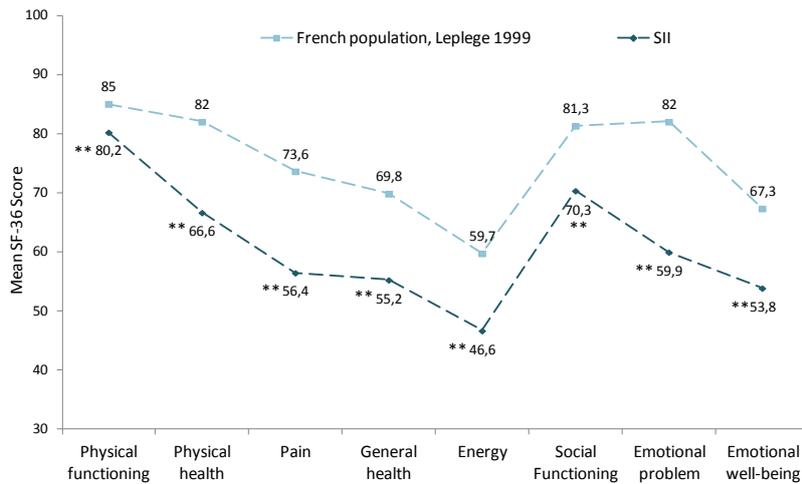
#### *A.I.a. Définition, épidémiologie, symptômes et diagnostic*

---

##### *A.I.a.1 : Le Syndrome de l'Intestin Irritable : SII*

###### Physiopathologie

Le SII est un trouble fonctionnel intestinal qui se caractérise par une douleur abdominale diffuse et irradiante qui est directement liée à des perturbations du transit intestinal et des ballonnements (Bellini M *et al.*, 2014). Cette atteinte touche le plus souvent l'extrémité distale du côlon et le rectum (Maxwell PR *et al.*, 1997) sans atteinte structurelle ou biochimique de la muqueuse. Il existe quatre formes du SII, classées selon le symptôme principal : Le SII à prédominance diarrhéique (SII-D, 20 à 30% des patients), avec constipation (SII-C, 20 à 30% des patients), avec alternance diarrhée/constipation (SII-M, environ 45% des patients). Cependant, environ 20% des patients n'arrivent pas à être classés dans un de ces sous-groupes, ce qui plaide en faveur de la création d'un 4<sup>ème</sup> groupe dit « inclassable » (Hungin APS *et al.*, 2003). Concernant les SII-D, 10 à 20 % seraient d'origine post-infectieuse (SII-PI) et consécutifs à une infection gastro-intestinale (Dai C and Jiang M, 2012 ; Drossman DA *et al.*, 2002). Il n'y a pas de distinction épidémiologique entre ces différentes formes (Guilera M *et al.*, 2005). Quelle que soit la forme du SII considérée, la qualité de vie de ces patients est fortement altérée (Nellesen D *et al.*, 2013), et elle l'est d'autant plus que l'intensité de la douleur abdominale est importante (Amouretti M *et al.*, 2006) (*Figure 1*).



**Figure 1 : Impact du Syndrome de l'Intestin Irritable sur la qualité de vie.**

Score SF-36 comparant des patients atteints de Syndrome de l'Intestin Irritable (SII, N=253) et un échantillon de population générale appariée en âge et en sexe. D'après Amourreti M *et al.*, 2006

Durant ces dernières décennies, de nombreuses études sur la physiopathologie du SII ont mis l'accent sur la perturbation de la motilité colique, l'hypersensibilité viscérale, et les perturbations de l'axe cerveau-intestin (Scaldeferri F and Fiocchi C, 2007). Cependant, il apparaît que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans cette pathologie telle que l'inflammation à bas bruit (Guilarte M *et al.*, 2007), une atteinte post-infectieuse (Mearin F *et al.*, 2005), une implication des facteurs immunologiques (Van der Veek PPJ *et al.*, 2005), une modification du microbiote (Simren M *et al.*, 2013 ; Ohman L *et al.*, 2012) ainsi qu'une perturbation des cellules endocrines.

### Épidémiologie

La prévalence de ce syndrome est de 10 à 15% en Europe et Amérique du nord (Ballou SK and Keefer L, 2013 ; Lovell RM and Ford AC 2012b). Il touche environ 4% de la population française mais les chiffres sont très variables selon les critères d'inclusion utilisés. Le SII survient le plus souvent entre 15 et 65 ans, touche 2 femmes pour 1 homme et est généralement diagnostiqué entre 30 et 50 ans (Lovell RM and Ford AC 2012a).

### Impact économique

L'impact économique de cette pathologie est important (Dapoigny M, 2009 ; Brun-Strang C *et al.*, 2007). En effet, les patients atteints du SII consultent plus souvent leur médecin (1,6 consultation/3 mois *versus* 0,8) et consomment plus de médicaments (Na *et al.*, 2007). Les coûts indirects, par définition plus difficile à évaluer, sont principalement dus aux arrêts de travail et à l'absentéisme (5,5 jours/an *versus* 3,1) (Nellesen D *et al.*, 2013 ; Cash B *et al.*, 2005).

## ➤ Symptômes

La majorité des consultations pour un SII se font en premier recours chez le médecin généraliste (77% *versus* 43% en gastroentérologie). Les principaux symptômes sont des douleurs abdominales chroniques, intermittentes, et dont la survenue est associée à une modification de la fréquence et/ou de la consistance des selles. Cette douleur peut être décrite comme une sensation de crampe d'intensité et de localisation variables, ou comme un inconfort abdominal, et est souvent soulagée par la défécation. Ces symptômes sont légers chez environ 70% des patients. Dans 25% des cas, ces symptômes sont dits modérés, ce qui signifie qu'ils se manifestent avec une intensité et une fréquence plus importantes et interfèrent avec les activités quotidiennes. Les symptômes sévères touchent environ 5% des patients atteints du SII (symptômes fréquents et intenses, qui interfèrent avec les activités quotidiennes). Enfin, certains patients peuvent présenter des symptômes extra-digestifs tels que des somnolences, des douleurs dorsales, etc. (Cash BD and Chey WD 2005).

## ➤ Diagnostic

Le plus souvent, c'est l'anamnèse et l'examen clinique du patient qui permettent de poser un diagnostic du SII (Bellini M *et al.*, 2014). Dans le but de standardiser ce diagnostic, plusieurs critères cliniques ont été caractérisés, parmi lesquels on trouve les critères de Rome III qui sont actuellement les critères de référence, et sont basés sur (Whitehead WE and Drossman DA, 2010 ; Longstreth GF *et al.*, 2006) :

- Début des symptômes au moins 6 mois avant le diagnostic
- Douleur abdominale ou inconfort digestif (sensation abdominale désagréable non douloureuse) survenant au moins 3 jours par mois durant les 3 derniers mois
- Associés avec au moins deux des critères suivants : amélioration par la défécation / survenue associée à une modification de la fréquence des selles / survenue associée à une modification de la consistance des selles.

La confirmation du diagnostic du SII nécessite la possibilité d'exclure, avec suffisamment de certitude, d'autres pathologies présentant des symptômes similaires telles que les MICI, la maladie cœliaque, l'entéropathie au gluten, etc. A noter qu'un tiers des patients diagnostiqués SII sont, en fait, des patients en phase de rémission d'une maladie de Crohn (Farrokhyar F *et al.*, 2006).

Il n'existe pas de marqueur spécifique de cette maladie. Cependant de nouveaux marqueurs fécaux reflétant l'infiltration de neutrophiles dans la muqueuse (tels que les protéines de la famille S100) ou la dégranulation leucocytaire (tels que la lactoferrine ou la myéloperoxydase) permettent de différencier les pathologies inflammatoires des non-inflammatoires. Le dosage de la calprotectine pourrait être pertinent pour discriminer SII et MICI. C'est une protéine de la famille des S100

synthétisée par les neutrophiles, et, dans une moindre mesure, par les monocytes, qui est dosée par ELISA dans les selles. La présence de lésions de la muqueuse colique, associée à une infiltration leucocytaire, résulte en une élévation de cette protéine. Un taux de calprotectine fécal inférieur à 50 µg/g permet d'exclure une inflammation intestinale sans avoir recours à une endoscopie, alors que des valeurs supérieures à 300 µg/g sont associées à une inflammation intestinale active (zone grise 50-300 µg/g). L'utilisation de ce marqueur biologique permet de réduire de 67% les coloscopies effectuées (Däbritz J *et al.*, 2014).

### *A.1.a.2 : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : MICI*

#### Physiopathologie

Les MICI regroupent la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC) (Abraham C and Cho JH 2009b ; Shanahan F and Bernstein CN, 2009 ; Scadlaferri F and Fiocchi C, 2007). Les autres formes, environ 5% des MICI sont : la colite collagénique, la colite lymphocytaire, la colite ischémique, la diverticulite, le syndrome de Behçet, la colite infectieuse et la colite essentielle (ou indéterminée). Dans ce manuscrit, l'acronyme MICI fera référence à la MC et à la RCH uniquement.

La MC et la RCH sont caractérisées par une atteinte inflammatoire intestinale chronique, alternant entre des phases actives (de poussées inflammatoires) et des phases de rémission. Dans la MC, l'inflammation peut, en principe, toucher l'ensemble du tractus intestinal, mais affecte préférentiellement la partie distale de l'intestin grêle («iléite terminale») et/ou le côlon («colite de Crohn») et dans une moindre mesure la région de l'anus. Il s'agit d'une inflammation transmurale en partie granulomateuse, qui peut également toucher la séreuse et les ganglions lymphatiques régionaux. L'inflammation est segmentaire et entrecoupée de zones saines. La RCH se définit par une atteinte inflammatoire de la muqueuse du rectum qui s'étend de manière continue sur le côlon (l'intestin grêle et l'anus n'étant jamais atteints). Environ 50 à 70% des patients MICI souffrent d'inconfort ou de douleur abdominale (Chang L *et al.*, 2000).

La classification de Vienne, modifiée par la suite à Montréal, définit différentes catégories de patients atteints de la MC sur la base de l'âge du diagnostic (A), de la topographie de l'affection inflammatoire (L) et du phénotype de la maladie (B). Une classification proche a également été établie à Montréal concernant la RCH ; elle prend en compte l'étendue de l'atteinte inflammatoire (E) ainsi que la sévérité de la maladie (S). En clinique, ces classifications vont permettre d'orienter la prise en charge médicale à mettre en œuvre (par exemple, une chirurgie dans le cas d'un phénotype pénétrant de la MC) (Mowat C *et al.*, 2011) (Tableau 1).

Classifications de Vienne et Montréal pour le Maladie de Crohn			Classifications de Montréal pour la Rectocolite Hémorragique	
	Vienne	Montréal		
<b>Age du diagnostic</b>	A1 < 40 ans A2 ≥ 40 ans	A1 < 16 ans A2 ≤ 17 et < 40 ans A3 ≥ 40 ans	<b>Étendue</b>	E1 : Rectite (atteinte limité au rectum) E2 : Colite gauche (atteinte dépassant l'angle gauche) E3 : Pancolite (atteinte dépassant l'angle gauche)
<b>Topographie</b>	L1 : Iléale L2 : Colique L3 : Iléocolique L4 : Tractus gastro-intestinale supérieur	L1 : Iléale L2 : Colique L3 : Iléocolique L4 : Tractus gastro-intestinale supérieur isolé*		S0 : Rémission (asymptomatique) S1 : RCH faible (moins de 4 selles par jour, marqueurs inflammatoires normaux, pas de maladie systémique) S2 : RCH modérée (plus de 4 selles par jour avec des signes minimaux de toxicité systémique) S3 : RCH sévère (au moins 6 selles par jour avec la présence de sang, fréquence cardiaque ≥ 90 bpm, température ≥ 37.5°C, hémoglobine < 10.5g/100ml et vitesse de sédimentation des érythrocytes ≥ 30mm/h)
<b>Phénotype</b>	B1 : non sténosant, non pénétrant B2 : sténosant B3 : pénétrant	B1 : non sténosant, non pénétrant B2 : sténosant B3 : pénétrant P : atteinte anopérinéale**	<b>Sévérité</b>	

\* : L4 peut être ajouté à L1-L3 et n'est pas exclusif

\*\* : p peut être ajouté à B1-B quand une atteinte anopérinéale est présente

**Tableau 1 : Classifications de Vienne et de Montréal pour la MC et la RCH.**

D'après Satsangi J *et al.*, 2006

La physiopathologie des MICI est complexe et non élucidée à l'heure actuelle. L'hypothèse est que l'inflammation intestinale serait le résultat d'une altération des interactions entre la flore intestinale et les cellules épithéliales, dans un contexte de polymorphisme génétique affectant notamment la fonction de barrière épithéliale ainsi que la réponse immune et adaptative (Kaser A and Blumberg RS, 2011 ; Fiocchi C, 1998).

### Epidémiologie

Ces maladies suivent un gradient Sud/Nord et Est/Ouest, parallèlement à l'occidentalisation (Burisch J *et al.*, 2014 ; Soon IS *et al.*, 2012) et touchent environ 1,5 million de personnes en Europe (5 millions dans le monde). Les MICI peuvent survenir à tout âge, il existe notamment des cas pédiatriques (Benchimol EI *et al.*, 2014 ; Uhlig HH *et al.*, 2014), mais elles sont le plus souvent diagnostiquées entre 20 et 30 ans pour la MC et entre 30 et 40 ans pour la RCH.

### Impact économique

Un rapport de 2012 de la Fondation Canadienne des Maladies Inflammatoires de l'Intestin (FCMII) indique qu'un patient canadien porteur de MICI représente un coût annuel de 7 800€ (4 400€ de dépenses directes et 3 400€ de dépenses indirectes), soit environ un coût annuel total pour le Canada de 1,9 milliards d'euros.

## Symptômes

En général, les patients consultent pour la 1<sup>ère</sup> fois pour des symptômes abdominaux (diarrhée chronique ou constipation) et des douleurs abdominales récidivantes. Ces symptômes sont souvent accompagnés de problèmes extra-digestifs (Marineață A *et al.*, 2014 ; Baumgart D and Sandborn WJ, 2007). En effet, ces patients présentent généralement une fatigue, des nausées et des douleurs articulaires, (Brakenhoff LKPM *et al.*, 2010), des altérations cutanées (Huang BL *et al.*, 2012), des inflammations oculaires, une température subfébrile, une perte de poids ou encore une anémie (Vavricka SR *et al.*, 2012).

## Diagnostic

Aucun symptôme ni aucun test biologique ne permet de diagnostiquer la MC ou la RCH, il est donc souvent difficile pour les gastroentérologues de poser un diagnostic univoque. Par conséquent, le diagnostic ne repose pas exclusivement sur les résultats anatomo-pathologiques, mais également sur les caractéristiques cliniques, en tenant compte de toutes les données disponibles (Magro F *et al.*, 2013). Les arguments les plus forts du diagnostic positif de MC sont le caractère discontinu et multisegmentaire des lésions, les fissures transmuraux histologiques et le granulome épithélioïde et géantocellulaire quand il est présent. Néanmoins, un diagnostic différentiel avec d'autres pathologies (iléocolite, iléite aiguë isolée, tuberculose, maladie de Behçet, vascularites, maladies granulomateuses chroniques) est généralement pratiqué. En ce qui concerne la RCH, la confirmation du diagnostic repose sur un faisceau d'arguments, incluant l'aspect endoscopique de la muqueuse et les caractéristiques histologiques du tissu malade.

Les dernières recommandations de l'ECCO (*European Crohn's and Colitis Organisation*) de 2014, donnent la protéine C-réactive, la calprotectine et la lactoferrine comme étant de bons marqueurs fécaux de l'inflammation intestinale qui peuvent être utilisés pour guider le traitement, le suivi à court terme et prédire la rechute clinique. De plus, comme indiqué précédemment, la calprotectine peut servir de marqueur afin de différencier la MC du SII (Bennike T *et al.*, 2014).

## *A.I.c. Etiologie et facteurs de prédispositions*

---

Bien qu'il n'y ait pas d'origine précise du SII (Marshall JK, 2014) et des MICI, un certain nombre de facteurs de prédisposition ou de susceptibilité ont pu être identifiés et seront décrits dans ce chapitre.

### A.I.c.1 : Le syndrome de l'Intestin Irritable : SII

#### Les facteurs génétiques

Des études d'agrégation familiale, des études sur des jumeaux ainsi que des données épidémiologiques portant sur des polymorphismes de gènes (Hotoleanu C *et al.*, 2008) mettent en avant l'influence de la génétique sur la physiopathologie du SII. En effet, 33% des patients atteints du SII présentent un historique familial du SII, contre 2% dans un groupe contrôle (Whorwell PJ *et al.*, 1986). De plus, la prévalence du SII est plus importante chez les jumeaux homozygotes que chez les jumeaux dizygotes (Lembo A *et al.*, 2007 ; Bengtson MB *et al.*, 2006 ; Levy RL *et al.*, 2001 ; Morris-Yates A *et al.*, 1998). A ce jour, plus de 60 gènes ont été décrits comme positivement associés au SII. Bien que certaines données soient contradictoires, les gènes mis en évidence codent pour des molécules impliquées dans l'inflammation, dans la neurotransmission, dans la synthèse des acides biliaires et le métabolisme.

#### Les facteurs environnementaux

##### Les facteurs psychologiques

Entre 54 et 94 % des patients souffrant du SII répondent aux critères d'au moins un trouble psychiatrique (Whitehead WE *et al.*, 2002) avec notamment l'anxiété, la dépression et la somatisation (Porcelli P *et al.*, 2004). L'historique d'abus sexuels ou physiques et d'événements émotionnels intenses, notamment durant l'enfance, sont également fortement corrélés au SII (Mykletun A *et al.*, 2010; Leserman J *et al.*, 2007 ; Baccini F *et al.*, 2003). Il est aujourd'hui admis que le stress influence le tractus gastro-intestinal (altération de la motilité, augmentation de la perception viscérale, modification des sécrétions gastro-intestinales, augmentation de la perméabilité, effet négatif sur la régénération de la muqueuse intestinale, influence négative sur le microbiote et modifications de l'axe « cerveau-intestin ») (Konturek PC *et al.*, 2011 ; Mönnikes H *et al.*, 2001). Cependant, il est plus probable qu'il soit responsable d'une aggravation des symptômes plutôt que de leur initiation (Bennett EJ *et al.*, 1998 ; Gaynes BN and Drossman DA 1999; Herschbach P *et al.*, 1999).

##### L'alimentation

Le rôle de l'alimentation dans la physiopathologie du SII est considéré comme mineur et peu d'études se sont réellement intéressées à l'impact du régime alimentaire sur la survenue du SII (Cuomo R R *et al.*, 2014). Environ 60% des patients rapportent une augmentation de leurs symptômes après l'ingestion de nourriture (Simrén M *et al.*, 2001; Morcos A *et al.*, 2009). La plupart d'entre eux attribuent leurs symptômes à l'alimentation (Hayes PA *et al.*, 2014b), entraînant des changements volontaires de régime alimentaire (Monsbakken KW *et al.*, 2006). Les aliments les plus fréquemment impliqués sont les aliments riches en FODMAPS (*Fermentable oligo-, di-, and mono-saccharides and polyols*, c'est-à-dire les produits à base de lait, de blé et certains fruits et légumes), mais également

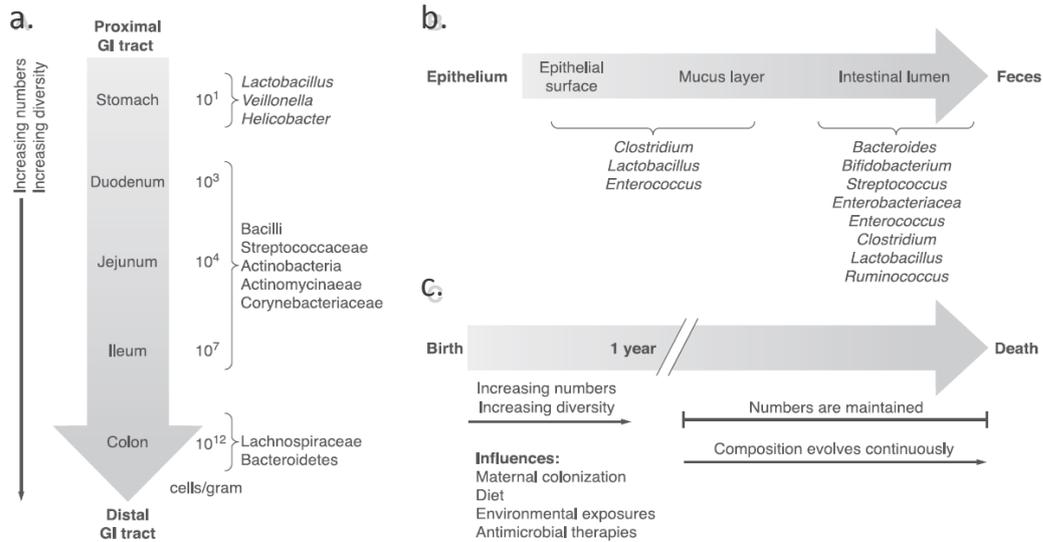
des aliments tels que la caféine, certaines viandes, les aliments gras ou épicés et l'alcool (Hayes PA *et al.*, 2014a et b). Des études récentes ont mis en évidence que certaines allergies alimentaires ou intolérances (au gluten notamment), ainsi qu'une hypersensibilité à certains aliments pouvaient augmenter la sévérité des symptômes associés au SII.

### Les infections

Malgré les nombreux mécanismes de défense que possède l'hôte au niveau de la muqueuse intestinale, des invasions par des pathogènes entériques peuvent se produire. Les bactéries responsables de ces gastro-entérites sont généralement *Helicobacter pylori* (Gerards C *et al.*, 2001) ou les bactéries du genre *Campylobacteria* (Spiller RC *et al.*, 2000), *Salmonella* (Cremon C *et al.*, 2014 ; Mearin F *et al.*, 2005 ; McKendrick MW and Read NW, 1994) ou *Shigella* (Spiller RC, 2007). Des virus (Rotavirus, Adénovirus ou Calicivirus) ou des parasites (*Giardia lamblia* ou *Blastocystis hominis*) peuvent également être impliqués. Il s'en suit généralement une perturbation du microbiote de l'hôte (dysbiose) qui peut le prédisposer à des séquelles post-infectieuses (Beatty JK *et al.*, 2014). La virulence et la durée de cette infection, le sexe féminin, le jeune âge, l'usage d'antibiotiques pendant l'infection, les troubles psychologiques ainsi que les différents polymorphismes génétiques de l'hôte sont des facteurs aggravants (Thabane M *et al.*, 2007). Ainsi, 7 à 31% des sujets développent des symptômes de type SII à long terme (SII-Post Infectieux, SII-PI) après une gastro-entérite aiguë d'origine virale (Barbara G *et al.*, 2009 ; Spiller R and Garsed K 2009).

### La dysbiose

Le corps humain est composé d'environ  $10^{14}$  microorganismes, soit environ 10 fois plus que les cellules (estimées à environ  $10^{13}$ ) (Savage DC, 2001) et la plupart d'entre elles se trouvent dans le tractus gastro-intestinal. Cependant, seul 40% du microbiote gastro-intestinal est détectable par les techniques classiques de culture (Eckburg PB *et al.*, 2005). Des études moléculaires de séquençage suggèrent qu'environ 15 000 à 36 000 espèces bactériennes pourraient habiter le tractus gastro-intestinal humain, et que chaque individu hébergerait environ 500 à 1500 espèces différentes (Frank DN and Pace NR 2008). Deux phylums semblent majoritairement représentés, les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* (Peterson DA *et al.*, 2008) et dans une moindre mesure des phylums tels que *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Cyanobacteria* sont également retrouvés (Eckburg PB *et al.*, 2005) (Figure 2).



**Figure 2 : Représentation spatio-temporelle de la composition bactérienne du tractus gastro-intestinal.**  
a. variations du nombre et de la composition microbienne le long du tractus gastro-intestinal. b. Variations longitudinales de la composition microbienne dans l'intestin. (c.) Aspects temporels de la mise en place et entretien du microbiote et les facteurs influençant la composition microbienne. D'après Sekirov I *et al.*, 2010

Ce microbiote gastro-intestinal complexe participe au maintien de l'homéostasie et joue un rôle important dans la nutrition, le métabolisme énergétique, la défense de l'hôte, et le développement du système immunitaire (Garrett WS *et al.*, 2010 ; Backhed F *et al.*, 2005 ; Hooper LV *et al.*, 2002) (Tableau 2).

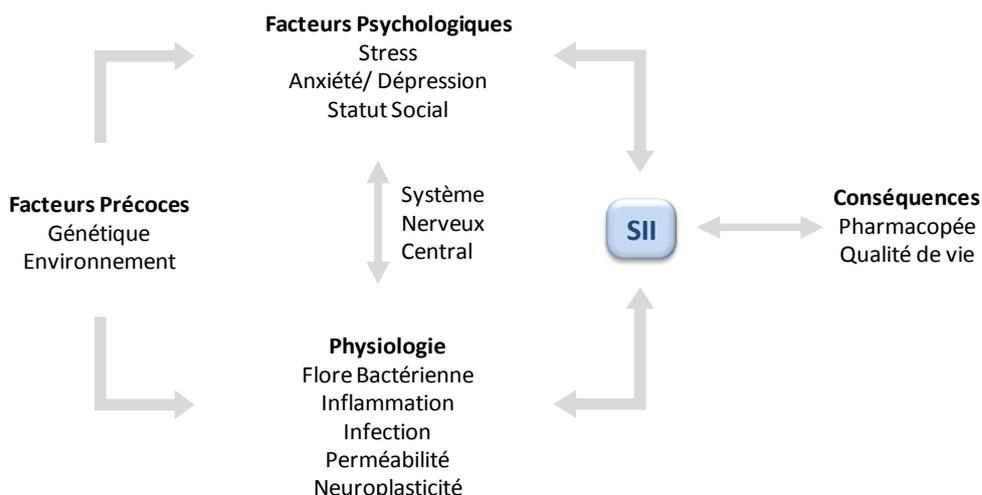
Fonction	Rôle
<b>Trophique</b>	Contribue à l'angiogenèse des microvillosités
	Module l'activité des enzymes intestinales
	Aide au développement des lymphocytes intestinaux
	Aide à maintenir l'homéostasie intestinale du système immunitaire
<b>Métabolique</b>	Influence la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales
	Fermente les composés non-digestibles et le mucus endogène
	Récupère l'énergie des acides gras à chaîne courte
	Produit de la vitamine K
<b>Protection</b>	Aide à l'absorption des ions
	Rôle de barrière contre les agents pathogènes

**Tableau 2 : Résumé des différents rôles du microbiote intestinal.**  
Adapté de Sharma R and Tepas JJ, 2010 ; De Guarner F and Malagelada JR, 2003

Une dysbiose ou toute autre perturbation de la composition de cette flore bactérienne et/ou de son activité métabolique, peut être associée à divers états pathologiques tels que le SII (ou les MICI) (Collins SM, 2014). La composition de la flore fécale montre des différences avec, de manière générale, une diminution de la biodiversité de la flore bactérienne et une augmentation de son instabilité temporelle (Simrén M *et al.*, 2013 ; Mättö J *et al.*, 2005). Les données concernant le microbiote intestinal des patients atteints du SII sont très hétérogènes. Les conditions d'observation sont variées (Taverniti V and Guglielmetti S, 2014) et les modifications de la flore intestinale peuvent varier selon le sous-type du SII considéré (Jeffery IB *et al.*, 2012a et b). Généralement, une diminution de la population de

*Bifidobacterium* spp. et une augmentation de la population d'*Enterobacter* sont retrouvées (Lee KN and Lee OY, 2014).

↳ Les facteurs environnementaux (perturbation du microbiote intestinal et facteurs psychologiques) semblent donc avoir une place prépondérante dans la physiopathologie du SII. Cependant un terrain génétiquement favorable semble également être impliqué (Figure 3). Ceci pouvant alors créer les conditions nécessaires à la mise en place d'une micro-inflammation.



**Figure 3 : Facteurs impliqués dans le Syndrome de l'intestin irritable**

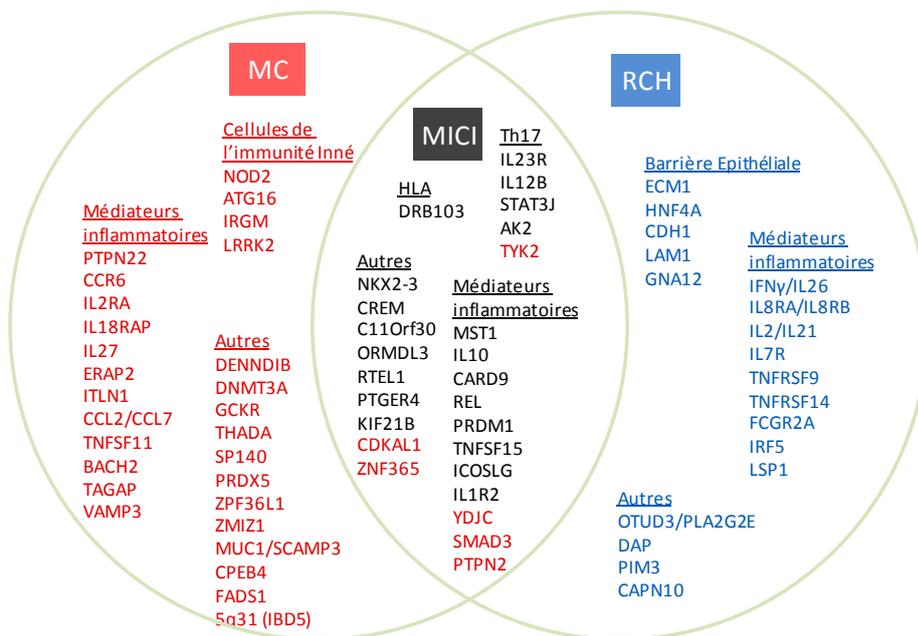
### A.I.c.2 : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : MICI

#### ↳ Les facteurs génétiques

Les MICI semblent, pour une part, sous l'influence de polymorphismes génétiques. Dans la MC environ 70 gènes (et 163 *loci* de susceptibilités) (Jostins L *et al.*, 2012) à risque ont été identifiés, contre 30 pour la RCH (Noomen CG *et al.*, 2009 ; Cho JH, 2008). Parmi ces gènes, 28 seraient communs entre MC et RCH (Figure 4).

Les nombreuses mutations liées à la physiopathologie des MICI, portent sur des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'immunité et la réaction inflammatoire, l'autophagie et l'homéostasie de la barrière épithéliale (Karatzas PS *et al.*, 2014 ; Graham DB and Xavier RJ, 2013).

Les mutations dans le gène codant la protéine *NOD2/CARD15* sont les plus communément retrouvées chez les patients atteints de MC (environ 20 à 30 % des patients sont porteurs de mutation sur *NOD2*) (Kattah MG and Mahadevan U, 2014 ; Cho JH and Abraham C, 2007). Ce gène code pour une protéine, majoritairement exprimée dans les monocytes, qui serait impliquée dans divers mécanismes cellulaires tels que le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale ou l'autophagie par interaction avec la protéine ATG16L1 (Kaser A and Blumberg RS, 2014 ; Kattah MG and Mahadevan U 2014 ; Fritz T *et al.*, 2011). Des mutations « perte de fonction » du gène *TTC7A*, entraînant des défauts dans les entérocytes et les lymphocytes T, ont également été identifiées pour causer une forme sévère et précoce de MICI (Avitzur Y *et al.*, 2014).



**Figure 4 : Gènes portant des loci de susceptibilité pour les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.**  
En rouge les loci impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Crohn (MC) ; en bleu, les loci impliqués dans la physiopathologie de la rectocolite hémorragique (RCH) et en noir, les loci impliqués dans ces 2 pathologies (MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin). D'après Lees CW *et al.*, 2011.

Cependant, toutes ces mutations ne peuvent expliquer qu'environ un quart des cas de MICI et ne peuvent donc pas servir d'outils de diagnostic (Lees CW *et al.*, 2011).

#### Les facteurs environnementaux

L'évolution de l'incidence dans le temps et dans l'espace, l'agrégation familiale, la présence de foyers de MC et l'absence de mutations ou de polymorphismes chez certains patients sont en faveur d'une implication de facteurs environnementaux dans le développement des MICI (Carbonnel F *et al.*, 2009 ; Lakatos PL, 2009). Le tabagisme et l'appendicectomie sont deux facteurs aujourd'hui bien connus comme étant fortement associés au développement de MICI. Cependant, des études épidémiologiques mettent à jour l'implication de nouveaux facteurs tels que l'alimentation, le stress, les traitements médicamenteux, l'hygiène de vie ou encore les dysbioses. D'autres facteurs, plus

controversés et qui ne seront pas détaillés ici, pourraient également avoir un lien avec l'étiologie des MICI. Parmi ceux-ci on peut noter la vaccination (anti-rougeole, BCG et ROR), l'allaitement maternel, ou encore l'antibiothérapie.

### Le tabagisme

Le tabagisme affecte différemment le risque de survenue des MICI (Lakatos PL *et al.*, 2007). En effet, le tabagisme actif augmente de 50% le risque de développer une MC et aggrave l'évolution de la maladie surtout chez les femmes (Higuchi LM *et al.*, 2012). A l'inverse, le tabagisme actif et passif pourrait protéger contre la survenue d'une RCH (environ 10 % des patients sont fumeurs au moment du diagnostic de RCH, alors que le pourcentage de fumeurs est de 25 à 40 % dans la population générale appariée) (Cosnes J, 2010). Ces effets opposés du tabac sur la survenue des MICI sont difficilement explicables.

### L'appendicectomie

L'appendicectomie est également connue pour être un facteur protecteur dans le développement de la RCH. En effet, le risque de développer une RCH est diminué d'environ 70% en cas d'appendicectomie (Abraham C and Cho JH 2009b ; Andersson RE *et al.*, 2001). Deux hypothèses pourraient expliquer cet effet protecteur de l'appendicectomie : (i) l'appendice, en tant que réservoir de bactéries, pourrait contenir un antigène ou un agent bactérien responsable de la RCH et/ou (ii) l'état inflammatoire prédisposant à l'appendicite pourrait protéger contre le développement ultérieur d'une RCH puisque ces deux organes présentent une réponse inflammatoire différente (Th1 pour l'appendicite et Th2 pour la RCH).

### L'alimentation

L'alimentation et, plus particulièrement, la consommation importante de viandes, de glucides raffinés et/ou la réduction de l'apport en fibres alimentaires sont très souvent incriminés dans la physiopathologie des MICI (Ng SC *et al.*, 2013). Cependant, les données récupérées auprès des patients sont souvent imprécises (type d'aliments, fréquence, quantité) et très hétérogènes quant à la période de la maladie et au pays (voire de la région) considéré (Andersen V *et al.*, 2012).

### Les facteurs psychologiques

Les facteurs psychologiques sont également souvent mis en cause dans la physiopathologie des MICI. La dépression et l'anxiété, plus élevées chez ces patients sont généralement la conséquence de la maladie et sont corrélées à la sévérité des symptômes (Lerebours E *et al.*, 2007). De nombreuses études s'accordent sur le fait que le stress n'influence pas l'évolution des MICI et son rôle d'initiateur reste en suspens (Maunder RG, 2005).

### Les traitements médicamenteux

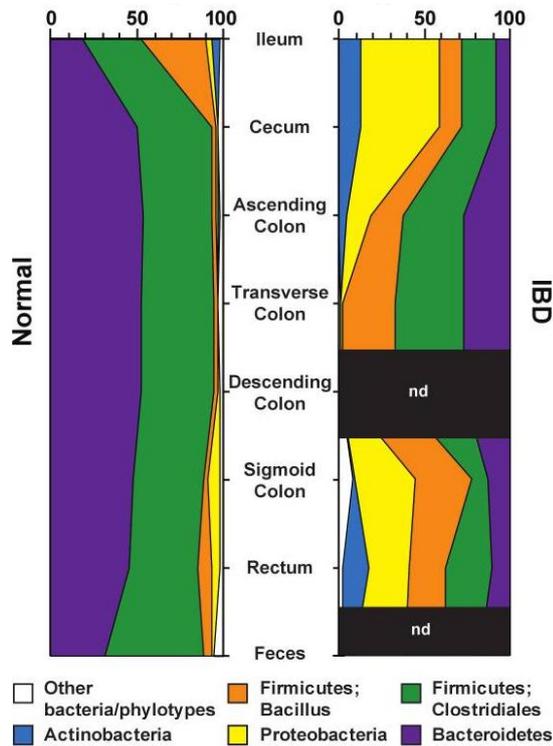
Les contraceptifs oraux ainsi que l'hormonothérapie substitutive sont également connus pour être des éléments associés à la survenue de MICI (Cornish JA *et al.*, 2008). De même, les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) peuvent être associés à un risque accru de poussées inflammatoires notamment durant les phases de rémission des MICI (Berg DJ *et al.*, 2002).

### L'hygiène de vie

La répartition géographique des MICI et l'augmentation de leur nombre ces dernières décennies suggèrent que l'amélioration des conditions d'hygiène de vie dans les pays de l'hémisphère nord, particulièrement durant la petite enfance, pourrait être impliquée. Ce lien est surtout montré chez les patients atteints de MC chez lesquels des études ont mis évidence des taux plus faibles d'IgG anti-*Helicobacter pylori* que dans la population générale (Halme L *et al.*, 1996). De plus, il semblerait que ces maladies touchent préférentiellement les classes socioprofessionnelles élevées et donc en lien avec les conditions d'hygiène de vie (Bøggild H *et al.*, 1996).

### La dysbiose

Le maintien de la composition de la flore bactérienne colique est essentiel et ses perturbations peuvent être associées aux MICI (Dalal SR and Chang EB, 2014 ; Scaldaferrri F *et al.*, 2013). Des études ont mis en évidence une diminution des populations de bactéries appartenant au phylum *Bacteroides* (diminution de *B. fragilis* et *B. vulgatus*) dans les selles de patients atteints de MICI, (Takaishi H *et al.*, 2008). A l'inverse, une diminution des espèces du phylum *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii*) est observée au niveau de l'iléon des patients atteints de MC, par rapport aux personnes saines (Sokol H *et al.*, 2009) (Figure 5). Ce phylum est connu pour avoir un effet protecteur. Une augmentation relative des bactéries du phylum *Proteobacteria*, en particulier celle de la famille *Enterobacteriaceae*, peut être associée à la MC (Darfeuille-Michaud A *et al.*, 1998), notamment lorsqu'elle est liée à une augmentation de leur récepteur CEACAM6 sur les entérocytes humains (Barnich N and Darfeuille-Michaud A, 2010 ; Lupp C *et al.*, 2007 ; Peterson DA *et al.*, 2008). Reste à savoir si ces déséquilibres sont la cause de l'inflammation ou si la présence de l'inflammation permet l'apparition de ces modifications.

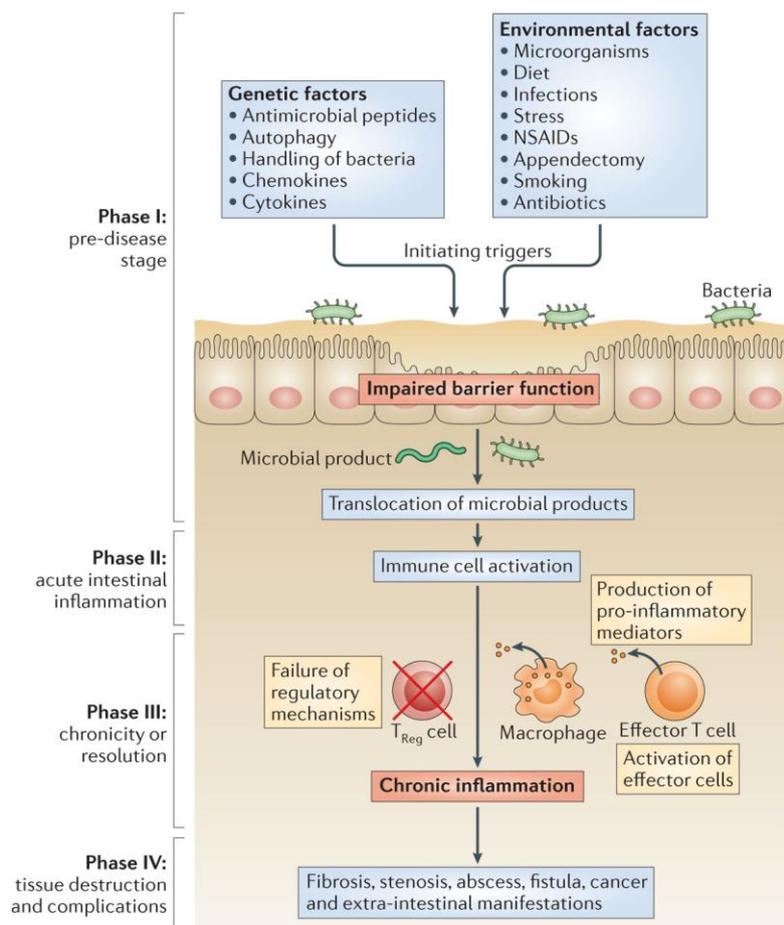


**Figure 5 : Phylum bactériens identifiés dans le microbiote humain**

Distribution des phylums bactériens prédominant dans le tractus gastro-intestinal humain. Les graphiques représentent l'abondance relative de ces phylums le long de l'axe céphalo-caudal de l'intestin distal. Les séquences ADN utilisées proviennent des études de Eckburg *et al.*, (2005) et de Frank *et al.*, (2007). IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), échantillons provenant des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (Frank *et al.*, 2007); Normal, échantillons provenant de volontaires sains (Eckburg *et al.*, 2005 et Frank *et al.*, (2007); n.d, données non définies. D'après Peterson DA *et al.*, 2008

↳ Les MICI apparaissent probablement chez les personnes présentant un terrain génétique favorable, entraînant une perturbation du système immunitaire (Basso PJ, 2014). De plus, la distribution géographique de ces MICI laisse supposer que les facteurs environnementaux et le mode de vie jouent également un rôle important dans l'étiologie des maladies (Figure 6).

↳ Le SII et les MICI sont des pathologies qui altèrent la qualité de vie d'un grand nombre de patients et dont l'étiologie reste encore mal connue. Dans les 2 cas, ce sont généralement des pathologies qui se développent sous l'influence de facteurs environnementaux, sur un terrain génétique favorable. Les douleurs abdominales associées à une hypersensibilité colique sont fréquemment associées à ces pathologies.



**Figure 6 : Physiopathologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.**

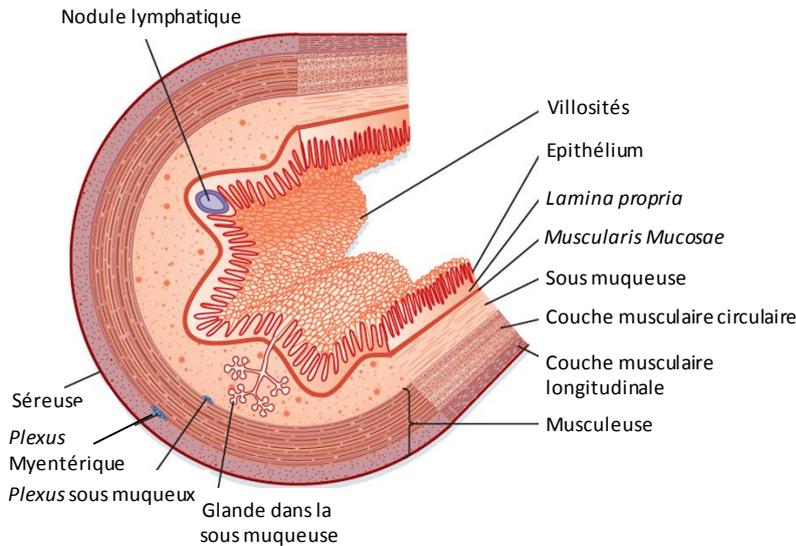
Les facteurs génétiques et environnementaux induisent des dysfonctionnements de la barrière épithéliale intestinale et de la barrière de mucus qu'elle produit. Ces perturbations induisent ensuite la translocation de bactéries commensales et de produits microbiens, de la lumière intestinale dans la paroi intestinale, ce qui conduit à l'activation des cellules immunitaires et à la production de cytokines. Si l'inflammation aiguë de la muqueuse ne peut être résolue par des mécanismes anti-inflammatoires et de suppression des réponses immunitaires pro-inflammatoires, l'inflammation intestinale chronique se développe. À son tour, l'inflammation chronique peut entraîner des complications telles que la destruction des tissus. DC, cellule dendritique; IBD, maladie inflammatoire de l'intestin; AINS, médicaments non-stéroïdiens anti-inflammatoires; Treg, cellules T régulatrices. D'après Neurath MF, 2014.

## A.II : Hypersensibilité colique : acteurs et mécanismes

### A.II.a. Introduction

Bien que le SII et les MICI diffèrent par de nombreux points, la douleur abdominale est un symptôme majeur et commun à ces deux pathologies (Keohane J *et al.*, 2010 ; Quigley EMM, 2005 ; Minderhoud IM *et al.*, 2004). Cette douleur est le reflet d'une hypersensibilité viscérale dont les acteurs et les mécanismes vont être décrit dans ce chapitre, en partant de la flore commensale, jusqu'aux nocicepteurs périphériques. Bien que les modulations nerveuses centrales prennent également une part importante dans la mise en place des phénomènes de chronicisation de la douleur, celles-ci ne seront pas développées ici.

L'ensemble du tube digestif présente une organisation caractéristique avec, de l'extérieur vers l'intérieur, quatre tuniques successives : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (Knowles CH and Aziz Q, 2009) (Figure 7).



**Figure 7 : Structure de la paroi intestinale**

Cette paroi se divise en 4 couches, avec de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse (qui comprend l'épithélium formant les villosités, la *lamina propria* -avec les nodules lymphatiques- et la *muscularis mucosae*), la sous muqueuse (qui abrite les *plexi* sous muqueux et les glandes sous-muqueuses), la musculature (formée des couches musculaires circulaire interne et longitudinale externe, ainsi que les *plexi* myentériques) et la séreuse. D'après Koepfen BM and Stanton BA, 2008

### La muqueuse

Elle diffère considérablement d'un segment intestinal à l'autre, reflétant ainsi des activités fonctionnelles différentes. Elle est constituée de trois couches successives: l'épithélium monostratifié, la *lamina propria* composée d'un tissu conjonctif fin et réticulé riche en lymphocytes et en polynucléaires éosinophiles et la *muscularis mucosae* (musculaire muqueuse) formée de deux couches musculaires minces orientées de façon longitudinale puis circulaire. Tous les éléments de la *lamina propria* et de la *muscularis mucosae* se prolongent dans les villosités dont elles constituent le support axial.

### La sous-muqueuse

Elle se compose d'un tissu conjonctif lâche à fibres de collagène et de quelques fibres élastiques, permettant le glissement de la muqueuse par rapport à la musculature. Elle abrite un riche réseau artériel, veineux et lymphatique, ainsi que les *plexus* nerveux sous-muqueux (ou *plexus* de Meissner).

### La musculature

Elle est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches : une couche longitudinale externe et une couche circulaire interne. Entre la couche circulaire et la couche longitudinale s'insèrent les *plexus* nerveux myentériques (ou *plexus* d'Auerbach).

### La séreuse

C'est une tunique fine formée de cellules mésothéliales en continuité avec le mésentère et adhérent de façon intime à la musculature.

## A.II.b : Acteurs potentiellement impliqués dans l'hypersensibilité viscérale

---

### A.II.b.1 : Modifications de la flore commensale

Comme nous l'avons vu précédemment, les perturbations de la composition de la flore bactérienne (dysbiose et infection) sont des phénomènes souvent retrouvés aussi bien chez les patients atteints du SII que de MICI. En plus des modifications quantitatives de la composition microbienne, des modifications qualitatives peuvent également avoir un impact fonctionnel au niveau colique (Steck N *et al.*, 2012).

Chez les patients atteints du SII, ces modifications peuvent conduire à la prolifération d'espèces qui produisent plus de gaz ou d'acides gras à chaîne courte et qui modifient certaines activités enzymatiques conduisant à un excès d'acides biliaires (particulièrement chez des patients atteints du SII-D) (Duboc H *et al.*, 2012). L'augmentation de la production de gaz (hydrogène et méthane) peut entraîner une augmentation de la distension de la paroi colique. Ceci peut, à terme, affecter la motilité colique, l'activité des cellules intestinales (épithéliales et immunitaires) (SII-C) (Chassard C *et al.*, 2012) et conduire à une sensibilisation colique (King TS *et al.*, 1998).

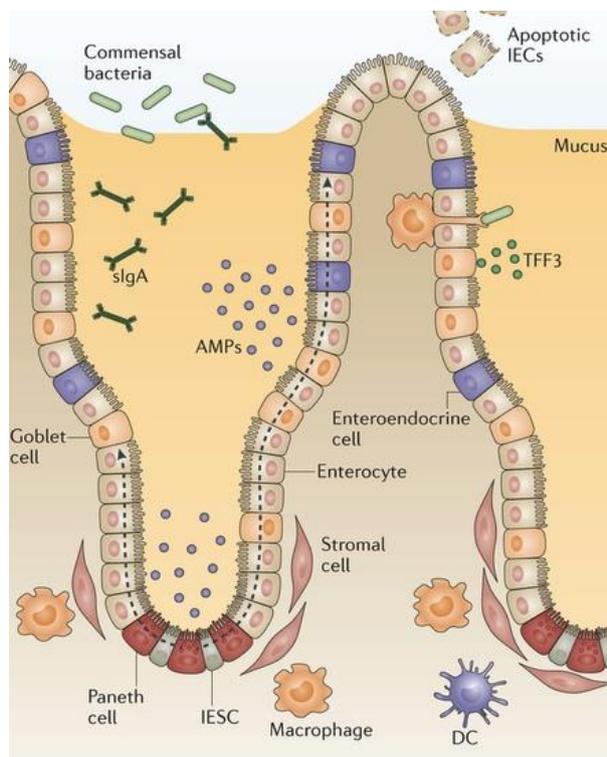
Chez les patients atteints de MICI, certaines espèces surreprésentées sont capables de stimuler les voies nociceptives et/ou d'induire des réactions inflammatoires. Par exemple, les bactéries telles que *Akkermansia muciniphila* et *Enterorhabdus mucosicola* peuvent dégrader la couche de mucus afin de la traverser la barrière épithéliale et stimuler les cellules immunitaires et neuronales sous-jacentes (Derrien M *et al.*, 2010).

Dans ces deux pathologies, une augmentation de la production bactérienne de protéase (particulièrement de métalloprotéinase MMP), peut entraîner l'activation des récepteurs PAR-2 (*protease-activated receptor*), augmentant la perméabilité paracellulaire et induisant une hypersensibilité viscérale (Gecse K *et al.*, 2008).

Enfin, il faut noter que cette flore peut entrer en contact avec le système immunitaire, pour entraîner une dérégulation de la réponse inflammatoire et/ou avec les nocicepteurs viscéraux pour entraîner une sensibilisation périphérique. En effet, certaines bactéries (*Escherichia coli* *Enterohemorrhagic* EHEC ou *Giardia duodenalis* par exemple) peuvent moduler les propriétés physico-chimiques de la barrière épithéliale permettant une translocation bactérienne excessive.

### A.II.b.2. Perturbation de la barrière épithéliale

La barrière épithéliale (BE) constitue une interphase dynamique qui participe activement à l'homéostasie intestinale de part ses propriétés de barrière physique, chimique et immunitaire. Cette BE occupe une place importante dans le maintien de l'homéostasie colique et les 4 sous-types de cellules qui la composent (cf. ci-après) sont liés par des jonctions finement régulées (Peterson LW and Artis D, 2014) (Figure 8). Du côté de la lumière intestinale, ces cellules secrètent et régulent la composition du mucus et du côté basolatéral, elles sont en contact direct avec les cellules sous-jacentes immunitaires et neuronales (Laukoetter MG *et al.*, 2008). Des altérations de cette BE ont été identifiées aussi bien dans le SII (Hyland NP *et al.*, 2014 ; Lee YJ and Park KS, 2014), que dans les MICI (Fakhoury M *et al.*, 2014 ; Vivinus-Nébot M *et al.*, 2014 ; Jäger S *et al.*, 2013), entraînant une augmentation de la perméabilité paracellulaire et donc une augmentation du contact entre les bactéries de la lumière intestinale et le système immunitaire.



**Figure 8 : Composition cellulaire de la barrière épithéliale intestinale**

Les cellules épithéliales de la barrière intestinale (IECs : *Intestinal Epithelial Cells*) forment une barrière physique et chimique entre le microbiote de la lumière intestinale et le système immunitaire muqueux (composé, entre autres des macrophages et des cellules dendritiques, DC –*dendritic cell*). Quatre familles d'IECs forment cette barrière : les entérocytes, les cellules entérochromaffines, les cellules de Paneth (*Paneth cells*) et les cellules caliciformes (*Goblet cells*). Ces deux dernières produisent les agents antimicrobiens (dont le TFF3) composants le mucus. Les IgA sécrétoires (IgAs) contribuent également à cette fonction bactéricide de la couche de mucus. Les cellules souches épithéliales (IESC : *Intestinal Epithelial Stem Cell*), une fois différenciées, migrent suivant la ligne indiquée en pointillé, afin d'assurer le renouvellement continu des cellules épithéliales composant cette barrière. D'après Peterson LW and Artis D, 2014.

#### Les entérocytes

Les entérocytes, également appelés cellules épithéliales absorbantes, sont les cellules les plus représentées dans la BE. Elles sont très importantes pour la régulation de la perméabilité intestinale grâce aux jonctions qui les lient entre elles. Ces jonctions permettent de limiter l'accès des pathogènes jusqu'à l'hôte et de gérer le transport des antigènes de la lumière intestinale à la *lamina propria*, où ils sont présentés et éliminés. Il existe 3 types de jonction (Figure 9) :

Les jonctions serrées

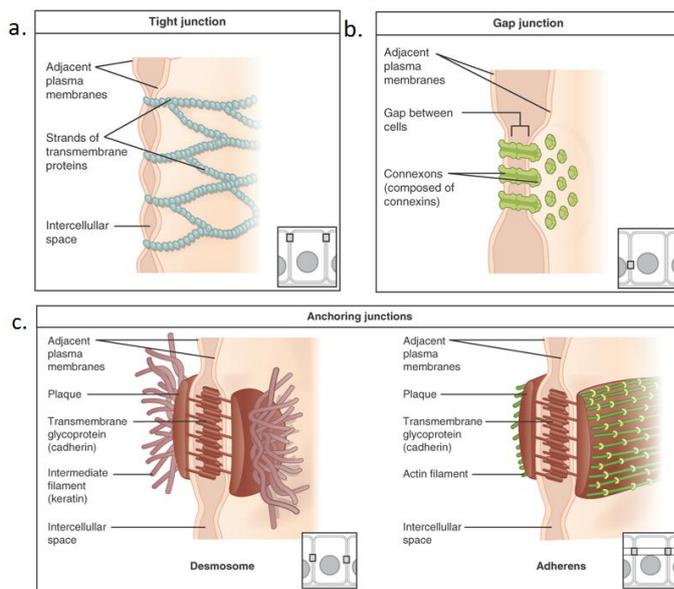
Elles sont composées de trois grandes familles de protéines, les occludines, les claudines et les *zonula occludens* (ZO) (Assimakopoulos SF *et al.*, 2011). Ces jonctions occupent deux fonctions principales, à savoir une fonction d'adhérence en maintenant la cohésion des cellules et une fonction de barrière en bloquant la circulation des protéines et des lipides au sein de la bicouche lipidique. Dans le SII (Piche T, 2014 ; Martínez C *et al.*, 2013 ; Bertiaux-Vandaële N *et al.*, 2011) ou les MICI (Edelblum KL and Turner JR, 2009 ; McGuckin MA *et al.*, 2009 ; Schulzke JD *et al.*, 2009), elles peuvent être modulées par des facteurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) et l'IFN $\gamma$  (*Interferon  $\gamma$* ) qui entraînent une modification de l'expression et de l'organisation de certaines protéines de ces jonctions, ce qui aboutit à une augmentation de la perméabilité intestinale (Su L *et al.*, 2013 ; Su L *et al.*, 2009 ; Li Q *et al.*, 2008).

Les jonctions d'ancrage

Il existe deux sous-types de jonctions d'ancrage ; les desmosomes, qui permettent les liaisons intercellulaires par des molécules transmembranaires de la superfamille des cadhérines (desmogléines et desmocollines) et les jonctions adhérentes qui sont situées immédiatement en dessous des jonctions serrées, au pôle basolatéral, et qui permettent le contact intercellulaire. Des modifications de la jonction E-cadhérine-caténine sont associées aux MICI (Zbar Ap *et al.*, 2004)

Les jonctions communicantes

Egalement appelées *gap junction*, elles sont constituées de connexons et de connexines et permettent un dialogue direct entre les cytoplasmes des cellules adjacentes par le passage d'ions et de molécules (de poids moléculaire inférieur à 1500 Da, principalement AMPc et Ca<sup>++</sup>).



**Figure 9 : Trois familles de jonctions intra-épithéliales.**

a. Jonction serrée ; b. Jonction communicante ; c. Jonction d'ancrage, avec à gauche un desmosome et à droite une jonction adhérente.

### Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes, également appelées cellules en gobelet, ont un rôle essentiellement dans le maintien de l'intégrité du tube digestif, car ce sont ces cellules qui produisent les mucines (codées par les gènes *MUC*) et les peptides dits en feuille de trèfle TFF (*trefoil factors*), composants majeurs du mucus (Pelaseyed T *et al.*, 2014 ; Johansson MEV *et al.*, 2013 ; Dharmani P *et al.*, 2009). Le mucus constitue un réel rempart physique et chimique contre les pathogènes présents dans la lumière intestinale. C'est une protection physique car il recouvre la muqueuse d'une couche de 150 µm d'épaisseur, et forme un maillage visqueux imperméable aux molécules de plus de 1000 nm. La protection chimique est assurée par la présence dans ce mucus de peptides TFF et de mucines. Les mucines, secrétées dans la lumière intestinale ou membranaire, sont les protéines qui déterminent les propriétés rhéologiques du mucus (élasticité, viscosité, filance et adhérence). Ces protéines et ces peptides possèdent également une puissante action antimicrobienne. L'altération de la qualité du mucus le rend plus perméable aux pathogènes, qui pourront alors être transportés vers les structures internes (Aamann L *et al.*, 2014 ; Johansson MEV, 2014).

### Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont des cellules sécrétrices exocrines qui se trouvent au fond des glandes de Lieberkühn (ou cryptes intestinales) au niveau de l'intestin grêle. Leur fonction principale est la production de peptides antimicrobiens et des défensines du mucus, qui jouent un rôle important dans l'immunité innée de la BE (Bevin CL and Salzman NH, 2011).

### Les cellules endocriniennes

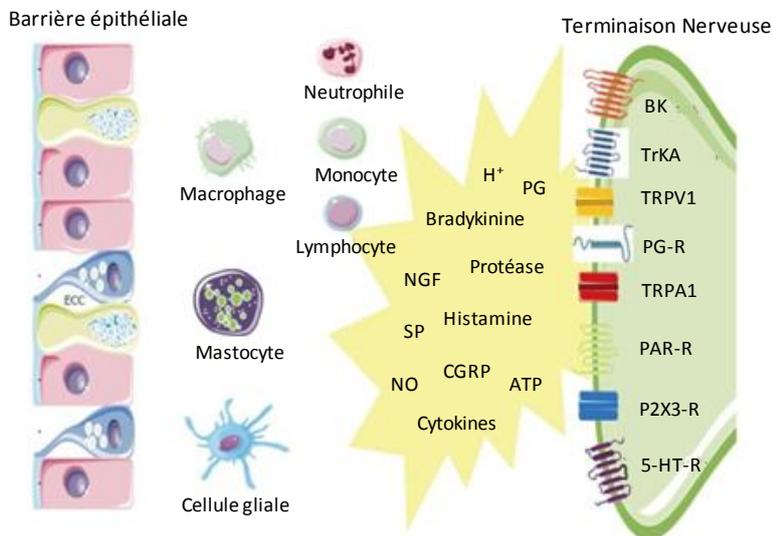
Ces cellules permettent la production d'hormones telles que la sécrétine, la cholecystokinine et la somatostatine qui vont agir par voie endocrine, paracrine et autocrine sur la régulation de la motricité et des sécrétions digestives. Ces hormones vont également intervenir dans la réparation tissulaire, l'angiogenèse et la différenciation des entérocytes (Roda G *et al.*, 2010). Un des sous-types majeurs de cellules endocrines, sont les cellules entérochromaffines (ECC) qui contiennent des granules sécrétoires de sérotonine, de cholecystokinine et de sécrétine. En réponse aux nutriments, à des toxines et à la stimulation mécanique de la muqueuse colique, les ECC libèrent leur contenu dans la paroi du tube digestif. La libération de sérotonine affecte la motilité, la sécrétion et peut activer les terminaisons afférentes vagales dans le tractus gastro-intestinal supérieur servant de déclencheur émétique (Bueno L *et al.*, 2007).

La BE est également composée de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE), mais ces cellules seront développées avec les autres cellules du système immunitaire dans le chapitre A.II.b.4.

↳ Les perturbations des cellules composant la BE, retrouvées chez les patients atteints du SII (Martínez C et al., 2012) ou de MICI (Fries W et al., 2013), associées à un terrain génétiquement favorable, vont entraîner une diminution de la protection de l'épithélium contre les agents bactériens de la lumière intestinale, une augmentation de la perméabilité de la BE et ainsi faciliter leur translocation aux niveaux des structures sous-jacentes. Ces agents vont alors entraîner une dérégulation de la réponse inflammatoire et/ou une sensibilisation des nocicepteurs viscéraux.

### A.II.b.3 : Les médiateurs de la réponse inflammatoire et des phénomènes de sensibilisation périphérique

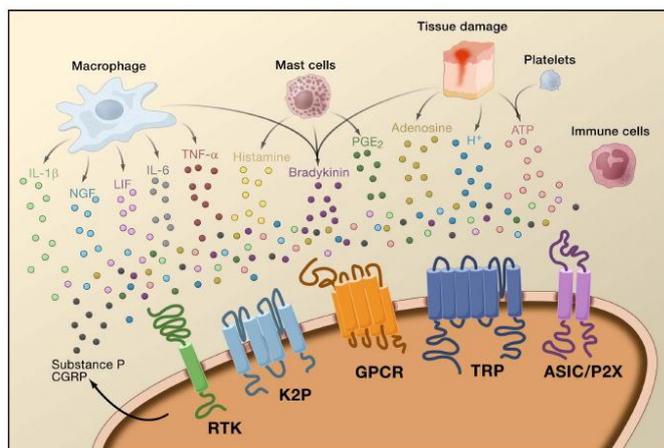
Dans le cas du SII, les données récentes confirment la présence d'une micro-inflammation (Fu Y et al., 2009 ; Cremon C et al., 2009 ; Liebrechts T et al., 2007) qui pourrait être à l'origine de la génération des symptômes associés à cette maladie (Hughes PA et al., 2013a et b). Concernant les MICI, certaines modifications génétiques peuvent aboutir à une activation exacerbée du système immunitaire (Cader MZ and Kaser A, 2013 ; Abraham C and Cho J, 2009a). Dans ce chapitre, les différents médiateurs de la réponse inflammatoire et les cellules qui les produisent vont être abordés (Figure 10), ainsi que leurs dérégulations observées dans les cas du SII ou de MICI.



**Figure 10 : Représentation schématique des cellules et médiateurs de la réponse inflammatoire, de leurs récepteurs cibles.** Schéma simplifié de cellules et médiateurs responsables de l'activation des afférences sensorielles entériques lors d'une réaction inflammatoire. 5-HT-R: récepteur à la 5-hydroxytryptamine; BK: récepteur à la bradykinine; CGRP: calcitonine gene-related peptide; ECC: cellule enterochromaffine; NGF: facteur de croissance nerveuse; NO: oxyde nitrique; PAR-R: récepteur activé par les protéases; PG-R: récepteur aux prostaglandines; SP: Substance P; TrKA: récepteur tyrosine kinase A; TRPA1: récepteur transitoire potentiel ankyrine-1; TRPV1: récepteur transitoire potentiel vanilloïde-1; P2X3: récepteur P2X3 Purinergique. D'après Vermeulen W et al., 2014

## Les médiateurs inflammatoires

La libération de médiateurs inflammatoires résulte d'une activation du système immunitaire. Ces médiateurs vont alors activer les terminaisons libres, *via* des récepteurs ou des canaux particuliers qui seront décrits ultérieurement (Figure 11).



**Figure 11 : Médiateurs de la réponse inflammatoire**

Les dommages tissulaires conduisent à la libération de médiateurs inflammatoires par les nocicepteurs activés et/ou par des cellules non-neuronales telles que des mastocytes (*mast cells*), basophiles, plaquettes (*platelets*), macrophages, neutrophiles ou des cellules endothéliales. Cette «soupe inflammatoire» comprend la sérotonine, l'histamine, le glutamate, l'ATP, l'adénosine, la substance P, le CGRP, la bradykinine, les prostaglandines (PGE), les thromboxanes, les leucotriènes, les endocannabinoïdes, le NGF (facteur de croissance des nerfs), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , des protéases extracellulaires et des protons (H<sup>+</sup>). Ces facteurs agissent directement sur les nocicepteurs par liaison à un ou des récepteurs tels que des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), des canaux TRP, des canaux ioniques sensibles au pH (ASIC), des canaux potassiques (K2P), ou des récepteurs à tyrosine kinases (RTK). D'après Basbaum AI *et al.*, 2009

### L'histamine et la sérotonine

Ce sont des amines vasodilatatrices produites par les cellules neuronales et les mastocytes (également par les plaquettes et les ECC pour la sérotonine). L'histamine agit *via* son récepteur H1, tandis que la sérotonine agit *via* une multitude récepteurs de la famille des 5-HT (5-HydroxyTryptamine). L'activation des récepteurs à la sérotonine stimule la motilité intestinale et sensibilise les nocicepteurs (Millan MJ, 1999).

Les patients souffrant du SII présentent une diminution de l'expression des transporteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (SERT) (Moskwa A and Boznanska P, 2007), avec comme conséquence, des taux de sérotonine constamment élevés et donc une dérégulation de la motilité intestinale et une augmentation de la stimulation des nocicepteurs (Sikander A *et al.*, 2009). Chez les patients atteints de MC, il semblerait que l'augmentation de sérotonine soit retrouvée pendant les phases de rémission présentant des symptômes assimilables à ceux du SII (Minderhoud IM *et al.*, 2007).

### Les kinines

Elles sont représentées par deux peptides vasodilatateurs, la bradykinine et la kallidine, qui sont issus du clivage du kininogène par la kallicroïne. Elles jouent un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire, la douleur et l'inflammation. En effet, ces peptides agissent sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins pour en augmenter la perméabilité et ainsi faciliter la migration

des leucocytes. Ces kinines vont agir *via* deux récepteurs distincts couplés aux protéines G (RCPG), appelés B1 (B1R) ou B2 (B2R). L'activation de ces récepteurs va entraîner la libération d'autres médiateurs tels que l'oxyde nitrique (NO), l'acide arachidonique, des prostaglandines ou des leucotriènes. Si aucune donnée ne semble exister sur leur implication dans le SII, une augmentation de la kallibrène et des récepteurs B1R et B2R a été mise en évidence sur des biopsies de patients atteints de MC et de RCH ainsi qu'une corrélation de cette augmentation avec le degré d'inflammation du tissu (Stadnicki A, 2011 ; Devani M *et al.*, 2005).

### Les eicosanoïdes

Ils sont métabolisés à partir de l'acide arachidonique et sont représentés par trois grandes sous-familles, (i) les prostaglandines PG (PGE2 et PGD2 majoritairement), (ii) le thromboxane et (iii) les leucotriènes. Les cyclo-oxygénases (COX-1 et -2) sont les enzymes nécessaires à la formation des deux premières familles, alors que la synthèse des leucotriènes est dépendante des lipo-oxygénases. Les PGs sont des médiateurs impliqués dans l'hypersensibilité d'origine inflammatoire, particulièrement la PGE2 (Salvemini D *et al.*, 2013). *Via* l'activation de leurs récepteurs (EP-1, -2 et IP particulièrement), ces molécules vont être capables d'induire des cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à la sensibilisation des nocicepteurs. Il n'y a pas d'étude qui montre directement l'implication des eicosanoïdes dans la physiopathologie du SII. Chez les patients atteints de MICI, une forte augmentation des ARNm codant pour la COX-2 (6 à 8 fois) a été mise en évidence au niveau des *plexus* myentériques (Roberts PJ *et al.*, 2001).

### L'oxyde nitrique (NO)

Ce gaz est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par la NO synthase (NOS) dans les cellules inflammatoires, endothéliales et dans les neurones. Une fois produit, le NO diffuse rapidement à travers les membranes afin d'agir sur les cellules voisines. Bien que son rôle exact soit encore discuté, il semblerait que le NO contribue de manière indirecte au développement de l'inflammation *via* l'activation de la guanylyle cyclase et des récepteurs TRPV1 et TRPA1 (Levy D and Strassman AM, 2004). Il stimule la sécrétion de prostaglandines et augmente le débit sanguin local, contribuant ainsi à l'inflammation et à la sensibilisation des nocicepteurs (Paragomi P *et al.*, 2014 ; Shamshiri H *et al.*, 2009). Une étude récemment publiée, a mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques en NO chez des patients atteints du SII par rapport à des volontaires sains (Mete R *et al.*, 2013 ; Yazar A *et al.*, 2005). L'augmentation de l'expression d'iNOS et de NO a été observée aux niveaux des tissus inflammés de patients atteints de MICI (Dhillon SS *et al.*, 2014 ; Cross RK and Wilson KT, 2003).

### Les cytokines

Ces protéines sont divisées en 5 familles (interférons, chimiokines, interleukines, *tumor necrosis factor* -TNF- et les *colony stimulating factors* -CSF-). Ce sont des facteurs pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , ou IL-1 $\beta$  par exemple) ou anti-inflammatoires (IL-10, -13 et TGF- $\beta$  par exemple). Ces cytokines peuvent sensibiliser les terminaisons nociceptives, activer la production d'autres médiateurs inflammatoires et conditionner la différenciation des lymphocytes *Thelper* ce qui fait le lien entre immunité innée et adaptative. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, des cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , altèrent les jonctions serrées et entraînent une perte de la fonction de barrière. A l'inverse le TGF- $\beta$ , cytokine anti-inflammatoire produite par les cellules Th régulatrices, peut préserver l'intégrité des jonctions serrées en agissant directement sur les cellules épithéliales (probablement par un mécanisme dépendant de l'AMPC) (Roda G *et al.*, 2010). Les études cliniques concernant la modification du profil de cytokines chez les patients souffrant du SII sont contradictoires. En effet, certains auteurs ne relèvent aucune différence dans la production de cytokines chez ces patients (Kindt, S *et al.*, 2009) quand d'autres trouvent des augmentations de cytokines pro-inflammatoires (Bashashati M *et al.*, 2014 ; Buckley MM *et al.*, 2014 ; Hughes PA *et al.*, 2013a et b). Concernant les MICI, de nombreuses études ont pu mettre en évidence une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 (McGuckin MA *et al.*, 2009 ; Polińska B *et al.*, 2009) ce qui est d'ailleurs la base d'une nouvelle stratégie thérapeutique visant à séquestrer le TNF- $\alpha$  par des anticorps, bloquant ainsi son action pro-inflammatoire (Fakhoury M *et al.*, 2014 ; Ardizzone S and Bianchi Porro G, 2005).

### Les tachykinines

Elles forment une famille de neurotransmetteurs qui regroupe la substance P (SP), les neurokinines A et B (NKA et NKB) et l'hémokinine (HK1). Ces neurotransmetteurs sont sécrétés par les neurones du système nerveux entérique, par les cellules immunitaires de la *lamina propria* et par les neurones sensoriels. Ils agissent *via* leurs récepteurs NK1 à 3 qui sont des récepteurs de type RCPG (Koon HW and Pothoulakis C, 2006). Ces récepteurs sont localisés sur les cellules épithéliales, immunitaires et inflammatoires (mastocytes, macrophages et lymphocytes T) et leur activation va aboutir à la production de cytokines. Les données cliniques concernant le SII sont contradictoires. Si la majorité des auteurs ne trouve aucune variation (Zhang H *et al.*, 2008), certaines études montrent au contraire une concentration plus élevée de SP chez les patients SII-D (Sohn W *et al.*, 2014 ; Dong W *et al.*, 2003). Concernant les MICI, des données cliniques montrent une surexpression de NK1 (Ter Beek WP *et al.*, 2007), ainsi que de la SP au niveau du tissu inflammé, mais également sur des parties saines (Michalski CW *et al.*, 2007).

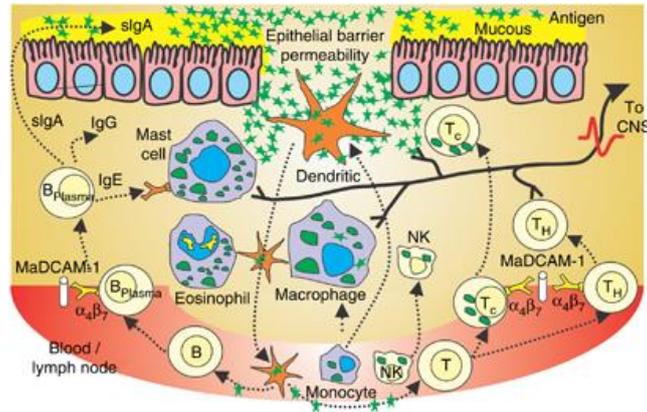
### Les neurotrophines

Ces polypeptides sont des facteurs de croissance essentiels au développement et à la survie des neurones (Skaper SD, 2012). Cette famille est composée du *nerve growth factor* (NGF), du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), et des neurotrophines-3 et -4/5 (NT3 et NT4/5). Ces neurotrophines agissent *via* les récepteurs p75 (p75NTR, qui n'a pas d'affinité spécifique pour une neurotrophine particulière) et TrKs (le NGF se lie au récepteur TrkA, le BDNF et la NT4/5 au récepteur TrkB et la NT-3 au récepteur TrkC). Le NGF est probablement la neurotrophine la plus importante pour les phénomènes de sensibilisation périphérique. En effet, en se liant à son récepteur TrkA, le NGF augmente l'expression de facteurs (substance P par exemple), de récepteurs (TRPV1, P2X3, par exemple) ou encore de canaux ioniques conduisant à une augmentation de l'activité des nocicepteurs et de la réponse inflammatoire. Les patients atteints du SII présentent une augmentation de la production de BDNF corrélée à l'intensité de la douleur (Yu YB *et al.*, 2012). Concernant les patients atteints de MICI, une étude a démontré une surexpression d'environ 55% des ARNm codant pour le NGF et pour son récepteur TrkA au niveau de la *lamina propria*, des mastocytes et des *plexus* d'Auerbach et de Meissner (Di Mola FF *et al.*, 2000).

↳ Les modifications d'expression de ces médiateurs vont conduire à une augmentation de la stimulation des nocicepteurs viscéraux, à une dérégulation de l'expression d'autres médiateurs, de canaux et de récepteurs et vont ainsi augmenter la stimulation des cellules immunitaires, conduisant à la mise en place d'une inflammation.

#### A.II.b.4 : Les cellules du système immunitaire

Comme nous venons de le voir, les médiateurs de l'inflammation participent à la sensibilisation des nocicepteurs ainsi qu'à l'inflammation. Ce chapitre va maintenant s'intéresser aux cellules du système immunitaire responsables de la libération de ces médiateurs ou activées par ces derniers (Figure 12), ainsi qu'aux dérégulations de celles-ci dans le cas du SII (Hughes PA *et al.*, 2013a et b ; Ohman L and Simrén M 2010) ou de MICI (Geremia A *et al.*, 2014 ; Wallace KL *et al.*, 2014) (Figure 12).



**Figure 12 : Activation de la réponse immunitaire**

Les défenses non spécifiques sont issues du mucus, des cellules de la barrière épithéliale et des cellules du système immunitaire inné (tel que les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules tueuses naturelles (NK), les mastocytes et les éosinophiles). Les défenses spécifiques à médiation cellulaire (majoritairement *via* les cellules T) ou humorale (lymphocytes B) activent une réponse spécifique contre l'exposition répétée à un antigène donné. Les cellules dendritiques (*dendritic*) sont des cellules présentatrices d'antigène qui phagocytent le matériel antigénique au site de l'infection et se déplacent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T, et sont donc des médiateurs clés entre la réponse immunitaire innée et adaptative. L'exposition répétée à un antigène active les cellules B et T dans les ganglions lymphatiques, qui migrent ensuite jusqu'au tractus gastro-intestinal par l'expression de  $\alpha_4\beta_7$ . Les afférences entériques sont modulées par les médiateurs immunitaires sécrétés par un grand nombre de types cellulaires immunitaires. CNS = SNC, système nerveux central; Ig, l'immunoglobuline; MadCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule-1. D'après Hughes PA *et al.*, 2013.

### Les cellules du système immunitaire inné

#### Les Mastocytes

Les mastocytes synthétisent une grande variété de médiateurs, qui peuvent être libérés rapidement à partir de granules préformés (histamine, sérotonine, serines protéases et des protéoglycanes) ou qui peuvent être synthétisés *de novo* tels que les prostaglandines (PGE2, PGD2), les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), et des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) (De Winter BY *et al.*, 2012 ; Rijniere A *et al.*, 2007). Dans la paroi gastro-intestinale, la proximité entre les mastocytes et les neurones semble être un phénomène important et une interaction bidirectionnelle entre les deux est généralement admise (Van Diest SA *et al.*, 2012 ; Van Nassauw L *et al.*, 2007). En effet, les patients atteints du SII présentent une infiltration mastocytaire dans la muqueuse intestinale (Piche T *et al.*, 2009 ; Guilarte M *et al.*, 2007 ; Chadwick VS *et al.*, 2002). De plus, le kétotifène, inhibiteur mastocytaire, réduit les symptômes liés à la maladie et améliore leur qualité de vie (Klooker TK *et al.*, 2010). Enfin, la proximité des mastocytes activés avec les neurones coliques est significativement corrélée avec la sévérité et la fréquence de la douleur abdominale ou de l'inconfort (Park JH *et al.*, 2006 ; Barbara G *et al.*, 2004). Il existe également de nombreuses études cliniques montrant l'implication des mastocytes dans les MICI. En effet, les patients atteints de MC ou de RCH présentent une augmentation significative de la tryptase des mastocytes ainsi qu'une forte augmentation du nombre de mastocytes dans la *lamina propria* et la sous-muqueuse (Popadiuk S *et al.*, 2006 ; Raithel M *et al.*, 2001). Chez certains patients atteints de RCH, une modification du profil de sécrétion des mastocytes a été démontrée (Fox CC *et al.*, 1990).

Les Phagocytes :

Les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les polynucléaires, composent la famille des phagocytes.

Les macrophages intestinaux possèdent une forte activité phagocytaire (Bain CC and Mowat AM, 2014a et 2014b). En condition physiologique, les CD14 négatifs, produisent, entre autre, des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, qui permet d'assurer la différenciation des cellules Th0 en cellules Thrégulatrices (Denning TL *et al.*, 2007). Quand il y a invasion de la muqueuse colique, un grand nombre de macrophages intestinaux sont recrutés sur le site de l'invasion et produisent des médiateurs pro-inflammatoires (Bain CC and Mowat AM, 2014a et b). Des biopsies effectuées chez des patients atteints du SII montrent une diminution de la capacité de ces macrophages CD68<sup>+</sup> à exercer leur rôle de chimiotacteur, ainsi qu'une diminution du nombre de ces macrophages par rapport à celui évalué chez des volontaires sains (Braak B *et al.*, 2012). Une autre équipe a mis en évidence que des cultures de cellules mononucléaires dérivées de cellules sanguines (PBMC) de patients SII produisaient une plus grande quantité de cytokines pro-inflammatoires en condition basale, que les PBMC issus de volontaires sains (Liebregts T *et al.*, 2007). Dans les MICI, une classe particulière de macrophages est présente dans la muqueuse intestinale puisque ce sont des cellules qui expriment à la fois des marqueurs des macrophages et des cellules dendritiques (CD14, CD33, CD68, CD205 et CD209). Ces macrophages produisent alors un panel important de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23, etc) (Kamada N *et al.*, 2008).

Les cellules dendritiques (CDs), sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) importantes dans l'organisme car se sont les principales cellules capables d'activer les cellules T naïves. Suite à leur activation (notamment *via* le récepteur PRR qu'elles portent à la membrane ou *via* des cytokines pro-inflammatoires), ces cellules vont pouvoir sécréter des cytokines et ainsi influencer la différenciation des lymphocytes Th0. Aucune étude clinique, à notre connaissance, n'a mis en évidence de modification de CD chez les patients atteints du SII (Hisamatsu T and Hibi T, 2012). Au niveau de la muqueuse colique inflammée de patients atteints de MC et de RCH (Nieminen JK *et al.*, 2014), les CDs observées présentent, entre autre, une forte augmentation du marqueur de maturation et d'activation CD40 que les anticorps anti-TNF- $\alpha$  permettent de diminuer (Hart AL *et al.*, 2005).

Les polynucléaires neutrophiles (producteurs de myéloperoxydase, MPO) sont les globules blancs les plus largement représentés, contrairement aux basophiles et aux éosinophiles. Les activités microbicides et cytotoxiques des neutrophiles impliquent la libération d'une enzyme protéolytique (la MPO), de médiateurs inflammatoires (cytokines par exemple) et la production rapide de formes réactives de l'oxygène. Les basophiles et éosinophiles sont, eux, des producteurs d'histamine. En clinique, les dosages de MPO et l'ECP (au niveau de muqueuse rectale) montrent que les concentrations de ces protéines sont significativement augmentées chez les patients atteints du

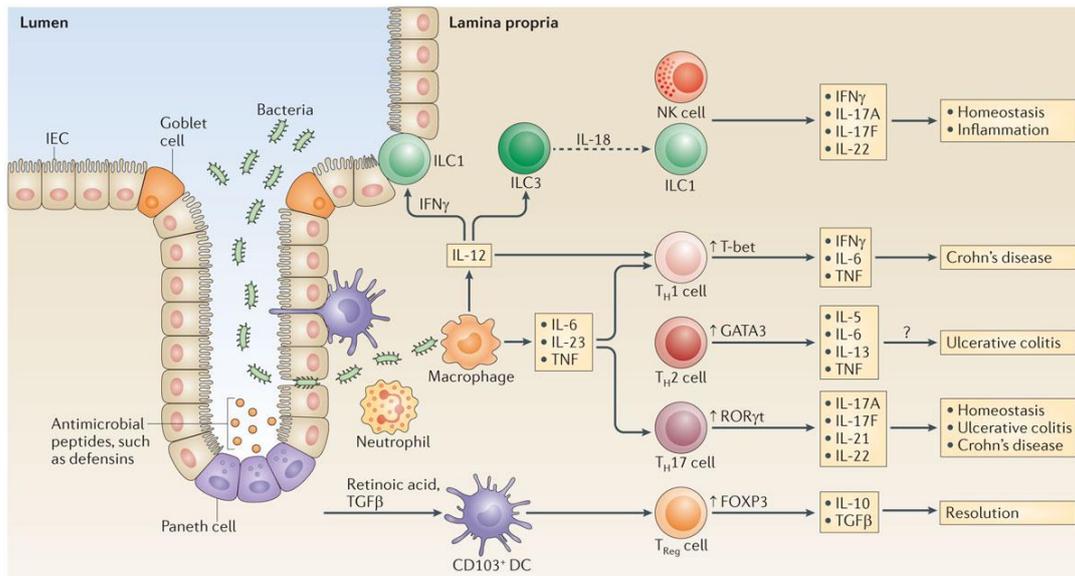
SII et de RCH en phase de rémission (Kristjánsson G *et al.*, 2004). Une preuve indirecte de l'augmentation de l'activation des neutrophiles dans les MICI est qu'une des protéines qu'ils synthétisent, la calprotectine, est corrélée à l'atteinte inflammatoire, et son dosage fécal participe aujourd'hui au diagnostic des MICI (Guardiola J *et al.*, 2014).

#### Les cellules Natural Killer : NK

Ces cellules sont à l'interphase entre le système immunitaire inné et adaptatif et possèdent une cytotoxicité directe envers les cellules infectées. Leurs effets sont multiples, dégranulation (majoritairement de perforine), déclencheurs des phénomènes d'apoptose ou de nécrose, et libération de cytokines permettant l'activation de cellules inflammatoires voisines et l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Zeissig S and Blumberg RS, 2014 ; Middendorp S and Nieuwenhuis EE, 2009). Les études menées sur des biopsies de patients souffrant du SII, sont peu nombreuses, avec peu de patients et dont les résultats sont divergents (Braak B *et al.*, 2012 ; Elsenbruch S *et al.*, 2004 ; Motzer SA *et al.*, 2002).

#### Lymphocytes inter-épithéliaux

Ils sont situés dans la BE et sont donc à l'interphase entre le milieu extérieur et intérieur, et entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces lymphocytes inter-épithéliaux (LIE) migrent à travers la BE afin d'adhérer à la lame basale des entérocytes où ils participent à la sécrétion d'IgA. Les IgA sécrétoires, forment un film antiadhésif à la surface de la muqueuse et neutralisent les toxines bactériennes. Les analyses de biopsies de patients atteints du SII sont contradictoires. Certains auteurs observent une augmentation du nombre de LIE alors que d'autres n'observent aucun changement (Foley S *et al.*, 2011 ; Guilarte M *et al.*, 2007 ; Dunlop SP *et al.*, 2003). Les dosages sérologiques récemment réalisés chez les patients atteints de MICI, montrent une augmentation d'IgA chez les patients atteints de MC mais pas de RCH (Gross S *et al.*, 2014) mais les dosages réalisés au niveau des cryptes du duodénum montrent une augmentation dans ces deux pathologies (Marsilio S *et al.*, 2014). Des données récentes suggèrent qu'une augmentation d'IgA pourrait servir de marqueur de prédiction d'aggravation de la MC (Tung CC *et al.*, 2014).



**Figure 13 : Cellules du système immunitaire (inné et adaptatif) et dérèglement dans le cadre de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) : maladie de Crohn (*Crohn's Disease*) et rectocolite hémorragique (*Ulcerative colitis*)**

Chez les patients atteints de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) et dans des modèles murins expérimentaux de colite, les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont produites par diverses cellules du système immunitaire, en réponse aux *stimuli* environnementaux, tels que des microorganismes commensaux. Les cellules dendritiques (CD), les neutrophiles, les macrophages, les cellules naturelles tueuses (NK), les cellules épithéliales de l'intestin (IEC), les cellules lymphoïdes innées (ILCs), les cellules T effectrices (T helper 1 (Th1), Th2 et Th17) et T régulatrices (Treg) produisent des cytokines dans la muqueuse lors d'une inflammation. L'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans la muqueuse régule le développement et le potentiel maintien de l'inflammation de la muqueuse chez les patients atteints de MICI. La flèche pointillée indique que les ILCs, qui produisent des cytokines qui sont impliquées dans l'inflammation intestinale, peuvent répondre à l'IL-18. D'après Neurath MF, 2014.

## Les cellules du système immunitaire adaptatif

### Les Lymphocytes T

La structure générale des lymphocytes T (LT) comprend des récepteurs spécifiques appelés TCR pour récepteurs des cellules T (qui permettent de reconnaître les fragments peptidiques associés aux molécules du CMH), d'un cluster de différenciation CD3, CD4 ou CD8 en fonction du sous-type de lymphocyte considéré ainsi que des récepteurs aux cytokines. De plus, ces LT expriment des protéines membranaires telles que des immunoglobulines, des intégrines et des sélectines. En fonction des marqueurs de surface exprimés par ces LT, trois grandes familles se distinguent ; les lymphocytes T- $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> et CD3<sup>+</sup>, les LT-CD8<sup>+</sup>, également appelés LT cytotoxiques (Tc) et les LT-CD4<sup>+</sup>, appelés LT *helper* ou auxiliaires (Th), qui une fois activés se différencient en quatre sous-familles (Th1, Th2, Th17 et Th régulateurs -Threg-). Dans les SII, le nombre de LT circulant reste inchangé mais avec une augmentation de la proportion de Tc et Th (Ohman L *et al.*, 2009). Concernant le profil de Th, les données sont discordantes et certains auteurs plaident pour une réaction plutôt de type Th1, quand d'autres sont plutôt en faveur d'une réponse de type Th2 (Hughes PA *et al.*, 2013a et b). Concernant les patients atteints de MICI (Geremia A *et al.*, 2014), la question n'est pas non plus tranchée

quand au type de réponse induite. La MC engendrerait plutôt une réponse de type Th1 et maintenant surtout Th17 et la RCH serait plutôt de type Th2, voir également Th17 (Gálvez J, 2014 ; Kanagavelu S *et al.*, 2014 ; Sugihara T *et al.*, 2010 ; Rovedatti L *et al.*, 2009). De manière générale, les LT prélevés dans la muqueuse de patients MC ou RCH entraînent une plus grande production de cytokines que les LT provenant de volontaires sains.

### Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) différenciés (plasmocytes) produisent des immunoglobulines (Ig) soit sous forme membranaire (BCR : récepteur des cellules B), soit sous forme soluble (Ac : anticorps). Ces Ig sont responsables de la réponse immunitaire humorale spécifique car ils servent à la reconnaissance et à la destruction de l'agent pathogène. Il existe cinq classes d'Ig :

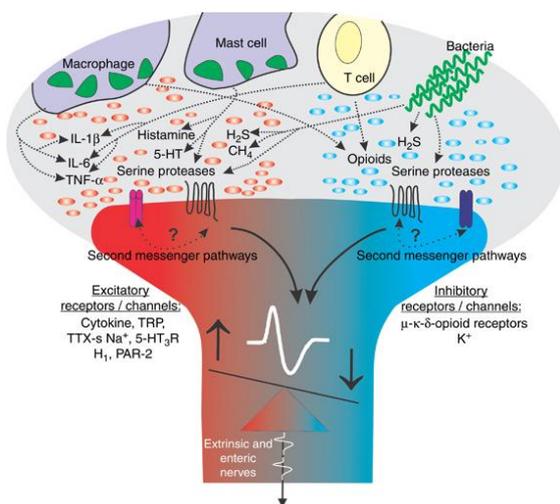
- Les IgM sont les premières produites lors d'une infection puis elles diminuent rapidement.
- Les IgD sont co-exprimées avec les IgM et auraient un rôle indispensable dans la différenciation des LB en plasmocytes et cellules mémoires.
- Les IgG sont les Ig les plus représentées et ont un rôle important dans la détection d'infection.
- Les IgE sont impliquées dans les mécanismes allergiques, *via* la présence de récepteurs à ces IgE à la surfaces des mastocytes et des polynucléaires basophiles.
- Les IgA, comme nous l'avons vue précédemment, jouent un rôle particulier au niveau des muqueuses en empêchant la fixation des agents pathogènes aux surfaces des cellules épithéliales.

Bien que ces cellules aient été moins étudiées que les LT, quelques études semblent montrer leur implication dans la physiopathologie du SII et des MICI (Cupi ML *et al.*, 2014 ; Brandtzaeg P *et al.*, 2010 ; Cremon C *et al.*, 2009 ; Öhman L *et al.*, 2009 ; Brandtzaeg P *et al.*, 2006 ; Zar S *et al.*, 2005).

 *Les dérégulations de la BE, l'augmentation de la production de médiateurs inflammatoires, ainsi que des dérèglements des cellules du système immunitaire sont donc souvent associés au SII et surtout aux MICI. Cette activation excessive de la réponse inflammatoire, va donc conduire à une activation répétée de récepteurs et de canaux ioniques présents sur les terminaisons libres (induisant des phénomènes de sensibilisation) et sur les cellules immunitaires et épithéliales (entraînant une inflammation chronique) (Brierley SM and Linden DR, 2014 ; Knowles C and Aziz Q, 2009).*

### A.II.c : Mécanismes de l'hypersensibilité viscérale

Nous venons de voir que plusieurs acteurs pouvaient être impliqués dans les phénomènes de sensibilisation périphérique à l'origine des douleurs chroniques du côlon. Ces acteurs peuvent entraîner la stimulation de récepteurs ou canaux ioniques présents sur les terminaisons douloureuses ou dans leur environnement qui contribuent à l'initiation et à la chronicisation de l'hypersensibilité colique (Figure 14). Ces récepteurs et canaux ioniques ainsi que l'innervation impliqués dans ces phénomènes sont décrits dans ce chapitre.



**Figure 14 : Activation des récepteurs et des canaux, via les médiateurs inflammatoires, conduisant à une activation des nocicepteurs**

Les bactéries, leurs produits, et les médiateurs immunitaires se lient à des récepteurs sur les terminaisons nerveuses. Ces récepteurs peuvent moduler soit directement soit via une action couplée à l'activation de canaux ioniques l'excitabilité de la terminaison nerveuse. La modulation de l'excitabilité neuronale peut être induite par des médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , des cytokines (ils : interleukines). D'après Hughes PA *et al.*, 2013.

#### A.II.c.1. Récepteurs et canaux ioniques

##### Les Pattern Recognition Receptors : PRR

Cette famille, composée des récepteurs TLRs et NODs, joue un rôle à l'interface entre l'immunité innée et adaptative et permet la communication entre la flore bactérienne luminale et les cellules épithéliales. Ces récepteurs, portés par les cellules de la BE et du système immunitaire, permettent la reconnaissance de motifs conservés particuliers appelés PAMPs (motifs moléculaires associés à des pathogènes) portés par des bactéries et des virus. L'activation des ces PRR va alors induire des mécanismes de l'immunité innée (phagocytose, synthèse de peptides antimicrobiens) mais également des mécanismes de l'immunité adaptative (activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK et donc la production de cytokines et de chimiokines) (Matricon J *et al.*, 2010 ; Dahan S *et al.*, 2008).

##### Les Toll Like Receptor : TLR

Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires, dont 10 sous-types ont été identifiés chez l'homme. Ces TLR sont exprimés sur les cellules de la BE, sur les cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques) et adaptatif. Une augmentation de l'expression de TLR3 et 4 et de TLR4 et

5 a été mise en évidence dans la muqueuse de patients atteints respectivement du SII-mixte et du SII-PI (Brint EK *et al.*, 2011). De telles modifications ont également été mise en évidence dans la muqueuse de patients atteints de MC (augmentation de TLR2 et 4) (Szebeni B *et al.*, 2008). Plusieurs polymorphismes génétiques ont également été associés aux MICI, tels que ceux de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR9 (De Jager PL *et al.*, 2007). Cependant, les effets fonctionnels de ces variants ne sont pas clairement définis. Ces modifications pourraient compromettre la capacité du système immunitaire à distinguer les agents commensaux des agents pathogènes ou pourraient amplifier des réponses immunitaires inappropriées. Il reste à clarifier si cette régulation à la hausse est l'une des causes des MICI ou tout simplement l'une des conséquences ou voir un facteur concomitant.

#### Les récepteurs NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain

Ces sont des récepteurs cytoplasmiques appartenant à la famille des NLR (*NOD-like receptor*), dont huit sous-types ont été identifiés chez l'Homme. L'internalisation de PAMP bactérien, reconnu par le domaine LRR des récepteurs NOD, va déclencher leur activation. Ces derniers vont alors former des dimères et recruter des sérines-thréonines kinases RIP2 au niveau de leur domaine CARD. Le complexe RIP2-CARD va ainsi engendrer l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et donc la production de cytokines pro-inflammatoires. Des modifications de ces récepteurs sont associées aux troubles gastro-intestinaux, particulièrement à la MC, mais il ne semble pas y avoir de corrélation avec le SII (Yazdanyar S *et al.*, 2009 ; Yazdanyar S and Nordestgaard BG, 2010). Beaucoup de polymorphismes de NOD, et particulièrement de NOD2, ont été identifiés comme étant des gènes de susceptibilité pour la MC (notamment dans le domaine de reconnaissance bactérien LRR, et de CARD15). Ces modifications engendrent une réponse immunitaire exacerbée en réponse à une stimulation antigénique.

#### Les canaux ioniques

#### Les canaux TRP : Transient Receptor Potential.

C'est une famille de canaux ioniques subdivisée en six sous-types : TRP*Vanilloïde*, TRP*Ankyrine*, TRP*Melastatine* TRP*Polycystine*, TRP*MucoLipine* et TRP*Canonique* (Farmer AD and Aziz Q, 2013 ; Boesmans W *et al.*, 2011 ; Montell C, 2011). À l'exception de TRPM4 et TRPM5, tous les canaux TRP sont perméables au calcium (Holzer P, 2011b). Ces canaux TRP peuvent contrôler les fonctions cellulaires en modifiant la perméabilité calcique (Voets T *et al.*, 2005). Certains activateurs de ces canaux sont connus comme l'huile de moutarde (TRPA1) et la capsaïcine (TRPV1), une augmentation de Ca<sup>++</sup> intracellulaire (TRPM4 et 5), la température (chaleur : TRPV1, V2, V3, V4, TRPM4 et M5 ; froid : TRPM8 et TRPA1) et des *stimuli* mécaniques ou osmotiques (TRPV4 et TRPCs). L'inflammation peut également les activer (bradykinine, NGF, PAR-2, sérotonine). Ces canaux sont exprimés sur les fibres afférentes intestinales et ils participent à la transmission du message douloureux au niveau de la MEp (Blackshaw LA *et al.*,

2010). Une surexpression de TRPV1, corrélée à l'intensité de la douleur, a été retrouvée chez les patients atteints du SII et de MICI (Akbar A *et al.*, 2010 ; Akbar A *et al.*, 2008).

#### Les canaux ASIC : Acid-Sensing Ion Channels

Les membres de cette famille de canaux sensibles à de faibles variations de pH, sont codés par trois gènes différents (ACCN1, ACCN2 et ACCN3) qui, grâce à des phénomènes d'épissage alternatif, encodent pour six protéines : ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 et ASIC4. Ces différentes sous-unités forment des complexes d'homo- ou d'hétéro-trimères qui diffèrent en termes de cinétique d'activation, de seuil de sensibilité au pH externe, de distribution tissulaire et de propriétés pharmacologiques. En cas d'acidose, il y a activation de ces canaux, qui vont alors être perméables aux ions sodium (et aux ions calcium pour ASIC1a et b). Ces canaux sont situés au niveau du système nerveux central et dans les neurones sensoriels. Ils sont notamment retrouvés au niveau des nocicepteurs viscéraux où ils peuvent être activés par l'acidose induite par une réaction inflammatoire (Holzer P, 2011a). Peu de données cliniques sont disponibles, cependant une étude met en évidence la surexpression du canal ASIC3 dans la muqueuse de patients MICI (Yiangou Y *et al.*, 2001b).

#### Les récepteurs P2X

Ces sont des récepteurs ionotropiques activés par l'ATP extracellulaire (Coddou C *et al.*, 2011). Ils sont exprimés par les cellules du système immunitaire ainsi que par les nocicepteurs viscéraux. L'ATP est connue depuis longtemps pour jouer un rôle dans la mécanosensibilité et permet d'activer les afférences nociceptives. Au niveau viscéral, l'ATP est libérée par les cellules épithéliales tapissant le tractus gastro-intestinal (Wynn G *et al.*, 2003), par les cellules du système immunitaire et par les nocicepteurs (Shinoda M *et al.*, 2009). Cette libération fait suite à une lésion tissulaire, à une distension, ou à l'activation des nocicepteurs. Certaines études suggèrent qu'ils seraient dérégulés, en particulier P2X3 et 7, chez les patients atteints du SII (Keating C *et al.*, 2011 ; Galligan JJ, 2004) et de MICI (Ochoa-Cortes F *et al.*, 2014 ; Christofi FL, 2008 ; Yiangou Y *et al.*, 2001a).

#### Les récepteurs à activité protéase : PAR

Ils forment une famille de quatre membres activés par des sérine-protéases, libérées lors d'une réaction inflammatoire. PAR-1 et PAR-2 sont les plus couramment exprimés au niveau viscéral et sont activés respectivement par des médiateurs tels que la thrombine et la trypsine et par la tryptase (Stenton GR *et al.*, 2002). Ils sont présents sur les neurones sensoriels et dans le tractus gastro-intestinal où ils participent à tous les aspects de la physiologie intestinale. L'activation des PAR, présents sur des cellules du système immunitaire et sur les neurones entériques, peut entraîner l'apparition d'une hypersensibilité *via* la libération de prostaglandines, cytokines, SP, CGRP, etc. (Dale C and Vergnolle N, 2008 ; Vergnolle N, 2005 ; De Garavilla L *et al.*, 2001). Enfin, il semblerait que ces récepteurs soient également

impliqués dans le maintien de la perméabilité de la barrière épithéliale colique, en jouant notamment sur les jonctions serrées (Vergnolle N, 2003). Il a récemment été montré que les patients atteints du SII ont une surproduction de sérine-protéase (Farmer AD and Aziz Q, 2013). Une augmentation du ratio PAR-1/PAR-2 a été observée chez les patients atteints du SII par rapport aux volontaires sains (Bian ZX *et al.*, 2009). Le récepteur PAR-1 serait également surexprimé dans des biopsies de patients atteints de MC et RCH (Vergnolle N *et al.*, 2004).

### Les récepteurs à la sérotonine 5-HT

Cette famille de récepteurs 5-hydroxytryptamine (5-HT), est composée de 13 membres : 5-HT<sub>1A/B/D/E/F</sub>, 5-HT<sub>2A/B/C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub>. Ces récepteurs sont localisés aux niveaux des systèmes nerveux entérique et central, et ont des fonctions très complexes (Greenwood-Van Meerveld B *et al.*, 2006).

Parmi les sous-types de récepteurs 5-HT impliqués dans l'hypersensibilité viscérale, le 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> sont les plus étudiés. En effet, les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (alosétron et cilansétron) et des agonistes du récepteur 5-HT<sub>4</sub> diminuent l'hyperalgésie et la douleur abdominale chez les patients atteints du SII (Sabaté JM *et al.*, 2008 ; Gershon MD, 2005). Si des modifications des concentrations en sérotonine ont pu être mises en évidence chez des patients atteints de MC et de RCH, aucune modification d'expression de ces récepteurs n'a cependant pu être observée (Margolis KG, Gershon MD, 2009).

### Canaux ioniques voltage-dépendants

#### Les canaux potassiques voltage-dépendants K<sub>v</sub>

Ces canaux sont au nombre de 12 (K<sub>v</sub>1 à K<sub>v</sub>12) et participent à la repolarisation neuronale. Ils sont constitués d'une sous-unité principale ( $\alpha$ 1) et de sous-unités régulatrices. Les études précliniques suggèrent une implication de ces canaux dans l'HSC (Bi Y *et al.*, 2011 ; Luo JL *et al.*, 2011 ; Hirano K 2007).

#### Les canaux sodiques voltage-dépendants Na<sub>v</sub>

Neuf sous-types de canaux Na<sub>v</sub> ont été identifiés (Na<sub>v</sub> 1.1 à 1.9) et comme les canaux K<sub>v</sub>, ils sont formés d'une sous-unité principale  $\alpha$ 1 et de sous-unités régulatrices  $\beta$ . Ces canaux participent à la dépolarisation neuronale. De part leur localisation sur les nocicepteurs, les canaux Na<sub>v</sub>1.7, 1.8 et 1.9, présentent un intérêt particulier dans l'étude des mécanismes de sensibilisation (Coste B *et al.*, 2007). En effet, des études ont montré que les médiateurs pro-inflammatoires modulent l'activation et l'inactivation de ces canaux (Na<sub>v</sub>1.8 plus particulièrement) induisant ainsi une sensibilisation neuronale (Amaya F *et al.*, 2006 ; Rush AM and Waxman SG, 2004).

### Les canaux calciques voltage-dépendants $Ca_v$

Ces canaux forment trois grandes familles  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  et  $Ca_v3$  qui seront décrites plus loin dans ce manuscrit. Ces canaux participent à la dépolarisation neuronale, et peuvent être activés par de faibles ou de fortes dépolarisations membranaires. La localisation de ces  $Ca_v$  sur les neurones myentériques, sur les terminaisons pré-synaptiques et dans le SNC, en font des acteurs importants de la mise en place et du maintien de la sensibilisation neuronale (Simms BA and Zamponi GW, 2014). Les études pharmacologiques ont pu mettre en évidence l'implication de ces canaux dans les douleurs d'origine viscérale, entre autre.

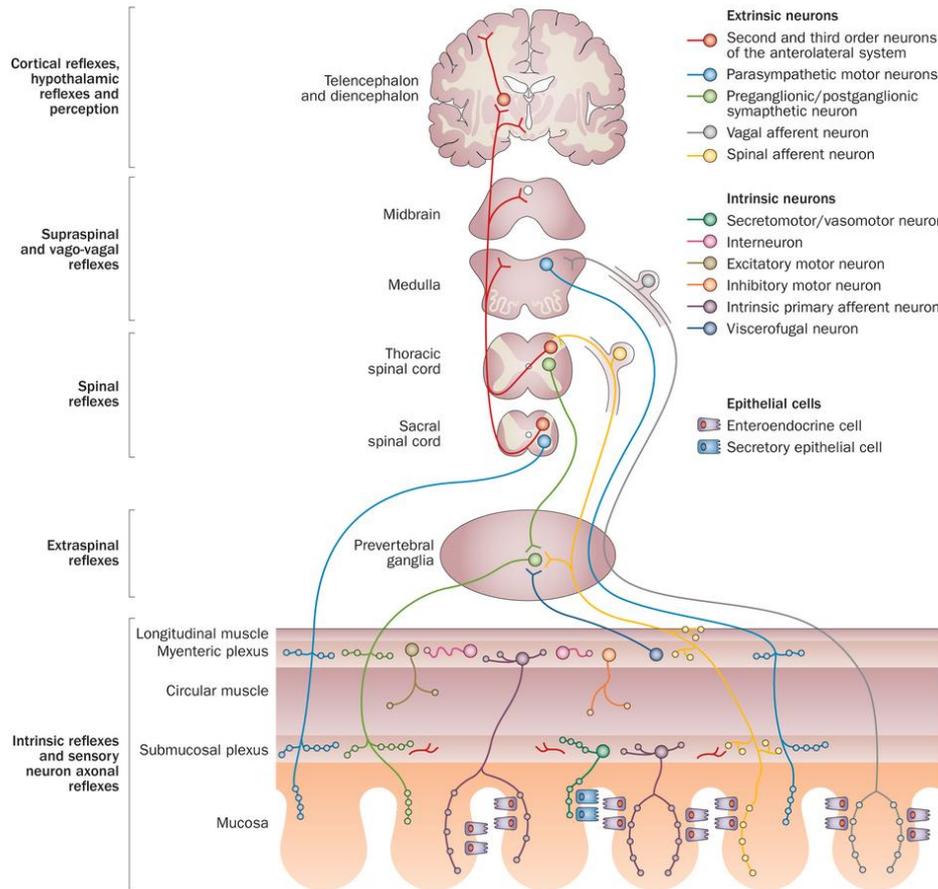
↳ L'augmentation de médiateurs inflammatoires dans la muqueuse intestinale combinée à la présence de récepteurs plus nombreux ou dont l'activité est dérégulée, induit une augmentation de la l'activation des afférences douloureuses qui seront alors sensibilisées et pourront entretenir ce phénomène en sécrétant des médiateurs inflammatoires (inflammation neurogène).

#### A.II.c.2. Innervation

L'homéostasie intestinale est régulée en permanence par des afférences entériques intrinsèques, et un réseau nerveux extrinsèque comprenant des afférences vagales, pelviennes et splanchniques (Figure 15). Les afférences extrinsèques transmettent les stimuli de la périphérie aux neurones de second ordre dans les couches superficielles de la moelle épinière. Dans les régions supraspinales et le tronc cérébral, les voies descendantes modulent l'entrée de l'information sensorielle. Seule une partie des informations douloureuses atteint effectivement le niveau de conscience et potentiellement de douleur.

#### ↳ Innervation intrinsèque : Système Nerveux Entérique : SNE

L'innervation intrinsèque forme un réseau qui comprend les corps cellulaires des neurones entériques et les motoneurons qui sont regroupés en noyaux et les inter-neurons qui relient les noyaux entre eux (Hansen MB, 2003a et b). Ces neurones forment les *plexus* et permettent de coordonner les réflexes viscéraux, notamment péristaltiques, et d'adapter la réponse intestinale en réponse aux différents stimuli provenant de la lumière. Les *plexus* les plus caractérisés sont le *plexus* myentérique (*plexus* d'Auerbach) et le *plexus* sous-muqueux (*plexus* de Meissner) (Costa M et al., 2000). Au sein des *plexi* myentériques, les neurones sensoriels innervent les muscles lisses circulaires, les ganglions myentériques et sous-muqueux et les cellules épithéliales. Ils régulent la motilité intestinale en modifiant l'activité des cellules interstitielles de Cajal dont le rôle est celui de «*pacemakers* intestinaux» en contrôlant la genèse, la fréquence et la propagation des contractions.



**Figure 15 : Innervation neurale intrinsèque et extrinsèque et niveaux de contrôle de la fonction gastro-intestinale.**

Les neurones du système nerveux entérique intrinsèque ont des corps cellulaires dans la paroi de l'intestin et forment des réseaux de neurones qui permettent de contrôler la motilité, la sécrétion et la vasodilatation. Les neurones viscéraux sont des neurones entériques qui projettent sur des neurones post-ganglionnaires sympathiques. Les réflexes qui sont activés par les neurones entériques sont appelés réflexes extra-rachidiens, car ils n'impliquent pas le système nerveux central. Les neurones sympathiques post-ganglionnaires se projettent sur la paroi intestinale pour moduler la sécrétion, le flux sanguin et la motilité. Ces neurones reçoivent également une entrée de neurones sympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière qui forment la branche efférente de réflexes du système nerveux central. L'autre branche efférente de réflexes du système nerveux central provient de neurones moteurs parasympathiques dans la moelle épinière et du tronc cérébral. Les neurones afférents extrinsèques ont des terminaisons périphériques au sein de la paroi intestinale et communiquent avec le système nerveux central par des voies vagales et spinales. Les afférences vagales ont des corps cellulaires dans les ganglions nœuds et des projections centrales dans le noyau du tractus solitaire, alors que les afférences spinales suivent des voies nerveuses splanchniques et pelviennes, ont des corps cellulaires dans les ganglions thoraco-lombaire et lombo-sacrés. Les afférences extrinsèques forment la branche afférente des réflexes centraux et les voies qui contribuent à la perception consciente, mais elles peuvent également avoir une fonction efférente par des réflexes d'axones qui peuvent être locales ou extra-rachidiens. D'après Brierley SM and Linden DR, 2014.

Les neurones sensoriels des *plexus* sous-muqueux sont non-adrénergiques-non-cholinergiques (NANC) et impliqués dans les sécrétions gastro-intestinales et le contrôle du débit sanguin local.

Le SNE est donc composé des neurones intrinsèques afférents primaires qui sont activés par des *stimuli* mécaniques (contraction, relaxation et distension) et chimiques et de neurones polymodaux, également appelés nocicepteurs, activés par des stimuli nociceptifs (mécaniques, chimiques ou osmotiques). Grâce à ces neurones, le SNE contrôle la motilité, la sécrétion, l'absorption, la croissance de la muqueuse, le débit sanguin local et la fonction immunitaire dans l'intestin (Hansen MB,

2003a et b). Le lien entre le SNC et le SNE est bidirectionnel : le cerveau influence la fonction du SNE et *vice versa*. Outre leurs implications dans les dérèglements de la motilité iléo-colique, les neurones du SNE peuvent sécréter des molécules qui peuvent déclencher ou aggraver une inflammation et sensibiliser les nerfs extrinsèques. En effet, ces cellules contiennent des précurseurs de neurotransmetteurs tels que le GABA et le NO ; elles expriment des récepteurs pour les purines et sont capables de produire des médiateurs inflammatoires (cytokines- IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ -, NGF, des neuropeptides -NKA et SP- ou encore de la sérotonine). Elles sont ainsi capables de moduler la neurotransmission entérique, l'inflammation et de contrôler la fonction de la BE.

#### Innervation extrinsèque

Les afférences primaires extrinsèques du tractus gastro-intestinal assurent la connexion anatomique avec le SNC et permettent ainsi la transmission des signaux du tractus gastro-intestinal non douloureux (la satiété, le passage de gaz, etc.) et douloureux (l'inflammation, l'ischémie, etc.). Le tractus gastro-intestinal reçoit une double innervation avec des rôles complémentaires dans la signalisation (Blackshaw LA *et al.*, 2007 ; Grundy D, 2002) :

#### Les afférences splanchniques

Elles longent les efférences du système orthosympathique et transmettent principalement les signaux nociceptifs. Les nerfs splanchniques innervent l'ensemble du tractus gastro-intestinal et sont la contrepartie fonctionnelle des nerfs vagues et pelviens. Les afférences viscérales situées dans les nerfs splanchniques projettent sur la moelle épinière. Contrairement aux afférences pelviennes, les informations coliques et rectales portées par les afférences splanchniques projettent sur les segments thoraco-lobaire T10 à L2 chez la souris et le rat (Christianson JA *et al.*, 2006). Leurs corps cellulaires sont situés dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD) thoraco-lombaire à proximité de la moelle épinière. Ces fibres afférentes splanchniques passent à travers les ganglions pré-vertébraux (cœliaque, ganglion mésentérique supérieur et inférieur) où ils peuvent former des synapses avec les neurones efférents sympathiques. Il est admis que les afférences splanchniques constituent la principale voie nociceptive de l'intestin car ils portent les différentes modalités d'informations mécano-sensorielles (Brierley SM *et al.*, 2004 ; Grundy D, 1988).

#### Les afférences vagues et pelviennes

Elles longent les efférences du système nerveux parasymphatique avec un rôle supposé sur l'homéostasie intestinale.

Les branches du nerf vague innervent l'ensemble du tube digestif, à l'exception de la partie transversale et distale du côlon. Les corps cellulaires résident dans les ganglions nodaux et les

terminaisons nerveuses centrales se terminent dans le noyau du faisceau solitaire du bulbe rachidien dorsal. Ces afférences vagales régulent principalement le comportement alimentaire (la perception de faim, de plénitude, de satisfaction et de ballonnement) par des réflexes supérieurs de l'intestin (l'accommodation gastrique, la vidange et la sécrétion gastrique, vomissements, etc.). Trois types de fibres vagales ont été caractérisés chez la souris : les mécano-récepteurs (intramusculaires : étirement des muscles et intraganglioniques : distension et contraction des muscles), les récepteurs de tension (activés pour des distensions péristaltiques « physiologiques ») et les chémo-récepteurs (spécifiquement activés par la bile). Les afférences vagales ont donc un rôle de perception de stimuli mécaniques physiologiques alors que la douleur provoquée par la distension du tractus gastro-intestinal est probablement médiée par les afférences splanchniques. Cependant des observations précliniques et cliniques laissent supposer que cette dichotomie n'est pas si nette (Chen SL *et al.*, 2008 ; Gschossmann JM *et al.*, 2002 ; Holtmann G *et al.*, 1998).

Les nerfs pelviens innervent principalement les structures pelviennes : la partie colorectale, la vessie et les organes reproducteurs. Les afférences pelviennes font converger les informations sur les neurones spinaux viscéraux dans les segments lombo-sacrés L6- S2 de la moelle épinière. Leurs corps cellulaires sont localisés dans le GRD lombo-sacré. Le nerf pelvien est spécialisé dans la détection du *stimulus* primaire généré par une faible intensité de distension colorectale ou le passage des selles. Les afférences pelviennes transmettent les modalités d'informations similaires à celles des afférences vagales, à savoir des sensations physiologiques. Cependant, comme pour les afférences vagales, l'implication dans la perception douloureuse, bien que non majoritaire, n'est pas nulle (De Schepper HU *et al.*, 2007 ; Brierley SM *et al.*, 2004 ; Traub RJ, 2000).

En 2007, Blackshaw et co-auteurs suggèrent une nouvelle classification en cinq types « structurellement distincts » de terminaisons sensorielles au sein de la paroi de l'intestin formant les voies sensorielles extrinsèques anatomiques décrites par ces auteurs comme la voie vagale, la voie de la moelle thoraco-lombaire qui projette par les nerfs splanchniques et la voie de la moelle lombo-sacrée qui projette via les nerfs pelviens et rectaux (Blackshaw LA *et al.*, 2007).

#### Les Nocicepteurs viscéraux.

Les nocicepteurs sont les terminaisons des fibres nerveuses périphériques A $\delta$  et C. Les fibres C, amyéliniques, représentent la plupart des afférences nociceptives viscérales. Ces terminaisons peuvent être différenciées en trois sous familles :

##### Les mécano-récepteurs toniques

Egalement appelés WDR pour *wide dynamic range*, ils ont une activité tonique de repos et répondent indifféremment à la distension, qu'elle soit ou non douloureuse.

### Les mécano-récepteurs phasiques

Egalement appelés mécano-nocicepteurs, car ils ont une faible activité de repos et nécessitent une distension nociceptive de la paroi intestinale pour être activés. Ces nocicepteurs peuvent également répondre à des stimulations chimiques produites lors des réactions inflammatoires ou lors d'ischémie.

### Les nocicepteurs silencieux

Ce sont des mécano-nocicepteurs activés uniquement lors d'une stimulation par des médiateurs inflammatoires.

↳ Les dérégulations de l'immunité à l'origine d'une réponse inflammatoire intense, notamment dans les MICI et le SII-PI, conduisent à une forte concentration de cellules du système immunitaire et de médiateurs inflammatoires dans la muqueuse intestinale. La libération de médiateurs inflammatoires, par ces cellules immunitaires et par les cellules de la BE à proximité des nerfs entériques, entraîne une sensibilisation des afférences nerveuses viscérales. De plus, l'augmentation des interactions neuro-immunitaires induit une inflammation neurogène, médiée par les cytokines pro-inflammatoires et qui stimulent la libération de neuropeptides par les terminaisons nerveuses locales. Ces neuropeptides vont en retour agir sur les terminaisons voisines en augmentant leur sensibilité. Tous ces processus participent à la sensibilisation périphérique. En effet, dans ce contexte de lésion et/ou d'inflammation, les stimulations intenses et répétées des terminaisons libres de ces nocicepteurs vont provoquer des changements phénotypiques importants modifiant ainsi leur seuil d'activation. Ils vont alors émettre des potentiels d'action pour des stimulations qui, en conditions physiologiques, ne sont pas douloureuses. Ce phénomène d'hyperexcitabilité neuronale est entretenu par la sensibilisation périphérique des nocicepteurs dans laquelle les canaux ioniques et les médiateurs de l'inflammation vont jouer un rôle de premier plan.

## A.III : Les traitements

### A.III.a. Les traitements des symptômes associés au SII

La mauvaise compréhension de l'étiologie de cette maladie ajoutée au fait que ces patients sont souvent de très bons répondeurs aux placebos (jusqu'à 40 à 50%) (Pitz M *et al.*, 2005) rend le développement de traitements spécifiques difficile. Cependant de nombreuses molécules ont été développées dans l'objectif de soulager la douleur abdominale et d'améliorer les troubles du transit et les ballonnements. Le choix du traitement est déterminé par le type et la sévérité de la symptomatologie ainsi que par l'importance des facteurs psychologiques (Bellini M *et al.*, 2014 ; Chang FY, 2014 ; Lazaraki G *et al.*, 2014).

#### A.III.a.1 : Les traitements non pharmacologiques

##### Les psychothérapies

Les troubles psychologiques prenant une part importante dans la physiopathologie du SII, la psychothérapie (thérapie cognitivo-comportementale, gestion du stress, hypnose, thérapie psychosociale, etc.) peut, dans certain cas, être une option thérapeutique proposée en complément des traitements pharmacologiques afin de diminuer la consommation de médicaments (Ahl A *et al.*, 2013 ; Pajak R *et al.*, 2013 ; Levy RL *et al.*, 2006).

##### Les conseils diététiques

Des conseils diététiques sont généralement suggérés aux patients dans le but de réguler le transit et de réduire ainsi les symptômes (Mullin GE *et al.*, 2014). Cependant, bien qu'un enrichissement de l'alimentation en fibres soit conseillé en cas de constipation, une méta-analyse de 2013 regroupant 12 études ne montre aucune efficacité de ce type de régime que ce soit sur la douleur abdominale, la qualité de vie des patients ou sur les symptômes associés au SII (Ruepert L *et al.*, 2013). Des régimes d'exclusion peuvent également être recommandés pour des produits tels que le café, les sodas, l'alcool, le lactose, le maïs, le blé ou les graisses, mais aucune preuve évidente de l'efficacité de ces types de régimes n'est clairement établie (Dapoigny M *et al.*, 2003). Les régimes appauvris en FODMAP (*fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyols*) sont généralement conseillés et semblent avoir un effet bénéfique sur le ballonnement et la douleur abdominale (Camilleri M and Acosta A, 2014 ; Halmos EP *et al.*, 2014 ; Sharma A and Ghoshal UC, 2014 ; De Roest RH *et al.*, 2013). Le rôle de l'alimentation dans la pathogénèse du SII reste donc à préciser (Hayes PA *et al.*, 2014a et b). Cependant, de nombreux patients adaptent eux même leur alimentation (limitation voir exclusion

de certains aliments), et le risque de déséquilibre alimentaire peut devenir important (calcium, vitamine B2, phosphore, etc.) (El-Salhy M *et al.*, 2012).

#### Les probiotiques

La mise en évidence de modifications de la flore intestinale chez les patients souffrant du SII, est à l'origine de l'utilisation de probiotiques afin d'en rétablir la composition (Ford AC *et al.*, 2009b). Plusieurs enquêtes ont montré qu'environ 20 % des patients atteints du SII utilisent ou ont utilisé des probiotiques. De nombreux probiotiques sont actuellement disponibles sur le marché (Dai C *et al.*, 2013) et contiennent des souches telles que *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, L., *Bifidobacterium animalis* ssp., *Lactis Bb12*, et des levures non pathogènes telles que *Saccharomyces boulardii* (Bixquert Jiménez M, 2009). Le mode d'action des probiotiques est mal connu. Ils pourraient agir soit en modifiant l'écosystème digestif, soit en induisant la sécrétion de substances ayant des effets régulateurs sur le pH colique, sur l'immunité locale, sur les acides biliaires ou sur d'autres cibles non encore identifiées (Quigley EMM and Flourie, 2007).

#### *A.III.a.2 : Les traitements pharmacologiques du transit intestinal, du ballonnement et de la distension*

##### Les modulateurs du transit intestinal

##### Les modulateurs des récepteurs à la sérotonine

Comme nous l'avons vu précédemment, la sérotonine est un neurotransmetteur important libéré par les cellules entérochromaffines. Au niveau du tube digestif, elle participe à la régulation des fonctions sensorielles, motrices, et sécrétoires. Les récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> et 5-HT<sub>4</sub> ont été particulièrement étudiés et des ligands des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et 5-HT<sub>4</sub> ont été développés (Stasi C *et al.*, 2014 ; Ford AC *et al.*, 2009a). Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>3</sub> ou sétrons (alosétron, ondansétron, cilansétron, granisétron, ramosétron et tropisétron) permettent la réduction du transit colique, la diminution des sécrétions et l'augmentation de la compliance colique et sont donc principalement prescrits chez des patients souffrant du SII-D. Cependant des effets secondaires tels que la constipation et l'ischémie colique limitent beaucoup leur utilisation (surtout en ce qui concerne l'alosétron). Les agonistes du récepteur 5-HT<sub>4</sub> (prucalopride) sont utilisés chez des patientes atteintes du SII-C réfractaires aux autres laxatifs. En effet, ils stimulent le péristaltisme, accélèrent le transit intestinal et colique ainsi que la vidange gastrique et diminuent le niveau d'activation des afférences rectales. Les effets secondaires sont assez limités, majoritairement représentés par des céphalées.

### Les laxatifs et les anti-diarrhéiques

Les troubles du transit étant fréquemment retrouvés chez les patients atteints du SII, la régularisation de celui-ci par des anti-diarrhéiques chez les patients SII-D ou par des laxatifs pour les patients SII-C est donc recommandée. Des agonistes des récepteurs  $\mu$ -opioïdiques périphériques (Loperamide) sont utilisés dans le cas du SII à prédominance diarrhéique (Regnard C *et al.*, 2011). Le loperamide exerce son action anti-diarrhéique *via* les neurones des *plexus* myentériques de l'intestin. Cette molécule stimule l'absorption de l'eau et possède une activité anti-sécrétoire médiée par un effet antagoniste sur la calmoduline.

Concernant les laxatifs, peu de données cliniques confirment leur efficacité dans le traitement du SII-C. Une seule étude comparant le polyéthylène glycol (Miralax) à un placebo chez 48 adolescents avec un SII-C a montré que ce laxatif améliorait la fréquence des selles, sans atténuer les douleurs abdominales (Khoshoo V *et al.*, 2006).

### Les antispasmodiques

Ces molécules sont utilisées pour leurs propriétés de relaxant des muscles lisses et sont donc prescrites chez les patients souffrants du SII-D car ils diminuent le péristaltisme intestinal (Ruepert L *et al.*, 2013). Deux classes d'antispasmodiques sont utilisées : (i) les anticholinergiques muscariniques agissant sur les *plexus* myentériques (dicyclomine, hyosciamine, le bromure de propantheline, le mebeverine, la trimebutine, et la teinture de belladonne) et (ii) les bloqueurs des canaux calciques de type L agissant directement sur les muscles lisses (citrate d'alverine, bromure d'otilonium, le bromure de pinaverium et la nifédipine) (Rychter J *et al.*, 2014 ; Darvish-Damavandi M *et al.*, 2010). Ces molécules peuvent apporter un soulagement de courte durée aux douleurs abdominales et à l'inconfort digestif. Bien que l'on ne dispose pas de données sur leur efficacité à long terme, une méta-analyse de 2013 regroupant 29 études cliniques conclut que ces molécules (et particulièrement la classe des anticholinergiques muscariniques) sont efficaces sur la douleur abdominale, la qualité de vie des patients et sur les symptômes associés au SII. Les effets indésirables de type anticholinergique (bouche sèche, vertiges et troubles de la vision), ne sont généralement pas cause d'arrêt du traitement (Annaházi A *et al.*, 2014).

### Les agonistes $\alpha_2$ adrénergiques pré-synaptiques

Cette classe de molécules est majoritairement représentée par la clonidine. Initialement synthétisée pour le traitement de l'hypertension, elle augmente la compliance colique et rectale, diminue le tonus musculaire (sans altérer la réponse colique au repas, ni le transit colique) et la douleur (diminution de l'excitabilité des afférences neuronales). Des effets indésirables tels que

l'hypotension orthostatique, somnolence, étourdissements et bouche sèche sont à noter avec ce type de traitement (Camilleri M *et al.*, 2009).

#### Les activateurs des canaux chlores

La lubiprostone est utilisée chez les personnes souffrant du SII-C, avec une meilleure efficacité chez la femme (Raschi E and De Ponti F, 2014). Son action passe par l'augmentation de l'activité des canaux chlorures de type 2 situés sur le pôle apical des cellules intestinales (Lacy BE and Chey WD, 2009). Elle augmente la sécrétion intestinale de chlorure et d'eau, entraînant une augmentation de la motilité intestinale. Un effet positif de cette molécule a été mis en évidence sur la consistance et la fréquence des selles (Johanson JF, 2004). Cependant des effets indésirables tels que des nausées, des diarrhées, des douleurs abdominales, des ballonnements (Chamberlain SM and Rao SS, 2012) voir des ischémies coliques en limite l'utilisation (Sherid M *et al.*, 2013).

#### Les agonistes de la guanylate cyclase : Linaclotide

Le linaclotide est un agoniste de la guanylate cyclase de type C (GCC) ayant des propriétés analgésiques et sécrétoires intestinales. Par son action sur la GCC, il a été démontré que le linaclotide réduit les douleurs abdominales, augmente le transit gastro-intestinal dans les modèles animaux et accroît le transit colique chez l'Homme (Johnston JM *et al.*, 2013). L'activation de la GCC a pour effet d'augmenter les concentrations de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), aussi bien au niveau extracellulaire qu'intracellulaire. La GMPc extracellulaire diminue l'activité des récepteurs sensoriels, avec pour résultat une diminution des douleurs abdominales. La GMPc intracellulaire provoque la sécrétion de chlorure et de bicarbonate dans la lumière intestinale, ce qui se traduit par un surcroît de fluide intestinal et un transit accéléré. Déjà disponible dans plusieurs pays européens, il n'est pas encore commercialisé en France (Lacy BE *et al.*, 2014 ; Layer P and Stanghellini V, 2014).

#### Les antagonistes de la CCK1

La cholecystokinine (CCK) est un neuropeptide sécrété par les cellules endocrines dans la muqueuse du duodénum et du jéjunum en réponse à de nombreux nutriments. Il a été mis en évidence que la réponse colique à la CCK est augmentée chez les patients atteints du SII (Chey WY *et al.*, 2001). Le récepteur à la CCK (CCK1) est localisé sur les muscles lisses du tractus gastro-intestinal et sur les afférences vagales. Le blocage de ce récepteur permet de stimuler la motilité intestinale et d'améliorer le transit. Deux antagonistes ont été synthétisés : le loxiglumide et le dexloxiglumide. Cependant, les données cliniques sur leur efficacité sont insuffisantes (Cremonini F *et al.*, 2005).

### Les analogues de la somatostatine

De part son analogie avec la somatostatine, l'octréotide active (préférentiellement) le récepteur à la somatostatine de type 2. L'activation de ce récepteur permet de réduire les sécrétions gastro-intestinales (glucagon, insuline et hormone de croissance), de ralentir le transit gastro-intestinal et pourrait avoir des propriétés antinociceptives. Bien que le seuil de première sensation rectale soit augmenté et que la consistance des selles soit améliorée, le traitement à long terme avec l'octréotide, n'a pas d'effet sur la douleur viscérale et ne permet pas d'améliorer les symptômes associés au SII-D (Klooker TK *et al.*, 2007).

#### Les traitements du ballonnement et de la distension

### Les antibiotiques

Comme pour les probiotiques, le dérèglement de la flore intestinale chez les patients atteints du SII peut justifier l'utilisation d'antibiotiques. La rifaximine est un antibiotique à large spectre qui a été testé dans plusieurs études cliniques. Les données convergent toutes vers une amélioration globale des symptômes, de la douleur abdominale, des problèmes de défécation et de ballonnements. Cependant, il n'est pas commercialisé en France (hors mis l'autorisation temporaire d'utilisation – ATU- dans le traitement de l'encéphalopathie hépatique). La néomycine semble être efficace chez les patients SII-C. Néanmoins, l'utilisation de cette classe thérapeutique sur le long terme reste discutée (Menees SB *et al.*, 2012 ; Pimentel M *et al.*, 2011).

### Les molécules à base de charbon actif

Associé à la levure, à la papavérine ou encore à la siméticone (Carbosymag®), le charbon activé peut être utilisé dans le cas de troubles fonctionnels intestinaux. De part sa propriété d'absorbant des gaz intestinaux, il est indiqué dans le traitement du météorisme.

#### *A.III.a.3 : Les traitements pharmacologiques de l'hypersensibilité viscérale*

#### Les antidépresseurs

L'étiologie de la maladie (anxiété, dépression, maladie psychiatrique) couplée aux effets antalgiques de cette classe de molécules peut conduire à leur utilisation dans le cas du SII (Rahimi R *et al.*, 2009). Deux classes d'antidépresseurs sont classiquement utilisées :

### Les antidépresseurs tricycliques (ATC)

Cette classe de molécules est composée de l'amitriptyline, la desipramine et l'imipramine. La douleur abdominale ainsi que les symptômes associés au SII sont significativement améliorés par

l'utilisation de ces molécules selon une méta-analyse de 2013 (Chao G and Zhang S, 2013) Cependant de nombreux effets indésirables, notamment anticholinergiques, limitent leur utilisation au long court.

### Les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (IRSS)

Cette classe de molécules se compose, entre autre, de la paroxetine, de la fluoxetine et du citalopram. Une méta-analyse regroupant 15 études menées de 1966 à 2009, met en évidence l'efficacité de ces molécules sur la qualité de vie des patients. Bien que moins efficaces que les ATC, ils pourraient représenter une alternative intéressante aux ATC en raison de leur meilleur profil de tolérance (Ford AC *et al.*, 2009c).

### Les gabapentinoïdes

Ces molécules ont été initialement synthétisées comme agoniste GABAergique. Cependant il est apparu que la cible de ces molécules est en réalité la sous-unité  $\alpha_2\delta$  des canaux calciques voltage-dépendants. Chez les patients atteints du SII, ces molécules sont utilisées au même titre que les antidépresseurs (Houghton LA *et al.*, 2007 ; Lee KJ *et al.*, 2005). Ces molécules faisant l'objet de mon étude, elles seront détaillées plus précisément dans les chapitres suivant.

### *A.III.a.4 : Les molécules en cours de développement*

A l'heure actuelle, 21 protocoles cliniques sont recensés concernant l'étude de l'efficacité de nouvelles molécules dans le cas du SII, voici une revue non-exhaustive des molécules pharmacologiques en cours de développement (Tableau 3).

Molécules	Mécanismes d'actions	Phase clinique
JNJ-27018966 (MuDelta)	Agoniste $\mu$ -opioïde et antagoniste $\delta$ -opioïde = diminution de la motilité et de la douleur viscérale	Phase III (SII-D)
ROSE-010	Analogue du peptide 1 glucagon-like = diminue la vidange gastrique et la motilité	Phase II (SII-C) terminée
Ibudotant	Antagoniste du récepteur à la neurokinine-2 = diminue la motilité et la sensibilité viscérale	Phase III (SII-D)
LX1033	Inhibiteur de la tryptophane hydroxylase = diminue la synthèse intestinale de sérotonine	Phase II (SII-D)
PD-217,014	GABA mimétique (mais mécanisme inconnu) = diminue la douleur viscérale	Phase II
Plecanatide	Agoniste du récepteur à la Guanylate cyclase-C = augmentation des concentrations extra- et intracellulaires en cGMP ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> ) = augmentation du chlorure, du bicarbonate et de la sécrétion de fluide dans la lumière intestinale = diminue le temps de transit + diminue la douleur viscérale	Phase II (SII-C)
DA-6886	Agoniste du récepteur à la sérotonine 5-HT <sub>4</sub> = augmente la motilité et les sécrétions intestinales	Phase I terminée
Daikenchuto (TU-100)	Issu de la médecine Kampo, modulateur des activités cholinergique et sérotoninergique (mais mécanisme inconnu) = augmente la motilité	Phase II (SII/ femme)
ASP7147	Antagoniste du récepteur à la Bombésine-2 = diminue la motilité et les sécrétions intestinales	Phase II (SII-D)
ONO-2952	Antagonistes de la translocation de protéine = inhibe la production centrale de neurostéroïdes = diminue la douleur viscérale	Phase II (SII-D)
AZD1722 (RDX5791, tenapanor)	Inhibiteur de l'échangeur membranaire 3 de d'hydrogène de sodium = augmente les fluides et le sodium intestinal = augmente la motilité + diminue la douleur viscérale	Phase II (SII-C)
Neu-P11 (piromelatine)	Agoniste de la mélatonine et de la sérotonine (5-HT <sub>1A/1D</sub> ) = augmente la motilité et la sécrétion de fluide intestinal	Phase I (SII-D)

**Tableau 3 : Molécules en cours d'essai pour le traitement du SII.** [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)

### A.III.b. Les traitements des symptômes associés aux MICI

---

En l'absence de causes biologiques identifiées, aucun traitement n'est en mesure de guérir définitivement une MICI. Les traitements utilisés actuellement sont insatisfaisants car ils ont pour objectif le contrôle de l'activité de la maladie en ciblant les symptômes mais non les causes de l'inflammation (Sandborn WJ, 2014 ; Baumgart DC and Sandborn WJ 2007). Voici les recommandations de traitements établies en 2010 et 2011 (Eugene C, 2011a, b, c, et d ; Van Assche G *et al.*, 2010a et b ; Dignass A *et al.*, 2010) et mise à jour en 2014 pour la MC et publiées en 2012 pour la RCH (Marchioni Beery R and Kane S, 2014 ; Dignass A *et al.*, 2012 ; Eugene C 2012) par l'*European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO)*.

#### A.III.b.1 : Les traitements non pharmacologiques

##### L'arrêt du tabagisme

Comme il a été cité précédemment, le tabac tient une place importante dans le développement et l'aggravation de la MC. Ainsi pour les patients fumeurs, la première recommandation est l'arrêt du tabagisme.

##### Les psychothérapies

Le stress chronique et la dépression augmenteraient la probabilité de rechute chez les patients en rémission (Lerebours E *et al.*, 2007), c'est pourquoi plusieurs approches de psychothérapie (thérapie cognitivo-comportementale, gestion du stress, hypnose, thérapie psycho-sociale, etc.) peuvent être proposées à ces patients (Knowles SR *et al.*, 2013). De manière générale, ces psychothérapies ne semblent pas diminuer le score de maladie des patients, mais peuvent contribuer à améliorer la qualité de vie en complément d'un traitement pharmacologique (McCombie AM *et al.*, 2013).

##### Les conseils diététiques

Le soutien nutritionnel est un élément essentiel de la gestion des patients atteints de MICI qui sont généralement dénutris et carencés. La carence en fer est la plus fréquente chez les patients. Elle provoque une anémie, peut entraîner de la fatigue et réduit la qualité de vie. Un régime bien équilibré est important pour assurer un apport suffisant en calories, protéines et nutriments. Bien que certains comportements alimentaires soient souvent cités dans la physiopathologie des MICI, une modification de ceux-ci ne permet pas de diminuer les symptômes des patients (Martin A, 2014).

##### La transplantation de microbiote fécal: FMT

La FMT consiste à recueillir les selles d'un donneur sain présélectionné, et après analyse et préparation, les implanter dans le tractus gastro-intestinal du patient receveur. De multiples études

ont examinées l'intérêt potentiel de cette FMT pour le traitement des infections récidivantes à *Clostridium difficile*. Les données suggèrent que cette thérapie est très sûre et efficace pour le traitement de cette infection. Cependant les données concernant l'utilisation de la FMT dans le cas de MICI sont plus rares et très difficilement comparables (Anderson JL *et al.*, 2012). En effet, les différences de *screening* des selles, de préparation du patient receveur et le mode d'administration des selles, sont autant de facteurs différents d'une étude à l'autre (Allegretti JR and Hamilton MJ, 2014). Bien que quelques études ne montrent aucun effet de la FMT sur l'évolution de la RCH (Kump PK *et al.*, 2013), la majorité des données de la littérature suggèrent que cette FMT permettrait de réduire les symptômes associés à cette maladie (Kunde S *et al.*, 2013; Borody TJ *et al.*, 2003). Des études complémentaires sont indispensables avant de valider la FMT comme traitement des MICI. Dix sept études cliniques sont en cours à ce jour (clinicaltrial.gov), et les premiers résultats semblent encourageants.

#### A.III.b.2 : Les traitements pharmacologiques

##### Les aminosalicylés

Ces molécules, représentées par la mésalamine et la sulfasalazine, sont des dérivées de l'acide -5-aminosalicylique (5-ASA). Ces molécules ont une action anti-inflammatoire locale directe sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon. Ces médicaments sont prescrits en 1<sup>ère</sup> intention pour induire et maintenir la rémission dans le cas de RCH active légère à modérée (Khan KJ *et al.*, 2011a).

##### Les antibiotiques

Les antibiotiques ont un rôle important dans le traitement des complications secondaires des MICI, comme la prolifération bactérienne dans l'intestin grêle, les abcès et les fistules (Khan KJ, *et al.*, 2011b). Les plus utilisés sont la ciprofloxacine et le métronidazole (Prantera C and Scribano ML, 2009). Les antibiotiques ne sont pas utilisés dans la RCH hormis lors d'une infection, à *Clostridium difficile* par exemple.

##### Les immunomodulateurs glucocorticoïdes

Ces molécules sont des anti-inflammatoires systémiques puissants, représentés par la prednisone, la prednisolone, la méthylprednisolone, l'hydrocortisone et le budésonide (le seul à action locale). Ce sont des molécules données en 1<sup>ère</sup> intention dans le cas de poussées modérées à sévères de MC (localisées à l'iléocæcum) ou de RCH (Ford AC *et al.*, 2011). Ils sont efficaces mais leur prescription sur le long terme est à éviter à cause de leurs effets indésirables (essentiellement diabète et ostéoporose mais également insomnie, tremblement, troubles émotionnels, hypertension, perforations, abcès, etc.). Ainsi l'utilisation de ces molécules reste limitée au

traitement des poussées, et est remplacée par des aminosalicylés ou des immunomodulateurs dans les phases de traitement d'entretien.

#### Les immunosuppresseurs

##### Les analogues des purines

Ils sont représentés par l'azathioprine (AZA : Imurel®) et son métabolite le 6-mercaptopurine (6-MP : Purinethol®, généralement mieux toléré mais beaucoup plus cher). Leur activité immunosuppressive réduit la prolifération lymphocytaire par l'interférence avec la synthèse des acides nucléiques purinergiques. Ces molécules sont utilisées afin de maintenir la phase de rémission des patients atteints de RCH (Gisbert JP *et al.*, 2009), et permet d'induire et de maintenir la rémission des patients souffrants de MC (Chande N *et al.*, 2013 ; Prefontaine E *et al.*, 2010). De plus, dans le cadre de MC, l'association de ces composés avec des anti-TNF- $\alpha$ , permet d'augmenter le taux de réponse ainsi que la durée d'efficacité du traitement (Colombel JF, *et al.*, 2010). Ces composés nécessitent une surveillance régulière car ils sont hépatotoxiques, favorisent les infections opportunistes et les lymphomes.

##### Le méthotrexate

C'est une molécule alternative à l'AZA et au 6-MP (lorsque ces molécules sont mal tolérées ou inefficaces) qui agit comme inhibiteur de la voie des folates ; entraînant ainsi une inhibition de la synthèse de l'ADN, ce qui lui confère ces propriétés antiprolifératives. Il est utilisé dans le cas de poussées sévères de MC ou de récurrences fréquentes (McDonald JW *et al.*, 2014) et à des doses plus faibles pour maintenir ces patients en phase de rémission (Patel V *et al.*, 2009). Son efficacité chez des patients atteints de RCH est en cours d'évaluation mais semble prometteuse (Timmer A *et al.*, 2012 ; Gisbert JP *et al.*, 2009). Cependant l'usage à long terme de cette molécule peut engendrer une tératogénéicité importante (Mahadevan U and Kane S, 2006), ainsi qu'une hépatotoxicité (Te HS *et al.*, 2000) et la survenue d'infections opportunistes demande une surveillance biologique accrue.

##### La ciclosporine

Cette molécule est un inhibiteur de la calcineurine qui bloque la prolifération des cellules de types T et la transcription du gène codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL-12. C'est un traitement de 2<sup>ème</sup> intention en cas de poussées de RCH sévères et cortico-résistantes, au même titre que l'infliximab (si échec des corticoïdes), mais le traitement ne peut dépasser les 3 à 6 mois (Pham CQD *et al.*, 2006). L'efficacité de cet inhibiteur n'est pas clairement établie en ce qui concerne la MC (McDonald JWD *et al.*, 2005). Les effets indésirables sont peu fréquents (tremblements, paresthésies, maux de tête, etc). Cependant une néphrotoxicité, des infections ou une neurotoxicité peuvent nécessiter l'arrêt du traitement

D'autres immunomodulateurs tels que le tacrolimus et le mycophénolate mofétil peuvent également être utilisés, mais leur place n'est pas clairement établie

### Les biothérapies

#### - Les anti-TNF- $\alpha$

Ces molécules (Infliximab -Remicade®- ; Adalimumab -Humira®- ; Golimumab -Simponi® et le certolizumab pegol -Cimzia®) sont essentiellement utilisées pour le traitement alternatif de formes actives modérées à sévères de la MC (Kawalec P *et al.*, 2014 ; Kawalec P *et al.*, 2013 ; Dretzke J *et al.*, 2011) et de RCH (Reinisch W *et al.*, 2012), chez des patients réfractaires, intolérants aux traitements conventionnels (corticoïdes avec immunosuppresseurs), en phase de rechute de MC iléocœcale ou présentant des critères de mauvais pronostics. Ces agents permettent un contrôle efficace des poussées inflammatoires et permettent également un maintien des phases de rémission. Ces anticorps vont séquestrer le TNF- $\alpha$ , qui ne peut plus se lier à son récepteur TNF-RI ou TNF-RII, et n'induit donc pas la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires et n'activera pas la voie de la caspase 8 (aboutissant à l'apoptose) (Tracey D *et al.*, 2008). A noter qu'il a récemment été mis en évidence un risque accru de cancer en cas de thérapie combinée (Osterman MT *et al.*, 2014).

#### - Les anticorps recombinants dirigés contre les intégrines

Le natalizumab, inhibiteur de l'adhésion leucocytaire, est un anticorps recombinant dirigé contre une sous-unité du récepteur d'adhésion cellulaire, l'intégrine  $\alpha 4$ . Cependant son utilisation est limitée, car elle n'est pas spécifique de la sphère abdominale et il y a un risque de leucoencéphalopathie multifocale progressive (Lanzarotto F *et al.*, 2006). Le vedolizumab, anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  vient d'obtenir son AMM. Bien que très proche du natalizumab, cette nouvelle molécule a l'avantage d'agir spécifiquement au niveau du tube digestif, ce qui limite les effets indésirables (Haddley K, 2014 ; Kawalec P *et al.*, 2014). Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer les cas précis de leur utilisation (MC et/ou RCH). D'autres molécules sont en cours de développement : l'AMG181 (similaire au vedolizumab) ou encore l'etrolizumab (anticorps dirigé contre MadCAM-1, le ligand de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ ) par exemple (pour revue sur les thérapies antiadhésives Lobatón T *et al.*, 2014).

#### Les opioïdes

Il existe très peu d'informations sur la prévalence de l'utilisation des opioïdes dans la prise en charge des MICI. Environ 5 à 13 % des patients atteints de MICI prennent des opioïdes de manière chronique et ce pourcentage s'élève jusqu'à 70% dans le cas des patients hospitalisés (Long MD *et al.*, 2012). Cependant les effets indésirables associés à l'utilisation de ces molécules sont nombreux

notamment la constipation, particulièrement délétère pour ces patients, et qui entraîne un risque de développer un syndrome de l'intestin narcotique (Grunkemeier DMS *et al.*, 2007). Ainsi l'utilisation des opioïdes dans les MICI reste très limitée.

#### Les antidépresseurs

Leur utilisation est essentiellement préconisée pour limiter la consommation d'opioïdes. Les deux classes principales d'antidépresseurs décrites précédemment sont utilisées dans le traitement des MICI. L'efficacité de ces molécules ne repose que sur l'extrapolation des données obtenues chez les patients souffrant du SII et quelques études cliniques qui montrent une efficacité de la paroxétine sur la qualité de vie. De plus, le traitement à long terme peut engendrer le développement d'effets indésirables (Mikocka-Walus AA *et al.*, 2006).

### *A.III.b.3 : La chirurgie*

#### Dans le cadre de la maladie de Crohn

En dernier recours ou si des complications apparaissent, l'intervention chirurgicale est une composante de la prise en charge de la MC. En général, le chirurgien pratique une exérèse des lésions inflammatoires mais avec une logique d'épargne intestinale. En effet, cette opération n'a pas de vertu curative (De Cruz P *et al.*, 2012). Les deux procédures les plus couramment pratiquées sont la résection et anastomose et la stricturoplastie (remodelage sans résection d'une partie de l'intestin). Après une première chirurgie, le taux de récurrence clinique nécessitant un nouveau geste d'exérèse se situe entre 25 % et 65 % à 10 ans. Cinq à 15 % des patients auront une troisième intervention, 12% une stomie définitive et 1,5 % présenteront au final un syndrome de grêle court avec, pour un certain nombre, la nécessité de recourir à une nutrition parentérale à domicile au long cours (Hashash JG and Requeiro MD, 2012).

#### Dans le cadre de la rectocolite hémorragique

Dans la RCH, la chirurgie est également proposée au patient en cas d'échec d'un traitement médical optimal ou en cas de complications. Cette intervention consiste à enlever l'ensemble du côlon (colectomie). C'est une option à prendre au sérieux, notamment en cas de poussées sévères cortico-résistantes, car de nombreuses études ont montré une augmentation de la morbi-mortalité lorsque la chirurgie était pratiquée trop tard (Kaplan GG *et al.*, 2008).

### A.III.b.4 : Les molécules en cours de développement

Comme pour le SII, de nombreuses molécules sont en cours d'essai clinique pour la MC et la RCH que ce soit de nouvelles molécules ou de nouvelles formulations (de mésalamine essentiellement : SPD476, TP-05, etc), dont voici une liste non-exhaustive (Tableau 4).

Molécules	Mécanismes	Phase Clinique
OPC-6535 (Tetomilast)	Inhibiteur de la phosphodiesterase-4 (PDE-4) = anti-inflammatoire	Phase II (RCH) Phase III (MC)
GSK-1399686	Inhibiteur de la sous-unité ribosomale 50S = anti-inflammatoire	Phase II (RCH)
LT-02	Modifie la libération de phosphatidylcholine = maintient l'intégrité de la barrière intestinale	Phase III (RCH)
HMPL-004 (Natrul)	Dérivé d'extrait végétal = anti-inflammatoire (inhibe l'expression de TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$ )	Phase III (RCH)
GWP42003 Cannabidiol (CBD)	Cannabinoïdes qui active les récepteurs CB2 = anti-inflammatoire	Phase I (MC) Phase II (RCH)
Etrolizumab	Anticorps dirigé contre la sous-unité $\beta$ 7 de l'hétérodimère $\alpha$ 4 $\beta$ 7 et $\alpha$ E $\beta$ 7	Phase II (RCH)
AMG 181	Anticorps anti- intégrine $\alpha$ 4 $\beta$ 7 = inhibiteur de lymphocyte T	Phase I
IL-2	Régulateur des lymphocytes T	Phase II
MT-1303	Antagoniste du récepteur S1P (Sphingosine 1-phosphate)	Phase I
Daikenchuto (TU-100)	Issu de la médecine Kampo, modulateur des activités cholinergique et sérotoninergique (mais mécanisme inconnu) = augmente la motilité	Phase II (MC)

**Tableau 4 : Molécules en cours de développement pour les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin**  
Clinicaltrials.gov

↳ Dans le cas du SII, les traitements actuels reposent essentiellement sur la modulation de la motricité intestinale. Cependant, chez un certain nombre de patients, des douleurs abdominales peuvent persister, sans être soulagées par la pharmacopée actuelle. Concernant les MICI, la stratégie thérapeutique est basée sur le contrôle de l'inflammation durant les phases actives des maladies. Des traitements antalgiques peuvent également être proposés aux patients présentant des douleurs abdominales. Cependant, à l'heure actuelle, les patients (atteints du SII ou de MICI) sont souvent peu satisfaits de l'efficacité des molécules qui leur sont proposées afin de les soulager.

## Chapitre B : Intérêt de la modulation de la sous-unité $\alpha_2\delta$

### B.I : Généralités sur la sous-unité $\alpha_2\delta$

Le calcium (plus précisément l'ion positif de charge +2 ( $\text{Ca}^{++}$ ) -dans la suite de ce manuscrit, le terme "calcium" fera systématiquement référence à l'ion calcium  $\text{Ca}^{++}$ ) constitue un signal intracellulaire ubiquitaire important. En effet, il permet le contrôle d'un grand nombre de processus cellulaires tels que la libération de neurotransmetteurs, l'excitabilité neuronale, le couplage excitation-contraction ou encore la régulation de l'expression génique (Berridge MJ *et al.*, 1998). En condition de repos, la concentration de calcium libre dans le cytosol est maintenue à un niveau très faible (10-100 nM à 2  $\mu\text{M}$ ) par rapport à la concentration de calcium extracellulaire (1 à 2 mM). Son élévation transitoire suite à une stimulation cellulaire constitue un signal dynamique capable d'activer des cibles moléculaires impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux (Petersen OH *et al.*, 2005). Cette régulation est gouvernée par divers types de canaux et de transporteurs calciques présents sur la membrane plasmique et permettant l'entrée et l'extrusion du  $\text{Ca}^{++}$  cytosolique. Parmi les transporteurs on retrouve les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD), typiquement constitués d'une sous-unité principale  $\alpha_1$ , et de sous-unités auxiliaires régulatrices parmi lesquelles on retrouve la sous-unité  $\alpha_2\delta$ .

#### *B.I.a. Rappel sur les canaux calciques voltage-dépendants $\text{Ca}_v$*

##### *B.I.a.1 Généralités*

Sur la base de propriétés électrophysiologiques, cette famille de canaux calciques voltage-dépendants peut être subdivisée en deux classes : les canaux à « haut seuil d'activation » (*High Voltage Activated*, HVA) activés pour de fortes dépolarisations de la membrane ; et les canaux à bas seuil d'activation (*Low Voltage Activated*, LVA), activés pour de faibles dépolarisations (Kamkin AG, *et al.*, 2007 ; De Waard M *et al.*, 1996).

La famille des canaux HVA est constituée de différents membres qui diffèrent par leurs propriétés électrophysiologiques. Quatre sous-types sont identifiés à ce jour : (i) les courants de type-L (*Long Lasting*) à conductance large et avec une cinétique d'inactivation très lente, (ii) les courants de type-P/Q (P : cellules Purkinje et Q : Granulaire de Cervelet, en rapport avec les cellules où ils ont été isolés pour la première fois), (iii) les courants de type-N (*Neither T nor L*) qui sont rapidement inactivés, et enfin (iv) les courants de type-R (R : Résistant, ce qui est dû au fait que ces

courant résistant à toutes les toxines) dont les caractéristiques sont proches des type P/Q (Dolphin AC, 2009).

La famille des canaux LVA est composée exclusivement des canaux à courant dit de type-T (T : *Tiny and Transient*), qui sont des courants transitoires et rapidement inactivés (Carbone E *et al.*, 2014 ; Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, 2011) (Tableau 5).

Sous types	Courants	Sous Unités $\alpha$	Gènes	Localisations	Implications physiopathologiques
Canaux à Haut-Seuil d'Activation : HVA	Type L	$\alpha 1S$ : Ca <sub>v</sub> 1,1	CACNA1S	Muscle squelettique	Couplage excitation-contraction musculaire Paralysie périodique hypokaliémique et d'hyperthermie maligne
		$\alpha 1C$ : Ca <sub>v</sub> 1,2	CACNA1C	Neurones, Cœur, Muscle lisse, Cellules endocrines	Homéostasie calcique dans les corps cellulaires neuronaux et les dendrites, Couplage excitation-contraction dans les muscles lisse et cardiaque, Sécrétion hormonale
		$\alpha 1D$ : Ca <sub>v</sub> 1,3	CACNA1D	Neurones, Cœur, Cellules endocrines	Syndrome de Timothy, Arythmie cardiaque, Autisme
		$\alpha 1F$ : Ca <sub>v</sub> 1,4	CACNA1F	Rétine	Transduction visuelle Cécité nocturne congénitale stationnaire
	Type P/Q	$\alpha 1A$ : Ca <sub>v</sub> 2,1	CACNA1A	Neurones, Cellules pancréatiques $\beta$	Libération de neuromédiateurs dans le SNC, homéostasie calcique dendritique Syndrome de Lambert-Eaton, Migraine Hémiplégique familiale de type I, l'ataxie épisodique et l'ataxie spinocérébelleuse
	Type N	$\alpha 1B$ : Ca <sub>v</sub> 2,2	CACNA1B	Neurones, Cellules chromaffines surrénaliennes, Cellules pancréatiques $\beta$	Libération rapide de neuromédiateurs, régulation du système circulatoire, contrôle de l'activité et de la vigilance, homéostasie calcique dendritique Douleur neuropathique, inflammatoire et cancéreuse, migraine Hémiplégique familiale de type I, l'ataxie épisodique et l'ataxie spinocérébelleuse
	Type R	$\alpha 1E$ : Ca <sub>v</sub> 2,3	CACNA1E	Neurones, Cellules endocrines	Sécrétion d'insuline, LTP, libération de neuromédiateur, homéostasie calcique dendritique
Canaux à Bas Seuil d'Activation : LVA	Type T	$\alpha 1G$ : Ca <sub>v</sub> 3,1	CACNA1G	Neurones, Cœur, Muscle lisse, Cellules endocrines, Spermatozoïdes	Activité oscillatoire du thalamus
		$\alpha 1H$ : Ca <sub>v</sub> 3,2	CACNA1H	Neurones, Cœur, Muscle lisse, Cellules endocrines	Prolifération et contraction du muscle lisse, sécrétion d'aldostérone et de cortisol impliquée dans la nociception mécanique et thermique ainsi que dans les troubles neurologiques tels que l'autisme, Epilepsie
		$\alpha 1I$ : Ca <sub>v</sub> 3,3	CACNA1I	Neurones, Spermatozoïdes	Activité oscillatoire du thalamus

Tableau 5 : Caractéristiques des canaux calciques voltage-dépendants.

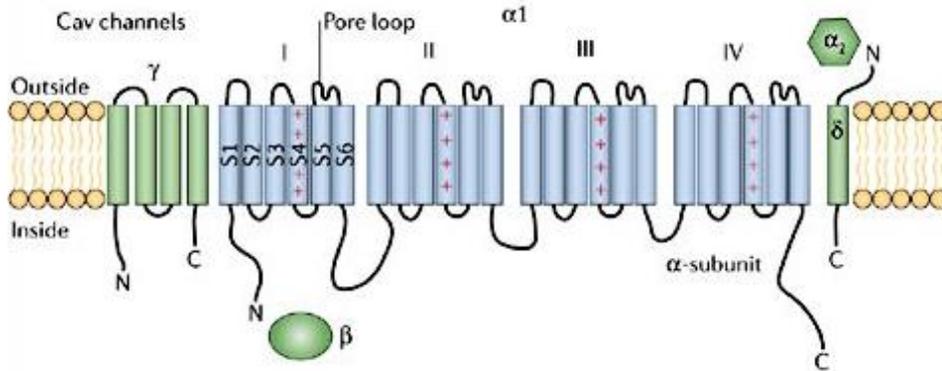
### B.1.a.2 Description

Bien que ces canaux se différencient par leurs propriétés électrophysiologiques, ils possèdent une structure commune, composée d'une sous-unité principale  $\alpha_1$  (servant de pore ionique), et de sous-unités régulatrices  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\delta$ .

#### Sous-unité principale : $\alpha_1$

La sous-unité  $\alpha_1$  représente le "cœur" de ces canaux calciques, et porte les fonctions de senseur du voltage et de pore ionique grâce à ses propriétés topologiques. Cette protéine s'organise sous la forme de quatre domaines transmembranaires (domaine I à IV), chacun constitué de six segments

transmembranaires en hélice  $\alpha$  (S1 à S6) (Heinemann SH *et al.*, 1994) (Figure 16). Ces quatre domaines sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires (boucles I à III). Au niveau extracellulaire, les segments de chaque domaine sont reliés entre eux par quatre boucles extracellulaires (I à IV). La boucle reliant les segments S5 et S6, également appelée boucle P (*Pore Loop*), forme le pore ionique. Le segment S4 de ces canaux affiche un motif conservé dans chaque domaine où l'on retrouve quatre à cinq acides aminés chargés positivement à pH neutre, majoritairement des arginines et des lysines, tous espacés de deux acides aminés neutres. Ces résidus chargés pourraient agir en tant que senseur du voltage et se déplacer sous l'effet du champ électrique membranaire. Ce déplacement aurait pour effet un changement de conformation permettant l'ouverture du canal (Bezaniilla F and Peozo E, 2002 ; Catterall WA and Striessnig J, 1992). Deux sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) ont été identifiés au sein de la boucle I-II (Zamponi GW *et al.*, 1997).



**Figure 16 : Structure des canaux calciques voltage-dépendants.**

En bleu, la sous-unité principale  $\alpha_1$ , forme le pore permettant le passage des ions calcium. Elle est formée de 4 domaines transmembranaires (I à IV), chacun formé de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Ces domaines sont reliés entre eux par des boucles intracellulaires et les segments sont reliés par des boucles extracellulaires. Les segments S4 sont chargés positivement et joue le rôle de senseur du voltage. En vert sont représentés les sous-unités régulatrices  $\beta$  (intracellulaire),  $\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2$  extracellulaire et  $\delta$  transmembranaire et intracellulaire) et  $\gamma$  (transmembranaire). D'après Lai HC and Jan LY 2006.

Le clonage des différentes sous-unités  $\alpha_1$  associées aux différents courants calciques a permis d'identifier 10 isoformes ( $\alpha_{1A}$  à  $\alpha_{1I}$  et  $\alpha_{1S}$ , codés par 10 gènes différents notés CACNA1A à CACNA1I et CACNA1S) (Lory P and Nargeot J, 2004), organisés en 3 familles :  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  et  $Ca_v3$  (Walker D and De Waard M, 1998). Les  $Ca_v1$  représentent les courants de type-L et sont composés de quatre membres :  $Ca_v1.1$  (Bannister RA and Beam KG, 2013 ; Striessnig J *et al.*, 2004),  $Ca_v1.2$  (Shaw RM and Colecraft HM, 2013 ; Bhat S *et al.*, 2012 ; Dixon RE *et al.*, 2012),  $Ca_v1.3$  (Mangoni ME *et al.*, 2003 ; Zhang Z *et al.*, 2002) et  $Ca_v1.4$  (Doering CJ *et al.*, 2007 ; McRory JE *et al.*, 2004). Les  $Ca_v2$  regroupent les courants de type-P/Q, -N, -R associés respectivement aux canaux  $Ca_v2.1$  (Pietrobon D, 2013 ; Rajakulendran S *et al.*, 2012),  $Ca_v2.2$  (Lee MS, 2014), et  $Ca_v2.3$  (Weiergräber M *et al.*, 2006 ; Jing X *et al.*, 2005 ; Dietrich D *et al.*, 2003). Enfin, les  $Ca_v3$  sont à l'origine des courants de type-T et possèdent trois membres :  $Ca_v3.1$  (Perez-Reyes E, 2003),  $Ca_v3.2$  (Bourinet *et al.*, 2005 ; Park JY *et al.*, 2003) et

Ca<sub>v</sub>3.3 (Astori S *et al.*, 2011). Le recoupement entre les isoformes  $\alpha_1$  et les différentes familles de Ca<sub>v</sub> est représenté dans le *Tableau 7*.

 Les sous-unités régulatrices :

La sous-unité  $\beta$

La sous-unité  $\beta$  est une protéine entièrement cytosoluble qui appartient à la famille protéique des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK) (Gonzalez-Gutierrez G *et al.*, 2008). Cette sous-unité se compose de cinq domaines distincts (A, B, C, D et E) (Buraei Z and Yang J, 2013). Les domaines A, C et E sont très variables alors que les domaines B et D sont extrêmement conservés, et présentent des homologies structurales avec les motifs SH3 (Src Homology-3) et GK (Guanylate Kinase), respectivement (Richards MW *et al.*, 2007). La sous-unité  $\beta$  représente la sous-unité des CCVD pour laquelle nous disposons actuellement du plus d'informations (Butcher AJ *et al.*, 2006 ; Dolphin AC, 2003). Il existe quatre isoformes de cette sous-unité ( $\beta_1$  à  $\beta_4$ , codées par 4 gènes *CACNB 1* à *4*) (*Tableau 6*). Ces quatre isoformes sont présentes dans le cerveau, et possèdent un pattern d'expression tissulaire propre à chacune d'entre elle ( $\beta_1$  : muscle squelettique et cœur,  $\beta_2$  : cœur, trachée, poumon, et aorte,  $\beta_3$  : muscle lisse, trachée, poumon et aorte,  $\beta_4$  : CNS) (Buraei Z and Yang J, 2010).

Sous unités	Isoformes	Gènes	Sites d'expressions	Pathologies Associées
$\beta$	$\beta_1$ : 4 variants (1a à 1d)	<i>CACNB1</i>	Muscles squelettique et cardiaque, CNS, rate, cellule T	-
	$\beta_2$ : 4 variants (2a à 2d)	<i>CACNB2</i>	CNS (hippocampe), muscle cardiaque, aorte, trachée, poumon, ostéoblaste et cellules T	Mutations associées au Syndrome de Brugada (mutation T11I) et au Syndrome de la mort subite (mutation S481L)
	$\beta_3$ : 3 variants (3a à 3c)	<i>CACNB3</i>	CNS, muscle lisse, aorte, trachée et poumon	Mutations retrouvées uniquement chez les patients épileptiques
	$\beta_4$ : 2 variants (4a et 4b)	<i>CACNB4</i>	CNS (prédominance dans le cervelet)	Mutation R468Q impliquée dans les convulsions fébriles et la mutation R482x est retrouvée chez les patients atteints d'épilepsie myoclonique juvénile
$\alpha_2\delta$	$\alpha_2\delta$ -1	<i>CACNA2D1</i>	Muscles squelettiques, lisses et cardiaque, CNS (particulièrement : cortex cérébral, hippocampe et cervelet), PNS et tissu endocrinien	Troubles cardiaques et douleur neuropathique
	$\alpha_2\delta$ -2	<i>CACNA2D2</i>	CNS (essentiellement : cervelet, hippocampe et striatum), poumons, pancréas, testicules et prostate	Epilepsie et ataxie cérébrale
	$\alpha_2\delta$ -3	<i>CACNA2D3</i>	CNS (essentiellement : noyau caudé, putamen, cortex cérébral et hippocampe) + muscle squelettique et cardiaque chez l'Homme	Hypersensibilité thermique Autisme
	$\alpha_2\delta$ -4	<i>CACNA2D4</i>	Rétine et tissu endocrinien cœur, muscle squelettique, intestin, foie fœtal, érythroblastes et reins	Dystrophie rétinienne et cécité nocturne
$\gamma$	$\gamma_1$	<i>CACNG1</i>	Muscle squelettique	Model murin, associé à l'épilepsie et à l'ataxie
	$\gamma_2$	<i>CACNG2</i>		
	$\gamma_3$	<i>CACNG3</i>		
	$\gamma_4$	<i>CACNG4</i>		
	$\gamma_5$	<i>CACNG5</i>		
	$\gamma_6$	<i>CACNG6</i>	Muscle cardiaque	
	$\gamma_7$	<i>CACNG7</i>		
	$\gamma_8$	<i>CACNG8</i>		

**Tableau 6 : Caractéristiques des sous-unités auxiliaires des canaux calciques voltage-dépendants**

La fonction de la sous-unité  $\beta$  est uniquement la régulation des CCVD. Elle est ainsi impliquée dans son adressage vers la membrane plasmique depuis le réticulum endoplasmique (Figure 17) et dans régulation de ses propriétés biophysiques (Dolphin AC, 2012b ; Karunasekara Y *et al.*, 2009). En effet, selon la nature de l'isoforme qui est liée à la sous-unité  $\alpha_1$ , les propriétés d'activation et d'inactivation peuvent être fortement modulées. L'association entre ces sous-unités et un CCVD n'est pas clairement établie (Tableau 7) (Van Petegem F *et al.*, 2004).

La sous-unité  $\gamma$

La sous-unité  $\gamma$  est composée de quatre domaines transmembranaires hautement conservés, liés par une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires, avec deux extrémités cytosoliques, amino-terminale et carboxy-terminale (Kang MG and Campbell KP, 2003). Le domaine d'interaction avec la sous-unité  $\alpha_1$  a été localisé sur la première moitié amino-terminale de la protéine (Arikath J *et al.*, 2003). Cette sous-unité possède 8 isoformes ( $\gamma_1$  à  $\gamma_8$ , codées par 8 gènes différents *CACNG 1* à *8*) (Chu PJ *et al.*, 2001, Sharp AH *et al.*, 2001) (Tableau 6).

Très peu de données sont connues sur les fonctions biophysiques des sous-unités  $\gamma$  et sur son couplage avec les CCVD (Tableau 7). Elle ne semble pas affecter l'adressage membranaire de la sous-unité  $\alpha_1$  et seuls des effets sur la modulation des propriétés biophysiques de la sous-unité  $\alpha_1$  ont été relevés (Kang MG *et al.*, 2001). Il apparaît ainsi que la sous-unité  $\gamma$  exercerait plutôt des effets de type "perte de fonctions", contrairement aux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ .

La sous-unité  $\alpha_2\delta$

La modulation de cette sous-unité faisant l'objet de mon travail, le chapitre suivant lui est consacré.

Sous-unités	Isoformes	Ca <sub>v</sub> Associés
$\beta$	$\beta_1$	Ca <sub>v</sub> 1.3. Ca <sub>v</sub> 2.1 et 2.2 dans le CNS ; Ca <sub>v</sub> 1.1 dans les muscles squelettiques Ca <sub>v</sub> 1.2/2.2/2.3 Association Ca <sub>v</sub> 2.2/ $\alpha_2\delta$ -1/ $\beta_{1b}$ et association Ca <sub>v</sub> 1.1/ $\alpha_2\delta$ -1/ $\beta_1$ / $\gamma$
	$\beta_2$	Ca <sub>v</sub> 1.2 voir 1.3) et 2.1 et 2.2 dans le CNS
	$\beta_3$	Ca <sub>v</sub> 1.2/2.2/2.3
	$\beta_4$	Ca <sub>v</sub> 2.1 et 2.2 dans le CNS Association Ca <sub>v</sub> 2.1 / $\beta_4$ / $\alpha_2\delta$ -2
$\alpha_2\delta$	$\alpha_2\delta$ -1	Ca <sub>v</sub> 1.2/2.2/2.3 Association Ca <sub>v</sub> 2.2/ $\alpha_2\delta$ -1/ $\beta_{1b}$ et association Ca <sub>v</sub> 1.1/ $\alpha_2\delta$ -1/ $\beta_1$ / $\gamma_1$
	$\alpha_2\delta$ -2	Association Ca <sub>v</sub> 2.1 / $\beta_4$ / $\alpha_2\delta$ -2
	$\alpha_2\delta$ -3	Ca <sub>v</sub> 1.2/2.2/2.3
	$\alpha_2\delta$ -4	
$\gamma$	$\gamma_1$	Ca <sub>v</sub> 1.1 et 2.1 / 2.2 et association Ca <sub>v</sub> 1.1/ $\alpha_2\delta$ -1/ $\beta_1$ / $\gamma$
	$\gamma_2$	Ca <sub>v</sub> 2.1 / 2.2
	$\gamma_3$	
	$\gamma_4$	
	$\gamma_5$	
	$\gamma_6$	
	$\gamma_7$	Ca <sub>v</sub> 2.2
	$\gamma_8$	

**Tableau 7 : Couplage des sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\delta$  aux sous-unités principales des canaux calciques voltage-dépendents**

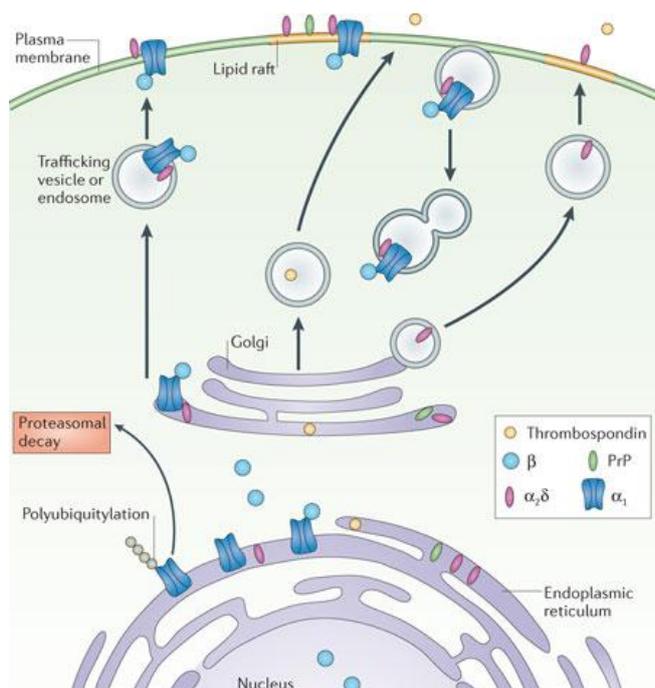
### B.I.b. La sous-unité $\alpha_2\delta$

#### B.I.b.1 Structure de la sous-unité $\alpha_2\delta$

Quatre isoformes composent cette famille,  $\alpha_2\delta$ -1 à  $\alpha_2\delta$ -4, et sont codées par 4 gènes distincts (*CACNA2D 1 à 4*) (Klugbauer N *et al.*, 2003 ; Klugbauer N *et al.*, 1999) (Tableau 6). Ce sont des glycoprotéines constituées de 2 protéines  $\alpha_2$  et  $\delta$ , qui sont issues de l'épissage alternatif d'un même gène (De Jongh KS *et al.*, 1990). Au cours d'un processus post-traductionnel,  $\alpha_2\delta$  est clivée en deux peptides  $\alpha_2$  et  $\delta$  qui sont ensuite reliés par des ponts disulfures. D'après les analyses topologiques, la sous-unité  $\alpha_2$  est entièrement extracellulaire tandis que la sous-unité  $\delta$  présente un seul domaine transmembranaire avec une petite portion intracellulaire de l'extrémité carboxy-terminale (Dolphin AC, 2012a). La sous-unité  $\alpha_2\delta$  interagit avec la sous-unité principale  $\alpha_1$  au niveau du 3<sup>ème</sup> domaine transmembranaire (Gurnett CA *et al.*, 1997).

#### B.I.b.2 Fonction de la sous-unité $\alpha_2\delta$

Au même titre que la sous-unité  $\beta$ , cette sous-unité  $\alpha_2\delta$  est un élément structural et fonctionnel essentiel au CCVD (Davies A *et al.*, 2007). En effet, cette glycoprotéine participe à l'adressage membranaire, au recyclage de la sous-unité  $\alpha_1$ , et joue un rôle important dans la modulation de ses propriétés biophysiques (Dolphin AC, 2012b) (Figure 17). En effet, la co-expression d' $\alpha_1$  et d' $\alpha_2\delta$  améliore l'adressage de la sous-unité principale vers la membrane et augmente l'amplitude du courant (Felix R *et al.*, 1997). A noter que l'ensemble de ces modulations biophysiques sont très largement dépendantes du couple  $Ca_v / \alpha_2\delta$  considéré.

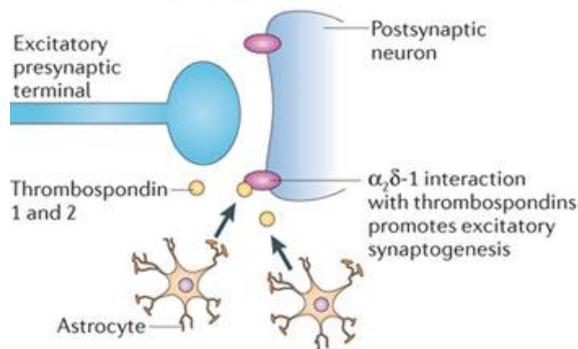


**Figure 17 : Vue d'ensemble de l'effet des sous-unités auxiliaires  $\alpha_2\delta$  et  $\beta$  sur le recyclage des canaux calciques voltage-dépendants CCVD.**

Les sous-unités  $\beta$  interagissent avec les sous-unités  $\alpha_1$  des CCVD néo-synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE), et les protègent de la polyubiquitination et donc de la dégradation par le protéasome. Ces sous-unités  $\beta$  favorisent également le pliage de la sous-unité  $\alpha_1$ . Ces deux mécanismes favorisent le départ du canal calcique du RE. La sous-unité  $\alpha_2\delta$  peut s'associer aux sous-unités  $\alpha_1$  ou  $\beta$  après qu'elles aient quitté le RE, notamment au niveau l'appareil de Golgi, pour réduire l'endocytose du canal calcique et favoriser son adressage membranaire. Les sous-unités  $\alpha_2\delta$  peuvent également atteindre la membrane plasmique en l'absence des canaux de calcium et sont présentes dans les fractions « radeaux lipidiques » de la membrane plasmique. D'après Dolphin AC, 2012b.

Parallèlement, la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  peut également être exprimée à la membrane, indépendamment de la sous-unité  $\alpha_1$ , où elle est impliquée dans la formation de synapses excitatrices par liaison directe à des protéines de la matrice extracellulaire de la famille des thrombospondines (Figure 18). En effet, la thrombospondine, sécrétée par les astrocytes, nécessite la présence de cette sous-unité au niveau post-synaptique pour promouvoir la synaptogenèse (Eroglu C *et al.*, 2009).

Des modifications d'expression ou de fonctions de ces sous-unités peuvent être associées à différentes pathologies (Tableau 6) (Neely GG *et al.*, 2010 ; Wycisk KA *et al.*, 2006a et b ; Barclay J *et al.*, 2001).



**Figure 18 : Rôle de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  dans la synaptogenèse excitatrice.**

L'interaction entre les thrombospondines 1 et 2 et la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  favorise la formation de synapses excitatrices. Les thrombospondines, protéines de la matrice extracellulaire, sont sécrétées, entre autres, par les astrocytes. D'après Dolphin AC 2012b

### B.1.b.3. Distribution et couplage des sous-unités $\alpha_2\delta$

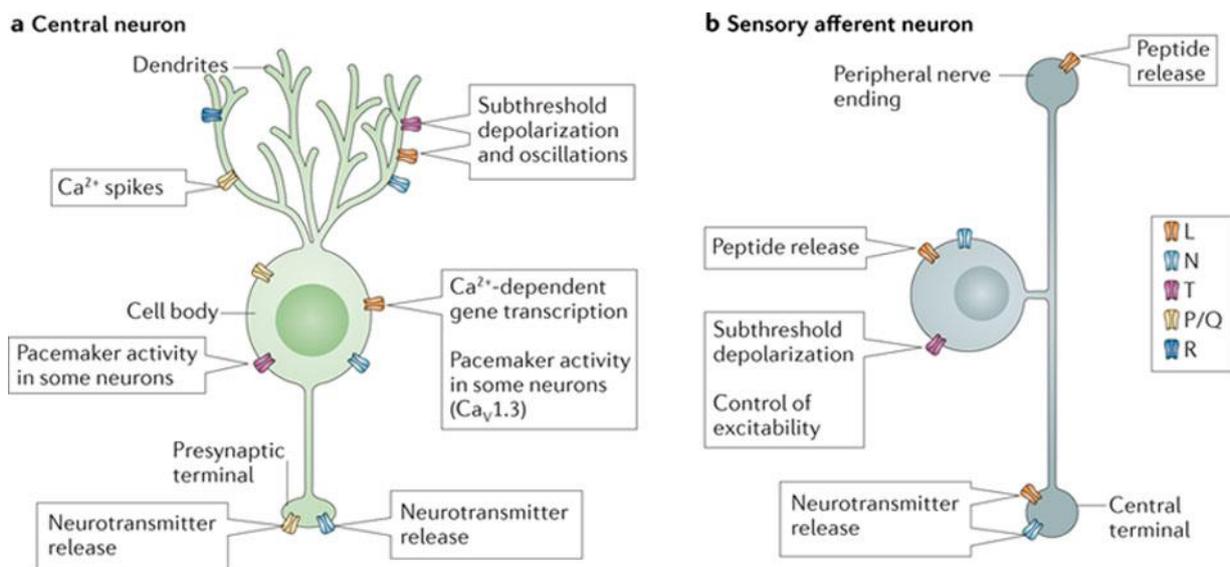
Les sous-unités  $\alpha_2\delta-1$  et  $\alpha_2\delta-3$  sont exprimées essentiellement dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, alors que la sous-unité  $\alpha_2\delta-2$  se distribue également dans les poumons, le pancréas, les testicules, la prostate et la moelle épinière. La sous-unité  $\alpha_2\delta-4$  ne présente quand à elle pas d'expression neuronale, et se localise dans le cœur, le muscle squelettique, l'intestin, le foie fœtal, les érythroblastes, les reins, la rétine et la glande pituitaire (Cole RL *et al.*, 2005 ; Arikath J and Campbell KP, 2003 ; Klugbauer N *et al.*, 2003 ; Barclay J and Rees M, 2000). Au niveau subcellulaire, les sous-unités  $\alpha_2\delta$  sont majoritairement localisées au niveau des rafts lipidiques (Dolphin AC, 2013 ; Davies A *et al.*, 2006).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données certaines sur l'association entre une sous-unité  $\alpha_2\delta$  et un CCVD particulier. Certaines associations sont néanmoins connues (Cassidy JS *et al.*, 2014 ; Davies A *et al.*, 2007) et répertoriées dans le Tableau 7.

## B.II : Intérêt de la modulation fonctionnelle des $Ca_v$ par le blocage de la sous-unité $\alpha_2\delta$

### B.II.a : Expression des $Ca_v$ et hypersensibilité

Les CCVD sont retrouvés à tous les niveaux des voies de signalisation de la douleur (GDR, moelle épinière –MEp- et cerveau) où ils participent à l'excitabilité neuronale. En pré-synaptique, ces canaux joueraient un rôle dans la libération de neurotransmetteurs ; alors qu'en post-synaptique, ils seraient impliqués dans des phénomènes de sensibilisation (Heinke B *et al.*, 2004). Au niveau des terminaisons nerveuses périphériques, ces canaux pourraient participer au phénomène d'inflammation neurogène de par leur rôle dans la libération de certains peptides (substance P, CGRP, etc.) (Gover TD *et al.*, 2003) (Figure 19). L'augmentation de leur expression dans des modèles d'hypersensibilité et les effets bénéfiques de leur blocage (génétique ou pharmacologique) font de ces canaux des cibles pharmacologiques intéressantes dans le traitement de la douleur.



**Figure 19 : Distribution et rôles des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) au niveau neuronal**

Au niveau des neurones du système nerveux central, des cellules dendritique, et des terminaisons pré-synaptiques, la distribution des CCVD n'est pas uniforme. La distribution et les fonctions principales de ces canaux sont présentées sur la figure (a.). Il faut noter que celles-ci varient grandement entre les différentes classes de neurones. Les canaux  $Ca_v2.1$  (type de Q P) et  $Ca_v2.2$  (type N) sont présents dans les terminaux pré-synaptiques, où ils sont nécessaires à la libération de neurotransmetteurs. Dans de nombreux neurones, les canaux de type T sont présents dans les dendrites et peuvent avoir un rôle dans certains neurones pré-synaptiques. Les canaux de type L participent aux couplages excitation-transcription, fournissant le  $Ca^{++}$  nécessaire à l'activation de transcription  $Ca^{++}$ -dépendante. (b.) Les neurones sensoriels périphériques utilisent principalement les canaux de type N pour la libération rapide de neurotransmetteurs, tandis que les canaux de type L sont impliqués dans la libération de peptides au niveau des corps cellulaires et au niveau central. Il existe aussi des preuves pour les canaux calciques dans les terminaux périphériques, contribuant à la libération de peptides. D'après Dolhpin 2012b.

### B.II.a.1 Effet de l'hypersensibilité sur l'expression des $Ca_v$

L'expression ou l'activité des canaux calciques peut être modulée dans certains contextes douloureux (Tableau 8).

#### Canaux de type-L: $Ca_v1$

Les données concernant cette famille sont contradictoires. En effet, en condition de douleur neuropathique (CCI et axotomie), une équipe a montré une diminution d'expression de  $Ca_v1.2$  et  $1.3$  dans les GRD (Kim DS *et al.*, 2001). A l'inverse, Fossat et collaborateurs ont montré en 2010 une augmentation de  $Ca_v1.2$  dans la corne dorsale de la MEp d'animaux SNL (*Sciatic Nerve Ligation*). Peu d'études se sont intéressées à l'implication des canaux de type-L dans la douleur viscérale. Un travail paru en 2013 montre que le canal  $Ca_v1.2$  est augmenté (ARNm et protéine) au niveau des neurones des GRD dans un modèle de douleur induit par le TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique) (Qian A *et al.*, 2013).

#### Canaux de type-P/Q : $Ca_v2.1$

Assez peu de données sont disponibles à notre connaissance concernant les modifications d'expression de ce canal en cas d'hypersensibilité. Néanmoins, une étude parue en 2001, a mis en évidence par hybridation *in situ* une augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha_{1a}$  dans les neurones de moyen et grand diamètre des GRD, suite à l'induction d'une neuropathie diabétique (Yusaf SP *et al.*, 2001).

#### Canaux de type-N : $Ca_v2.2$

Ce canal est probablement le plus impliqué dans la nociception. En effet, il a été mis en évidence une augmentation protéique de ce canal en cas d'inflammation (modèle de CFA) (Lu SG *et al.*, 2010) et de douleur neuropathique (CCI) (Cizkova D *et al.*, 2002).

#### Canaux de type-R : $Ca_v2.3$

Ce canal a été relativement peu étudié dans un contexte de douleur. Néanmoins, tout comme pour le canal  $Ca_v1.2$ , l'équipe de Qian a pu mettre en évidence une augmentation des ARNm et de la protéine  $\alpha_{1E}$  au niveau des neurones des GRD dans un modèle TNBS de douleur viscérale (Qian A *et al.*, 2013).

#### Canaux de type-T : $Ca_v3$

Plusieurs études ont pu mettre en évidence une augmentation des courants de type-T en condition douloureuse (neuropathique -Jagodic MM *et al.*, 2008-, HSV -Marger F *et al.*, 2011- et inflammatoire -Todorovic SM and Jevtovic-Todorovic V, 2007-). De plus, les ARNm codant pour les canaux

Ca<sub>v</sub>3.1 et 3.3 sont significativement augmentés dans la neuropathie diabétique. Au sein de cette famille, le canal Ca<sub>v</sub>3.2 est très certainement celui qui présente le plus d'intérêt dans la nociception (Kerckhove N, Boudieu L *et al.*, en cours de soumission, annexe 4). En effet, dans un modèle de douleur neuropathique, les courants, les ARNm et la protéine Ca<sub>v</sub>3.2 sont augmentés (Wen XJ *et al.*, 2010).

Au niveau viscéral, Marger et collaborateurs ont récemment montré une augmentation des neurones marqués pour le canal Ca<sub>v</sub>3.2 dans un modèle d'HSV (butyrate), corrélée à l'hypersensibilité (Marger F *et al.*, 2011).

#### Sous-unité auxiliaire β

Bien que peu d'études aient été publiées sur cette protéine, la sous-unité auxiliaire β semblerait également être impliquée dans la nociception, et plus particulièrement la sous-unité β<sub>3</sub>. En 2012, l'équipe de Li L, a pu mettre en évidence une augmentation des ARNm codant pour cette sous-unité dans un modèle de douleur neuropathique induit par ligature du nerf sciatique (Li L *et al.*, 2012).

	Augmentation	Diminution
Inflammation	Ca <sub>v</sub> 2.2 et α <sub>2</sub> δ-1 (CFA / ARNm et prot. / GRD et MEp)	
	Ca <sub>v</sub> 1.2 et Cav2.3 (TNBS / ARNm et prot. / GRD)	
Neuropathie	Ca <sub>v</sub> 1.1 et Ca <sub>v</sub> 1.4 (GRD) 1.2 (MEp) Ca <sub>v</sub> 2.2 (CCI)	Ca <sub>v</sub> 1,2 et Ca <sub>v</sub> 1,3 (CCI et axotomie du SN)
	Ca <sub>v</sub> 2.1 (Diabétique / ARNm / GRD), α <sub>2</sub> δ-1,-2 et -3 (Diabétique / ARNm et prot / GRD)	α <sub>2</sub> δ-2 (SNL)
	β <sub>3</sub> (SNL / ARNm / GRD), α <sub>2</sub> δ-1 (SNL / ARNm et prot. / GRD et MEp) Ca <sub>v</sub> 3.2 (ARNm, prot et courant)	

**Tableau 8 : Modification de l'expression des canaux calciques voltage-dépendants et de leurs sous-unités auxiliaires en condition d'hypersensibilité d'origine inflammatoire et somatique.**

Abréviations : CCI : constriction chronique de nerf ; CFA : Adjuvant complet de Freund ; GRD : ganglions rachidiens dorsaux ; MEp : Moelle Epinière, Prot. : protéine ; SN : système nerveux ; SNL : ligature du nerf sciatique ; TNBS : acide 2,4,6-Tri-nitro-benzène-sulfonique.

#### B.II.a.2 Effet de la modulation des Ca<sub>v</sub> sur l'hypersensibilité

Le blocage de ces canaux (génétique ou pharmacologique) permet de diminuer les seuils de sensibilité dans de nombreux modèles d'étiologies variées (Tableau 9).

#### Canaux de type-L : Ca<sub>v</sub>1

Le blocage de Ca<sub>v</sub>1.2 par des ARNsi et des PNA (*peptide nucleic acide*), permet de reverser l'hypersensibilité mécanique induite par ligature du nerf sciatique, alors que les ARNsi et PNA dirigés contre Ca<sub>v</sub>1.3 n'ont aucun effet sur les seuils de douleur de ces animaux (Fossat P *et al.*, 2010). Les dihydropyridines (nifédipine par exemple), le diltiazem et le vérapamil sont des antagonistes

calciques qui ciblent les canaux de type-L, mais sans spécificité pour un sous-type particulier. Le vérapamil permet de réduire l'hypersensibilité thermique et mécanique chez le rat (Todorovic SM *et al.*, 2004) et les douleurs neuropathiques (Kawashiri T *et al.*, 2012 ; Fossat P *et al.*, 2010 ; Shutov L *et al.*, 2006).

Au niveau viscéral, Kania et collaborateurs ont montré que ces molécules permettaient de diminuer l'HSV chez la chèvre (Kania BF *et al.*, 2011 ; Kania BF *et al.*, 2009). En 2013, une étude a également mis en évidence une diminution de l'HSV induite par le TNBS, suite à une injection intrathécale de nimodipine (antagoniste calcique de la famille des dihydropyridines) (Qian A *et al.*, 2013).

#### Canaux de type-P/Q : Ca<sub>v</sub>2.1

Une mutation non-sens, sur le chromosome 19p13, au niveau du gène codant la sous-unité principale  $\alpha_{1a}$  des canaux Ca<sub>v</sub>2.1, est responsable des migraines hémiplégiques familiales (Uchitel OD *et al.*, 2012) ainsi que de l'ataxie épisodique de type II (Ophoff RA *et al.*, 1996). L'implication de ce canal dans la nociception semble complexe et dépend de la modalité douloureuse étudiée. De plus, le KO (*knockout*) total du gène codant ce canal, entraîne le développement d'une dystonie à 10/12 jours postnataux et ces animaux ne survivent pas au sevrage. Cependant, les tests effectués chez les souris (avant le développement des troubles moteurs) ont révélé une hypoalgie mécanique (test du *tail-flick*) et viscérale (modèle d'acide acétique). Le mutant hétérozygote Ca<sub>v</sub>2.1<sup>+/-</sup> ne présente pas de troubles du développement, ni de modification des réponses aux stimuli mécanique et viscéral. Des études pharmacologiques avec l' $\omega$ -agatoxine IVA, bloqueur du canal Ca<sub>v</sub>2.1, ne montrent que peu d'effet sur les comportements douloureux induits par des modèles de neuropathie (Murakami M *et al.*, 2004 ; Matthews EA and 2001 ; Yamamoto T and Sakashita Y, 1998). Des études complémentaires sont nécessaires afin d'établir clairement le rôle de ce canal dans la douleur.

#### Canaux de type-N : Ca<sub>v</sub>2.2

L'ablation du gène codant pour la sous-unité  $\alpha_{1B}$  confirme l'importance et la complexité de ce canal dans la nociception. Les souris Ca<sub>v</sub>2.2<sup>-/-</sup> présentent une réduction de la sensibilité mécanique mais pas thermique (Kim C *et al.*, 2001). Cependant, Hatakeyama (2001), ont montré une réduction de la sensibilité thermique mais aucune modification de la sensibilité mécanique chez ces animaux (Hatakeyama S *et al.*, 2001). Concernant la douleur inflammatoire, les trois équipes s'accordent sur la moindre réponse de ces animaux lors de la phase II du test au formol, ainsi qu'une diminution du nombre de crampes suite à l'injection d'acide acétique (Saegusa H *et al.*, 2001).

Des toxines issues de mollusques marins, les  $\omega$ -conotoxines MVIIA et GVIA, ont la capacité de bloquer spécifiquement ce canal. Ces molécules se sont montrées particulièrement intéressantes lors des études précliniques, puisqu'elles ont mis en évidence des effets antinociceptifs et anti-

allodyniques sur toutes les modalités testées (douleur aiguë thermique, inflammatoire et neuropathique) (Schroeder CI *et al.*, 2006). Ainsi de nombreuses formulations ont été mises au point, et actuellement le Ziconotide (Prialt®) est utilisé dans les douleurs réfractaires chez des patients cancéreux ou souffrant d'un syndrome d'immunodéficience acquise (Williams JA *et al.*, 2008). Cependant, son utilisation est limitée de part les nombreux effets indésirables. C'est pourquoi de nouvelles molécules sont en cours de développement et semblent prometteuses, par exemple le TROX-1 (Swensen AM *et al.*, 2012).

#### Canaux de type-R : Ca<sub>v</sub>2.3

Le KO du gène codant la sous-unité  $\alpha_{1E}$  n'entraîne pas de modification des seuils de sensibilité basale, mais réduit l'hypersensibilité inflammatoire (Saegusa H *et al.*, 2002 ; Saegusa H *et al.*, 2000).

L'utilisation de l'antagoniste SNX-482 permet de diminuer l'hyperexcitabilité des fibres nerveuses A $\delta$  et C dans un modèle de douleur neuropathique induit par ligature du nerf sciatique (Matthews EA *et al.*, 2007) et le temps de léchage durant la phase II du test au formol (Murakami M *et al.*, 2004).

Au niveau viscéral les animaux Ca<sub>v</sub>2.3<sup>-/-</sup> développent une moindre hypersensibilité viscérale inflammatoire suite à l'injection intrapéritonéale d'acide acétique (Seagusa 2000 et 2001). De la même manière, l'injection intrathécale de nimodipine (inhibiteur de Ca<sub>v</sub>2.3 et 1.2) permet de diminuer l'hypersensibilité viscérale induite par le TNBS (Qian A *et al.*, 2013).

#### Canaux de type-T : Ca<sub>v</sub>3

Des études utilisant des stratégies anti-sens ou des animaux KO, ont permis de mettre en évidence l'implication spécifique du canal Ca<sub>v</sub>3.2 dans les douleurs d'étiologies variées (Choi S *et al.*, 2007 ; Bourinet E *et al.*, 2005).

Il n'existe pas de ligand spécifique d'un sous-type particulier de canaux Ca<sub>v</sub>3. Néanmoins, des molécules telles que le TTA-A2 et l'éthosuximide semblent avoir une plus forte affinité pour le canal Ca<sub>v</sub>3.2 et permettent de réduire les seuils de douleurs aiguës (thermique et mécanique), inflammatoire et neuropathique (traumatique, diabétique et chimio-induite) (Francois A *et al.*, 2013 ; Dogrul A *et al.*, 2003) (Nicolas Kerckhove, Ludivine Boudieu *et al.*, en cours de soumission, annexe 4). Le blocage génétique et pharmacologique du canal Ca<sub>v</sub>3.2 prévient le développement de l'hypersensibilité viscérale non-inflammatoire induite par des instillations intracoliques de butyrate (Marger F *et al.*, 2011).

Modalités douloureuses	Génétiques	Pharmacologiques
Aigue	Thermique KO Ca <sub>v</sub> 2.1 : hyperalgie MAIS Souris <i>Leaner</i> (tg <sup>fl<sup>o</sup></sup> /tg <sup>fl<sup>o</sup></sup> ) et Souris <i>Rolling Nagoya</i> (tg <sup>fl<sup>o</sup></sup> /tg <sup>fl<sup>o</sup></sup> ) = hypoalgiques KO Ca <sub>v</sub> 1.3 = pas de modification des seuils KO Ca <sub>v</sub> 2.2 / Ca <sub>v</sub> 3.2 / β + AS Ca <sub>v</sub> 3.2 = hypoalgie	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 1.2 (vérapamil), de Ca <sub>v</sub> 2.2 (ω-conotoxine), de Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
	Mécanique KO Ca <sub>v</sub> 1.3 : pas de modification des seuils KO Ca <sub>v</sub> 2.1 / Ca <sub>v</sub> 2.2 / Ca <sub>v</sub> 3.2 / β3 + AS Ca <sub>v</sub> 3.2 = hypoalgie	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 1.2 (vérapamil), de Ca <sub>v</sub> 2.2 (ω-conotoxine), Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
Excès de nociception / Inflammatoire	KO Ca <sub>v</sub> 2.1 / Ca <sub>v</sub> 2.2 / Ca <sub>v</sub> 2.3 / Ca <sub>v</sub> 3.2 / β3 + AS Ca <sub>v</sub> 3.2 = hypoalgie	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 2.1 (ω-agatoxine), de Ca <sub>v</sub> 2.2 (ω-conotoxine), Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
Neuropathique	Traumatique KO Ca <sub>v</sub> 2.1 / Ca <sub>v</sub> 2.2 / Ca <sub>v</sub> 3.2 + AS Ca <sub>v</sub> 3.2 = hypoalgie AS Ca <sub>v</sub> 1.2 / Ca <sub>v</sub> 3.2 / β3 = réversion de l'HS	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 2.2 (ω-conotoxine), Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT), d'α2δ1/2 (GBP/PGB) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
	Diabétique KO Ca <sub>v</sub> 3.2 et AS : hypoalgie	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 1.2 (vérapamil), de Ca <sub>v</sub> 2.2 (ω-conotoxine), Cav 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT), d'α2δ1/2 (GBP/PGB) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
	Cancéreuse	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 1.2 (vérapamil), Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT), d'α2δ1/2 (GBP/PGB) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
Viscérale / Inflammatoire	KO Ca <sub>v</sub> 2.1 / Ca <sub>v</sub> 2.2 / Ca <sub>v</sub> 2.3 / Ca <sub>v</sub> 3.2 / β3 + AS Ca <sub>v</sub> 3.2 = hypoalgie	Bloqueurs de Ca <sub>v</sub> 1.2 / 2.3 (nomodipine), de Ca <sub>v</sub> 3.2 (TTA-A2, éthosuximide, mibéfradil, DTT), et α2δ1/2 (GBP) = diminution de l'HSV inflammatoire Agoniste Ca <sub>v</sub> 3.2 (H2S) : effet pro-algique

**Tableau 9 : Récapitulatif de l'impact des modulations génétiques et pharmacologiques des canaux calciques voltage-dépendants et de la sous-unité auxiliaire β sur différentes modalités douloureuses.**

### B.II.b : Effet de l'hypersensibilité sur l'expression des sous-unités α<sub>2</sub>δ

La modification de l'expression des sous-unités α<sub>2</sub>δ a essentiellement été étudiée dans le cas de douleurs neuropathiques (Tableau 10).

Les données concernant les sous-unités α<sub>2</sub>δ-2 et -3, sont controversées, car si certaines équipes ont pu mettre en évidence une augmentation de ces sous-unités en cas de douleur neuropathique (Yusaf SP *et al.*, 2001), d'autres ont, au contraire, trouvé une diminution de leur expression (Bauer CS *et al.*, 2009). De plus, un polymorphisme génétique de la sous-unité α<sub>2</sub>δ-3 a été montré comme étant significativement corrélé à une diminution de la sensibilité à la chaleur, chez le volontaire sain, mais également chez des patients douloureux chroniques (Neely GG *et al.*, 2010) (Tableau 10).

Les études consacrées à la sous-unité α<sub>2</sub>δ-1 sont plus uniformes, et toutes s'accordent sur l'augmentation de cette sous-unité en cas d'hypersensibilité. En effet, plusieurs études ont pu mettre en évidence une augmentation de l'expression des ARNm codant la sous-unité α<sub>2</sub>δ-1 ainsi que de cette protéine, au niveau des neurones des GRD et de la corne dorsale de la MEp sur des modèles de

douleur neuropathique ou inflammatoire (Li KW *et al.*, 2014 ; Boroujerdi A *et al.*, 2011 ; Lu SG *et al.*, 2010 ; Luo ZD *et al.*, 2001 ; Newton RA *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que cette augmentation d' $\alpha_2\delta$ -1 était associée au développement d'une allodynie et que cette surexpression n'affectait ni l'expression de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , ni celle des sous-unités  $\beta$  (Li CY *et al.*, 2004 ; Luo ZD *et al.*, 2001) (Tableau 10).

	Augmentation	Diminution
Excès de nociception / Inflammation	$\alpha_2\delta$ -1 (CFA / ARNm et prot / GRD et MEp)	
Neuropathie	$\alpha_2\delta$ -1, -2 et -3 (Diabétique / ARNm et prot / GRD) $\alpha_2\delta$ -1 (SNL / ARNm et prot / GRD et MEp)	$\alpha_2\delta$ -2,-3 (SNL)

**Tableau 10 : Modification d'expression des sous-unités auxiliaires  $\alpha_2\delta$  en condition de douleur inflammatoire ou neuropathique**

Abréviations : GRD : ganglions rachidiens dorsaux ; MEp : Moelle Epinière ; SNL : ligature du nef sciatique

### B.II.c : Effet de la modulation des sous-unités $\alpha_2\delta$ sur l'hypersensibilité

#### B.II.b.1 : Modulation génétique des sous-unités $\alpha_2\delta$

Il existe différents modèles murins où l'expression des gènes codant soit  $\alpha_2\delta$ -1, -2 ou -3, a été modifiée (Tableau 11).

##### La sous-unité $\alpha_2\delta$ -1

Concernant la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1, certainement la plus étudiée à ce jour, deux modèles de souris ont été créés. Le premier, publié en 2006 par Field et collaborateur, a été obtenu par le remplacement de l'arginine en position 217 du gène codant la partie  $\alpha_2$  de la protéine  $\alpha_2\delta$ -1 par une alanine (souris R217A). Cette mutation ne modifie ni l'expression des ARNm, ni l'expression protéique mais diminue grandement les courants calciques  $Ca_v2.2$  ainsi que la liaison de cette protéine avec son ligand pharmacologique, la prégabaline. En terme de comportement douloureux, ces souris ne montrent aucune altération de leur réponse vis-à-vis d'un *stimulus* d'origine inflammatoire (test au formol) ou neuropathique (CCI) (Field MJ *et al.*, 2006). Trois ans plus tard, Fuller-Bicer et collaborateurs, ont publié un autre modèle où le gène codant la protéine  $\alpha_2\delta$ -1 est invalidé (Fuller-Bicer GA *et al.*, 2009). Cette délétion entraîne une diminution importante de la contractilité basale du myocarde ainsi que de sa relaxation et diminue l'amplitude des courants calciques de type-L. Comme pour le premier modèle, cette modification entraîne une diminution de la liaison entre la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 et son ligand pharmacologique, la gabapentine. Quelques années plus tard, le comportement de ces animaux vis-à-vis de la douleur a été étudié (Patel R *et al.*, 2013). Ces animaux montrent une hypoalgie mécanique et au froid, mais pas au chaud, une hypersensibilité mécanique

retardée par rapport aux littermates. L'implication de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 dans le développement des douleurs neuropathiques a récemment été confirmée par l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés spécifiquement contre cette sous-unité qui permet de reverser l'hypersensibilité orofaciale induite par ligature du nerf infra-orbitaire (Li KW *et al.*, 2014 ; Zhou C and Luo ZD, 2014). De plus, l'implication de cette sous-unité auxiliaire dans plusieurs étiologies douloureuses a pu être mise en évidence chez des animaux qui surexpriment cette protéine. En effet, ces animaux ont un phénotype allodymique basal (mécanique et thermique) et développent une hyperalgie plus importante que les animaux sauvages lors d'une stimulation au formol, au CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) ou encore suite à la ligature du nerf sciatique (Li CY *et al.*, 2006).

#### La sous-unité $\alpha_2\delta$ -2

La souris ducky (du/du) est un modèle où le transcrit du gène codant pour la sous-unité  $\alpha_2$ , de la protéine  $\alpha_2\delta$ -2, est tronqué (Brodbeck J *et al.*, 2002 ; Barclay J and Rees M, 2000). Il en résulte l'expression d'une petite portion de  $\alpha_2$  qui se traduit par l'absence totale de  $\delta$  et un défaut d'ancrage dans la membrane plasmique. Les études électrophysiologiques montrent une réduction sévère de la densité de courants de type-P des souris ducky avec une conductance unitaire normale. Phénotypiquement, la souris ducky est plus petite que les souris contrôles et n'arrive pas à survivre au delà de cinq semaines. Elle est atteinte d'ataxie et de dyskinésie paroxysmale. Aucune évaluation de la sensibilité n'a donc pu être réalisée sur cette souche.

#### La sous-unité $\alpha_2\delta$ -3

La sous-unité  $\alpha_2\delta$ -3 a été délétée chez la souris (Neely GG *et al.*, 2010). Ces animaux ont permis de mettre en évidence que cette sous-unité est nécessaire à la réponse à la chaleur (en basal ou en condition inflammatoire). De plus, les réponses aux *stimuli* mécaniques sont identiques entre les génomes ( $\alpha_2\delta$ -3<sup>-/-</sup> et  $\alpha_2\delta$ -3<sup>+/+</sup>), ce qui suggère une implication de cette sous-unité dans la nociception étiologie-dépendante.

#### La sous-unité $\alpha_2\delta$ -4

Concernant la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -4, aucune publication à notre connaissance, n'a étudié l'impact de sa modification d'expression sur le comportement douloureux. Cependant, des mutations de cette protéine entraînent un dysfonctionnement des photorécepteurs, responsable d'une forme récessive de cécité et d'une dystrophie progressive des cônes (Wycisk KA *et al.*, 2006a et b). Ces mutations donnent des protéines tronquées, donc peu nombreuses et non fonctionnelles.

Modalité douloureuse		Modulation génétique	Modulation pharmacologique
Aiguë	Thermique	KO $\alpha_2\delta$ -1 / $\alpha_2\delta$ -3 = Hypoalgie KI $\alpha_2\delta$ -1 = Allodynie	
	Mécanique	KO $\alpha_2\delta$ -1 = Hypoalgie KI $\alpha_2\delta$ -1 = Allodynie	
Excès de nociception / Inflammatoire		KO $\alpha_2\delta$ -3 = Hypoalgie KI $\alpha_2\delta$ -1 = Hyperalgie	
Neuropathique	Traumatique	KO $\alpha_2\delta$ -1 = Hypoalgie AS $\alpha_2\delta$ -1 = Réversion de l'HS KI $\alpha_2\delta$ -1 = Hyperalgie	Bloqueurs d' $\alpha_2\delta$ -1, -2 (GBP/PGB) = effet antihyperalgique et anti-allodynique
	Diabétique		
	Cancéreuse		
Viscérale / Inflammatoire			Bloqueurs $\alpha_2\delta$ -1/2 (GBP) = diminution de l'HSV inflammatoire

**Tableau 11 : Impact de la modulation génétique ou pharmacologique des sous-unités  $\alpha_2\delta$  sur la nociception**

Abréviations = AS : Antisens ; GBP : Gabapentine ; HSV : Hypersensibilité viscérale, KI : *Knock in* et KO : *Knock out*, PGB : Prégabaline.

### B.II.b.2 Modulation pharmacologique de la sous-unité $\alpha_2\delta$ par les gabapentinoïdes

A ce jour, aucun ligand des sous-unités  $\alpha_2\delta$ -3 et  $\alpha_2\delta$ -4 n'a pu être identifié. Concernant les sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 et  $\alpha_2\delta$ -2, deux molécules sont actuellement disponibles. Commercialisées sous le nom de Neurotin<sup>®</sup>, la gabapentine (GBP) est mise sur le marché depuis 1994 et sa nouvelle formulation, la Prégabaline (PGB) (commercialisée sous le nom de Lyrica<sup>®</sup>) est sur le marché depuis 10 ans. Ces molécules sont regroupées sous le terme de gabapentinoïdes et sont des analogues ((S)-3-(aminométhyl)-5-acide méthylhexanoïque) de l'acide gamma-aminobutyrique. Des études ont montré que ces molécules ne se liaient pas aux récepteurs GABA<sub>A</sub> ni GABA<sub>B</sub>, et que les effets de ces molécules n'étaient pas reversés par des antagonistes GABAergiques (Hendrich J *et al.*, 2008 ; Cheng JK *et al.*, 2006 ; Eutamene H *et al.*, 2000).

 Etudes précliniques de l'impact de la modulation de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  par les gabapentinoïdes sur la douleur

#### Modèles de douleur neuropathique

Depuis plusieurs années, l'intérêt de la modulation des sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 et  $\alpha_2\delta$ -2 par les gabapentinoïdes est étudié notamment dans le cadre des douleurs d'origine neuropathique. Ainsi ces molécules ont révélé des propriétés antihyperalgique et anti-allodynique lors de leurs administrations systémiques dans divers modèles de douleur neuropathique (Li KW *et al.*, 2014 ; Kusunose N *et al.*, 2010 ; Bauer CS *et al.*, 2009 ; Xiao W *et al.*, 2007 ; Lynch JJ *et al.*, 2004 ; Field MJ *et al.*, 1999). Dans un modèle

de neuropathie induite par constriction chronique de nerf la gabapentine permet de diminuer la réponse inflammatoire du nerf lésé (diminution des taux de MPO et de cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ ) (Câmara CC *et al.*, 2013). L'équipe de Lee a également montré dans un modèle de neuropathie traumatique (ligature du nerf spinal L5/L6) que la GBP, en plus de son effet anti-allodynique mécanique, possédait un effet anti-inflammatoire dépendant de la production de la cytokine IL-10 (Lee BS *et al.*, 2013).

#### Modèles de douleur inflammatoire

L'injection locale de GBP (intrathécale ou intra-plantaire) permet de diminuer la réponse des animaux lors de la phase II du test au formol (Kaneko M *et al.*, 2000 ; Yoon MH and Yaksh TL, 1999 ; Shimoyama N *et al.*, 1997), et de prévenir et de reverser l'hyperalgie thermique induite par un modèle d'arthrite (Lu Y and Westlund KN, 1999). Une étude clinique menée en 2002 sur des volontaires sains, a montré que la GBP diminuait l'hypersensibilité et l'allodynie induite par la capsaïcine, mais n'avait aucun effet sur la sensibilité thermique évaluée sur des zones de peau « saines » (Dirks J *et al.*, 2002). Les effets sur l'inflammation, elle-même, n'ont pas encore été étudiés.

#### Modèles de MICI

Les injections intrapéritonéales de PGB (2 et 50 mg/kg) ou de GBP (50, 100 et 200 mg/kg), permettent de diminuer les comportements douloureux (nombre de crampes abdominales) induites par l'injection d'acide acétique (Meymandi MS and, Keyhanfar F, 2013, Stepanović-Petrović RM *et al.*, 2008 ; Feng Y *et al.*, 2003). De la même manière, l'HSV induite par le LPS est bloquée par des injections de PGB par voie intrapéritonéale (10 et 330 mg/kg) et par voie orale (1, 3, 10 et 30 mg/kg) (Eutamene H *et al.*, 2000). Enfin, par voie sous-cutanée (30 et 200 mg/kg) ou orale (3, 10, 30, 60 et mg/kg), la PGB permet de diminuer, de manière dose dépendante, l'hypersensibilité colique (évaluée par distension colorectale –DCR-) induite par le TNBS (Ohashi-Doi K *et al.*, 2010 ; Ohashi K *et al.*, 2008 ; Diop L *et al.*, 2002).

#### Modèles du SII

A la dose de 30 mg/kg et en injection sous-cutanée, la PGB permet de limiter l'augmentation des réponses viscéromotrices à la DCR chez les animaux stimulés à l'huile de moutarde (Sikandra S and Dickenson AH, 2012) et la GBP permet de reverser l'HSC induite par le stress néonatal chez le rat (O'Mahony *et al.*, 2011). Enfin, à la même dose, la GBP permet de restaurer une normo-sensibilité viscérale chez les rats Wistar Kyoto (O'Mahony *et al.*, 2011).

### Autres modèles d'hypersensibilité viscérale

Ces molécules ont également été testées dans d'autres modèles d'HSV, tel que :

- Modèles de sensibilisation colique par des distensions colorectales répétées sur lesquels le traitement oral à la PGB (10 et 30 mg/kg) permet de diminuer les seuils de réponse lors des distensions (Ravnefjord A *et al.*, 2008 ; Million M *et al.*, 2007).
- Modèle d'HSV induit par injection de morphine (mini-pompe osmotique, 90µg/µl/h) où la PGB (10 et 30 mg/kg en sc.) diminue les réponses viscéromotrices au test de DCR (Bannister K *et al.*, 2011).
- Modèle de pancréatite chronique induit par le dibutyltin dichlorure (DBTC) dans lequel la GBP (100mg/kg en ip.) permet de reverser l'hypersensibilité mécanique de l'abdomen (Liao XZ *et al.*, 2010).

Concernant l'action de ces molécules chez les animaux sains, les données sont contradictoires. En effet, certains auteurs ont révélé un effet antinociceptif de ces molécules (Bannister K *et al.*, 2011 ; Sikandra S and Dickenson AH, 2011), alors que d'autres ne montrent aucun effet (Diop L *et al.*, 2002).

### Etudes cliniques des gabapentinoïdes

#### Autorisations de Mise sur le Marché (AMM)

Actuellement la GBP et la PGB sont indiquées en association dans le traitement des épilepsies partielles avec ou sans généralisation secondaire chez l'adulte (et chez l'enfant pour la GBP). Ces molécules sont également prescrites dans le cadre de douleurs neuropathiques périphériques (telles que la neuropathie diabétique ou la névralgie post-zostérienne) et centrale (concernant la PGB) au même titre que les antidépresseurs. De nombreuses études cliniques ont évalué l'efficacité de ces molécules dans les douleurs neuropathiques, et il apparaît que 22 à 48% des patients traités à la PGB montrent une amélioration de 50% de leur score de douleur (contre 7 à 18% pour les patients traités au placebo) (Kukkar A *et al.*, 2013). Enfin la PGB possède également son AMM pour les troubles d'anxiété généralisée chez l'adulte.

#### Les études cliniques

La plupart des protocoles cliniques sont encore consacrés à l'étude de l'efficacité de la PGB dans les nombreuses étiologies de la douleur neuropathique (Alayed N *et al.*, 2014 ; Siddiqui NT *et al.*, 2014 ; Kukkar A *et al.*, 2013, Salman AE *et al.*, 2013 ; Koyuncu T *et al.*, 2013). Cependant, de nouvelles perspectives thérapeutiques sont à l'étude pour la PGB notamment dans le syndrome des jambes sans repos (Kume A, 2014, Allen RP *et al.*, 2014, Takahashi N *et al.*, 2014) ainsi que dans le sevrage alcoolique (Mason BJ *et al.*, 2014 ; Saitz R, 2014) avec des résultats encourageants.

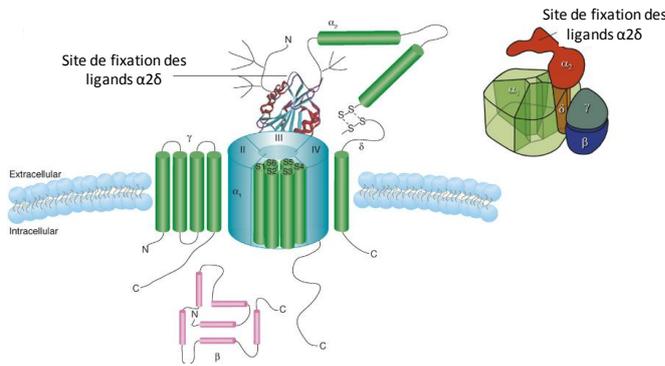
Concernant les douleurs viscérales, les études menées concernent uniquement des volontaires sains ou des patients atteints du SII (Gale JD and Houghton LA, 2011). La première étude date de 2005, où Lee et collaborateurs ont montré que, chez des patients souffrant du SII-D (40 patients), la GBP (*per os*, doses croissantes jusqu'à 600mg/jour, protocole de 5 jours) entraînait une diminution des seuils de sensibilité et une augmentation de la compliance rectale. Chez ces mêmes patients, la GBP a également permis d'améliorer les seuils de première sensation, l'urgence fécale, les sensations de ballonnement, l'inconfort et la douleur (Lee KJ *et al.*, 2005). Deux ans plus tard, la GBP (*per os*, doses croissantes jusqu'à 200 mg/jour, protocole de 3 semaines) a été testée sur des patients atteints du SII (26 patients). Les résultats montrent une augmentation des seuils de première sensation, d'urgence fécale, de douleur en réponse au test de DCR, ainsi qu'une augmentation de la compliance rectale (Houghton LA *et al.*, 2007). En 2011, deux études ont été publiées concernant l'efficacité de la PGB chez des volontaires sains (62 volontaires) (Iturrino J *et al.*, 2011) et chez des patients douloureux atteints de pancréatite (31 patients) (Olesen SS *et al.*, 2011). Concernant les patients atteints de pancréatite, la PGB (*per os*, doses croissantes jusqu'à 600mg/jour, protocole de 3 semaines), augmente les seuils de réponse lors de la stimulation électrique de l'intestin. Chez les volontaires sains, une prise de PGB par voie orale (200 mg) permet de réduire de 25% la sensation de douleur évaluée lors d'une rampe de distension. Suite à ces résultats, les auteurs ont testé cette molécule chez des patients souffrant du SII-C (18 patients) en suivant le même protocole mais aucune modification de la compliance colique ni des seuils de sensation n'a pu être mise en évidence ce qui a conduit à l'arrêt de l'étude (Iturrino J *et al.*, 2014).

### Les effets secondaires

Au cours des études cliniques citées précédemment, deux ont noté des effets secondaires, tels que somnolence, vertige et perte d'énergie suite au traitement par la PGB (200mg/jour). Cependant, ces troubles n'ont jamais nécessité l'arrêt du protocole (Iturrino J *et al.*, 2011 ; Houghton LA *et al.*, 2007). Ces résultats sont en accord avec les effets indésirables référencés pour cette molécule, à savoir de manière très fréquente (>1/10) des affections du système nerveux (étourdissement et somnolence) et de façon fréquente (>1/100 à >1/10) des affections psychiatriques (humeur euphorique, confusion, irritabilité, diminution de la libido, insomnie), des affections du système nerveux (troubles de la coordination, tremblements, vertiges, etc.) ainsi que des affections gastro-intestinales (vomissement, bouche sèche, constipation). De façon beaucoup plus ponctuelle, des affections psychiatriques importantes (hallucinations, dépression, etc.) et gastro-intestinales (distension abdominale, reflux gastro-œsophagien, etc.) peuvent être observées.

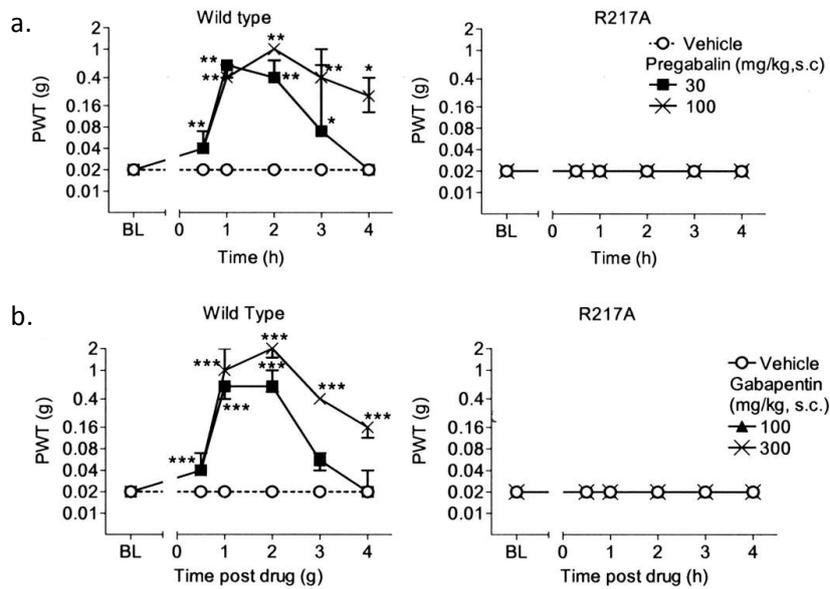
Mécanismes d'action

Ces molécules se lient aux sous-unités auxiliaires  $\alpha_2\delta-1$  et  $\alpha_2\delta-2$  (Dolphin AC, 2012a, Li Z *et al.*, 2011 ; Dooley DJ *et al.*, 2007 ; Bian F *et al.*, 2006 ; Belliotti TR *et al.*, 2005) (Figure 20). En effet, la prégabaline se fixe spécifiquement et fortement aux sous-unités  $\alpha_2\delta$ , avec un  $K_i = 40nM$  (Gee NS *et al.*, 1996) et la mutation ou la délétion de la protéine  $\alpha_2\delta-1$  entraîne une forte diminution de la fixation de la GBP (Wang M *et al.*, 1999 ; Brown JP and Gee NS, 1998).



**Figure 20 : Site de fixation des ligands  $\alpha_2\delta-1$  sur les canaux calciques de type L**  
D'après Dooley DJ *et al.*, 2007

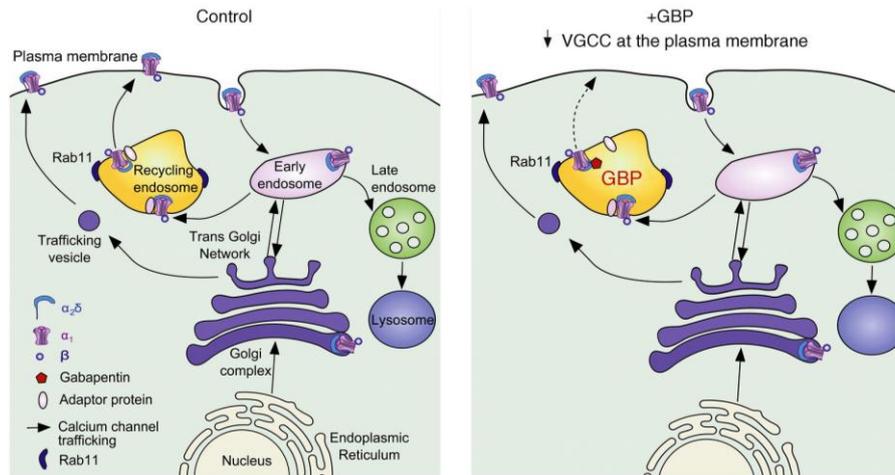
De plus, il a été démontré que l'effet analgésique des gabapentinoïdes nécessitait la présence d'une sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  fonctionnelle. En effet, Field et collaborateurs, ont montré que la PGB et la GBP ne se fixaient plus chez les animaux R217A ( $\alpha_2\delta-1$  non-fonctionnelle), ce qui entraînait la perte de leurs effets antinociceptifs (Field MJ *et al.*, 2006) (Figure 21).



**Figure 21 : Efficacité de la prégabaline (a.) et de la gabapentine (b.) chez des animaux neuropathiques (CCI) sauvages (côté de gauche) et R217A (côté de droite).**

Le développement de l'allodynie mécanique est induit par CCI. L'effet de la prégabaline (a.) et la gabapentine (b.) sur l'allodynie induite par CCI est évaluée chez les souris sauvages (*wild type*, figures de gauche) et mutées pour la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  (figures de droite). Le seuil basal de retrait de la patte est évalué par von Frey sur la patte. Les seuils sont mesurés durant les 4h qui suivent l'administration de prégabaline (30 ou 10 mg/kg, sous-cutanée) ou de gabapentine (100 ou 300 mg/kg, sous-cutanée). Les données sont exprimées comme la force médiane (g) requise pour induire un retrait de la patte, N= 6 ou 7 animaux par groupe (barres verticales représentent les premier et troisième quartiles). \*, P <0,05; \*\*, P <0,01 (test U de Mann-Whitney) par rapport au groupe traité avec le véhicule à chaque point de temps (Field MJ *et al.*, 2006).

Au niveau intracellulaire, la GBP diminue le recyclage membranaire post-golgi, Rab-11-dépendant, des sous-unités  $\alpha_2\delta$  et des sous-unités principales  $\alpha_1$  associées, sans altérer leur internalisation (Tran-Van-Minh A and Dolphin AC, 2010) (Figure 22). La conséquence de cette fixation de GBP aux sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 et -2 va donc être une diminution des flux entrants de calcium (Fink K *et al.*, 2002 ; Van Hooft JA *et al.*, 2002) et des courants calciques (McClelland D *et al.*, 2004 ; Alden KJ and Garcia J, 2001 ; Sarantopoulos C *et al.*, 2002 ; Sutton KG *et al.*, 2002) induits, entre autre par  $Ca_v2.1$  et 2.2 (Heblich F *et al.*, 2008 ; Hendrich J *et al.*, 2008).



**Figure 22 : Effet de la GBP sur le recyclage des canaux calciques voltage-dépendants.**

Gauche: Les sous-unités des canaux calciques sont endocytées, puis recyclées en forme mature dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, avant d'être adressées à la membrane plasmique. Les sous-unités ainsi exprimées en surface peuvent à nouveau être internalisées et recyclées. Droite: La gabapentine se lie, aux sous-unités  $\alpha_2\delta$  à la surface des cellules, mais elle peut également interagir avec la sous-unité  $\alpha_2\delta$  à l'intérieur de la cellule, résultant en une diminution de l'adressage membranaire et donc de la densité à la surface de la cellule de ces sous-unités  $\alpha_2\delta$  et des sous-unités  $\alpha_1$  associées. La gabapentine perturbe l'interaction entre  $\alpha_2\delta$  et la protéine Rab-11 (protéine adaptatrice impliquée dans la voie de recyclage). Les symboles sont identifiés sur l'image. D'après Bauer CS *et al.*, 2010.

Cette interaction entre gabapentinoïdes et  $\alpha_2\delta$ -1 va bloquer le transport antérograde de cette sous-unité pour aboutir à une diminution de l'influx calcique, une diminution de la fusion des vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique et ainsi une diminution de la libération des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses (Bauer CS *et al.*, 2010 ; Uchitel OD *et al.*, 2010 ; Bauer CS *et al.*, 2009 ; Dooley DJ *et al.*, 2007 ; Joshi I and Taylor CP, 2006). Au niveau spinal, ceci entraîne une baisse de la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs et une diminution l'excitabilité neuronale post-synaptique (Hendrich J *et al.*, 2012 ; Cunningham MO *et al.*, 2004).

Au niveau central, il a été démontré que la GBP diminuait la sensibilisation centrale en interagissant avec la boucle excitatrice spino-bulbaire spinale et en activant le système noradrénergique descendant. En effet, la GBP perd de son efficacité antihyperalgique après blocage des récepteurs NK1 qui activent les faisceaux sérotoninergiques descendants (Suzuki R *et al.*, 2005). De plus, l'administration intrathécale de l'idasoan (antagoniste des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques) bloque l'effet analgésique de la GBP (Hayashida KI *et al.*, 2007a et b).

## Chapitre C : Objectifs

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons donc vu les mécanismes majeurs impliqués dans la pathogénicité du SII et des MICI. Bien qu'ils diffèrent par de nombreux points, des éléments communs peuvent néanmoins être retrouvés. En effet, si les altérations génétiques et l'inflammation sont essentiellement impliquées dans les MICI, des études récentes montrent que de telles modifications peuvent prendre part au développement du SII (identification de gènes de susceptibilité et présence de micro-inflammation). De même, l'impact de l'environnement (alimentation, stress) indiscutablement impliqué dans le SII, s'avère aujourd'hui participer à l'augmentation des symptômes associés aux MICI. Les perturbations du microbiote intestinal sont également retrouvées dans ces pathologies. Toutes ces modifications peuvent contribuer au symptôme commun de ces maladies, à savoir la douleur abdominale associée à une HSV, retrouvée chez les patients atteints du SII aussi bien que chez les patients en phase de rémission de MICI. Cette HSV est un problème majeur pour ces patients car elle impacte négativement leur qualité de vie et manque actuellement de prise en charge thérapeutique satisfaisante.

Les gabapentinoïdes, PGB et GBP, sont des molécules qui ont fait leurs preuves dans le traitement de la douleur neuropathique et sont aujourd'hui prescrits au même titre que les antidépresseurs. Cependant, peu d'études se sont penchées sur leur potentielle efficacité dans les douleurs d'origine viscérale.

C'est dans ce contexte là que s'inscrit cette thèse avec deux objectifs principaux qui seront développés dans ce manuscrit :

- L'évaluation, au niveau comportemental, du potentiel thérapeutique de la GBP et de la PGB en évaluant l'efficacité antinociceptive de ces molécules dans différents modèles animaux de douleur viscérale. Trois modèles seront étudiés :

- un modèle de douleur colique d'origine non inflammatoire, telle que celle retrouvée chez les patients souffrant du SII,
- un modèle de douleur colique d'origine inflammatoire, assimilable aux douleurs perçues dans le cas de MICI
- un modèle de douleur vésicale inflammatoire, afin d'évaluer l'effet de ces molécules sur une douleur viscérale extra-colique.

- L'évaluation des mécanismes intracellulaires pouvant expliquer les résultats obtenus. Pour cela nous analyserons les différents échantillons récoltés sur les animaux utilisés, ainsi que

différentes cultures cellulaires, afin de regarder, au niveau protéique, l'impact du traitement par les gabapentinoïdes.

# Données Expérimentales

*\*Chapitre A*

*Effets des ligands  $\alpha_2\delta$  dans des modèles de douleur  
viscérale non-inflammatoire et inflammatoire*

*\*Chapitre B*

*Effets des ligands  $\alpha_2\delta$  sur les paramètres  
inflammatoires*

*\*Chapitre C*

*Etude du mécanisme d'action des ligands  $\alpha_2\delta$*

*\*Chapitre D*

*Validation clinique*

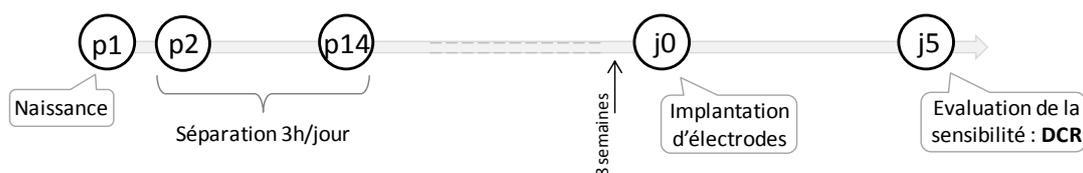


## Chapitre A : Effets des ligands $\alpha_2\delta$ dans des modèles de douleur viscérales non-inflammatoire et inflammatoire

### A.I : Modèle d'HSC non inflammatoire et effet des ligands $\alpha_2\delta$

#### A.I.a Description du modèle d'HSC non-inflammatoire induit par stress néonatal

Un modèle de douleur viscérale non-inflammatoire a été développé au sein du laboratoire. Pour cela les souriceaux sont séparés de leur mère 3h par jour (de 9h à 12h) de j2 post-natal (p2) à j14 post-natal (p14). Durant ce temps, les souriceaux sont placés dans une salle de stabulation différente et dans une enceinte thermostatée (37°C) dans laquelle ils sont isolés les uns des autres. Du 15<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour post-natal, les souriceaux sont laissés dans la cage avec leur mère puis sevrés. La sensibilité viscérale de ces animaux (mâles) est mesurée à 8 semaines par le test de distension colorectale (DCR). Pour cela, les souris sont opérées afin d'implanter des électrodes dans le muscle abdominal grand oblique pour en mesurer les contractions par électromyographie lors de la DCR, réalisée 4 jours après la chirurgie (Figure 23). Elle consiste à mesurer la réponse douloureuse suite au gonflement par palliers d'un ballonnet (20, 40, 60, 80 et 100  $\mu$ L) inséré dans le côlon (à 5mm de la marge anale) (pour plus d'informations se référer au chapitre matériel et méthodes). Une augmentation de la réponse viscéromotrice (VMR) pour un même volume de distension reflète une hypersensibilité colique.



**Figure 23 : Modèle d'HSC non inflammatoire : protocole d'induction du modèle et d'évaluation de la sensibilité**

La séparation maternelle est réalisée du 2<sup>ème</sup> jour post-natal (p2) au 14<sup>ème</sup> jour (p14). Les électrodes sont implantées durant la 8<sup>ème</sup> semaine post-natale et permettent l'évaluation de la sensibilité 5 jours après par distension colorectale.

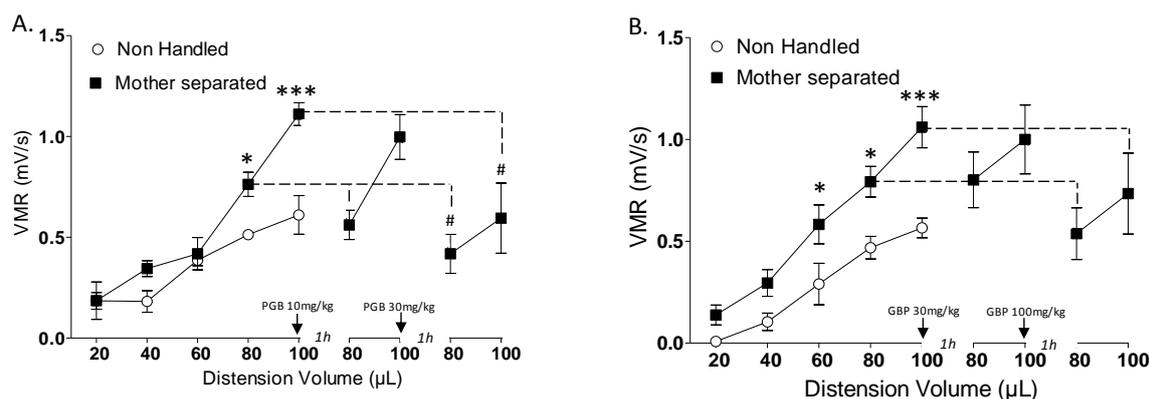
### A.I.b. : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur la réponse à la distension colorectale dans un modèle d'HSC non-inflammatoire

Lors de la distension colorectale, aux volumes de 80 et 100  $\mu\text{L}$ , les animaux séparés en post-natal (carrés noirs) présentent des VMR significativement plus importantes que les animaux non séparés (carrés blancs), ce qui traduit l'apparition d'une hypersensibilité colique chez ces animaux. Ce sont donc ces volumes qui seront utilisés pour tester l'efficacité des ligands  $\alpha_2\delta$  (Figure 24).

Une fois la sensibilité basale déterminée, les animaux reçoivent une injection de PGB (sc. 10mg/kg) (Figure 24A), ou de GBP (sc. 30mg/kg) (Figure 24B), puis une heure après une nouvelle distension est réalisée (avec les volumes de distension de 80 et 100  $\mu\text{L}$ ). L'administration de ces doses de ligands  $\alpha_2\delta$  ne modifie pas les VMR des animaux.

Une seconde injection de ligands  $\alpha_2\delta$  est réalisée afin d'atteindre les doses de 30mg/kg pour la PGB et de 100mg/kg pour la GBP, puis une heure après, une dernière distension est réalisée (à 80 et 100  $\mu\text{L}$ ). La PGB, permet de réduire les VMR des animaux pour les deux volumes de distension testés (80 $\mu\text{L}$  : 0,762 $\pm$ 0,060 mV/s vs. 0,418 $\pm$ 0,097mV/s,  $p<0,01$  ; 100 $\mu\text{L}$  : 1,111 $\pm$ 0,056 mV/s vs. 0,595 $\pm$ 0,174 mV/s,  $p<0,01$  ; prétraitement vs. prégabaline 30mg/kg respectivement). La GBP n'a aucun effet. Enfin, ces ligands  $\alpha_2\delta$  ne montrent aucun effet chez les animaux témoins et la carbamazépine (antiépileptique inhibiteur des canaux sodiques) n'a également aucun effet (données non montrées).

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'effet de ces ligands  $\alpha_2\delta$  sur l'HSC d'origine inflammatoire.



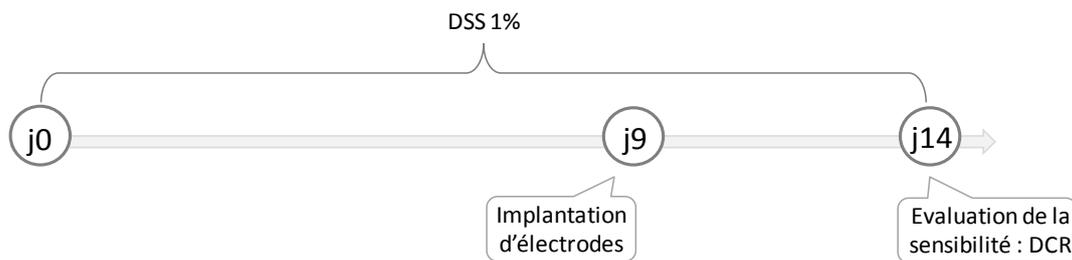
**Figure 24 : Effet des ligands  $\alpha_2\delta$  sur l'hypersensibilité colique non inflammatoire.**

La sensibilité colique est évaluée par distension colorectale à la 8<sup>ème</sup> semaine post-natale. Après mesure de la sensibilité basale des animaux une première dose de ligands  $\alpha_2\delta$  est administrée et la sensibilité est réévaluée aux volumes de 80 et 100 $\mu\text{L}$ . Le même protocole est réalisé après une seconde injection permettant d'atteindre la 2<sup>ème</sup> dose. Les résultats montrent un effet antihyperalgique de la prégabaline (A) à sa plus forte dose (30mg/kg) et pour les 2 volumes testés (80 et 100 $\mu\text{L}$ ). La gabapentine (B) n'a pas d'effet dans ce modèle. (Non Séparés : n=6 ; Séparés : n=8. \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$ , DSS vs. Eau, ANOVA 2voies (Stabulation ; Volume) Test de Bonferroni post-hoc ; # $p<0,05$ , post-ligands  $\alpha_2\delta$  vs. pré-ligands  $\alpha_2\delta$ , ANOVA 1voie (Traitement) Test de Bonferroni post-hoc (PGB : prégabaline, GBP : gabapentine)).

## A.II : Modèle d'HSC inflammatoire et effet des ligands $\alpha_2\delta$

### A.II.a : Description du modèle d'HSC inflammatoire induit par le DSS

Un modèle murin de douleur viscérale inflammatoire sub-chronique a été mis au point au laboratoire. A j0, l'eau de boisson des souris traitées est supplémentée avec 1% de *Dextran Sulfate Sodium* (DSS) (Poids moléculaire : 36000-50000) (MP Biomedicals). La sensibilité est évaluée par le test de DCR. Pour cela, à j9, les souris sont opérées afin d'implanter des électrodes d'enregistrement et la distension est réalisée 5 jours après la chirurgie (j14) (Figure 25).



**Figure 25 : Modèle d'HSC inflammatoire : protocole d'induction du modèle et d'évaluation de la sensibilité.**

Le DSS est administré dans l'eau de boisson durant 14 jours. Neuf jours après le début du traitement, les électrodes sont implantées dans le muscle abdominal et les animaux sont laissés au repos jusqu'au test de distension réalisé au 14<sup>ème</sup> jour.

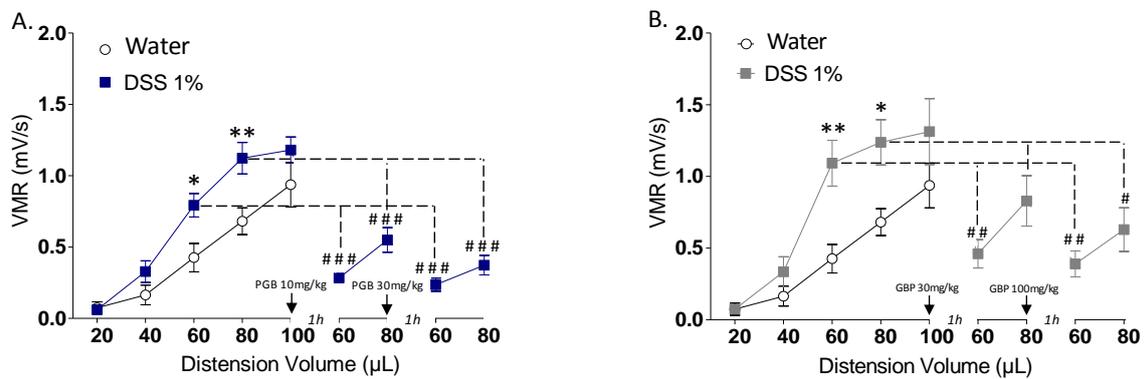
### A.II.c : Effet de la PGB sur la réponse à la DCR

Lors de la distension, les animaux traités au DSS présentent des VMR significativement plus importantes que celles mesurées chez animaux témoins pour les volumes de 60 et 80  $\mu\text{L}$ , ce qui traduit la mise en place d'une hypersensibilité colique chez ces animaux et ce sont donc ces volumes qui seront utilisés pour tester l'efficacité des ligands  $\alpha_2\delta$  (Figure 26).

Comme précédemment, après cette rampe de distension, une 1<sup>ère</sup> dose de ligands  $\alpha_2\delta$  est injectée (PGB : 10mg/kg, GBP : 30 mg/kg) et 1 heure après les animaux sont distendus. Une seconde dose est alors injectée (doses cumulées : PGB 30mg/kg et GBP 100 mg/kg), et une dernière distension est effectuée.

L'injection aiguë de PGB montre un fort potentiel analgésique puisque dès la dose de 10mg/kg, la VMR est très significativement réduite pour les deux volumes de distensions testés (60 $\mu\text{L}$  : 0,793 $\pm$ 0,082 mV/s vs. 0,283 $\pm$ 0,033 mV/s,  $p < 0,001$  ; 80 $\mu\text{L}$  : 1,123 $\pm$ 0,110 mV/s vs. 0,550 $\pm$ 0,087 mV/s,  $p < 0,001$  ; pré-traitement vs. prégabaline 10mg/kg respectivement). Cet effet est retrouvé après la seconde injection (dose cumulée de 30mg/kg) (60 $\mu\text{L}$  : 0,793 $\pm$ 0,082 mV/s vs. 0,236 $\pm$ 0,046 mV/s,  $p < 0,001$  ; 80 $\mu\text{L}$  : 1,123 $\pm$ 0,110 mV/s vs. 0,373 $\pm$ 0,068 mV/s,  $p < 0,001$  ; pré-traitement vs. prégabaline

30mg/kg respectivement). L'injection de GBP semble être moins efficace car elle induit une diminution de la VMR significative à la dose de 30mg/kg uniquement pour le volume de 60 $\mu$ L (60 $\mu$ L : 1,092 $\pm$ 0,160 mV/s vs. 0,460 $\pm$ 0,099 mV/s,  $p < 0,01$  ; pré-traitement vs. gabapentine 30mg/kg respectivement) et aux deux volumes à la dose de 100mg/kg (60 $\mu$ L : 1,092 $\pm$ 0,160 mV/s vs. 0,390 $\pm$ 0,090 mV/s,  $p < 0,01$  ; 80 $\mu$ L : 1,238 $\pm$ 0,157 mV/s vs. 0,630 $\pm$ 0,153 mV/s,  $p < 0,05$  ; pré-traitement vs. gabapentine 100mg/kg respectivement). Enfin, ces ligands  $\alpha_2\delta$  ne montrent aucun effet sur les animaux témoins et la carbamazépine (antiépileptique inhibiteur des canaux sodique) n'a également aucun effet (données non montrées).



**Figure 26 : Effet des ligands  $\alpha_2\delta$  sur l'hypersensibilité colique inflammatoire.**

La sensibilité colique est évaluée par distension colorectale au 14<sup>ème</sup> jour après le début du traitement au DSS1%. Après mesure de la sensibilité basale des animaux une première dose de ligands  $\alpha_2\delta$  est administrée et la sensibilité est réévaluée aux volumes de 60 et 80 $\mu$ L. Le même protocole est réalisé après une seconde injection permettant d'atteindre la 2<sup>ème</sup> dose. Les résultats montrent que la prégabaline (A) et la gabapentine (B) ont un effet antihyperalgique. L'effet le plus prononcé est observé avec la prégabaline qui induit une réduction très significative de la réponse viscéro-motrice aux 2 doses (10 et 30mg/kg) et pour les 2 volumes de distension testés (60 et 80 $\mu$ L). (Water : n=7 ; DSS : n=6-9. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , DSS vs Eau, ANOVA 2voies (Traitement ; Volume) Test de Bonferroni post-hoc ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , post-ligands  $\alpha_2\delta$  vs. Pré-ligands  $\alpha_2\delta$ , ANOVA 1voie (Traitement) Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline, GBP : Gabapentine)).

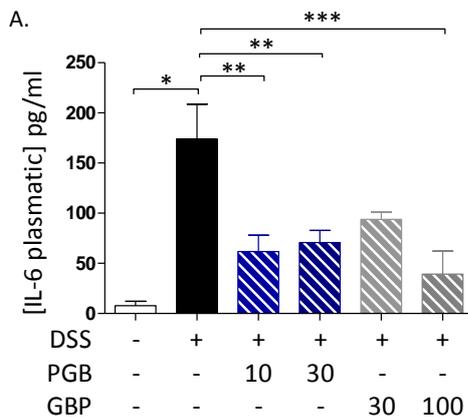
↳ L'efficacité des ligands  $\alpha_2\delta$  (et plus particulièrement de la PGB) est donc supérieure dans modèle d'HSC à composante inflammatoire par rapport au modèle de séparation maternelle induisant une HSC non-inflammatoire. Après sacrifice de ces animaux, nous avons évalué leur atteinte inflammatoire et l'influence des ligands  $\alpha_2\delta$  sur celle-ci.

## Chapitre B : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires

### B.I : Evaluation de l'effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans le modèle d'HSC inflammatoire

#### B.I.a Effet de l'injection aiguë de ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans un modèle DSS

Des animaux ayant reçu le même protocole de traitement que celui décrit précédemment ont été sacrifiés et le sang ainsi que le côlon ont été prélevés afin de doser différents marqueurs inflammatoires (cytokines plasmatique et tissulaire, myéloperoxydase colique et établissement d'un score histologique).



**Figure 27 : Effet des ligands  $\alpha_2\delta$  sur l'IL-6 plasmatique dans le modèle d'HSC induite par le DSS.**

Le plasma des souris traitées au DSS1% (14 jours) et injectées avec les ligands  $\alpha_2\delta$  (doses indiquées dans la légende en mg/kg) est rapidement prélevé après sacrifice des animaux. L'IL-6 plasmatique est dosée par test ELISA. ((IL-6 n=6/groupe, \*p<0,0 eau/sérum physiologique vs. DSS, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 DSS vs. DSS/PGB-GBP ANOVA 1voie (Traitement) Test de Bonferroni post-hoc ; (PGB : Prégabaline, GBP : Gabapentine)).

Tous ces marqueurs sont significativement augmentés chez les animaux DSS par rapport au groupe témoin. En ce qui concerne les échantillons des animaux ayant reçu le traitement DSS ainsi qu'une injection de ligands  $\alpha_2\delta$ , ces marqueurs semblent être plus faibles que chez les animaux DSS. Cependant, seul le dosage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 au niveau plasmatique s'est révélé significativement diminué (Figure 27). Enfin l'injection de carbamazépine n'entraîne aucune modification de ces marqueurs, tout comme l'injection de ligands  $\alpha_2\delta$  chez des animaux naïfs (données non montrées).

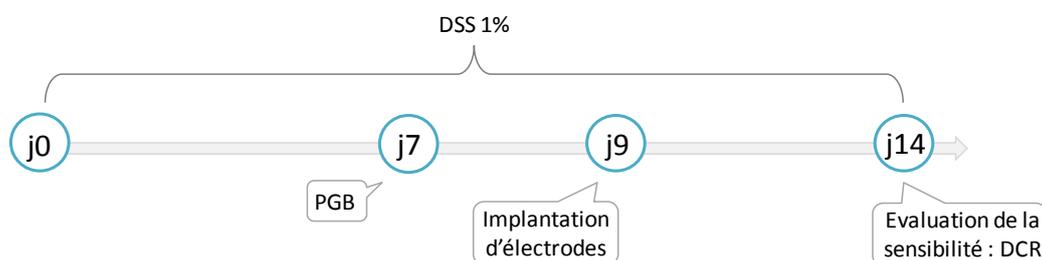
Les ligands  $\alpha_2\delta$  semblent donc avoir un effet sur la réponse inflammatoire. Afin d'approfondir cet aspect, un modèle d'HSC inflammatoire induit au DSS est reconduit avec cette fois-ci des injections chroniques de PGB (ce ligand ayant présenté la meilleure efficacité au test de DCR).

## B.I.b Effet d'injections chroniques de ligands $\alpha_2\delta$ sur les paramètres inflammatoires dans un modèle DSS

### B.I.b.1. Présentation du protocole et résultats de la DCR

#### ➤ Présentation du protocole

De j0 à 14, l'eau de boisson des animaux est supplémentée avec 1% de DSS. A partir de j7 et jusqu'à la fin du protocole (j14), les animaux reçoivent une injection quotidienne de PGB (30mg/kg/jour) ou de sérum physiologique (Figure 28). Comme précédemment, la sensibilité viscérale est évaluée grâce au test de DCR.

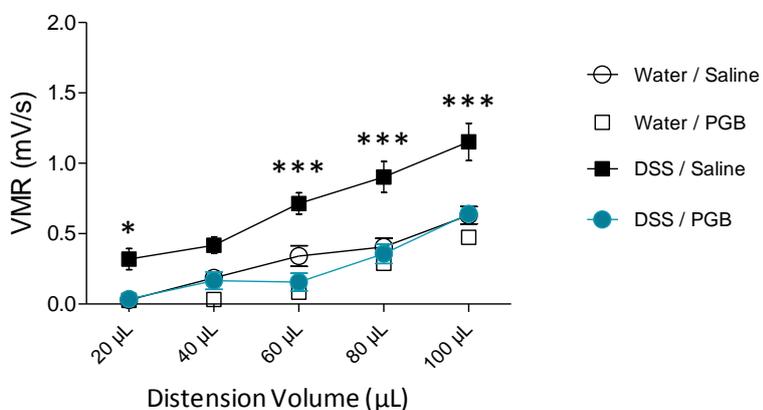


**Figure 28 : Modèle d'HSC induit au DSS1% et protocole d'administration de la PGB**

L'HSC est induite par addition de 1% de DSS dans l'eau de boisson des animaux durant 14 jours. Sept jours après le début du DSS1% (j7) et jusqu'à la fin du protocole (j14), les animaux reçoivent quotidiennement une injection de PGB à la dose de 30mg/kg en sous-cutané (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). A j14, une heure après la dernière injection, la sensibilité colique des animaux est évaluée par le test de distension colorectale.

#### ➤ Effet des injections chroniques de PGB sur les mesures de DCR

Lors du test de DCR, les animaux DSS (carrés noirs) montrent des réponses viscéromotrices significativement plus importantes que celle mesurées chez les animaux témoins (carrés blancs) pour tous les volumes de distension hormis 40  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{L}$  :  $0,03 \pm 0,02$  mV/s vs.  $0,32 \pm 0,08$  mV/s  $p < 0,05$  ; 60  $\mu\text{L}$  :  $0,34 \pm 0,07$  mV/s vs.  $0,71 \pm 0,08$  mV/s ; 80  $\mu\text{L}$  :  $0,41 \pm 0,06$  mV/s vs.  $0,90 \pm 0,11$  mV/s ; 100  $\mu\text{L}$  :  $0,63 \pm 0,06$  mV/s vs.  $1,15 \pm 0,13$  mV/s,  $p < 0,001$  ; Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement) (Figure 29).



**Figure 29 : Effet de la PGB sur l'HSC inflammatoire.**

La sensibilité colique est évaluée par distension colorectale au 14<sup>ème</sup> jour après le début du traitement au DSS, soit 7 jours après le début des injections de PGB. (n=8/groupe, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , DSS vs. DSS/PGB, ANOVA 2voies (Traitement ; Volume) Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

Les animaux DSS qui ont été traités à la PGB (carrés bleus), montrent un profil de réponse similaire à celui des animaux témoins. La PGB n'entraîne aucun effet chez des animaux naïfs. Ces données confirment l'effet antihyperalgique de la PGB dans le modèle DSS d'HSC inflammatoire.

Afin d'étudier le potentiel effet sédatif d'injection chronique de PGB, qui pourrait induire un faux positif sur le test, nous avons complété ces études comportementales par un test d'actimétrie. Aucune différence d'activité locomotrice n'a été mise en évidence entre les 4 groupes d'animaux (données présentées en annexe 1).

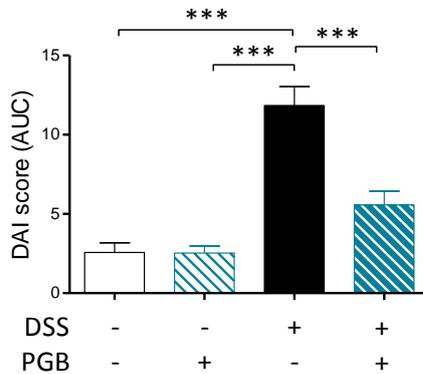
### B.I.b.2. Effets d'injections chronique de PGB sur les paramètres inflammatoires

Durant les 14 jours du protocole, les animaux ont été suivis puis euthanasiés après la rampe de distension. Le sang ainsi que le côlon ont été prélevés afin de réaliser différents dosages de marqueurs inflammatoires.

#### Suivi de l'état général des animaux

##### Score de maladie : DAI

Afin d'évaluer l'état général des animaux, le score DAI (*Disease Activity Index*) a été établi quotidiennement en prenant compte du pourcentage de perte de poids des animaux, de la consistance des selles et de la présence de sang dans les selles. Chaque paramètre est noté selon un score de 0 à 4 et la somme de ces scores permet de calculer le score DAI.



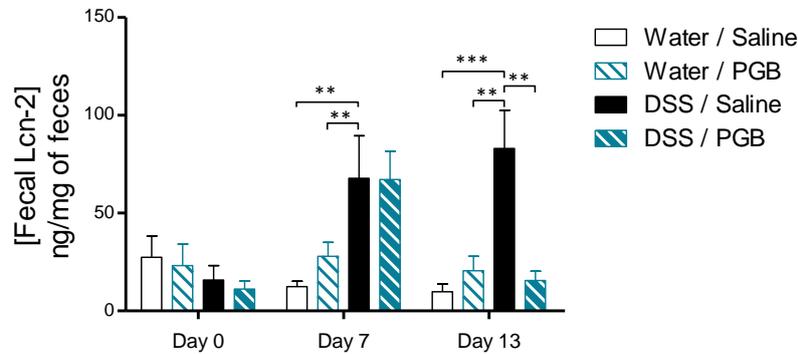
**Figure 30 : Evaluation de l'état général des animaux par mesure du score DAI (*Disease Activity Index*).**

Ce score, mesuré quotidiennement tient compte du pourcentage de perte de poids des animaux, de la consistance des selles et de la présence de sang dans les selles. Il est significativement augmenté chez les animaux traités au DSS et ceux jusqu'au jour du test de DCR. Le traitement chronique à la PGB, prévient l'augmentation de la dégradation de l'état général des animaux. (n=8/groupe, \*\*\*p<0.001 ; ANOVA 1voie (Traitement) et Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

L'injection chronique de PGB permet de préserver l'état général des animaux dans un modèle DSS. En effet, ce score est significativement augmenté uniquement chez les animaux DSS (11,84±1,19 vs. 2,56±0,36, p<0,001, DSS/Saline vs. Water/Saline respectivement ; 11,84±1,19 vs. 5,56±0,87, p<0,001, DSS/Saline vs. DSS/PGB respectivement) (Figure 30).

Marqueur précoce d'inflammation : Lipocaline fécale (LCN-2)

Les fèces des animaux ont été collectées au début du protocole (j0), le jour où commencent les injections de PGB (j7) et le jour précédent la distension (j13), afin de doser la lipocaline-2 (LCN-2). La lipocaline-2 est un marqueur de précoce l'inflammation (Chassaing B *et al.*, 2014) dont le dosage est réalisé par ELISA.



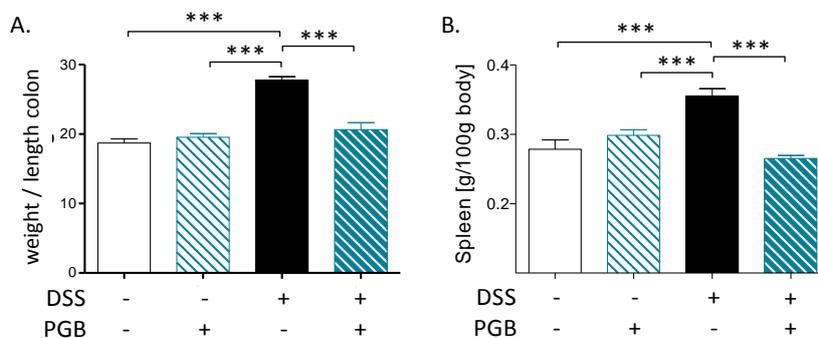
**Figure 31 : Effet d'un traitement chronique à la PGB sur un marqueur précoce d'inflammation, la lipocaline-2 (LCN-2), dans le modèle DSS d'HSC.**

Les fèces des animaux ont été collectées, le jour de début du traitement au DSS1% (Day 0), puis 7 jours après, au début des injections chroniques de PGB (30 mg/kg/jour) (Day 7), et enfin 6 jours après, soit le jour précédant la distension et le sacrifice des animaux (Day 13). La lipocaline-2 est dosée par test ELISA. (n=8/groupe, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ANOVA 2voies (Traitement ; Temps), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

A j0, les quatre groupes présentent des concentrations similaires en LCN-2. A j7 (date de la 1<sup>ère</sup> injection de PGB), les deux groupes d'animaux qui ont reçu du DSS (côlones noire et bleu rayée), montrent une augmentation significative des taux de LCN-2 fécale par rapport au groupe contrôle (12,39±2,77ng/mg vs. 67,81±21,75ng/mg, p<0,01, Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement et 12,39±2,77ng/mg vs. 67,16±14,43ng/mg, p<0,01, Water/Saline vs. DSS/PGB respectivement). Ces données suggèrent la mise en place d'une réaction inflammatoire au niveau colique. A j13, le groupe DSS (côlone noire) présente toujours une concentration augmentée de LCN-2 par rapport au groupe contrôle (9,86±3,99ng/mg vs. 83,03±19,48ng/mg, p<0,001, Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement). Les animaux DSS ayant reçu huit injections de PGB ont, quant à eux, des concentrations en LCN-2 diminuées par rapport à j7 et par rapport à celles mesurées dans les fèces des animaux DSS (83,03±19,48ng/mg vs. 15,60±4,68ng/mg, p<0,01, DSS/Saline vs. DSS/PGB respectivement) et qui sont de nouveaux équivalentes aux concentrations mesurées chez les animaux témoins. La PGB permet de réverser l'augmentation de LCN-2 induite par le DSS et n'a aucun effet lorsqu'elle est injectée chez des animaux naïfs, ce qui suggère un effet anti-inflammatoire de cette molécule (Figure 31).

### Paramètres anatomiques

Lors du sacrifice des animaux, le côlon ainsi que la rate des animaux ont été prélevés, pesés et mesurés. Ces mesures montrent que la densité du côlon est significativement augmentée chez les animaux DSS par rapport aux animaux du groupe témoin ( $18,71 \pm 0,61$  vs.  $27,74 \pm 0,53$ ,  $p < 0,001$ , Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement) (Figure 32A). Ces données confortent notre modèle d'HSC inflammatoire, puisque chez les patients souffrant de MICI, l'inflammation induit une fibrose qui aboutit à un raccourcissement de la taille du côlon. De plus, l'augmentation du poids du côlon s'explique par un œdème envahissant la paroi intestinale. Les animaux DSS qui ont reçu une injection chronique de PGB, présentent une densité colique équivalente à celle mesurée chez les animaux témoins, et l'injection de PGB chez des animaux naïfs n'entraîne aucune modification de ce paramètre.



**Figure 32 : Evaluation des modifications anatomiques induites par le DSS.**

La longueur et le poids du côlon des animaux ont été mesurés suite au sacrifice au 14<sup>ème</sup> jour. Le poids du côlon est rapporté à sa longueur (A). La rate est également pesée et son poids est rapporté à 100g de poids corporel (B) (n=8/groupe, \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc) (PGB : Prégabaline)).

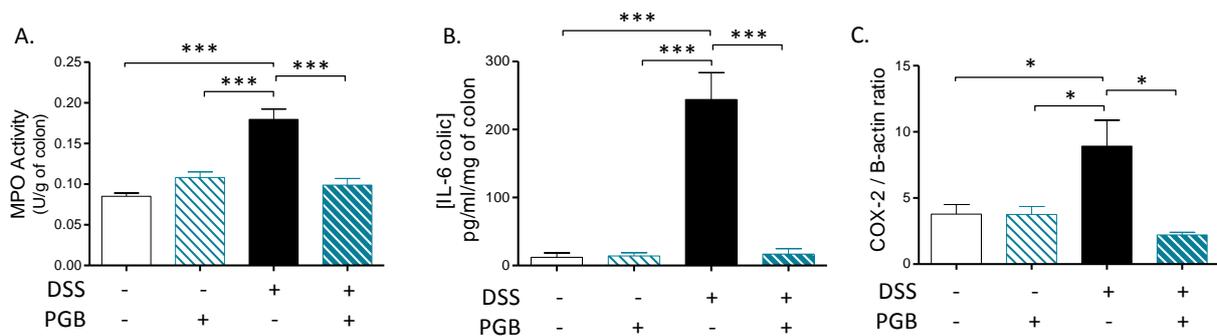
Enfin, le poids relatif de la rate est également fortement augmenté uniquement chez les animaux DSS ( $0,35 \pm 0,01$  vs.  $0,28 \pm 0,013$ ,  $p < 0,001$ , DSS/Saline vs. Water/Saline respectivement ;  $0,35 \pm 0,01$  vs.  $0,26 \pm 0,004$ ,  $p < 0,001$ , DSS/Saline vs. DSS/PGB respectivement), signe du développement d'une forte réponse immunologique (Figure 32B).

Là encore, il semblerait que les injections de PGB permettent de prévenir les modifications anatomiques induites par le DSS.

### Marqueurs tissulaires de l'inflammation

Afin de confirmer l'état inflammatoire des animaux DSS et l'action de la PGB, des marqueurs tissulaires d'inflammation, tels que les concentrations en IL-6 (coliques et plasmatiques), l'activité enzymatique de la myéloperoxydase colique ainsi que les taux de cyclo-oxygénase-2 (COX-2) au niveau colique ont été évalués.

Les concentrations en IL-6 coliques (mesurées par ELISA) sont significativement augmentées chez les animaux DSS (côlonne noire) par rapport aux animaux témoins ( $12,13 \pm 6,54$  mg/ml/mg vs.  $244,20 \pm 39,51$  mg/ml/mg,  $p < 0,001$ , Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement) ((Figure 33B). Les animaux DSS qui ont reçu une injection quotidienne de PGB (côlonne bleue rayée), montrent des concentrations similaires à celles mesurées chez les animaux des groupes témoins ( $16,93 \pm 7,89$  mg/ml/mg vs.  $12,13 \pm 6,54$  mg/ml/mg, ns, DSS/PGB vs. Water/Saline respectivement). Des profils similaires ont été retrouvés pour le dosage de l'activité enzymatique de la MPO (Figure 33A), pour le dosage semi-quantitatif de la COX-2 (évalué par western blot) (Figure 33C) ainsi que pour d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et KC) (données non montrées). Ces données sont cohérentes avec les analyses réalisées en clinique, puisque la COX-2 est exprimée uniquement dans le côlon de patients atteints de MICI, au niveau des cellules épithéliales, des cellules mononucléaires de la lamina propria ainsi que les cellules des plexus myentériques (Roberts PJ et al., 2001).



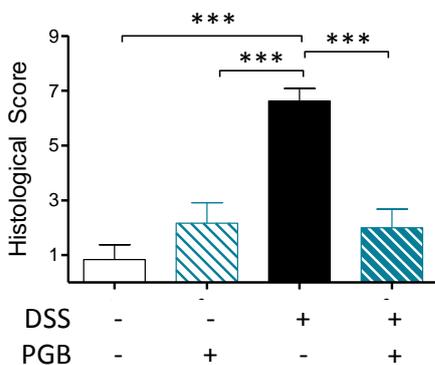
**Figure 33 : Effet d'un traitement chronique à la PGB sur les paramètres inflammatoires coliques dans le modèle d'HSC induit par le DSS.**

L'eau de boisson des animaux a été additionnée avec 1% de DSS durant 14 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement au DSS, les animaux ont reçu des injections quotidiennes de PGB (30mg/kg, sc, ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). A j14, après évaluation de la sensibilité des animaux par distension colorectale, trois parties distales du côlon ont été prélevées. L'activité de la MPO colique est mesurée dans le broyat de côlon (A), l'IL-6 colique est dosée par test ELISA (B), et la COX-2 est étudiée par Western Blot (C). (n=8/groupe, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,001$  ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

Ces résultats mettent donc en évidence une forte réaction inflammatoire locale lors d'un traitement au DSS que l'injection répétée de PGB permet de limiter. Enfin les injections répétées de PGB sur des animaux naïfs n'entraînent aucune modification de ces paramètres.

**Score Histologique**

Après inclusion en paraffine, coupe et coloration histologique, un score histologique a été établi sur les côlons des ces animaux, en prenant en compte l’atteinte de l’épithélium, l’étendue de cette atteinte, ainsi que l’infiltration de cellules immunitaires (polynucléaires) dans la sous muqueuse.



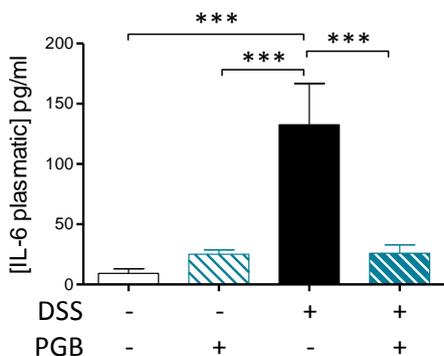
**Figure 34 : Examen et score histologique des côlons.**

L’eau de boisson des animaux a été additionnée avec 1% de DSS durant 14 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement DSS, les animaux ont reçu des injections quotidiennes de PGB (30mg/kg, sc, ou d’un volume équivalent de sérum physiologique). A j14, après évaluation de la sensibilité des animaux par distension colorectale, les côlons ont été prélevés, fixés, coupés et colorés. L’examen histologique des coupes de côlon montre un épaississement général de la paroi intestinale, une destruction complète de la muqueuse et l’infiltration de la sous-muqueuse par des polynucléaires (flèche noire) uniquement chez les souris traitées au DSS (A). La quantification du score histologique, basée sur l’infiltration de cellules inflammatoires, les dommages épithéliaux et l’étendue de ces dommages, confirme l’atteinte tissulaire (B) (n=8/groupe, \*\*\*p<0.001, ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : prégabaline)).

Le traitement au DSS induit une forte augmentation du score histologique par rapport aux animaux témoins (0,83±0,54 vs. 6,63±0,46, p<0,001, Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement) (Figure 34). En effet, les côlons de ces animaux DSS présentent une destruction importante de leur structure ainsi qu’une infiltration de cellules immunitaires. Le traitement à la PGB permet de préserver leur intégrité car ils ne montrent ni d’atteinte particulière, ni d’infiltration de cellules immunitaires (2,00±0,68 vs. 0,83±0,54, ns, DSS/PGB vs. Water/Saline respectivement).

**Marqueur plasmatique d’inflammation**

Enfin, après analyse de ces paramètres locaux d’inflammation, des cytokines pro-inflammatoires ont été dosées au niveau plasmatique afin d’évaluer l’atteinte inflammatoire systémique.



**Figure 35 : Effet d’un traitement chronique à la PGB sur un paramètre inflammatoire systémique dans le modèle d’HSC induite par le DSS.**

L’eau de boisson des animaux a été additionnée avec 1% de DSS durant 14 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement DSS, les animaux ont reçu des injections quotidiennes de PGB (30mg/kg, sc, ou d’un volume équivalent de sérum physiologique). A j14, après évaluation de la sensibilité des animaux par distension colorectale, le sang a été prélevé par ponction rétro-orbitaire. Les concentrations plasmatiques en IL-6 ont été dosées par test ELISA. (n=8/groupe, \*\*\*p<0,001 ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : prégabaline)).

Là encore, le DSS induit une forte production d'IL-6 au niveau plasmatique, par rapport à celle des animaux témoins ( $9,17 \pm 3,96$  vs.  $132,50 \pm 34,25$ ,  $p < 0,001$ , Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement), reflétant l'atteinte inflammatoire généralisée de ces animaux (Figure 35). Lors d'un traitement chronique à la PGB cette augmentation n'est pas retrouvée ( $25,83 \pm 7,00$  vs.  $9,17 \pm 3,96$ , ns, DSS/PGB vs. Water/Saline respectivement). Les injections de PGB n'entraînent aucun effet sur des animaux naïfs. De plus, des profils similaires ont été retrouvés lors du dosage de TNF- $\alpha$  et KC.

Ces résultats mettent donc en évidence une forte réaction inflammatoire systémique lors d'un traitement au DSS que l'injection répétée de PGB permet de limiter.

Le traitement chronique à la PGB permet donc de prévenir le développement de l'HSC induite par le DSS mais permet également d'empêcher la mise en place de la réaction inflammatoire. Afin de confirmer ces effets et de savoir s'ils sont tissu-dépendant, la PGB a été testée sur un autre modèle d'hypersensibilité viscérale inflammatoire, le modèle de cystite.

## B.II : Validation de l'effet anti-inflammatoire de la PGB sur un autre modèle de douleur viscérale inflammatoire : la cystite

### B.II.a : Présentation du modèle et résultats comportementaux

#### B.II.a.1 : Présentation du modèle

Ce modèle est induit par le cyclophosphamide (CYP) (Lancare, LTD, UK), injecté à la dose de 150mg/kg en intrapéritonéale (T0) (Augé C *et al.*, 2013). Trois heures après (t3h), la PGB est injectée en sous-cutanée à la dose de 30 mg/kg. La sensibilité des animaux est évaluée grâce au test de Von Frey abdominal et selon la méthode de « up and down » avant toute injection (t0) puis 1h après l'injection de PGB (t4h) (Figure 36). Les animaux sont ensuite sacrifiés afin de doser différents marqueurs inflammatoires.

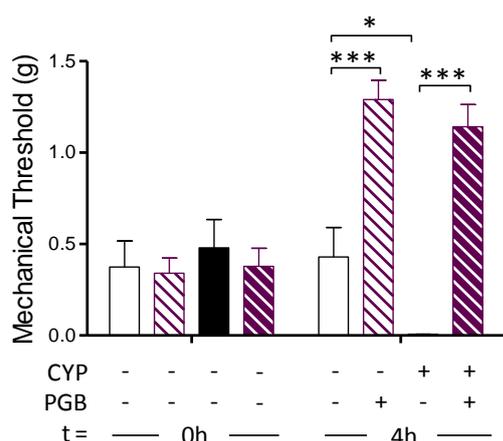


**Figure 36 : Modèle de cystite induit par le cyclophosphamide et protocole d'administration de la PGB**

L'hypersensibilité vésicale est induite par une injection de cyclophosphamide (CYP) à la dose de 150 mg/kg en intrapéritonéale à t0. Trois heures après (t3h), les animaux reçoivent une injection de PGB à la dose de 30mg/kg en sous-cutanée (ou d'un volume de sérum physiologique équivalent). La sensibilité des animaux est évaluée par le test de Von Frey abdominale et la méthode up and down avant l'injection de CYP et 4h après (t4h) c'est-à-dire une heure après l'injection de PGB.

### B.II.a.b : Effet de l'injection de PGB sur l'hypersensibilité vésicale induite par le CYP

Au niveau basal, les seuils de réponse des animaux sont équivalents entre les quatre groupes. Quatre heures après l'injection de CYP, soit 1h après l'injection de PGB, le seuil de réponse des animaux qui ont reçu uniquement une injection de CYP (côlonne noire) est proche de 0 ( $0,01 \pm 0,001g$ ), ce qui traduit une hypersensibilité mécanique importante au niveau abdominal (Figure 37). A l'inverse, les animaux ayant reçu une injection de CYP et de PGB (côlonne violette rayée), ont des seuils de réponse élevés, supérieurs aux animaux témoins (côlonne blanche) ( $1,14 \pm 0,12g$  vs.  $0,45 \pm 0,16g$ ,  $p < 0,001$ , CYP/PGB vs. Saline/Saline respectivement), reflétant une hyposensibilité chez ces animaux. De plus, l'injection de PGB chez des animaux naïfs induit le développement d'une forte hyposensibilité, puisque leur seuil de réponse est significativement plus élevé que celui mesuré chez les animaux témoins ( $1,15 \pm 0,10g$  vs.  $0,45 \pm 0,16g$ ,  $p < 0,001$ , Saline/PGB vs. Saline/Saline respectivement).



**Figure 37 : Effet de la PGB sur l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de cystite induit par le cyclophosphamide.**

Les seuils de sensibilité mécanique sont mesurés au niveau abdominal par le test de Von Frey et la méthode de « up and down » avant toute injection (t0h) et 4h après l'injection de CYP à 150 mg/kg en intrapéritonéal (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique), c'est-à-dire 1h après l'injection de PGB (30mg/kg, sc., ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). La mesure de la sensibilité des animaux montre que le traitement à la PGB a un effet antihyperalgique et hypoalgique. (n=8/groupe, \* $p < 0,05$ , sérum physiologique vs. CYP; \*\*\* $p < 0,001$ , sérum physiologique vs. PGB et CYP vs. CYP/PGB, ANOVA 2voies (Traitement ; Temps) Test de Bonferroni post-hoc (CYP : Cyclophosphamide, PGB : Prégabaline)).

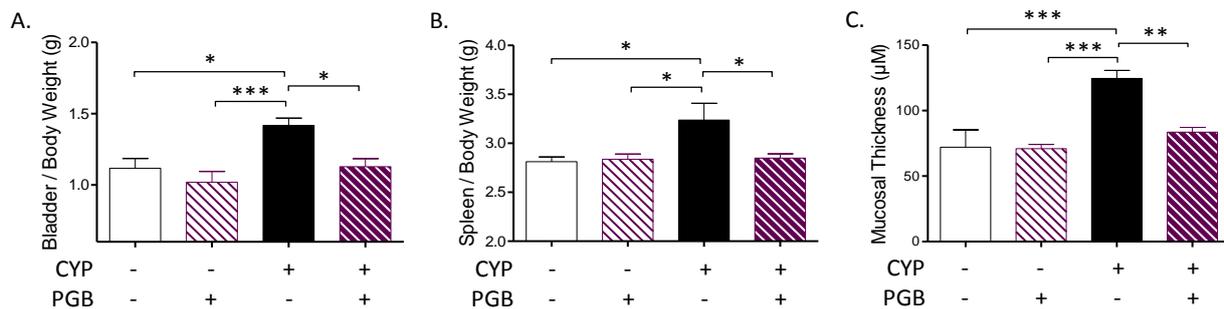
Dans un modèle de cystite induit par le CYP, la PGB présente un fort effet antihyperalgique ainsi qu'une action hypoalgique. Par la suite, nous avons évalué l'atteinte inflammatoire de ces animaux.

### B.II.b : Les paramètres inflammatoires

A la suite du test de Von Frey (T4h), les animaux ont été sacrifiés et le sang ainsi que les vessies et les rates ont été prélevés. Les mêmes paramètres ont été analysés à savoir : paramètres anatomiques (poids de la vessie et de la rate), analyse histologique, dosage ELISA des cytokines pro-inflammatoires (vésicales et plasmatiques) et dosage de l'activité enzymatique de la MPO au niveau vésical.

### B.II.b.1 : Les paramètres anatomiques

La vessie, ainsi que la rate des animaux ont été pesées après sacrifice et ramenées au poids total de l'animal. Comme pour le modèle DSS, lors d'une injection de CYP, ces organes deviennent plus lourds (vessie :  $1,1 \pm 0,1$  vs.  $1,4 \pm 0,1$  ; rate :  $2,8 \pm 0,04$  vs.  $3,2 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ , Saline/Saline vs. CYP/Saline respectivement) ce qui peut traduire le développement d'une inflammation (Figure 38 A et B, respectivement). L'injection de PGB permet de prévenir ces augmentations, puisque les poids des organes de ces animaux sont équivalents à ceux des animaux témoins (vessie :  $1,1 \pm 0,1$  vs.  $1,1 \pm 0,1$  ; rate :  $2,8 \pm 0,04$  vs.  $2,8 \pm 0,05$ , ns, Saline/Saline vs. CYP/PGB respectivement).



**Figure 38 : Effet de la PGB sur les paramètres anatomiques dans le modèle d'HSV induite par le CYP.**

Les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de cyclophosphamide à 150 mg/kg (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique), puis 3h après une injection sous-cutanée de PGB à 30mg/kg (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). Enfin 1h après (soit 4h après l'injection de cyclophosphamide), ces animaux sont sacrifiés et les vessies (A) ainsi que les rates (B) ont été prélevées et pesées (le poids de ces organes est ramené au poids total des animaux). Les vessies ont ensuite été fixées, incluses en paraffine et coupées afin de réaliser une coloration hématoxyline et éosine. L'analyse de l'épaisseur de la muqueuse des vessies a été réalisée avec le logiciel Gimp. Quatre mesures par coupe de vessie sur 4 coupes/animal ont été réalisées. (n=8/groupe, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA 1voie (Traitement) Test de Bonferroni posthoc (CYP : Cyclophosphamide, PGB : Prégabaline)).

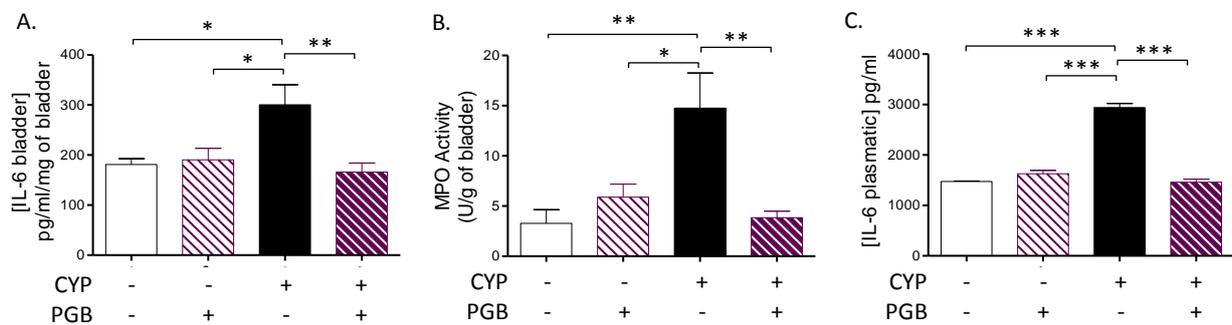
Après inclusion, coupe et coloration histologique, l'épaisseur de la muqueuse des vessies a été mesurée. L'injection de CYP entraîne un épaississement de la muqueuse qui n'est pas retrouvé chez les animaux ayant reçu l'injection de CYP et de PGB (Figure 38C).

L'injection de CYP induit des modifications anatomiques pouvant être la résultante d'une réaction inflammatoire. Lors de l'injection de CYP et de PGB aucune de ces modifications n'est retrouvée. Enfin l'injection de PGB chez des animaux naïfs n'entraîne aucune modification de ces paramètres.

### B.II.b.2 : Les marqueurs inflammatoires

Les marqueurs inflammatoires (cytokines tissulaires et plasmatiques et MPO tissulaire) ont été dosés sur les vessies et sur les plasmas récupérés après sacrifice. Les concentrations en IL-6 vésicales (mesurées par ELISA) sont significativement augmentées chez les animaux CYP (côlonne noire) par

rapport aux animaux témoins ( $181,25 \pm 11,54 \text{ pg/ml/mg}$  vs.  $300,49 \pm 40,16 \text{ pg/ml/mg}$ ,  $p < 0,05$ , Saline/Saline vs. CYP/Saline respectivement) (Figure 39A). Les animaux CYP qui ont reçu une injection de PGB (côlonne violette rayée), montrent des concentrations similaires à celles mesurées chez les animaux du groupe témoin ( $181,25 \pm 11,54 \text{ pg/ml/mg}$  vs.  $166,17 \pm 18,06 \text{ pg/ml/mg}$ , ns, Saline/Saline vs. CYP/PGB respectivement). Des profils similaires ont été retrouvés pour le dosage de l'activité enzymatique de la MPO (Figure 39B), pour le dosage de l'IL-6 plasmatique (Figure 39C), ainsi que pour d'autres cytokines pro-inflammatoires tissulaires et plasmatiques (TNF- $\alpha$  et KC) (données non montrées). Enfin, l'injection de PGB sur des animaux naïfs n'entraîne aucune modification de ces paramètres.



**Figure 39 : Effet de la PGB sur les paramètres inflammatoires tissulaires et plasmatiques dans le modèle d'HSV induite par le CYP.**

Les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de cyclophosphamide à 150 mg/kg (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique), puis 3h après une injection sous-cutanée de PGB à 30mg/kg (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). Enfin 1h après (soit 4h après l'injection de cyclophosphamide), ces animaux sont sacrifiés et la vessie ainsi que le sang ont été prélevés. Une partie de la vessie est mise en culture durant 12h, afin de réaliser, sur le surnageant, le dosage de l'IL-6 (A). L'autre partie de la vessie est broyée afin de doser l'activité enzymatique de la myéloperoxydase (B). Enfin, après centrifugation du sang, le plasma est récupéré afin de doser l'IL-6 (C). (n=8/groupe, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

Ces résultats mettent en évidence que le traitement à la PGB permet de bloquer l'hyperalgie et l'inflammation dans un modèle aigu de cystite induit par l'injection de CYP.

La PGB a également été testée sur un modèle chronique de cystite (données montrées en annexe 2). Bien que la PGB permette de reverser l'hypersensibilité mécanique viscérale induite par le CYP, aucune inflammation n'a pu être mise en évidence chez les animaux CYP (dosage des cytokines vésicales et plasmatiques- ainsi que la MPO vésicale). Nous n'avons donc pas pu évaluer le potentiel anti-inflammatoire de la PGB sur ce modèle.

## B.III : Validation cellulaire

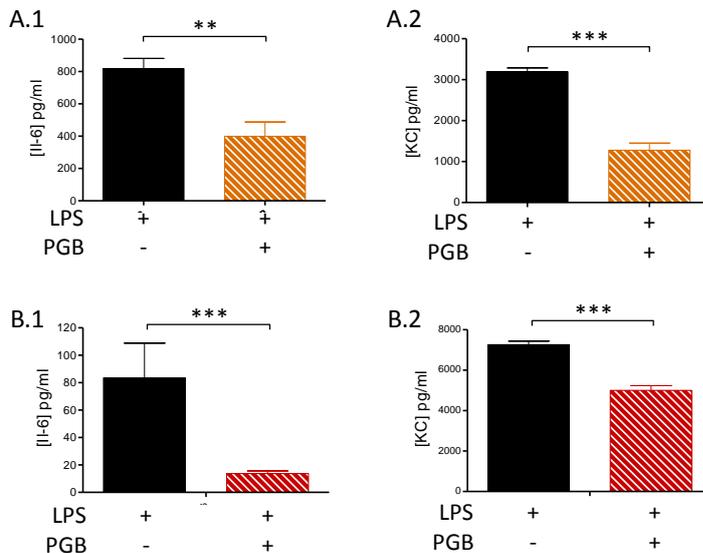
### B.III.a : Présentation des cultures cellulaires

Après avoir démontré l'effet antihyperalgique et anti-inflammatoire des ligands  $\alpha_2\delta$  au niveau viscéral, des cultures cellulaires ont été réalisées afin de déterminer la ou les cible(s) de ces molécules.

Pour cela, des cultures primaires d'exsudats cellulaires péritonéaux (*peritoneal exudates cells* : PEC's) majoritairement constituées de macrophages et des cultures de cellules épithéliales coliques murines (*murine duodenal epithelial cell clone K* : MODE-K) ont été réalisées.

### B.III.b : Dosage de cytokines

Des cultures de ces deux lignées cellulaires ont été réalisées et stimulées avec 100ng/ml de LPS (lipopolysaccharide) ou avec 100 ng/ml de LPS et 17,6mg de PGB. Après 24h d'incubation à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub>, le surnageant de culture a été récupéré afin de doser par ELISA l'IL-6 et le KC.



**Figure 40 : Effet de la PGB sur la production de cytokines IL-6 et KC dans 2 types de cellules stimulées au LPS.**

Les cultures de *Peritoneal exudates cells* (PEC's)(A) et de *murine duodenal epithelial cell clone K* (MODE-K) (B) ont été stimulées soit avec 100ng/ml de LPS soit avec 100ng/ml de LPS et 17,6mg de PGB. Après 24h d'incubation, le surnageant de culture a été récupéré et a servi de matrice pour le dosage des cytokines IL-6 et KC. (n=4/groupe, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni posthoc (LPS : Lipopolysaccharide, PGB : Prégabaline)).

Le dosage de ces cytokines montre des profils similaires quel que soit le type cellulaire. En effet, le traitement au LPS entraîne une production d'IL-6 et de KC supérieure à celle mesurée pour des cellules co-stimulées avec du LPS et de la PGB (PEC's = IL-6 : 817,71±63,36pg/ml vs. 399,30±88,70pg/ml, p<0,01 ; KC : 3195,22±94,38pg/ml vs. 1278,68±174,12pg/ml, p<0,001, LPS vs. LPS/PGB respectivement) (Figure 40A) ; (MODE-K = IL-6 : 83,59±25,24pg/ml vs. 13,75±1,87pg/ml ; KC : 7261,11±172,25pg/ml vs. 5001,39±235,18pg/ml, p<0,001, LPS vs. LPS/PGB respectivement) (Figure 40C).

↪ La PGB montre des propriétés antinociceptives dans des modèles d'HSV d'origine inflammatoire. De plus, une action anti-inflammatoire de ces ligands  $\alpha_2\delta$  vient d'être démontrée *in vitro* et *in vivo*. Le prochain chapitre sera donc consacré aux mécanismes intracellulaires mis en jeu par ces ligands et aboutissant à une diminution de la réponse inflammatoire.

## Chapitre C : Etude du mécanisme d'action des ligands $\alpha_2\delta$

### C.I : Introduction

#### C.I.a : Revue bibliographique

---

##### C.I.a.1 : Effet anti-inflammatoire des gabapentinoïdes, un début d'explication ?

Dans les cellules nerveuses, l'augmentation des niveaux intracellulaires d'ions  $\text{Ca}^{++}$  régule l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. En effet, Lilienbaum et collaborateurs ont découvert en 2003 que l'ouverture des canaux calciques membranaires ainsi que les stocks intracellulaires de calcium, étaient indispensables à l'activité basale de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, ils ont mis en évidence que ce rôle de second messenger du calcium, nécessitait l'activation de trois senseurs calciques intracellulaires, à savoir la calmoduline, les protéines kinases C et la voie p21ras/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Lilienbaum A and Israel A, 2003).

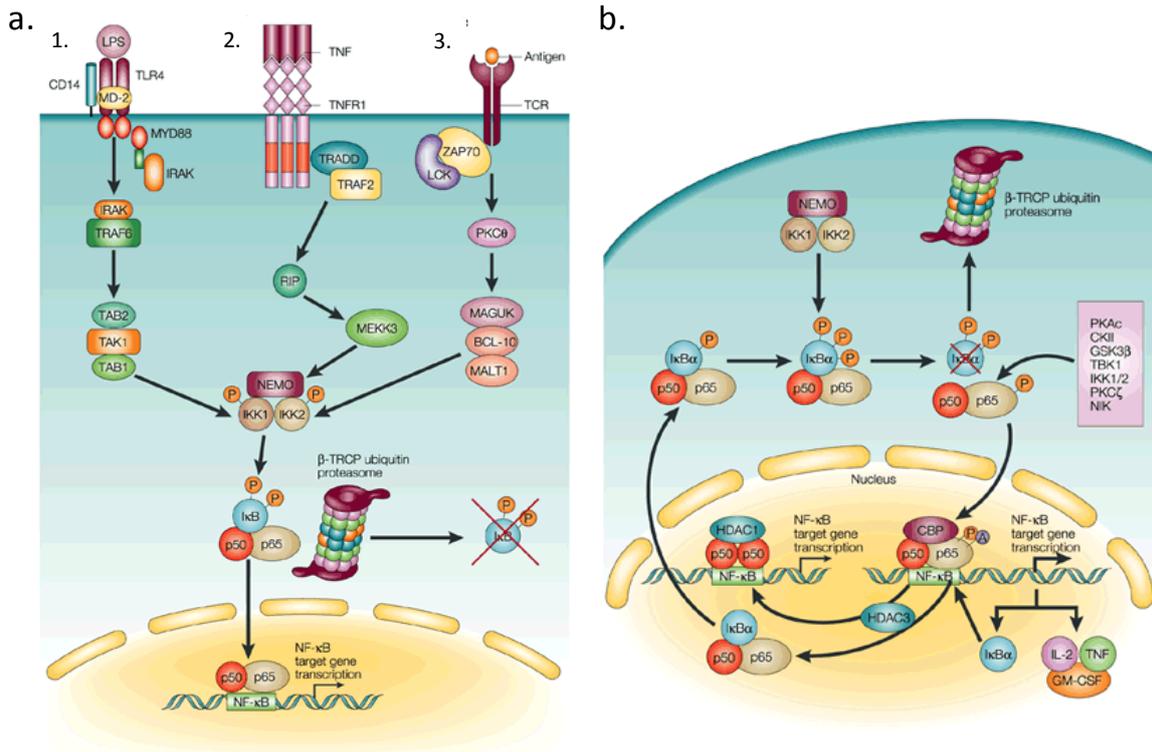
Trois ans plus tard, Zhou et collaborateurs, ont également montré que le calcium (intra- et extra-cellulaire) était nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, mais cette fois sur des macrophages péritonéaux de rat lors d'une stimulation au LPS. De plus, ils ont montré que cette activation était dépendante de plusieurs protéines kinases telles que les PKC ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et les kinases de la voie MAPK, et qu'elle permettait la production de iNOS et de TNF- $\alpha$  (Zhou X *et al.*, 2006).

Enfin, Park et collaborateurs, ont récemment montré que la PGB et la GBP inhibaient l'activation, substance-P dépendante, de cette voie NF- $\kappa$ B, et la production de COX-2 et d'IL-6 qui en résultait (sur des neuroblastomes humains et des cellules gliales de rats). Ils ont également pu mettre en évidence que cet effet inhibiteur des gabapentinoïdes passait, entre autre, par un blocage de la translocation nucléaire de la protéine p65 (Park S *et al.*, 2008). Des données de 2009, montrent qu'en condition de douleur neuropathique (ligature du nerf sciatique), l'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 est augmentée au niveau du RE des GRD, des vésicules intracellulaires mais également au niveau des membranes plasmiques des terminaisons pré-synaptiques. De manière intéressante, ils ont pu mettre en évidence, *in vitro* (cellules Cos-7), que la PGB permettait de réduire l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 (par rapport à des cellules naïves), sans pour autant affecter son endocytose (Bauer CS *et al.*, 2010 ; Bauer CS *et al.*, 2009).

### C.I.a.2 : Généralités sur la voie NF- $\kappa$ B

Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) sont impliqués dans la régulation de la transcription de gènes impliqués dans des processus tels que la mémoire ou l'apprentissage. Plus de 150 gènes sont actuellement connus pour être régulés par ces facteurs de transcription, parmi lesquels on retrouve des gènes codant des protéines pro-inflammatoires (COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6 ou encore IL-8), du cycle cellulaire (cyclines) ou anti-apoptotique (Bcl-2, A20). NF- $\kappa$ B est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères et comporte cinq membres, p50, p52, p65, c-Rel et RelB. Ces différents facteurs de transcription lient l'ADN sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères (Thanos D and Maniatis T, 1995).

Dans les cellules au repos, le dimère de NF- $\kappa$ B est retenu dans le cytoplasme par son association avec des molécules inhibitrices de la famille I $\kappa$ B (*Inhibitor of Nuclear Factor- $\kappa$ B*) principalement I $\kappa$ B $\alpha$ . Le complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B masque le NLS (*Nuclear Localisation Signal*) présent sur NF- $\kappa$ B empêchant sa translocation nucléaire (Whiteside ST and Israël A, 1997). Deux voies majeures sont principalement décrites comme activatrices de la voie NF- $\kappa$ B, la voie canonique (ou classique) et la voie non canonique (ou alternative) (une troisième voie semblerait à l'étude). La voie classique est induite par l'activation d'un certain nombre de récepteurs tels que ceux répondant aux cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 et ceux activés par des produits bactériens. Cette voie va entraîner le recrutement de protéines telles que TRADD, RIP ou encore les protéines TRAFs. La voie d'activation non canonique, est quand à elle activée par un nombre limité de protéines qui conduisent à l'activation du récepteur au TNF $\alpha$ . Ces deux voies sont donc activées par de nombreux stimuli et convergent vers l'activation du complexe IKK (*inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ -B kinase*) (deux sous-unités catalytiques : IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et une sous-unité régulatrice : NEMO/IKK $\gamma$ ) codant alors un signal de dégradation protéolytique *via* la voie du protéasome 26S. Cette élimination du facteur I $\kappa$ B libère donc le dimère de NF- $\kappa$ B qui peut alors être phosphorylé et migrer dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription (pour revue Li Q and Verma IM, 2002) (Figure 41).



**Figure 41 : Voies d'activation du complexe NF-κB.**

a. L'activation du Nuclear factor-kappaB (NF-kappa B) est stimulée par plusieurs voies, de signalisation dont celle induite par le lipopolysaccharide (LPS), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le récepteur des cellules T (TCR). Le complexe IKK (IκB kinase) - composé des kinases IKK1 et IKK2 (également connue sous le nom IKKα et IKKβ, respectivement) et la sous-unité régulatrice NEMO (également connue sous le nom IKKγ) - est un point de convergence pour les trois voies de signalisation.

1. La liaison du LPS au récepteur Toll-like 4 (TLR4)-CD14-MD-2 active une cascade intracellulaire qui implique le recrutement de MYD88 et IRAK. L'activation d'IRAK entraîne la phosphorylation du récepteur de *TNF-6-associated factor* (TRAF6), qui active le complexe TAK1-TAB1-TAB2, qui lui-même active le complexe d'IKK permettant la libération des facteurs de transcription NF-kappaB (p50/p65).

2. L'activation du TNFR1 (récepteur au TNF) entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD, qui, à son tour, interagit avec TRAF2. Ceci permet l'activation de protéines RIP et de la voie MAP / ERK kinase kinase 3 (MEKK3) et conduisant à l'activation d'IKK.

3. La stimulation des lymphocytes T, en réponse à des cellules présentatrices de l'antigène ou à des anticorps, entraîne l'activation de protéine kinase C (PKCθ) à la membrane plasmique ce qui aboutit également à l'activation du complexe IKK.

b. L'activation par ces différentes voies, conduit à la phosphorylation du complexe IKK, qui lui-même va phosphoryler la protéine inhibitrice de NF-κB (IκBα), ce qui conduit à sa dégradation et permet au dimère NF-κB d'entrer dans le noyau. Pendant ou après la dégradation IκBα, p65 est phosphorylée, ce qui est essentiel pour sa liaison à CREB-binding protein (CBP) et à l'activation de la transcription de gènes cibles, tels que IκBα, l'interleukine-2 (IL -2), ou encore le facteur de nécrose tumorale (TNF). Les complexes p50-p50-HDAC1 ont une activité histone déacétylase et donc de répression de la transcription, tandis que les complexes p50-p65-CBP ont une activité histone-acétylase et activent la transcription. En outre, HDAC3 pourrait permettre de désactiver le complexe NF-κB par désacétylation conduisant ainsi à son recyclage. P : phosphorylation. D'après Li Q and Verma IM, 2002

### C.I.b : Hypothèse de travail

---

Lors d'une stimulation, les cellules vont répondre, entre autre, en augmentant l'expression membranaire des canaux calciques voltage-dépendants, et de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$ . Ceci va alors entraîner une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, et ainsi activer les voies de signalisations telles que la voie NF- $\kappa$ B, entraînant la production de médiateurs inflammatoires.

Dans le cas d'un traitement avec les ligands  $\alpha_2\delta$ , ceux-ci vont se fixer sur les sous-unités  $\alpha_2\delta-1$ , ce qui va bloquer l'adressage membranaire de ces sous-unités et donc diminuer l'activité des canaux calciques voltage-dépendants auxquels elles étaient associées. Une diminution de l'activité des CCVD va se traduire par une diminution des concentrations intracellulaires en calcium, et donc par une diminution de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ce complexe ne pourra alors plus jouer son rôle de facteur de transcription, ce qui entraînera une baisse de production des médiateurs inflammatoires.

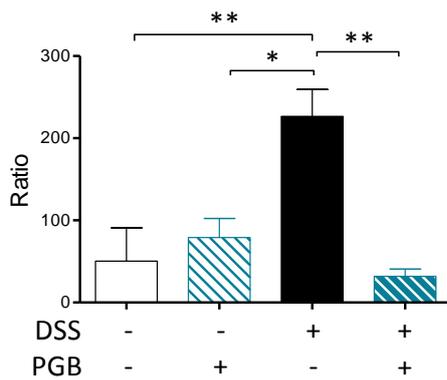
Pour valider cette hypothèse, des dosages par Western Blot, ont permis de quantifier la proportion de sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  membranaire et intracellulaire. Ensuite, l'influence des gabapentinoïdes sur les concentrations intracellulaires de  $Ca^{++}$  a été évaluée *in vivo*. Enfin, les acteurs majeurs de la voie NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibiteur de la voie et la forme phosphorylée de p65, forme libre du facteur de transcription p65) ont été dosés par Western Blot.

Ces dosages ont été réalisés sur les côlons des animaux des deux expériences DSS (injections aiguë et chronique de ligands  $\alpha_2\delta$ ), sur les vessies des animaux du modèle aigu de cystite, ainsi que sur les extraits cellulaires de nos différentes cultures.

## C.II : Localisation de la sous-unité $\alpha_2\delta-1$

---

La localisation de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  des CCVD a été mesurée par Western Blot. Pour cela, les côlons et les vessies ont été extraits selon un protocole permettant d'isoler les protéines membranaires des autres protéines de la cellule (pour description voir chapitre « Matériel et Méthodes »). Après dosage semi-quantitatif, un ratio a été calculé entre les taux de sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  retrouvés au niveau membranaire et ceux obtenus dans le reste de la cellule.



**Figure 42 : Effet de la PGB sur la localisation de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 dans un modèle d'HSC induit au DSS.**

L'eau de boisson des animaux a été additionnée avec 1% de DSS durant 14 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement DSS, les animaux ont reçu des injections quotidiennes de PGB (30mg/kg, sc, ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). A j14, après évaluation de la sensibilité des animaux par distension colorectale, les côlons ont été prélevés, afin de réaliser l'extraction différentielle des protéines membranaires. Après séparation par électrophorèse, un marquage et une quantification de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 a été réalisés par analyse Western Blot. Les données sont présentées sous forme de ratio entre  $\alpha_2\delta$ -1 mesuré au niveau membranaire et  $\alpha_2\delta$ -1 mesuré au niveau cytoplasmique et nucléaire. (n=5/groupe, \*p<0,05, \*\*p<0,01, ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (PGB : Prégabaline)).

Le traitement au DSS durant 14 jours (côlonne noire) induit une augmentation du ratio des taux de sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 membranaires/intracellulaires par rapport aux animaux témoins (côlonne blanche) (50,39±40,52 vs. 226,62±32,66, p<0,01, Water/Saline vs. DSS/Saline respectivement). Chez les animaux traités au DSS et à la PGB (côlonne bleue rayée), ce ratio est diminué par rapport à celui des animaux DSS (226,62±32,66 vs. 31,90±8,68, p<0,01 DSS/Saline vs. DSS/PGB respectivement), et est équivalent à celui des animaux témoins (50,39±40,52 vs. 31,90±8,68, ns, Saline/Saline vs. DSS/PGB respectivement) (Figure 42). Le traitement à la PGB chez les animaux sains n'induit pas de modification du ratio.

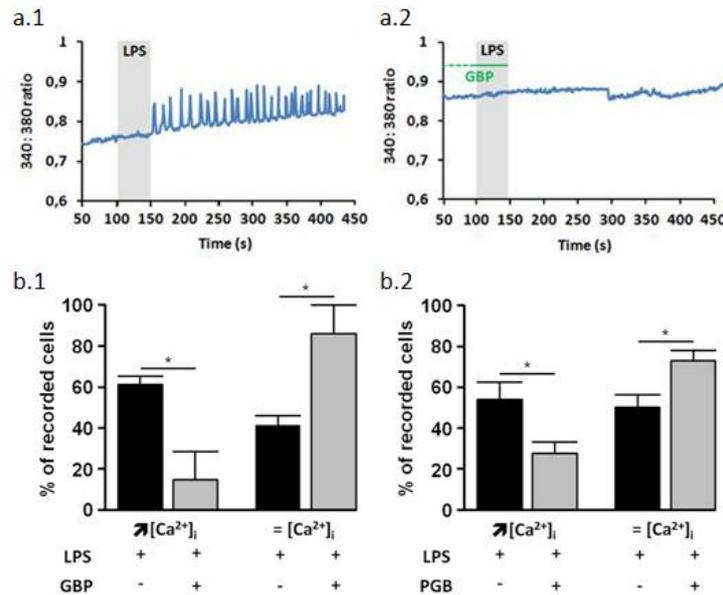
Des profils similaires ont été retrouvés lors des dosages réalisés sur les protéines des côlons des animaux DSS ayant reçu une injection aiguë de PGB (pour la dose de 30mg/kg), ainsi que sur les extraits protéiques de vessies.

L'induction d'une HSV, par le DSS ou par le CYP, induit une augmentation de l'adressage de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 à la membrane. Le traitement à la prégabaline permet de bloquer cette augmentation.

### C.III : Effet des ligands $\alpha_2\delta$ sur les concentrations en calcium intracellulaire

Grâce à une collaboration avec l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier et tout particulièrement avec le Dr Lauriane ULMANN et le Pr. François RASSENDREN, des dosages de calcium intracellulaire ont été réalisés sur des macrophages péritonéaux en culture primaire stimulés au LPS en présence ou en absence de GBP ou de PGB. Les résultats montrent que la co-incubation avec les gabapentinoïdes permet de diminuer significativement le nombre de cellules qui répondent au LPS par une augmentation de calcium intracellulaire.

Les ligands  $\alpha_2\delta$  permettent de bloquer l'augmentation des concentrations en calcium intracellulaire induite par une stimulation au LPS (Figure 43).

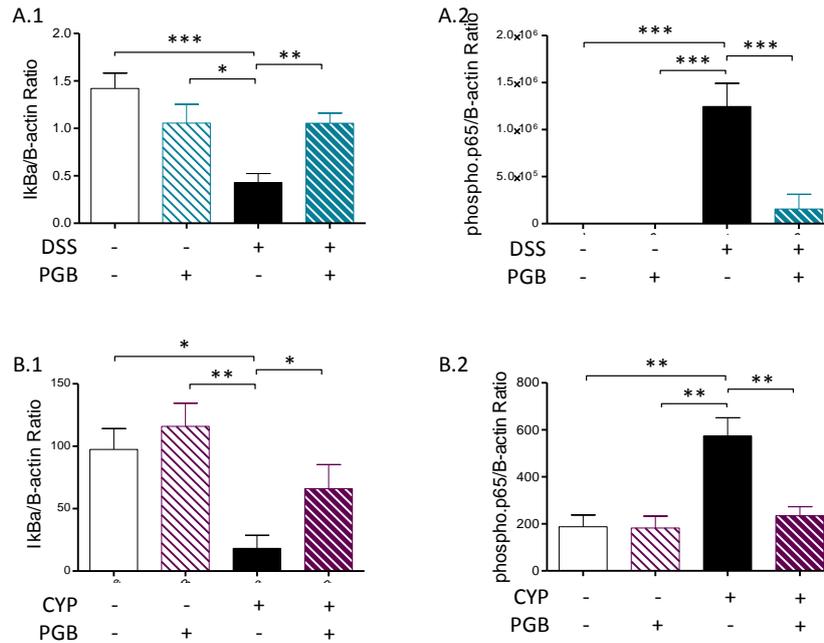


**Figure 43 : Effet de la PGB sur la réponse calcique de macrophages péritonéaux stimulés au LPS**

Le LPS est appliqué à raison de 100ng/ml durant 1min et les gabapentinoïdes (GBP : 60mg, PGB : 17,6 mg), sont appliqués durant 16 minutes (15 minutes seul puis 1 minute avec le LPS). Le calcium intracellulaire a été mesuré à l'aide d'une sonde Fura-2. a. Exemple de profil reflétant les courants calciques intracellulaires lors d'une stimulation au LPS (a.1) et lors d'une co-stimulation LPS et GBP (a.2). b. Pourcentages de PECs qui répondent à la stimulation par une augmentation de calcium intracellulaire (signalé par une flèche) et des PECs dont la concentration en calcium intracellulaire n'est pas modifiée par la stimulation (signalé par un symbole égal). Histogramme noir : stimulation au LPS ; histogramme gris stimulation au LPS et à la GBP (b.1) ou à la PGB (b.2). GBP : Gabapentine, LPS : Lipopolisaccharide, PEC : *peritoneal exudates cells*, PGB : Prégabaline

## C.VI : Influence des ligands $\alpha_2\delta$ sur l'activité de la voie NF- $\kappa$ B

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B a été évaluée par dosage Western Blot de l'inhibiteur de la voie, I $\kappa$ B $\alpha$ , et par dosage de la phosphorylation de l'effecteur p65. Ces dosages semi-quantitatifs ont été réalisés sur les côlons des animaux du modèle DSS après traitement chronique à la PGB, sur les vessies du modèle CYP après injection aiguë de PGB, et sur les cellules PEC's et MODE-K stimulées au LPS et co-traitées avec la PGB.



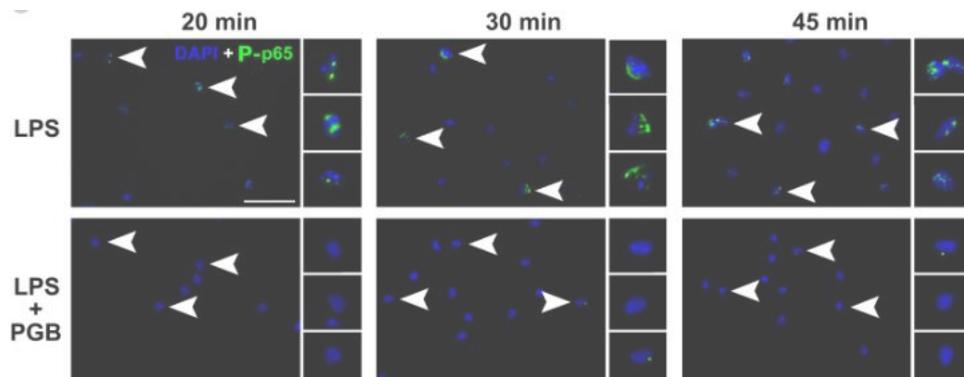
**Figure 44 : Effet de la PGB sur l'expression protéique d'IkBa et sur la phosphorylation de p65 dans deux modèles d'hypersensibilité viscérale inflammatoire.**

Une douleur viscérale inflammatoire a été induite chez les animaux (14 jours de DSS1% induit une HSC et une injection de CYP à 150mg/kg, ip induit une hypersensibilité vésicale). La PGB a été injectée à ces animaux à raison de 30mg/kg, sc (de j7 à j14 pour le modèle DSS, et 1h avant le sacrifice pour le modèle CYP). Après sacrifice, les protéines de côlon (pour le modèle DSS) (A) et de vessies (pour le modèle CYP) (B) ont été extraites. Après séparation par électrophorèse, un marquage et une quantification des protéines IkBa et phospho.p65 (ser 276) ont été réalisés par Western Blot. Les histogrammes présentent le ratio entre la quantification d'IkBa et  $\beta$ -actine (A.1 et B.1) et entre phospho.p65 et  $\beta$ -actine (A.2 et B.2). (n=5/groupe, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA 1voie (Traitement), Test de Bonferroni post-hoc (CYP : Cyclophosphamide, PGB : Prégabaline)).

Dans les côlons des animaux DSS (côlons noirs), une diminution significative d'IkBa (Figure 44A.1), ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de p65 (Figure 44A.2) ont été observées par rapport au groupe témoin (côlon blanc) (IkBa :  $1,42 \pm 0,16$  vs.  $0,43 \pm 0,09$  ; phospho.p65 :  $0,76 \pm 0,13$  vs.  $1,25 \times 10^6 \pm 2,47 \times 10^5$ , p<0,001, Saline/Saline vs. DSS/Saline respectivement), ce qui traduit une activation de cette voie de signalisation. En cas de traitement à la PGB (côlon bleu rayé), les taux d'IkBa et de phosphorylation de p65 sont similaires à ceux évalués chez les animaux témoins (IkBa :  $1,42 \pm 0,16$  vs.  $1,05 \pm 0,11$ , p<0,01 ; phospho.p65 :  $0,76 \pm 0,13$  vs.  $1,56 \times 10^5 \pm 1,65 \times 10^4$ , p<0,001, Saline/Saline vs. DSS/PGB respectivement). De plus, l'injection seule de PGB ne permet pas de modifier l'activation de cette voie.

Des profils similaires ont été observés dans le cas du modèle d'HSV induit par le CYP (Figure 44B), ainsi que dans le cas de protéines extraites de cultures cellulaires de PEC's et de MODE-K (données non montrées). En effet, une diminution d'IkBa et une augmentation de la phosphorylation de p65 sont observées lors d'une stimulation (CYP ou LPS) et sont reversées par le traitement à la PGB.

Ces données ont été confirmées sur une culture primaire de PEC's. Ces cellules ont été stimulées au LPS et co-traitées à la PGB. Après 20, 30 et 45 minutes de stimulation, un marquage immunohistochimique de la forme phosphorylée de p65 a été réalisé.



**Figure 45 : Effet de la PGB sur l'activation par le LPS de la voie NF- $\kappa$ B**

Visualisation immunohistochimique de la forme active de p65 (marquage de la phosphorylation sur la serine 276, représentée en vert) dans des PECs. Ces cellules sont stimulées durant 20, 30 ou 45 minutes au LPS (100ng/ml) (panneaux du haut) et co-stimulées au LPS et à la PGB (17.6mg) (panneaux du bas). Marquage bleu : DAPI, marqueur nucléaire. Les flèches indiquent les cellules qui sont agrandies dans les panneaux de droite. Bar d'échelle : 100 $\mu$ m. LPS : lipopolisaccharide, PECs : *peritoneal exudates cells*, PGB : pré-gabaline.

Le traitement au LPS induit rapidement une phosphorylation de la protéine p65 (20 minutes) qui perdure durant au moins jusqu'à 45 minutes. Le co-traitement à la PGB permet de limiter (voir d'inhiber) cette phosphorylation. Ces données immunohistochimiques sont cohérentes avec les données de Western Blot, et confirment l'inhibition de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par la PGB.

↳ En condition inflammatoire, la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  est surexprimée au niveau de la membrane plasmique et contribue ainsi à l'augmentation des concentrations en calcium intracellulaire et à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. L'utilisation de PGB limite ces effets, permettant ainsi une diminution des processus inflammatoires.

## Chapitre D : Validation clinique

### D.I. Introduction

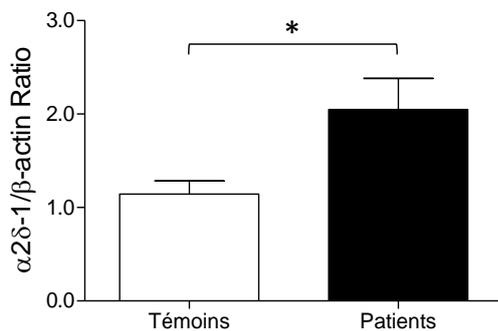
Les différentes analyses réalisées montrent des corrélations positives entre les taux d'expression membranaire d' $\alpha_2\delta-1$  et les médiateurs inflammatoires et entre ces médiateurs inflammatoires et les seuils de réponse viscéromotrices obtenus au test de DCR.

Dans le cadre d'un protocole clinique étude cas/témoins, l'opportunité nous a été donnée d'évaluer les niveaux d'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  au niveau de la paroi colique de patients atteints du SII, par rapport à ceux d'une population contrôle.

### D.II. Analyses des biopsies

Des patients atteints du SII (n=11) ainsi que des patients témoins (adressés pour dépistage de polype(s) ou de cancer colorectal) (n=8) ont été inclus dans cette étude. En plus des biopsies réalisées dans le cadre du suivi médical des patients, le prélèvement de biopsies supplémentaires destinées à la recherche a été réalisé.

La petite taille des échantillons ne nous a pas permis de réaliser une extraction protéique différentielle. L'expression semi-quantitative d' $\alpha_2\delta-1$  a été réalisée par Western Blot sur des extractions protéiques totales. Une surexpression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  a pu être mise en évidence chez les patients atteints du SII (côlonne noire) par rapport aux patients contrôles (côlonne blanche) ( $1,14\pm 0,14$  vs  $2,05\pm 0,33$ ,  $p<0,05$ , témoins vs. patients SII respectivement) (Figure 46).



**Figure 46 : Analyse semi-quantitative par Western Blot de l'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur des biopsies coliques de patients atteints du SII et de patients sains.**

Des biopsies de la paroi colique ont été effectuées chez des patients atteints du SII (notés « Patients») et chez des patient témoins (adressés pour le dépistage de polypes ou de cancer colorectal) (noté « Témoins»). Après extraction protéique, un marquage et une quantification de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  a été réalisés par analyse Western Blot. Les données sont présentées sous forme de ratio entre  $\alpha_2\delta-1$  et une protéine de référence, la  $\beta$ -actine. ((n=8 pour le groupe témoins et n=11 pour le groupe patients), \* $p<0,05$ , ANOVA 1voie (maladie), Test de Bonferroni post-hoc (SII : syndrome de l'intestin irritable)).

👉 La surexpression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  a été observée au niveau colique dans nos modèles animaux d'HSV inflammatoire est retrouvée chez les patients atteints du SII confirmant la potentielle implication de cette sous-unité dans l'hypersensibilité colique de ces patients et donc l'intérêt de l'utilisation des gabapentinoïdes.

# Discussion & Perspectives

*\*Chapitre A  
Effet antinociceptif des ligands  $\alpha_2\delta$*

*\*Chapitre B  
Effet anti-inflammatoire des ligands  $\alpha_2\delta$*

*\*Chapitre C  
Mécanisme d'action des ligands  $\alpha_2\delta$*

*\*Chapitre D  
Conclusion générale*



## Chapitre A : Effets antinociceptifs des ligands $\alpha_2\delta$

### A.1 Observations comportementales

Au cours de ce travail de thèse, l'effet antinociceptif des ligands  $\alpha_2\delta$  a pu être mis en évidence grâce au test de distension colrectale sur différents modèles murins d'hypersensibilité viscérale d'origine non-inflammatoire (mimant l'HSV retrouvée chez les patients atteints du SII) et d'origine inflammatoire (assimilable à l'HSV retrouvée chez les patients atteints de MICI).

La PGB et la GBP ont permis de reverser l'hypersensibilité colique non-inflammatoire dans le modèle de stress néonatal chez la souris récemment mis en point au laboratoire (Méleine M, Boudieu L, *et al.*, soumis) (*annexe 3*). Cela confirme certains résultats de la littérature. En effet, des résultats similaires ont été publiés sur un modèle l'HSC induit par stress néonatal chez le rat (O'Mahony S *et al.*, 2011) et dans d'autres modèles de douleur viscérale non-inflammatoire (Sikandar S *et al.*, 2012 ; O'Mahony S *et al.*, 2011). Des études cliniques ont également montré que ces ligands pouvaient entraîner une augmentation des seuils de douleur chez des patients atteints du SII (Houghton LA *et al.*, 2007 ; Lee KJ *et al.*, 2005).

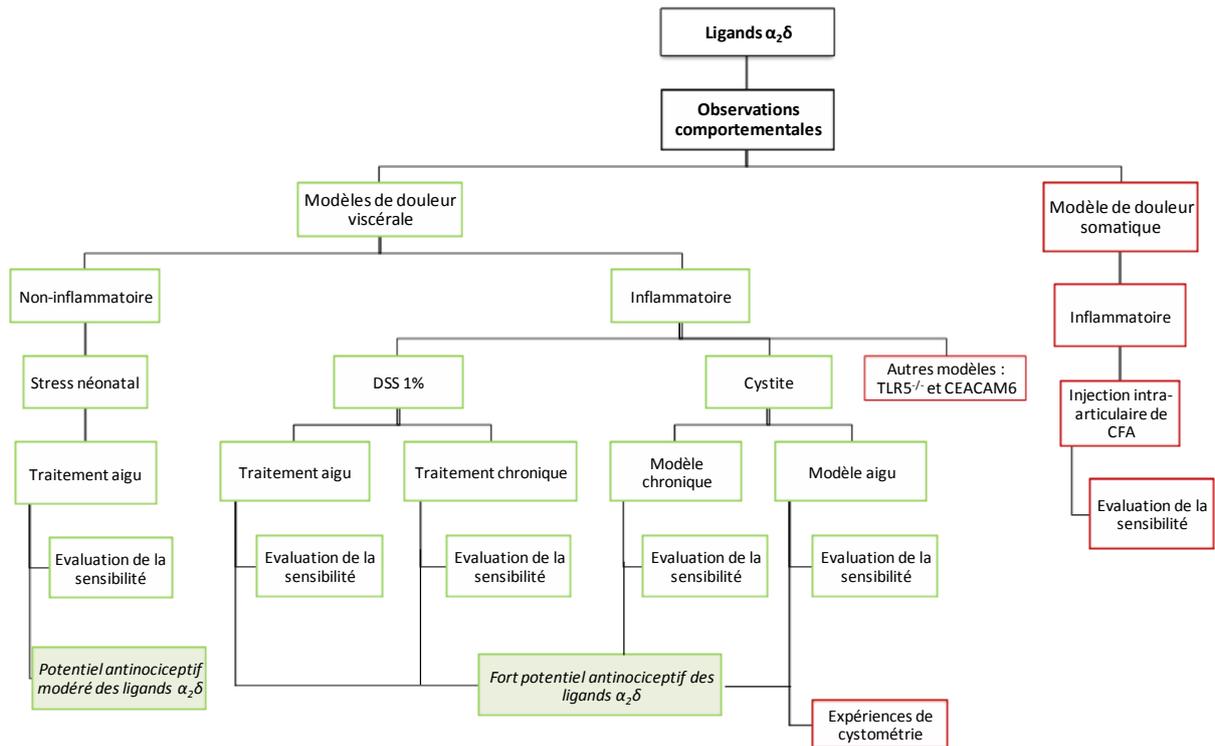
Concernant les modèles de douleur viscérale inflammatoire (modèle d'HSC induit au DSS et modèle d'HS vésicale induit au CYP), les ligands  $\alpha_2\delta$  ont également montré un fort potentiel antinociceptif (tout particulièrement lorsque la PGB est injectée de manière chronique). Quelques études pré-cliniques avaient déjà montré l'efficacité de ces molécules dans des contextes inflammatoires aigus, loin de l'inflammation chronique, observée en clinique chez les patients atteints de MICI, contrairement à notre modèle au DSS sur 14 jours (Ohashi-Doi K *et al.*, 2010 ; Ohashi K *et al.*, 2008 ; Diop L, *et al.*, 2002 ; Eutamene H *et al.*, 2000).

Cette efficacité de la gabapentine et la prégabaline semble être spécifique aux gabapentinoïdes puisqu'un autre antiépileptique, également utilisé dans le traitement de la douleur neuropathique chez l'homme, s'est révélé inefficace dans nos modèles. En effet, une injection aiguë de carbamazépine ne modifie pas les seuils de douleur dans le modèle de stress néonatal et dans le modèle de DSS. Les effets obtenus avec les gabapentinoïdes sont produit-dépendants. La PGB diminue l'hypersensibilité colique pour des doses aiguës moindres (10 et 30mg/kg) par rapport à la GBP (30 et 100mg/kg). Ces doses correspondent à celles retrouvées dans la littérature et leurs effets semblent indépendants, tout du moins pour la prégabaline, d'un effet sédatif (*annexe 1*). De plus, dans les premières études où les ligands  $\alpha_2\delta$  sont injectés de façon aiguë, la PGB a montré une meilleure efficacité que la GBP. Ceci peut s'expliquer par le fait que la PGB est une nouvelle formulation de

GBP, qui présente une affinité plus forte pour la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1, un meilleur profil pharmacocinétique et une biodisponibilité plus importante (90% pour la PGB contre 33 à 66% pour la GBP) (Bockbrader HN *et al.*, 2010 ; Taylor CP, 2009).

Les effets des ligands  $\alpha_2\delta$  sont presque exclusivement retrouvés dans des conditions d'hypersensibilité viscérale. C'est le cas pour les modèles de douleur colique (par séparation maternelle ou par le DSS 1%). Cependant un effet antinociceptif a été retrouvé chez des animaux naïfs lors du test de Von Frey dans le modèle de cystite expérimental. Au niveau colique, il apparaît donc une implication de ces sous-unités spécifiquement en conditions physiopathologiques. Les données obtenues durant le protocole de cystite suggèrent une implication modalité dépendante de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  et/ou des gabapentinoïdes. En effet, en plus de toucher un organe différent, l'évaluation de la sensibilité par Von Frey dans le modèle de cystite reflète une douleur mécanique référée au niveau somatique et non pas la sensibilité de la vessie en elle-même. Afin de déterminer si ces différences sont organe-dépendantes ou test-dépendants, des expériences de cystométries sont en cours de réalisation. Les premiers résultats confirment que l'injection de CYP entraîne une modification des propriétés uro-dynamiques de la vessie (pression basale, contractilité, amplitude des contractions, intervalle inter-contraction, etc.). L'objectif, à présent, est de tester si la PGB permet de rétablir ces paramètres.

Afin de compléter l'exploration de l'efficacité de ces produits dans les pathologies coliques, il serait intéressant de tester l'efficacité de ces molécules sur d'autres modèles d'HSC tels que le modèle de souris délétées pour le gène codant le récepteur TLR5 (Vijay-Kumar M *et al.*, 2010), ou encore sur les souris exprimant de façon hétérozygote le récepteur humain CEACAM6 (Carvalho FA *et al.*, 2009). Ces deux modèles disponibles au laboratoire miment respectivement une colite spontanée due à un défaut du système immunitaire, associée à une inflammation de bas grade et une HSC d'origine post-infectieuse suite au gavage par la souche bactérienne d'*Escherichia coli* adhérentes et invasives LF82 (Figure 47).



**Figure 47 : Effets comportementaux des ligands  $\alpha_2\delta$ .**

En vert les données obtenues durant cette thèse, en rouges les perspectives

## A.2 Modulation de la transmission nociceptive par les ligands $\alpha_2\delta$

Ces ligands, initialement synthétisés comme analogues du GABA pour cibler l'effet antiépileptique, se lient aux sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 et  $\alpha_2\delta$ -2 dans canaux calciques voltage-dépendants. L'expression de ces sous-unités au niveau du système nerveux central et périphérique, couplée à leurs blocages par les gabapentinoïdes, pourrait expliquer les effets obtenus lors des tests comportementaux.

### A.2.a. Action des ligands $\alpha_2\delta$ sur les fibres afférentes primaires

Assez peu d'études se sont focalisées sur l'implication physiopathologique des canaux calciques voltage-dépendants dans la douleur viscérale. Néanmoins, une étude de 2010 a mis en évidence pour la première fois la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 au niveau des neurones myentériques. Les auteurs ont montré que cette sous-unité était associée aux canaux calciques  $Ca_v2.2$  et que la PGB, en se liant sur cette sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 présente sur ces neurones, induisait une diminution de la durée des potentiels d'actions qu'ils pouvaient déclencher. Par contre, à ce niveau entérique, les canaux  $Ca_v2.3$  ne semblent pas sensibles à la PGB, suggérant qu'ils ne sont pas couplés à la sous-unité

auxiliaire  $\alpha_2\delta$ -1 (Needham K *et al.*, 2010). Ces données récentes, en accord avec l'abondance des canaux  $\text{Ca}_v2.2$  au niveau des neurones la muqueuse et de la sous-muqueuse colique (Kirchgessner AL and Liu MT, 1999) suggèrent que la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 pourrait être associée à ces canaux  $\text{Ca}_v2.2$  au niveau colique. Ainsi, il serait intéressant de réaliser des co-marquages immunohistochimiques de ces différents acteurs sur des coupes de côlon en *whole mount* ou des expériences de co-précipitation afin de confirmer cette interaction.

L'effet antinociceptif des ligands  $\alpha_2\delta$  au niveau viscéral, pourrait donc être directement dû à une inhibition des courants calciques au niveau des neurones entériques, entraînant une réduction des potentiels d'action de ces derniers et donc une diminution de la transmission nerveuse. Ce blocage de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants pourrait être du à une diminution du transport antérograde de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 comme cela a été montré dans un modèle de douleur neuropathique avec comme conséquence la moindre libération de neuromédiateurs (glutamate, aspartate, SP ou encore des catécholamines par exemple) dans la fente synaptique (Bauer CS *et al.*, 2010 ; Bauer CS *et al.*, 2009 ; Fink K *et al.*, 2002). Il serait intéressant de réaliser des immunomarquages de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 au niveau des afférences coliques, ainsi que des expériences de microdialyse (technique mise au point au laboratoire), afin de vérifier si de tels mécanismes sont transposables au niveau viscéral. De plus, la technique de nerf-colon toujours en cours de développement au laboratoire pourrait permettre d'évaluer les propriétés électrophysiologiques des CCVD présents sur les afférences primaires, dans différentes conditions pathologiques, et de tester l'impact du traitement aux ligands  $\alpha_2\delta$  sur ces propriétés.

### *A.2.b. Action des ligands $\alpha_2\delta$ au niveau spinal*

---

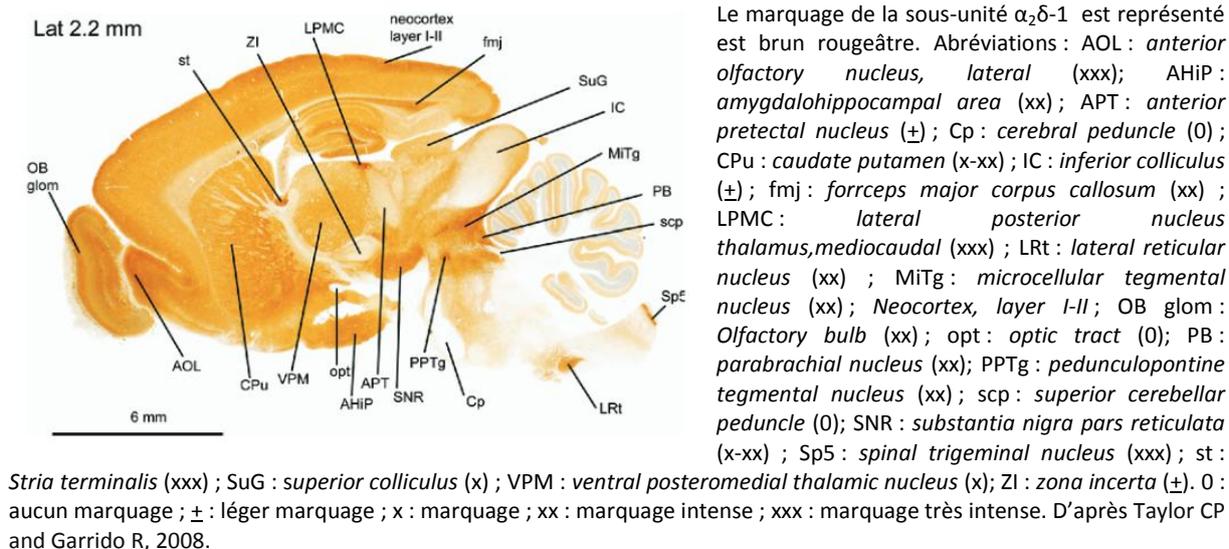
Comme indiqué précédemment, les ligands  $\alpha_2\delta$  pourraient entraîner une diminution de la libération de neuromédiateurs au niveau spinal, conduisant à une diminution de l'activation de neurone de second ordre. De plus, les gabapentinoïdes pourraient également agir sur ces neurones et inhiber l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ . Ces deux phénomènes associés, pourraient conduire à une diminution de l'excitabilité neuronale post-synaptique au niveau de la MEp. Ces hypothèses sont étayées par le fait que dans un modèle de pancréatite chronique, l'augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 au niveau spinal (MEp thoracique T8-T11) est reversée par des injections chroniques de GBP (Liao XZ *et al.*, 2010). De tels résultats ont également été obtenus dans un modèle de mono-arthrite, où, en plus, les auteurs montrent que la GBP permet de diminuer l'activation gliale (Yang JL *et al.*, 2012). Enfin, des données récentes ont mis en évidence que le prétraitement à la PGB permettait de prévenir l'activation neuronale (c-Fos) et microgliale (au niveau de la de la MEp) induite par l'injection intra-plantaire de zymosan (Jeong YC *et al.*, 2014). Afin de

confirmer si de tels mécanismes peuvent être impliqués dans nos modèles, des marquages immunohistochimiques de l'activation gliale (GFAP, Iba-1, CD11b ou OX-42) et neuronale (NeuN, c-Fos ou zif268), pourraient être réalisés au niveau de la MEp des animaux, afin d'évaluer l'impact des gabapentinoïdes sur l'activation spinale. A noter que des études *in vitro* ont mis en évidence que la GBP, en se liant à la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1, bloquait l'interaction de cette dernière avec les thrombospondines, limitant ainsi la synaptogenèse et donc potentiellement la sensibilisation centrale (Eroglu C *et al.*, 2009).

### *A.2.c. Action des ligands $\alpha_2\delta$ au niveau supraspinal*

---

La barrière hémato-encéphalique est perméable aux ligands  $\alpha_2\delta$ , et leurs récepteurs sont également présents au niveau de différentes structures supraspinales. En effet, la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 est fortement exprimée au niveau du noyau olfactif antérieur, de l'amygdale (antérieure, basolatérale ventrale et corticale) et au niveau de structures corticales telles que l'insula, le cortex perirhinal piriforme et le cortex entorhinal chez le rat. Cette sous-unité est également retrouvée en moindre quantité au niveau des aires CA1 et 3 de l'hippocampe, dans le noyau postérieur latéral du thalamus, les couches superficielles du néocortex, de la substance grise périaqueducule, noyau tegmental et noyau accumbens (Taylor CP and Garrido R, 2008 ; Bian F *et al.*, 2006) (Figure 47). Ces structures sont principalement impliquées dans des mécanismes de mémorisation, d'apprentissage, de gestion des émotions ou encore dans le traitement sensori-discriminatif, cognitif et émotionnel de la douleur. Cette localisation des sous-unités  $\alpha_2\delta$ -1 laisse supposer une action centrale de ces molécules, particulièrement en ce qui concerne les effets antinociceptifs observés dans le modèle d'HSC induit par stress néonatal, puisqu'aucune atteinte périphérique n'a pu être mise en évidence chez ces animaux. De part leur effet inhibiteur sur les courants calciques, les ligands  $\alpha_2\delta$  pourraient entraîner une diminution du traitement de l'information nociceptive et/ou à une modulation des contrôles descendants. D'un point de vue clinique, les études récentes d'imagerie fonctionnelle réalisées chez des patients atteints du SII montrent des dysfonctionnements au niveau des différentes structures précédemment citées (Elsenbruch S, 2011). Des injections locales intracérébrales de PGB ou de GBP pourraient être réalisées chez des animaux sensibilisés (séparation maternelle ou par un traitement de 14 jours au DSS 1%), avant l'évaluation des seuils de nociception par DCR. Ceci permettrait d'évaluer en détail l'impact des ligands  $\alpha_2\delta$  au niveau supraspinal et sa contribution à l'effet antinociceptif observé (Figure 49).



**Figure 48 : Immunomarkage de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur une coupe sagittale de cerveau de rat.**

Les données de la littérature plaident en faveur d'une action au niveau des différentes structures du système nerveux central et périphérique. En effet, l'action antinociceptive des gabapentinoïdes est toujours retrouvée, quelle que soit la voie d'administration utilisée (intraplantaire, sous-cutanée, intrapéritonéale, orale ou encore intrathécale). Seule la voie intracérébro-ventriculaire n'a pas été testée, à notre connaissance, et ne nous permet donc pas de conclure quant à l'action centrale de ces molécules (Eutamene H *et al.*, 2000 ; Yoon MH and Yaksh TL, 1999 ; Carlton SM and Zhou S, 1998). Dans notre travail, l'efficacité antinociceptive de ces ligands s'est révélée être bien meilleure dans le modèle au DSS par rapport au modèle de séparation maternelle laissant supposer un mécanisme d'action supplémentaire, dépendant des processus inflammatoires, de ces molécules.

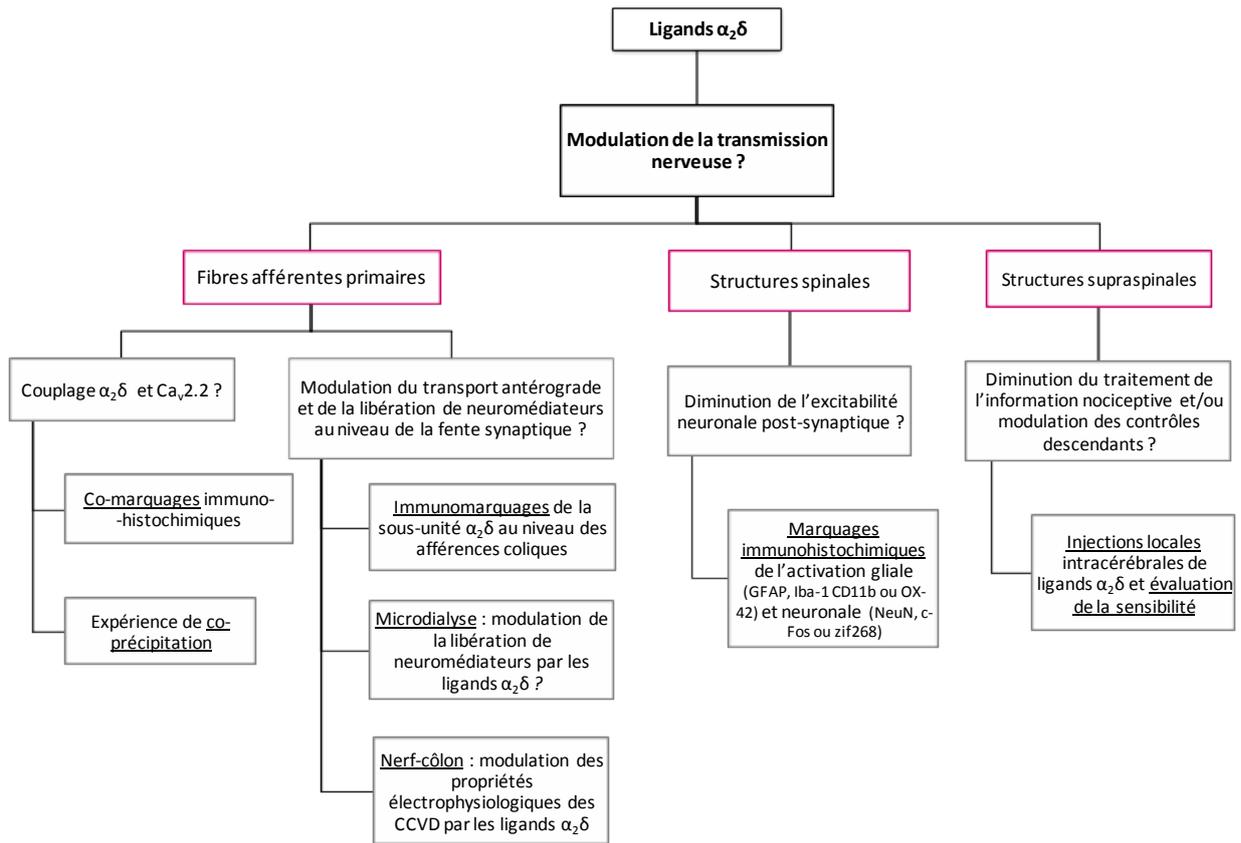


Figure 49 : Etudes des voies nerveuses potentiellement impliquées dans le mécanisme d'action des ligands  $\alpha_2\delta$ .

## Chapitre B : Effets anti-inflammatoires des ligands $\alpha_2\delta$

En plus des propriétés antalgiques des gabapentinoïdes dues à la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  au niveau du SNP et du SNC, les résultats de cette thèse mettent en évidence, pour la première fois, un effet anti-inflammatoire de ces molécules au niveau viscéral.

### B.1 Observations *in vivo* et *in vitro*

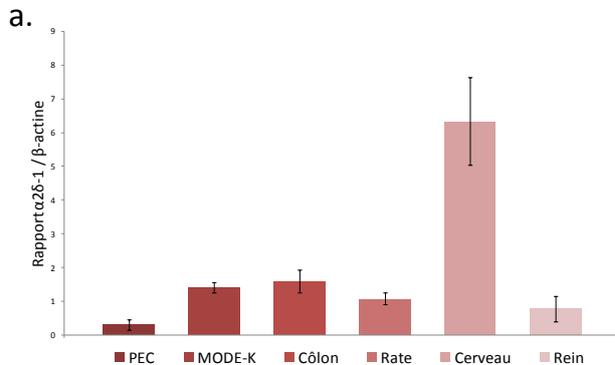
#### B.1.a. Données *in vivo*

La plus grande efficacité d'une injection aiguë de ligands  $\alpha_2\delta$  dans le modèle d'HSC inflammatoire, par rapport au modèle non-inflammatoire, a conduit à l'évaluation de l'effet de ces molécules sur les paramètres inflammatoires. Après administration aiguë, la PGB réduit, bien que non significativement, les paramètres inflammatoires mesurés. Cela nous a amené à tester l'efficacité d'injections chroniques de PGB. Les analyses des paramètres anatomiques (poids des organes et score histologique) montrent que les côlons des animaux DSS/PGB ne présentent aucune atteinte macroscopique contrairement aux côlons des animaux DSS/Saline. Ceci est confirmé par l'absence de modification des taux coliques et systémiques de cytokines pro-inflammatoires, de l'activité enzymatique colique de la MPO et du dosage de la COX-2. De manière intéressante, le suivi des concentrations en lipocaline-2 fécale a mis en évidence l'apparition d'une réaction inflammatoire dès le 7<sup>ème</sup> jour de DSS, qui est reversée à j14, par l'injection journalière de PGB. Ce marqueur fécal permet de mettre en évidence une micro-inflammation et peut être considéré comme un marqueur d'inflammation précoce (Chassaing B *et al.*, 2014). La PGB a également été testée sur un modèle d'inflammation vésicale, la cystite. Des données similaires à celles évoquées précédemment ont été obtenues, confirmant l'effet anti-inflammatoire des gabapentinoïdes au niveau viscéral. Ces effets pourraient être dus à une action des gabapentinoïdes sur les cellules impliquées dans la réponse immunitaire. En effet, les premiers résultats obtenus montrent la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur les macrophages péritonéaux murins (PEC's). Il serait maintenant intéressant de savoir quel type de réponse immunitaire est modulé par les ligands  $\alpha_2\delta$  (Th1, Th2, Th17, LB, etc.). Pour cela, la technique de cytométrie en flux est en cours de développement au laboratoire et permettra d'identifier si une population particulière de cellules immunitaires coliques (ou vésicales) est modulée par un traitement aux ligands  $\alpha_2\delta$ . Une étude récente conclue également un effet anti-inflammatoire local (spinal) de la GBP sur un modèle de ligature de nerf. L'auteur rapporte que l'injection intrathécale de GBP stimule la production d'IL-10, que cette cytokine anti-inflammatoire bloque la production de cytokines pro-inflammatoires et serait ainsi responsable de l'effet anti-allodynique de la GBP (Lee BS,

2013). Cette cytokine a également été dosée au niveau plasmatique dans le modèle au DSS. Nous avons pu constater que des injections chroniques de PGB diminuent la production d'IL-10 induite par le DSS. Cependant le dosage effectué au niveau colique n'a montré aucun impact du traitement au DSS, ni à la PGB sur les concentrations en IL-10. Des injections d'anticorps anti-IL-10 et d'IL-10 pourraient être réalisées afin de déterminer si cette hypothèse peut être également validée au niveau viscéral. Enfin, il faudrait vérifier si cet effet anti-inflammatoire peut être retrouvé lors d'une inflammation somatique. Pour cela, un protocole de douleur inflammatoire articulaire chronique induit au CFA pourrait être réalisé, avec ou sans injections chroniques de PGB.

### B.1.b. Données *in vitro*

Des cultures primaires de macrophages péritonéaux et des cultures des cellules épithéliales immortalisées MODE-K, ont été stimulées par du LPS. Nous avons pu montrer que les ligands  $\alpha_2\delta$  diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) ainsi induite. Ces données suggèrent que les macrophages mais également les cellules de la barrière épithéliale sont impliqués dans l'effet anti-inflammatoire observé *in vivo*. Afin de vérifier la présence, sur ces cellules, de la cible des ligands, des Westerns Blots, des immunomarquages et des expériences en cytométrie en flux confirment la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur ces deux types cellulaires (Figure 50).

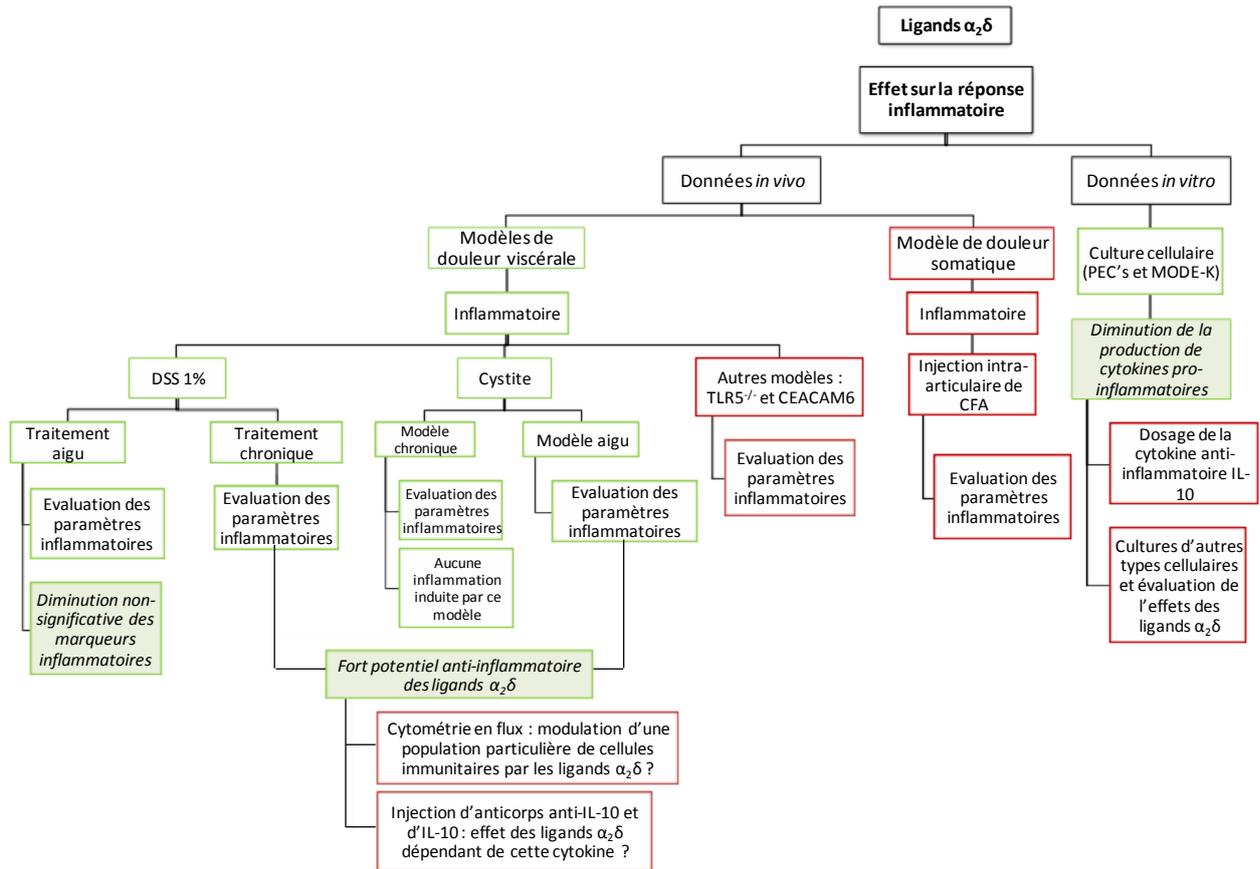


**Figure 50 : Dosage semi-quantitatif de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur différents tissus, par Western Blot.**

La sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  est présente sur les 2 types cellulaires (PEC et MODE-K) et sur les 4 tissus murin testés (côlon, rate, cerveau, rein). De manière cohérente avec les données de la littérature, l'intensité de marquage la plus importante est retrouvée pour les protéines extraites du cerveau. a. Moyenne des rapports de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur la  $\beta$ -actine (n=3 par tissu). b. exemple de résultat de Western Blot pour la sous unité  $\alpha_2\delta-1$ .



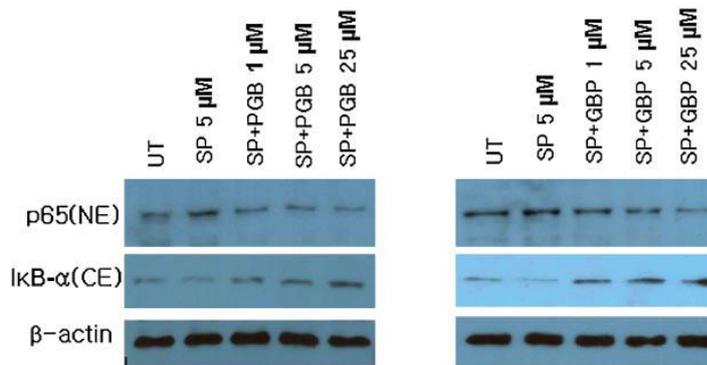
Afin de compléter ces données un dosage de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 pourrait également être réalisé. D'autres types cellulaires (lymphocytes, mastocytes et phagocytes) peuvent être également impliqués dans la réaction inflammatoire. Il faudrait réaliser des cultures de ces différents types cellulaires afin de regarder si les ligands  $\alpha_2\delta$  modifient leur réponse lors d'une stimulation inflammatoire (Figure 51).



**Figure 51 : Effet des ligands  $\alpha_2\delta$  sur la réponse inflammatoire**  
 En vert les données obtenues durant cette thèse, en rouges les perspectives

## B.2 La voie NF- $\kappa$ B

L'implication bien décrite de la voie NF- $\kappa$ B dans les processus inflammatoires nous a conduits à analyser l'impact des ligands  $\alpha_2\delta$  sur l'activation de cette voie. La stimulation inflammatoire *in vivo* ou *in vitro* (DSS, CYP ou LPS) entraîne une dégradation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$ , l'inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, et une augmentation de la phosphorylation de p65. Ces effets sont bloqués par la PGB. Ces données confirment, pour la première fois, celles publiées en 2008 où les auteurs montrent une diminution de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (augmentation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  et diminution du facteur p65 au niveau nucléaire) suite à un traitement à la PGB et à la GBP sur des cultures de neuroblastomes humains et sur des gliomes de rat (Park S *et al.*, 2008) (Figure 52).



**Figure 52 : La prégabaline (PGB) et la (GBP) inhibent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par la substance P en prévenant la dégradation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  et la localisation nucléaire du facteur de transcription p65.**

Les cellules SH-SY5Y (neuroblastome humain) ont été traitées durant 2h avec 5 $\mu$ M de substance P (SP) et ensuite traitées 2h avec les concentrations indiquées de PGB et GBP. Des extraits nucléaires et cytoplasmiques ont été préparés à partir de ces échantillons et analysés par Western Blot. NE, extrait nucléaire; CE, extrait cytoplasmique, UT, non traité. D'après Park S *et al.*, 2008.

D'autres voies de signalisation intracellulaires prennent également part à la réponse immunitaire, notamment la voie des MAPkinases, dont les modulations par les gabapentinoïdes devront également être étudiées. Une étude récente vient de mettre en évidence que le prétraitement à la PGB (*per os*, 10 et 30 mg/kg) pouvait bloquer la phosphorylation de ERK1/2 et ERK5 (deux acteurs majeurs de la cascade intracellulaire des MAPkinases), induite par l'injection intraplantaire de zymosan (Jeong YC *et al.*, 2014). Afin de vérifier si d'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'effet des ligands  $\alpha_2\delta$ , la stimulation de PEC's et de MODE-K devra être réalisée en présence d'un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B (tel que le BAY 11-7085 par exemple) afin de voir si les taux de certaines cytokines sont toujours augmentés dans le surnageant de culture et si le traitement aux gabapentinoïdes est toujours efficace. Des analyses par Westerns Blots ciblant d'autres protéines majeures des voies de signalisation intracellulaires devront également être réalisées sur les extraits protéiques des cellules et des échantillons de tissus des animaux de nos différents modèles.

Cette action des ligands  $\alpha_2\delta$  sur les cellules du système immunitaire, combinée aux effets sur le système nerveux décrit précédemment, explique l'efficacité supérieure de ces ligands en condition

inflammatoire. Des études cliniques ont également montré une efficacité des ligands  $\alpha_2\delta$  chez des patients souffrant du SII, cependant au vu de nos données, il semble pertinent de tester ces molécules chez des patients présentant une atteinte inflammatoire tels que les patients atteints du SII avec micro-inflammation ou les patients atteints de MICI en phase de rémission.

### B.3 Protocoles cliniques

Deux projets cliniques vont donc découler des travaux réalisés durant cette thèse. Les données préliminaires obtenues sur des biopsies de patients atteints du SII qui montrent une surexpression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$ , cible des gabapentinoïdes, au niveau de la muqueuse colique devront être confirmées (Figure 53). Si cette modification est corrélée avec le niveau d'inflammation, le deuxième projet consistera à tester la PGB chez des patients atteints du SII avec une micro-inflammation (probablement les patients atteints du SII-D et du SII-PI) (De Silva AP *et al.*, 2012), mais également chez des patients souffrant de MICI en phase de rémission.

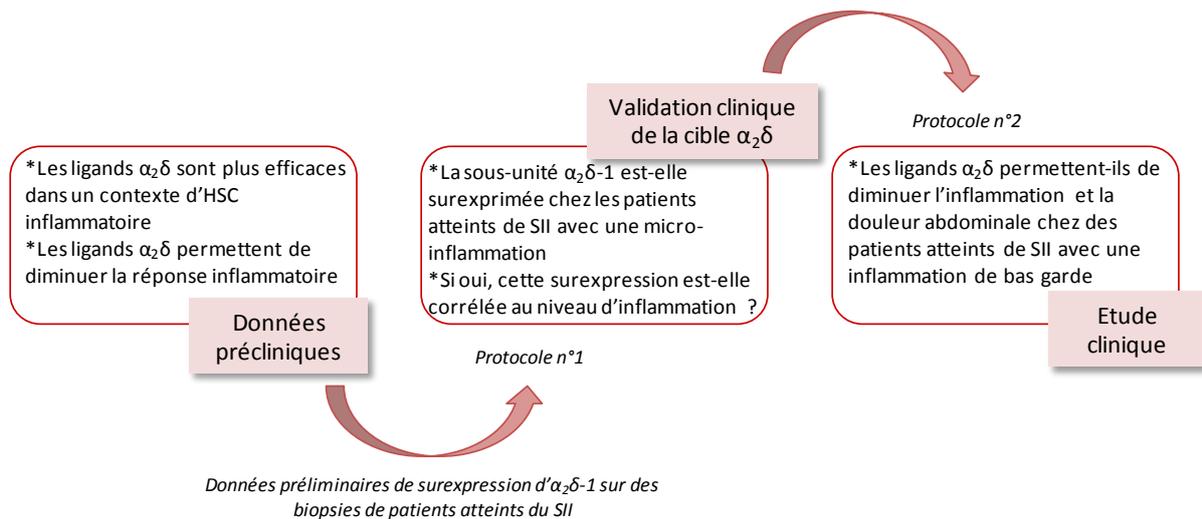


Figure 53 : Rationnel des deux projets cliniques découlant de ces travaux de thèse

#### B.3.a : Protocole clinique n°1

Ce projet aura pour objectif la validation clinique de la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  au niveau de la muqueuse colique de patients atteints du SII, mais également le dosage de différents marqueurs de l'inflammation, afin de savoir si une corrélation peut être établie entre le niveau d'expression d' $\alpha_2\delta-1$  et le niveau d'inflammation. Ceci a pour but de pouvoir identifier un biomarqueur, facilement dosable, permettant de prédire le niveau d'expression de cette sous-unité

et ainsi de pouvoir sélectionner les patients qui seront les meilleurs répondeurs au traitement par les gabapentinoïdes.

Pour cette étude, 120 patients devront être inclus afin d'avoir un nombre suffisant de patients pour chaque niveau d'inflammation. Le gastro-entérologue proposera cette étude aux patients adressés pour une coloscopie et répondant aux critères de Rome III (des critères de non-inclusion sont également décrits dans le protocole). La douleur abdominale, le confort digestif ainsi que la qualité de vie seront évalués grâce à un score de douleur et à l'échelle GIQLI (*Gastro-intestinal Quality of life Index*). Quatre biopsies seront récupérées durant la coloscopie (deux sur le côlon gauche et deux sur le côlon droit afin d'être plus représentatives), ainsi qu'un échantillon de selles.

La moitié des biopsies ainsi récupérées serviront aux dosages par ELISA des marqueurs inflammatoires tels que l'activité de la MPO, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , l'autre moitié sera utilisée pour évaluer la quantité de sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 (par Western Blot et RT-qPCR) et leur localisation (par immunohistochimie). L'échantillon de selle servira au dosage ELISA de la calprotectine. Cette protéine est contenue dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles et est également synthétisée par les macrophages. Ce marqueur fécal d'inflammation reflète le degré d'infiltration inflammatoire dans la muqueuse intestinale et est corrélé à l'activité des leucocytes ainsi qu'au score histologique et endoscopique d'inflammation. L'état inflammatoire peut ainsi être évalué en fonction de la concentration en calprotectine (<50 $\mu$ g/g de selles : aucune inflammation, entre 50 et 200 $\mu$ g/g de selles : inflammation à bas bruit, >200 $\mu$ g/g de selles : présence d'une inflammation) (Dabritz J *et al.*, 2014 ; Goeppl *et al.*, 2014) (Figure 54).

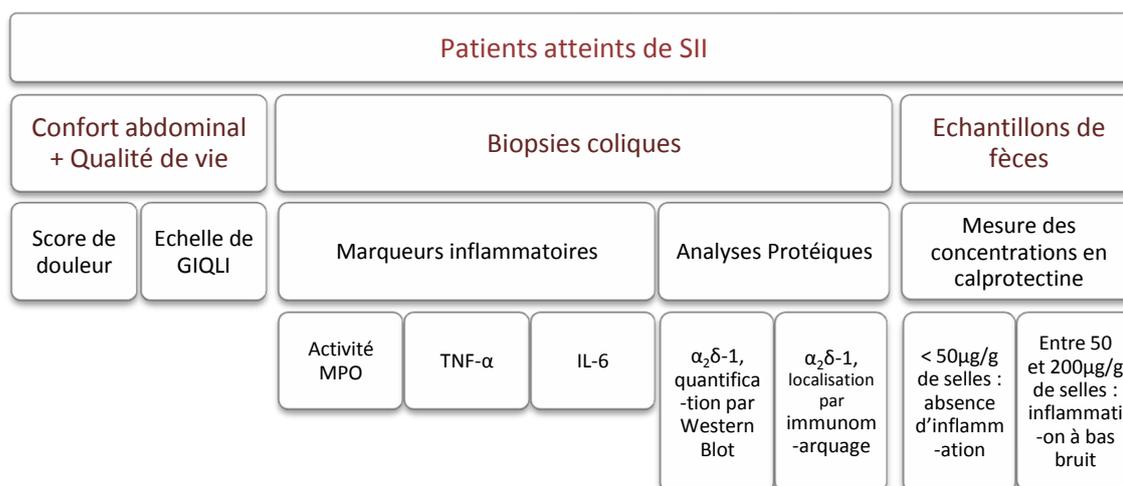


Figure 54 : Organigramme du projet clinique n°1

### B.3.2 : Protocole clinique n°2

---

Si le premier protocole clinique confirme les données obtenues chez l'animal, à savoir une augmentation de la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur la muqueuse colique corrélée à l'augmentation d'un ou plusieurs marqueurs inflammatoires, l'efficacité de la PGB pourra alors être testée chez les patients souffrant du SII.

Pour cela, comme précédemment le protocole sera proposé aux patients souffrant du SII et adressés pour une coloscopie. Les dosages de marqueurs inflammatoires réalisés sur un prélèvement de selles ainsi que sur les biopsies permettront de séparer les patients en deux groupes (15 patients/groupe), ceux présentant une micro-inflammation, et ceux ne présentant aucun signe d'inflammation (le choix du ou des marqueur(s) inflammatoire(s) sera déterminé en fonction des données obtenues durant le premier protocole).

Une fois les groupes définis, chaque patient suivra un traitement de 3 semaines à la PGB (300mg/jour) ou avec un placebo en essai croisé avec une période de *wash-out* de 4 semaines. L'évaluation de la sensibilité rectale (par distension rectale), la douleur abdominale, le confort digestif, la qualité de vie (échelle de GIQLI) et le prélèvement d'un échantillon de selles (dosage de la calprotectine), seront réalisés avant le début du traitement et après les 3 semaines de PGB ou de placebo.

Si les résultats sont concluants, un troisième protocole pourrait être envisagé pour tester l'efficacité de ces molécules chez les patients atteints de MICI en phase de rémission.

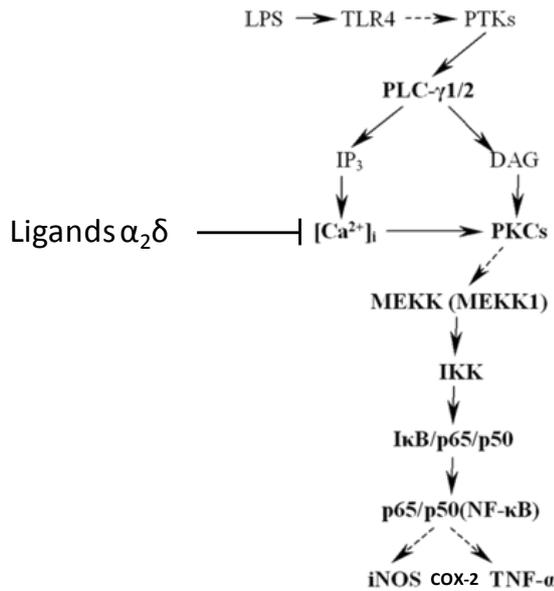
## Chapitre C : Mécanismes d'action des ligands $\alpha_2\delta$

Nos résultats suggèrent un double effet des gabapentinoïdes. En plus de leur action sur la transmission du message nociceptif, ces molécules bloquent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, conduisant à une diminution de la production de médiateurs inflammatoires. Nos travaux ont également permis de mettre évidence que la variation de concentration en calcium intracellulaire, notamment dans les macrophages, pourrait expliquer cet effet.

### C.1 Effets des ligands $\alpha_2\delta$ sur les concentrations en calcium intracellulaire

Les études menées en collaboration avec Lauriane Ulmann et François Rassendren de l'IGF de Montpellier ont montré que lors d'une stimulation au LPS, la PGB ou à la GBP diminuent le nombre de PEC's qui répondent par une augmentation de calcium intracellulaire. En effet, si environ 60% des PEC's augmentent leur concentration en calcium intracellulaire sous LPS, ce pourcentage n'est que de 20% en cas de traitement à la PGB ou à la GBP.

Le calcium joue un rôle important de second messager intracellulaire. En effet, il est impliqué dans de nombreuses fonctions essentielles pour la cellule telles que l'activation de kinases, de phosphatases, l'endo-exocytose, ou encore le contrôle de la transcription (Mandeville JT and Maxfield FR, 1996). Des travaux ont pu mettre en évidence que la production de médiateurs inflammatoires induite par le LPS était dépendante de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Martin L *et al.*, 2006 ; Chen BC and Lin WW, 2001). Une étude a également mis en évidence sur des cultures de PEC's que le blocage des influx de calcium (par le SK&F96365), bloquait la translocation nucléaire de p65 et la production de médiateurs pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$  entre autres) (Ye Y *et al.*, 2012). La PGB et la GBP induisent une diminution des concentrations en calcium intracellulaire, qui pourrait ainsi être responsable de la moindre activation de la voie NF- $\kappa$ B et donc de la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. L'activation des protéines kinases C (PKC), par l'augmentation du calcium intracellulaire semble également être nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et à la production de médiateurs inflammatoires (iNOS et TNF- $\alpha$ ) par les PEC's lors d'une stimulation au LPS (Zhou X *et al.*, 2006) (Figure 55).



**Figure 55 : Hypothèse du mécanisme d'action des ligands  $\alpha_2\delta$ .**

Les ligands  $\alpha_2\delta$  (prégabaline et gabapentine) induisent une diminution des concentrations en calcium intracellulaire, conduisant à une diminution de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Le blocage de cette voie entraîne une moindre transcription de ses gènes cibles tels qu'iNOS, COX-2 ou encore TNF- $\alpha$ . Adapté de Zhou X *et al.*, 2006.

Afin de déterminer si l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par les ligands  $\alpha_2\delta$  passe par l'inhibition des PKC, des cultures de PEC's stimulées au LPS pourraient être réalisées en présence d'inhibiteur de toutes les PKC (tel que le GF109203X) ou d'inhibiteurs spécifiques d'une PKC (tel que le LY379196, inhibiteur de la PKC $\beta$ , par exemple) et/ou de ligands  $\alpha_2\delta$ . Si le double traitement entraîne une plus grande inhibition de la voie NF- $\kappa$ B et de la production de cytokines cela signifie que ces molécules passent par deux mécanismes différents et donc que les ligands  $\alpha_2\delta$  n'influent pas sur l'activité des protéines kinases C.

En plus d'être nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, le calcium intracellulaire joue un rôle important dans la formation, le transport et la fusion au niveau de la membrane plasmique des vésicules d'exocytoses et participe donc à la sécrétion des cytokines et des neuromédiateurs (Duitman EH *et al.*, 2011 ; Stanley AC and Lacy P, 2010 ; Burgoyne RD and Clague MJ, 2003). En effet, l'augmentation de la concentration en calcium dans la cellule va conditionner trois mécanismes de formation de vésicules de transport intracellulaire (l'endocytose médiée par les clathrines, exo-endocytose *Kiss and run* et l'endocytose « en vrac ») (Yamashita T, 2012).

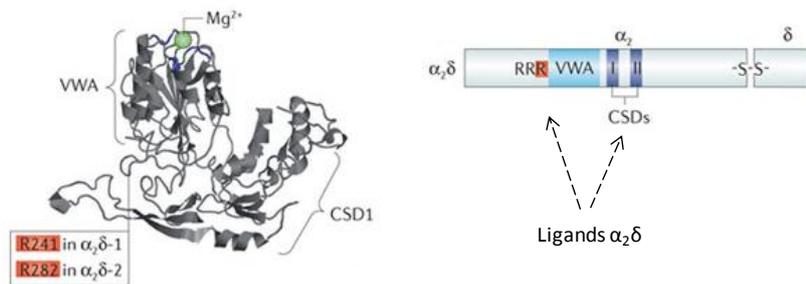
Dans les cellules excitables telles que les neurones, il a été mis en évidence que l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire et la présence des CCVD étaient des pré-requis essentiels pour la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons pré-synaptiques (Sitges M and Galindo CA, 2005). Dans les cellules non excitables telles que les macrophages, le calcium nécessaire à l'exocytose semble pour la majorité être importé par les canaux SOCC (*store-operated calcium channel*) (Parekh AB and Putney JW, 2005) et par les réserves contenues dans le RE. Assez peu de données sont connues

quand à l'implication de CCVD dans ce mécanisme. Cependant, il a récemment été mis en évidence que les CCVD étaient présents sur des cellules non-excitables telles que les cellules dendritiques et les macrophages, et pourraient ainsi prendre part à l'exocytose des cytokines (Gupta S *et al.*, 2009). Dans notre travail, nous avons pu mettre en évidence par Western Blot et par cytométrie en flux, la présence de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  sur les PEC's (Figure 48). Afin de vérifier le rôle de ces sous-unités dans le mécanisme d'exocytose, il faudrait stimuler des PEC's avec du LPS et bloquer les canaux SOCC (par le gadolinium par exemple) et/ou les CCVD (par les ligands  $\alpha_2\delta$ ). Le dosage de cytokines dans le surnageant de cultures reflétera alors le niveau d'exocytose de ces cellules dépend de l'un ou de l'autre de ces canaux. La stimulation des PEC's peut également être réalisée en présence d'un inhibiteur de la transcription (l'actinomycine D ou l' $\alpha$ -amanitine par exemple), ainsi le dosage de cytokines reflétera uniquement l'effet des gabapentinoïdes sur l'exocytose, et non sur la néo-synthèse contrôlée par la voie NF- $\kappa$ B.

## C.2 Effet des gabapentinoïdes sur l'expression membranaire de la sous-unité $\alpha_2\delta-1$

Nos données suggèrent que l'HSC inflammatoire induite, *in vivo*, entraîne une augmentation de l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  au niveau du tissu inflammé (côlon et vessie) qui est bloquée par un traitement chronique à la PGB (Figure 57). Cette diminution de l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  par les gabapentinoïdes est en accord avec les données récentes de la littérature. En effet, les ligands  $\alpha_2\delta$  entraînent une diminution de l'expression membranaire des sous-unités  $\alpha_2\delta-1$  dans des modèles de douleur neuropathique et des sous-unités  $\alpha_1$  dans des systèmes d'expression hétérologue (Bauer CS *et al.*, 2010 ; Hendrich J *et al.*, 2008). Ce mécanisme passe par une inhibition du recyclage à la membrane de ces protéines, après leur passage dans l'appareil de Golgi en impliquant la protéine Rab11 mais n'affecte pas le phénomène d'endocytose de ces sous-unités des CCVD (Tran-Van-Minh A and Dolphin AC, 2010). Cependant, ce mécanisme n'a été montré qu'*in vitro* avec un système hétérologue d'expression de cellules transfectées avec une protéine Rab11 dominant-négatif dans lequel la GBP perd sa capacité à diminuer l'expression membranaire d' $\alpha_2\delta$ . La présence d'une protéine Rab-4 dominant-négatif, ne modifie pas cette propriété de la GBP, ce qui indique que les gabapentinoïdes ne modulent pas la voie de recyclage rapide Rab4-dépendante qui ne passe ni par l'appareil de Golgi, ni par le RE. Il serait maintenant intéressant d'approfondir le mécanisme par lequel les ligands  $\alpha_2\delta$  bloquent le recyclage membranaire Rab11-dépendant. Pour cela, nous pourrions confirmer que la liaison des gabapentinoïdes aux sous-unités  $\alpha_2\delta-1$  perdure lors de l'endocytose de cette sous-unité. Ensuite, il faudrait étudier comment les gabapentinoïdes

peuvent bloquer l'action de Rab11 sur le recyclage membranaire d' $\alpha_2\delta$ -1 et d' $\alpha_1$ , même si l'hypothèse d'une modification de conformation et d'un masquage d'un site essentiel par les ligands  $\alpha_2\delta$ , soit la plus vraisemblable. En effet, la liaison entre les gabapentinoïdes et  $\alpha_2\delta$ -1 se fait au niveau d'un motif RRR (trois arginines) présent sur cette sous-unité (Field MJ *et al.*, 2006) (Figure 56). La boucle qui contient ce motif RRR est proche des domaines ancestraux CSD (*chemosensory-like domains*), où peuvent se lier des molécules endogènes telles que la leucine et la plupart des autres acides aminés neutres (Brown JP and Gee NS, 1998). Les données de la littérature suggèrent que la liaison des gabapentinoïdes se ferait en réalité sur ces deux domaines juxtaposés. De plus, de part la proximité de ces domaines CSD avec le domaine VWA (*von Willebrand factor A*), il est fort probable que la fixation de molécules endogènes ou de gabapentinoïdes influence l'activité de ce domaine. Ce domaine VWA, contient un motif MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*), qui est essentiel à l'affichage membranaire des  $Ca_v$  par les sous-unités  $\alpha_2\delta$ . En effet, une mutation dans ce motif entraîne une rétention intracellulaire des sous-unités principales  $\alpha_1$  (Canti C *et al.*, 2005). Bien que le mécanisme par lequel les sous-unités  $\alpha_2\delta$  régulent l'affichage membranaire des sous-unités  $\alpha_1$  ne soit pas complètement élucidé, il est admis que l'interaction entre ces deux domaines est essentielle.



**Figure 56 : Modèle structurel de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1.**

Le motif de RRR, essentielle pour la liaison de la gabapentine, est situé sur une boucle juste avant le domaine VWA (*von Willebrand factor A*) représenté en bleu clair. Ce domaine VWA, porte un motif MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*), essentiel à l'affichage membranaire des sous-unités principales  $\alpha_1$  par les sous-unités  $\alpha_2\delta$ . A proximité de ce domaine VWA se trouvent des domaines ancestraux nommés CSDs (*chemosensory-like domains*). Les données de la littérature suggèrent que la liaison des gabapentinoïdes se ferait au niveau du motif RRR et des domaines CSDs. D'après Dolphin AC, 2012b.

Des preuves selon lesquelles le transport intracellulaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 peut conditionner l'expression membranaire des CCVD et ainsi moduler la sécrétion de neurotransmetteurs, ont également été trouvées dans un autre contexte, celui de la maladie du Prion (maladie de Creutzfeldt-Jakob). En effet, il a été mis en évidence que la rétention de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ -1 dans le réticulum endoplasmique (par une version mutée de la protéine prion) entraîne une diminution de l'expression membranaire des canaux calciques voltage-dépendants et une diminution des influx calciques pré-synaptiques, responsables d'un défaut de l'exocytose du glutamate (bloquant ainsi la transmission glutamatergique) (Senatore A *et al.*, 2012).

Ainsi de part leur site de fixation, les gabapentinoïdes pourraient moduler l'activité du domaine VWA (modification de conformation, modification de leur charge, etc.), empêchant l'action de Rab11 et ainsi inhiber l'expression membranaire des canaux  $Ca_v$  et de leurs sous-unités auxiliaires.

### C.3 Ligands $\alpha_2\delta$ et sous unités $\alpha_1$

---

Dans la mesure où les ligands  $\alpha_2\delta$  se lient majoritairement aux sous-unités  $\alpha_2\delta-1$  (voir  $\alpha_2\delta-2$ ), seule l'expression membranaire des sous-unités  $\alpha_1$  auxquelles elles sont associées va être affectée par ces ligands. Cependant aucune des données actuelles établit clairement les couples  $\alpha_1 / \alpha_2\delta$ , et il est fort probable que ces associations soient tissu- voir types cellulaires-dépendantes.

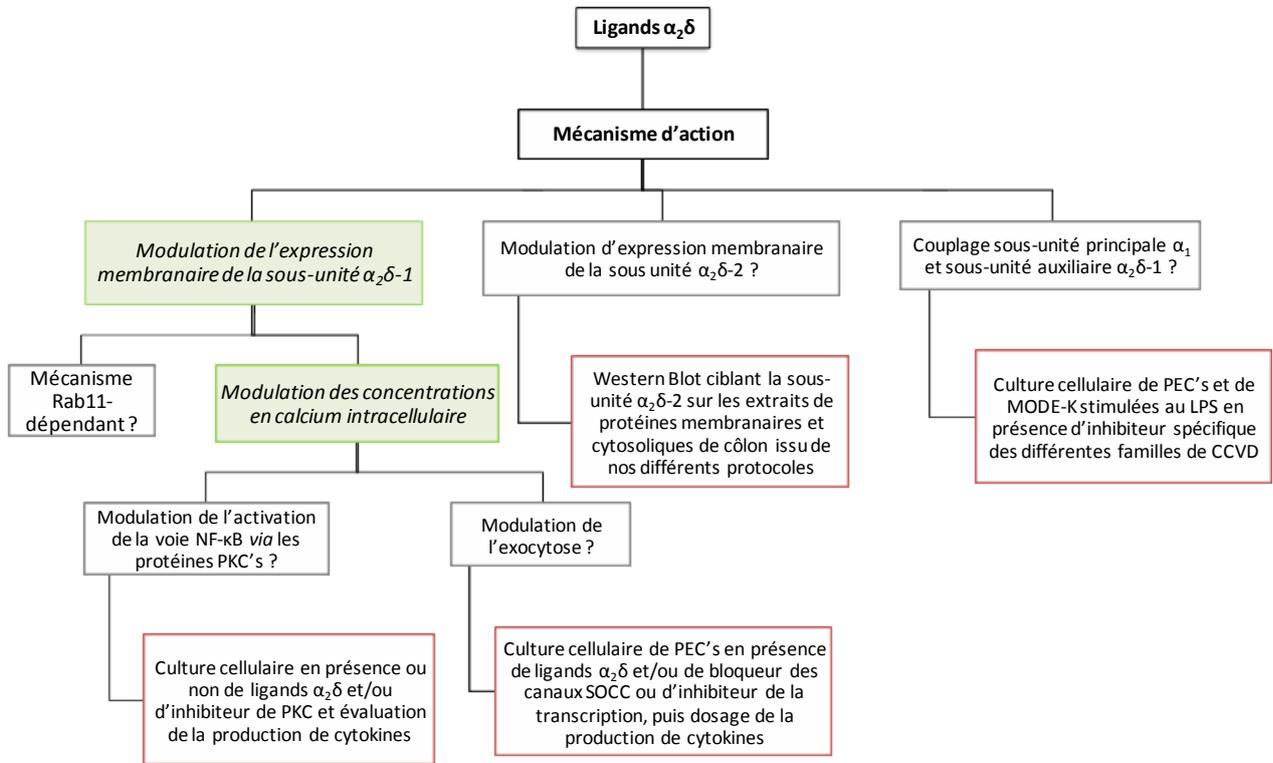
Des travaux ont pu mettre en évidence une association fonctionnelle du canal  $Ca_v2.2$  avec la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  au niveau des neurones myentériques (la PGB n'a plus d'effet sur les courants calciques en cas de blocage préalable des canaux  $Ca_v2.2$  par l' $\omega$ -conotoxine) (Needham K *et al.*, 2010). Bien que l'association avec le canal  $Ca_v2.2$  semble être à privilégier au niveau colique, les autres canaux calciques peuvent également être régulés. Afin de déterminer quelles sous-unités  $\alpha_1$  peuvent être associées aux sous-unités auxiliaires  $\alpha_2\delta-1$ , il faudrait réaliser des protocoles de cultures cellulaires similaires à ceux présentés dans cette thèse en utilisant des inhibiteurs spécifiques des différents sous-types de canaux calciques. Dans un premier temps il faudrait réaliser des cultures de PEC's, les stimuler au LPS et les traiter par un antagoniste calcique puis doser la production de cytokines. Si ces antagonistes montrent la même capacité que les ligands  $\alpha_2\delta$  à inhiber la production de cytokines, il serait alors intéressant de les tester *in vivo*, sur un modèle d'HSC inflammatoire. Les données de la littérature indiquent que la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  pourrait être liée aux canaux  $Ca_v1.1 / 1.2 / 2.2 /$  ou encore 2.3. Les premières molécules à tester seront donc, respectivement, les dihydropyridines (inhibiteur non spécifique des canaux  $Ca_v1$ , tout comme les benzothiazépines ou encore le phenylalkylène), l' $\omega$ -conotoxine GVIA et le SNX-482 (Figure 57).

### C.4 Ligands $\alpha_2\delta$ et sous-unité $\alpha_2\delta-2$

---

Des modulations de l'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta-2$  ont été retrouvées dans des contextes de douleurs neuropathiques. Sa localisation au niveau des neurones GABAergiques du SNC et son affinité pour les gabapentinoïdes, suggèrent qu'elle pourrait également prendre part aux effets antinociceptifs des ligands  $\alpha_2\delta$ . Cependant, la majorité des études ont mis en évidence que les effets des gabapentinoïdes passaient par la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$ . Ainsi, un travail précise la perte des effets antinociceptifs de ces molécules chez des souris possédant une sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  non-fonctionnelle (Field MJ *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant de vérifier si, dans nos conditions, les ligands  $\alpha_2\delta$

affectent également l'adressage membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta-2$ . Pour cela, il faudrait réaliser les mêmes quantifications par Western Blot et les mêmes immunomarquages que ceux présentés pour  $\alpha_2\delta-1$  mais avec des anticorps dirigés contre  $\alpha_2\delta-2$  (Figure 57).



**Figure 57 : Mécanismes d'action des ligands  $\alpha_2\delta$**

En vert les données obtenues durant cette thèse, en rouges les perspectives

## Chapitre D : Conclusion générale

Nos travaux ont permis de valider que les ligands  $\alpha_2\delta$  pouvaient présenter un intérêt dans le traitement des douleurs viscérales notamment coliques. Contrairement à ce qui est classiquement admis, elles se sont révélées plus efficaces en conditions inflammatoires, permettant ainsi de souligner les effets anti-inflammatoires de ces molécules. Cette propriété a ensuite été confirmée *in vitro*, dans des cultures cellulaires de macrophages péritonéaux mais également de cellules épithéliales. Concernant les mécanismes sous-tendant ces effets, l'hypothèse d'une diminution de la concentration en calcium intracellulaire, due à une diminution de l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$ , a pu être avancée *in vitro* et *in vivo*.

En effet, au niveau cellulaire, les ligands  $\alpha_2\delta$  entraînent une diminution de l'adressage membranaire des sous-unités  $\alpha_2\delta-1$  et des sous-unités  $\alpha_1$ , donc des CCVD. Cette diminution a pour conséquence un affaiblissement des courants calciques entrants dans la cellule. La baisse de calcium intracellulaire entraîne une diminution de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et une moindre formation de vésicules d'endocytose. L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B entraîne une baisse de la production de médiateurs pro-inflammatoires et de l'endo-exocytose ce qui conduit à une diminution de la libération de ces médiateurs inflammatoires mais également des neuromédiateurs. Ceci a pour conséquence une sollicitation moins importante des cellules immunitaires et épithéliales qui activeront moins les cellules environnantes immunitaires mais également neuronales. Les terminaisons des fibres afférentes primaires sont alors moins stimulées et donc moins excitables.

Les gabapentinoïdes vont également bloquer le transport antérograde de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  et donc des CCVD au niveau pré-synaptique d'où la diminution de la libération de neurotransmetteurs tel que le glutamate, la noradrénaline, la substance P ou encore de CGRP dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les ligands  $\alpha_2\delta$  conduisent donc à une diminution de l'excitabilité neuronale post-synaptique entraînant, une baisse de la fréquence des potentiels excitateurs post-synaptiques. De plus, ces molécules peuvent également agir sur les cellules de la microglie, limitant alors leur effet sensibilisant sur les terminaisons synaptiques.

Les perspectives thérapeutiques de ce travail sont très intéressantes puisqu'elles ouvrent le champ d'utilisation des gabapentinoïdes aux douleurs viscérales d'origine inflammatoire ou ayant une composante inflammatoire. Cela nécessitera probablement une sélection des patients qui pourra être effectuée grâce au dosage de marqueurs fécaux de type calprotectine. Cela pourra peut-être contribuer à une « réhabilitation » de ces substances auprès des gastro-entérologues qui, pour

le moment, ne perçoivent pas ces produits comme pertinents notamment dans le traitement de la douleur abdominale liée au SII.

# Matériel & Méthodes

*\*Chapitre A  
Tests comportementaux*

*\*Chapitre B  
Evaluation de l'inflammation*

*\*Chapitre C  
Analyses protéique*

*\*Chapitre D  
Culture cellulaire*

*\*Chapitre E  
Analyses statistiques*



## Chapitre A : Tests comportementaux

Des souris mâles C57Bl/6J (Laboratoires Janvier, Le Genest Saint Isle, France) pesant 20-24g le jour de l'expérimentation sont utilisées dans toutes les expérimentations décrites dans ce mémoire. Les animaux sont stabulés par groupes de 8 par cage en cycle jour / nuit 12h / 12h dans une animalerie EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Les animaux reçoivent un régime alimentaire standard. Eau et nourriture sont disponibles *ad libitum*. Chaque expérimentation est réalisée après au moins une semaine d'acclimatation aux conditions de stabulation de l'animalerie. Les expérimentations ainsi que le nombre de tests douloureux subis par chaque animal sont planifiés afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentations présentées dans ce rapport suivent les consignes éthiques de l'*International Association for the Study of Pain* (IASP) (Zimmermann M., 1983) et sont en accord avec les consignes du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (décret n°874848). Les protocoles d'implantation des électrodes, de DCR, ainsi que de Von Frey abdominal sont approuvés par le comité d'éthique régional (respectivement autorisation n° CE08-10, n° CE09-10 et n°CE08-09). Le protocole d'induction d'une hypersensibilité vésicale par injection de cyclophosphamide est en cours de traitement.

### A.I : Evaluation de la sensibilité colique : test de distension colorectale

La DCR est utilisée pour évaluer la sensibilité colique chez la souris. Cette méthode est proche de celle utilisée chez l'homme (Ritchie J. 1973) et consiste en l'inflation d'un ballonnet calibré et rempli d'eau dans le côlon distal des souris. Cette distension va engendrer différentes réponses quantifiables chez l'animal : augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire, augmentation de la pression artérielle et augmentation des contractions abdominales. Cette dernière réponse est facilement mesurable par l'implantation d'électrodes d'enregistrement dans le muscle abdominal grand oblique. L'électromyogramme alors obtenu au moment de la DCR permet de déterminer la VMR, marqueur de la sensibilité colique des animaux (Christianson JA and Gebhart GF, 2007).

#### A.I.a. Implantation des électrodes

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine (100mg/kg) / Xylazine (10mg/kg) (rapport 4/1, v/v dans du NaCl 0.9%) puis tondus au niveau de l'abdomen (zone d'implantation) et de la nuque. Les zones de tonte sont nettoyées 5 fois à l'alcool à 90° et à la Bétadine® dermique à 10%. L'opération est réalisée sur une plaque chauffante afin d'éviter une

diminution trop importante de la température corporelle, et du sérum physiologique est régulièrement déposé sur les yeux afin d'éviter qu'ils sèchent.

Une incision d'un centimètre du plan cutané est pratiquée au niveau de l'abdomen. Après avoir dilacéré les aponévroses du côté de l'implantation, deux électrodes (30cm environ) (Nikrothal 80, Kanthal, Suède) sont implantées et maintenues en place dans le muscle. L'extrémité libre des électrodes est passée sous la peau de l'animal jusqu'à la nuque où une petite incision a été préalablement réalisée. L'ouverture abdominale est refermée par deux points en U maintenus par des nœuds de chirurgien (Fil Ethicon®3-0) et la plaie nettoyée à l'aide de Bétadine® à 10% en gel. Au niveau de la nuque, les électrodes sont maintenues à l'aide d'un point de suture (Fil Ethicon®5-0) réalisé dans le tissu adipeux du cou. Un morceau de cathéter, dans lequel ont été introduites les électrodes, est fixé à la peau de l'animal par trois points simples avec des nœuds en demi-clefs (Fil Ethicon®3-0) et la plaie (sous le cathéter) est nettoyée à l'aide d'une pommade antibiotique (Auréomycine 2%). Les électrodes sont ensuite enroulées autour du cathéter et maintenues à l'aide d'un morceau de compresse et de ruban adhésif.

Les animaux sont laissés sous une lampe jusqu'au réveil puis stabulés individuellement jusqu'au jour du test afin d'éviter la dégradation des électrodes par leurs congénères.

#### *A.I.b. Distension ColoRectale : DCR*

---

Quatre jours après l'implantation des électrodes, les animaux sont placés en habitude dans le système de contention durant les 3h précédant le test de DCR. La phase d'habitude permet non seulement de diminuer le stress des animaux au moment du test comportemental mais également l'évacuation des fèces, facilitant ainsi l'introduction de la sonde dans le côlon.

Les animaux sont ensuite légèrement anesthésiés à l'isoflurane 2.5% (dans 3L/min d'air) pour permettre de retirer le ruban adhésif et la compresse maintenant les électrodes sur le cathéter au niveau de la nuque. La sonde de distension (Cathéter Fogarty pour embolectomie artérielle taille 4, Edward Lifesciences) est introduite dans le côlon distal de sorte que le ballonnet se situe à 1cm de la marge anale. La sonde est maintenue en place avec du ruban adhésif. Au cours de l'anesthésie une électrode de référence est également introduite dans la queue de l'animal. Une fois préparé, l'animal est replacé dans la cage de contention et laissé au moins 30 minutes en habitude. Durant cette période, les électrodes sont branchées aux amplificateurs de signal, eux-mêmes reliés à une interface permettant l'intégration du signal numérique à l'aide du logiciel LabChart 7 (Ad Instruments). Ce logiciel permet d'afficher les différences de potentiel (reflétant les contractions abdominales) entre les deux électrodes en temps réel. Ce signal brut est alors traité en appliquant tout d'abord un filtre

passé à 100Hz puis positif et enfin lissé afin d'obtenir une courbe qui nous permet de déterminer la VMR pour chaque point de distension. La VMR est calculée pour chaque point de distension en soustrayant l'aire sous la courbe de la ligne de base (10 secondes précédant la stimulation) à l'aire sous la courbe durant les 10 secondes de stimulation.

## A.II. : Evaluation de la douleur vésicale référée : Von Frey

Le test de Von Frey utilisé suit le principe de la « *up and down method* » publiée par Chaplan en 1994 (Chaplan *et al.*, 1994). Les animaux sont placés sur un support grillagé et isolés les uns des autres par des séparateurs en plexiglas. Après environ 1h d'habituation, le test débute en utilisant le filament de taille 3.22 (soit 0.16g), qui correspond à la taille intermédiaire de la gamme de filaments (Bioseb, France). Le filament est alors appliqué perpendiculairement au niveau de la vessie de l'animal, en exerçant une force suffisante pour le fléchir durant une période 6 secondes. Deux possibilités de réponses :

- Si l'animal réagit (retrait, léchage, etc.), cette réponse est notée « X » et le test continue avec le filament de taille inférieure dans la gamme (2.83 / 0.07g).
- Si l'animal ne réagit pas, cette réponse est notée « O » et le test continue avec le filament de taille supérieure dans la gamme (3.61 / 0.4g).

Ce schéma continue jusqu'à ce que la réponse objectivée de l'animal change par rapport à la première réaction observée lors de l'application du filament 3.22. A partir de ce moment là, quatre filaments sont appliqués (toujours selon la même méthode) et le test est terminé (Figure 49).

Taille Filaments	2.36	2.44	2.83	3.22	3.61	3.84	4.08	4.17
Force (g)	0.02	0.04	0.07	0.16	0.4	0.6	1	1.4
Souris n°1	1			O				
	2				O			
	3					X		
	4					X <sub>1</sub>		
	5				O <sub>2</sub>			
	6					O <sub>3</sub>		
	7						X <sub>4</sub>	
Motif	OOXXOOX							
Score	-0.763							
Seuil de réponse 50 %	0.23g							

Figure 58 : Exemple de résultats du test de Von Frey selon le principe de *up and down*.

Le motif ainsi obtenu correspond à un score disponible dans l'appendice de la publication de Chaplan. Enfin, grâce à la formule de Dixon (Dixon WJ, 1980), il est possible de calculer le seuil de réponse 50% : seuil de réponse =  $(10^{[Xf + k\delta]})/10000$ , avec Xf : taille du dernier filament appliqué (ici

3.84),  $\kappa$ : score (ici -0.763) et  $\delta$  : différence moyenne entre les stimuli (ici : 0.62), ce qui donne un seuil de réponse de 0.23g.

### A.III : Evaluation de l'activité locomotrice : Actimétrie

Ce test est réalisé afin de déterminer si la PGB a un impact sur la fonction locomotrice des animaux. En effet, certaines molécules peuvent avoir un effet sédatif potentiellement inducteur de biais dans les tests comportementaux de sensibilité. Le test d'actimétrie consiste à placer les animaux en champ libre dans des compartiments individuels (25cm x 25cm) équipés sur chaque face de cellules photoélectriques et disposées en vis-à-vis de sorte que chaque passage de l'animal au travers du faisceau situé entre deux cellules soit dénombré. Le total des interruptions de faisceaux est mesuré durant 15 minutes (Actisystem, Apelex, Passy, France).

## Chapitre B : Evaluation de l'inflammation

### B.I : Score DAI : *Disease Activity Index*

Afin d'évaluer l'état général des animaux, et l'impact que les ligands  $\alpha_2\delta$  peuvent avoir dessus, le score DAI est établi quotidiennement en prenant en compte le pourcentage de perte de poids des animaux, la consistance des selles et la présence ou non de sang dans les selles. Chaque paramètre est noté selon un score de 0 à 4 et la somme de ces scores permet de calculer le score DAI (*Tableau 12*).

	Score	Caractéristiques
<b>Perte de Poids</b>	0	Pas de perte de poids
	1	1 à 5% de perte de poids
	2	5 à 10% de perte de poids
	3	10 à 20% de perte de poids
	4	>20% de perte de poids
<b>Consistance des Fèces</b>	0	Consistance normale
	1	Selles molles
	2	Diarrhée aqueuse
	3	Diarrhée aqueuse avec ou non présence de sang
	4	Diarrhée sévère et présence de sang
<b>Sang dans les Fèces</b>	0	Pas de sang
	2	Présence de sang au test Hemocult II
	4	Sang visible

Tableau 12 : Table d'évaluation du score de maladie, DAI *Disease Activity Index*

## B.II : *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* : ELISA

Les dosages ELISA sont réalisés sur différentes matrices qui reçoivent un traitement préalable différent :

### Le plasma :

Le sang est prélevé par ponction rétro-orbitaire puis centrifugé (5500rpm, 30 minutes, 4°C) afin de récupérer le plasma qui est alors conservé à -20°C jusqu'au dosage.

### Le surnageant de tissu :

Une fraction (préalablement pesée) de tissu d'intérêt (partie distale du côlon ou vessie) est incubée dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, #D5796, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplémenté de 10% d'un cocktail d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, #P11-010, PAA, Autriche), dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après une nuit d'incubation, le surnageant est prélevé, conservé à -20°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines mesurées sont ensuite ramenées au poids du tissu mis en culture.

### Le surnageant de culture de cellules :

Le surnageant de culture est prélevé suivant les différentes cinétiques étudiées et conservé à -20°C jusqu'au dosage.

### Les fèces :

Cinquante à 100 mg de fèces sont dilués dans 1mL de tampon *Phosphate Buffer Saline* 1X (PBS), puis centrifugés (13000rpm, 10min). Le surnageant est récupéré et servira de matrice pour le dosage de la lipocaline-2, dont les concentrations sont ramenées au poids de fèces dilués initialement.

Les kits de dosage utilisés sont des kits Duo Set de chez R&D (IL-6 # DY 406 ; KC # DY 453 ; TNF- $\alpha$  # DY 410 et LCN-2 # DY 1857, Minneapolis, USA) qui utilisent la technique des « sandwichs » en phase solide. Pour cela un anticorps primaire monoclonal est fixé au fond des puits d'une microplaque 96 puits (Plaques maxisorp F96 x60, #55133, Thermo Scientific, Brumath, France) durant une nuit. Après rinçage, les puits sont saturés à l'aide de BSA à 1% durant 1h, puis les échantillons (dilués au 1/5), ainsi qu'une gamme d'étalonnage sont déposés et incubés durant 2h. Après une nouvelle étape de 3 rinçages, un anticorps biotinylé est incubé pendant 2h dans les puits. Une dernière étape de 3 lavages est réalisée et un substrat chromogène, la streptavidine-horseradich peroxydase, est ajouté dans les puits et va se fixer à la biotine. Enfin, une solution substrat (0.1mg/ml de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine -TMB- et 0.003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dilué dans du tampon acétate, pH 6) est

ajoutée afin de révéler l'activité peroxydase, et une coloration bleue se développe durant 20 min et se transforme en jaune après ajout de la solution stop ( $H_2SO_4$  à 1,2M).

La lecture de la densité optique (DO) à 450nm est ensuite réalisée par un lecteur de microplaques (EpochTM, BioTek® Instruments).

### B.III : Dosage de l'activité enzymatique de la myéloperoxydase

---

A la fin de chaque expérimentation, l'organe d'intérêt (partie distale du côlon ou vessie) est prélevé, congelé dans l'azote liquide puis conservé à  $-80^{\circ}C$  jusqu'au dosage.

Le jour du dosage, les échantillons (préalablement pesés) sont broyés dans un tampon PBS supplémenté avec 0.5 % de hexdecyltriméthylammonium bromide (# 52365, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) à raison de 1ml/50mg de tissu. Trois cycles de congélations ( $-80^{\circ}C$ ) / décongélations ( $37^{\circ}C$ ) sont réalisés afin de dénaturer les protéines. Le lysat est centrifugé (14000rpm, 15min) et le surnageant collecté. Le dosage de la MPO est réalisé en incubant 50 $\mu$ L de surnageant en présence de 200 $\mu$ L de tampon phosphate contenant du  $H_2O_2$  à  $0,5 \times 10^{-4}\%$  et de l'o-dianisidine dihydrochloride à 0,167mg/ml (# D 3252, Sigma Aldrich, Saint Louis, UvSA). La réaction colorimétrique induit des modifications d'absorbance à 460nm mesurées par spectrophotométrie (EpochTM, BioTek® Instruments).

L'activité de la MPO dans les échantillons est mesurée en fonction de l'activité du standard (MPO standard) et les données sont présentées en tant qu'unité par gramme de tissu.

### B.IV : Analyse histologique

---

#### *B.IV.a : Fixation des tissus*

---

Après sacrifice, la partie distale du côlon ou le dôme de la vessie sont fixés au formaldéhyde 4% pendant 24h puis rincés dans du PBS à 0.1% durant 24 h minimum avant d'être inclus en paraffine.

#### *B.IV.b : Inclusion et coupe des tissus*

---

Pour cela, les échantillons sont placés dans un automate d'inclusion en paraffine réalisant un cycle automatique de déshydratation en éthanol et d'imprégnation en toluène puis en paraffine (Microm STP120, Microm, France). Les tissus imprégnés de paraffine sont ensuite inclus en blocs à l'aide d'un distributeur de paraffine (Microm EC-350-1, Microm, France).

Les blocs de paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome (Microm HM-340-E, Microm, France) en tranches de 5µm d'épaisseur déposées sur des lames (SuperFrost Plus, MenzelGläser, France), séchées une nuit à 37°C puis conservées à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

#### B.IV.c : Coloration Hématoxyline / Eosine

Après déparaffinage dans du xylène, les coupes sont réhydratées dans des bains d'alcool successifs de titres décroissants puis à l'eau. La coloration hématoxyline/éosine est une coloration dite « topographique » qui consiste en une première coloration nucléaire à l'hématoxyline puis après rinçage une seconde coloration des cytoplasmes à l'éosine. Le montage des lames est réalisé en milieu aqueux.

#### B.IV.d : Analyses des images et score histologique

Les lames sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope AxioScope A1 équipé d'une caméra digitale (Zeiss, France). L'analyse des images est réalisée avec le logiciel AxioVision 4.8 (Zeiss, France).

En ce qui concerne les échantillons de vessie, l'épaisseur de la muqueuse est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ-win32.

Pour les échantillons de côlon, un score est établi en double aveugle, en tenant compte de la présence ou non de lésion épithéliale, de l'étendue de ces lésions et de l'infiltration de cellules inflammatoires (Tableau 13).

Symptôme	Score	Caractéristiques
<b>Atteinte de l'épithélium</b>	0	Aucune atteinte
	1	Lésion épithéliale légère et locale
	2	Erosion de la muqueuse / Ulcération
	3	Lésion profonde de la muqueuse
<b>Surface de l'atteinte de l'épithélium</b>	0	Aucune atteinte
	1	Une zone unique
	2	Plusieurs zones
	3	Entière
<b>Infiltration de cellules inflammatoire</b>	0	Cellules inflammatoires rares dans la <i>lamina propria</i>
	1	Présence de Cellules inflammatoires dans la <i>lamina propria</i>
	2	Cellules inflammatoires à confluence qui s'étendent dans la sous-muqueuse
	3	L'extension transmurale de l'infiltrat de cellules inflammatoires

Tableau 13 : Score histologique

## Chapitre C: Analyse protéique

### C.I Extraction protéique et Western Blot

#### *C.I.a : Extraction protéique totale*

---

Après sacrifice, la partie du côlon distal ou la vessie des animaux sont prélevée, congelée dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. De même, les biopsies coliques des patients sont cryo-conservées dès leurs prélèvements.

Les prélèvements sont broyés sur glace dans du tampon de lyse (300µl pour les morceaux de côlon, 200 µL pour les vessies et 200µL pour les cultures cellulaires) constitué de Tris-HCl pH7,4 à 50mM, d'EDTA à 0,5mM (acide éthylène diamine tétraacétique, #E5134, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), de Triton 100X à 1%, de PMSF à 0,5mM (Phenylmethanesulfonyl fluoride, #P7626, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) en DMSO, d'aprotinine (#A6279, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) à 100UI/ml et de leupeptine à 20µM (#SP-04-2217-B, Euromedex). Les échantillons sont ensuite passés au sonicateur durant 2min dans un bain glacé puis incubés sur la glace pendant 20min. Après centrifugation (14000rpm, 20min, 4°C), le surnageant de chaque échantillon est récupéré et conservé afin d'être dosé et dénaturé (D.III.a.3).

#### *C.I.b : Extraction protéique différentielle*

---

Cette extraction différentielle est réalisée grâce au kit Millipore «*Compartment Protein Extraction Kit*» (#2145, Millipore, Darmstadt, Allemagne), qui permet de différencier les protéines membranaires des protéines cytoplasmiques et nucléaires.

Les tissus (préalablement pesés), sont broyés dans le *buffer C* (à raison de 2ml de *buffer/g* de tissu), puis laissés à incuber durant 20min à 4°C, avant d'être centrifugés (14000rpm, 20min, 4°C). Le surnageant est collecté et contient les protéines cytoplasmiques. Après rinçage du culot (à l'aide du *buffer W*), il est repris avec du *buffer N* (1mL de *buffer/g* de tissu). Après 20min d'incubation et une centrifugation (14000rpm, 20min, 4°C), les protéines nucléaires contenues dans le surnageant sont récupérées et additionnées aux protéines cytoplasmiques. Enfin, les culots sont re-suspendus à l'aide du *buffer M* (1mL/g de tissu) et incubés durant 20 min puis centrifugés (14000rpm, 20min, 4°C). Le surnageant contenant les protéines membranaires est alors récupéré et conservé.

### C.I.c : Dosage et dénaturation des protéines

La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée sur 50µL d'une dilution au 1/5 du surnageant à l'aide du kit *Pierce® BCA protein assay* (# 23225, Thermo Scientific, France). Afin de dénaturer les échantillons et de pouvoir les visualiser lors des dépôts, ils sont additionnés de 15% de bleu de bromophénol/ $\beta$ -mercapto-éthanol et de 38% de tampon de reprise (12% de SDS) avant d'être incubés 5min à 100°C. Les échantillons peuvent ainsi être conservés à -20°C jusqu'à la réalisation du western blot.

### C.I.d : Western Blot

Les protéines (50 µg pour les extractions totales et 20 µg pour les extractions différentielles et les protéines extraites de culture cellulaire) sont séparées sur gel SDS-polyacrylamide (dont le maillage est adapté à la taille de la protéine ciblée) avec l'appareillage Mini-Protean3 Cell (BioRad, France) et transférées sur membranes de PVDF (#88520, Millipore) en milieu liquide. Après blocage des membranes pendant 2h à température ambiante dans un tampon *Tris Buffer Saline* (200mM de Tris, 1400mM de NaCl, pH7.6)-Tween 20 à 0.1% (TBS-T) contenant 5% de lait en poudre écrémé, les membranes sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans du TBS-T /Régilait® 5% (Tableau 14). Les membranes sont ensuite lavées 3 fois pendant 5min en tampon TBS-T puis incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase dilué au 1/10000 (Thermoscientific, France). Après 3 lavages de 5min en TBS-T, le signal est révélé avec une solution d'ECL (Interchim, France).

L'intensité des bandes immunoréactives est quantifiée avec le logiciel ImageLab (BioRad) et normalisée par rapport à l'intensité de la protéine de référence.

Protéines Cibles	Anticorps Primaire	Poids Moléculaire	Dilution	Anticorps Secondaire
p65 Phosphorylée	p.NF- $\kappa$ B p65 (ser 276), sc-101749	65 KDa	1/500	
I $\kappa$ B $\alpha$	I $\kappa$ B $\alpha$ (C-21), sc-371	35-41 KDa	1/500	
COX-2	Cox-2 (M-19), sc-1747	70-72 KDa	1/1000	Pierce® <i>goat-anti-rabbit</i> IgG, # 31460
$\alpha$ 2 $\delta$ 1	Cac $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (H-147), sc-98693	123 KDa	1/500	
EGFR	EGFR (1005), sc-03	170 KDa	1/1000	
$\beta$ -actine	$\beta$ -actine, A5441	42 KDa	1/5000	Pierce® <i>goat-anti-mouse</i> IgG, # 31430

**Tableau 14 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés dans ces travaux**

### C.I.e : Destripping

---

La protéine I $\kappa$ B $\alpha$  se trouvant à la même taille que la protéine de référence  $\beta$ -actine, une étape supplémentaire de *destripping* est réalisée. Elle est effectuée après révélation des bandes immunoréactives obtenue pour l'anticorps I $\kappa$ B $\alpha$ , et permet de laver la membrane de tous les anticorps fixés. Pour cela, la membrane est incubée 2 fois 10min dans du tampon réalisé dans de l'eau ultra pure et contenant 1.5% de glycine (#26-128-6405-C, Euromedex, Mundolsheim, France), 0.1 % de SDS (#1012, Euromedex, Mundolsheim, France), 1% de Tween 20 et un pH ajusté à 2.2. La membrane est ensuite rincée durant 30min dans différents bain de PBS puis de TBS-T. Ce traitement permet ensuite de reprendre le Western Blot à partir de l'étape de saturation.

## C.II : Immunohistochimie

---

Le marquage immunohistochimique est réalisé sur des cultures de cellule (décrite au paragraphe suivant) afin de visualiser la phosphorylation du facteur p65 en présence ou non de PGB suite à une stimulation au LPS. Une fois les différents traitements terminés, les cellules sont rincées 3 fois au PBS 0.1M-Triton 0.1% (PBS-T), puis fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4% durant 20min, puis durant 3min avec une solution de méthanol froid. Après rinçage, les cellules sont saturées pendant 1h avec du sérum de chèvre (#UP379030, Interchim, Montluçon, France) dilué à 5% dans du PBS-T. Les cellules sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la forme phosphorylée de p65 (sc- 101749) dilué au 1/1000 dans du PBS-T. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois pendant 5min en tampon PBS-T puis incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/1000 ALEXA 488 IgG *goat anti-rabbit* (#A11008, Invitrogen) et après rinçage, incubées avec du DAPI (afin de marquer les noyaux) durant 20min. Les lames sont ensuite montées en milieux aqueux (*Dako Fluorescence Mounting Medium*, # S3023, Les Ulis, France) et conservées à 4°C dans l'obscurité.

Les lames sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope AxioScope A1 équipé d'une caméra digitale (Zeiss, France). L'analyse des images est réalisée avec le logiciel AxioVision 4.8 (Zeiss, France).

## Chapitre D : Cultures Cellulaires

### D.I : Les macrophages péritonéaux : *Peritoneal exudates cells* : PEC's

#### D.I.a : Mise en culture

Les souris sont euthanasiées par asphyxie dans une chambre hermétiquement fermée et saturée en isoflurane. Une solution de PBS 1X additionnée de 3% de sérum de veau fœtal (SVF, #10270-98, Gibco®, Invitrogen) est injectée dans l'abdomen des animaux (à raison de 5ml/souris). Après avoir massé l'abdomen de l'animal, les cellules exsudées par les tissus sont aspirées et l'opération est renouvelée une seconde fois. Les cellules sont alors comptées sur cellules de Malassez, puis centrifugées (1500rpm, 8 min, 4°C), et le culot repris avec un volume de milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, #D5796, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) complétement avec 10% de SVF, un cocktail d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, #P11-010, PAA, Autriche) à 1% et avec 1% de glutamine (#M11-006, PAA, Autriche), permettant d'obtenir une concentration de  $4 \times 10^5$  cellules/ml. Les cellules sont alors réparties :

- Soit dans des plaques 6 puits (#353046, Falcon, Durham, USA). Au terme des différentes cinétiques de traitement, le surnageant de culture est recueilli afin de doser les cytokines par ELISA (cf. paragraphe D.II.b. *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* : ELISA), et les protéines sont extraites pour le dosage semi-quantitatif par Western Blot (cf. paragraphe C.I Analyses Protéiques).

- Soit dans des *Culture Slides* (#354104 et #354114, BD Falcon, Erembodegem, Belgique) pour l'immunomarquage (cf. paragraphe C.II Immunohistochimie).

#### D.I.b : Traitements

Les cellules sont incubées 24h dans une étuve à 37°C et CO<sub>2</sub> avant toute expérimentation. Pour toutes les données présentées, les cellules sont incubées avec 100 ng/mL de LPS (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et/ou de 17.6 mg de PGB.

#### D.I.c : Imagerie calcique

Afin d'évaluer la quantité de calcium intracellulaire, des PEC's sont incubées avec 2µM d'ester acetoxy-méthyl Fura-2 (Fura-2/AM, Invitrogen) dans une solution de BSA 0,5% contenant (en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 10 Hepes, pH 7.4. Après 1h d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées trois fois. L'effet de la gabapentine (60mg) et de la prégabaline

(17.6mg) sur la quantité de calcium intracellulaire est évalué en pré-incubant les cellules 15 min avec la molécule puis en la co-administrant avec le LPS (1µg/mL) durant 1 min. L'acquisition et l'analyse de la quantité de fluorescence dans chaque cellule sont réalisées à l'aide du système *Metafluor Imaging* (Molecular Devices).

## D.II : Les MODE-K

Afin de savoir si les ligands  $\alpha_2\delta$  agissent sur les cellules épithéliales coliques murines, une culture de MODE-K est réalisée. Pour cela, ces cellules sont mises en culture jusqu'à confluence ( $5 \times 10^5$  cellules par puits) dans un milieu de culture RPMI-1640 medium (#R0883, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) additionné de 1% de sodium pyruvate (#S11-003, PAA, Autriche), de 1% d'HEPES (#S11-001, PAA, Autriche), de 1% de MEM acides aminés (#M11-002, PAA, Autriche), de 0.1% de 2- $\beta$ -mercaptoéthanol (#31350-010, Gibco®, Paisley, UK), de 1% d'antibiotiques et de 1% de glutamine. Après avoir été rincées 3 fois avec du tampon PBS, les cellules sont incubées avec du LPS à 100ng/ml et/ou de la PGB à 17.6mg. Au terme des différentes cinétiques de traitement, le surnageant de culture est recueilli afin de doser les cytokines par ELISA et les protéines sont extraites pour le dosage semi-quantitatif par Western Blot.

## Chapitre E : Analyses Statistiques

Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne. Les valeurs de VMR obtenues à la DCR sont analysées en utilisant une ANOVA à 2 voies (Traitement x Volume) suivi par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples. Les valeurs de Von Frey sont également analysées en utilisant une ANOVA à 2 voies (Temps x Traitement) puis par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples. Les effets des ligands sur chaque paramètre (poids des organes, concentration en MPO, concentration en cytokines, les analyses histologiques et activation de la voie NF- $\kappa$ B) sont analysés par la réalisation d'une ANOVA à 1 voie (Traitement), suivi par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples. La concentration fécale en lipocaline-2 est analysée à l'aide d'une ANOVA à 2 voies (Traitement x Temps) et par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples. Pour la cinétique d'activation de la voie NF- $\kappa$ B, une analyse de variance à 1 voie (temps) suivi d'un test post-hoc de *Dunnett* des comparaisons par rapport à un contrôle (T0) est réalisé. Pour les expériences d'imagerie du calcium les différences statistiques sont évaluées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées comme statistiquement significative lorsque  $P < 0,05$ .

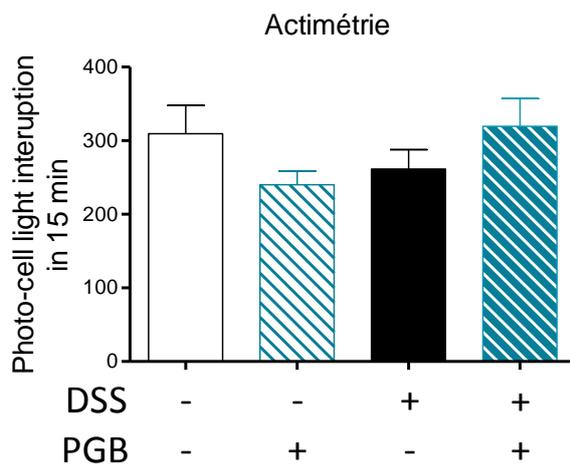
# *Annexes*



## Annexe 1

## Evaluation de l'impact moteur de prégabaline par le test d'actimétrie

Durant le protocole de DSS 1%, deux groupes d'animaux ont également reçu des injections quotidiennes de PGB (30 mg/kg, durant 8 jours, de j7 à j14). Afin d'évaluer si ces injections répétées avaient un effet sédatif sur les animaux, des études comportementales par un test d'actimétrie ont été réalisées. Ce test permet d'évaluer l'activité locomotrice des animaux et est réalisé une heure après la dernière injection de PGB. Les données obtenues ne montrent aucune différence d'activité locomotrice entre les animaux qui ont eu les injections de PGB et ceux qui ont reçu un volume équivalent de sérum physiologique.



**Figure 59 : Impact d'un traitement chronique à la PGB sur l'activité locomotrice des animaux.**

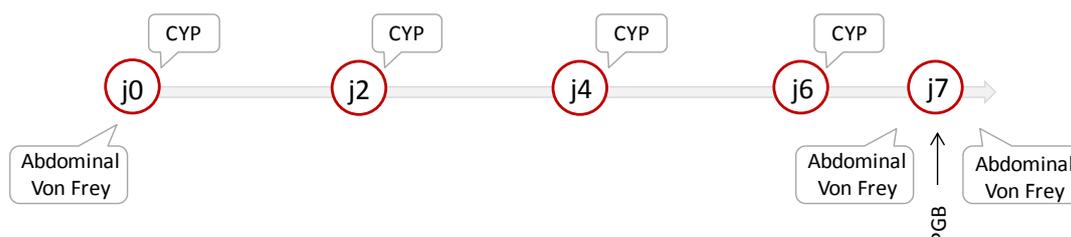
L'eau de boisson des animaux a été additionnée avec 1% de DSS durant 14 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement DSS, les animaux ont reçu des injections quotidiennes de PGB (30mg/kg, sc, ou d'un volume équivalent de sérum physiologique). Une heure après la dernière injection de PGB ou de NaCl, l'activité locomotrice est évaluée durant 15 minutes en dénombrant le nombre d'interruptions des faisceaux photoélectriques disposés sur les parois de l'actimètre. (n=8 / groupe. ANOVA 1 voie Test de Bonferroni post-hoc) (PGB : prégabaline).

Ces résultats indiquent que les données obtenues lors du test de DCR ne sont pas induites par un effet sédatif du protocole d'injection de la PGB (Figure 59).

## Annexe 2

### Modèle chronique de cystite et évaluation de l'effet antinociceptif de la prégabaline par le test de Von Frey abdominal

Ce modèle est induit par quatre injections de cyclophosphamide (CYP), à la dose de 80mg/kg (par voie intrapéritonéale) réalisées à j0, j2, j4 et j6 (Boudes M *et al.*, 2011). La sensibilité mécanique des animaux est évaluée grâce au test de Von Frey abdominal et selon la méthode de « *up and down* ». Ce test est réalisé avant la première injection de CYP afin d'avoir les seuils basaux de réponse des animaux. Le lendemain de la dernière injection (soit à j7), la sensibilité des animaux est à nouveau évaluée puis ceux-ci reçoivent une injection de PGB (30mg/kg, en sous-cutané) ou d'un volume équivalent de sérum physiologique et 1h après un dernier test de Von Frey est effectué (Figure 60). Les animaux sont ensuite sacrifiés afin de doser différents marqueurs inflammatoires.



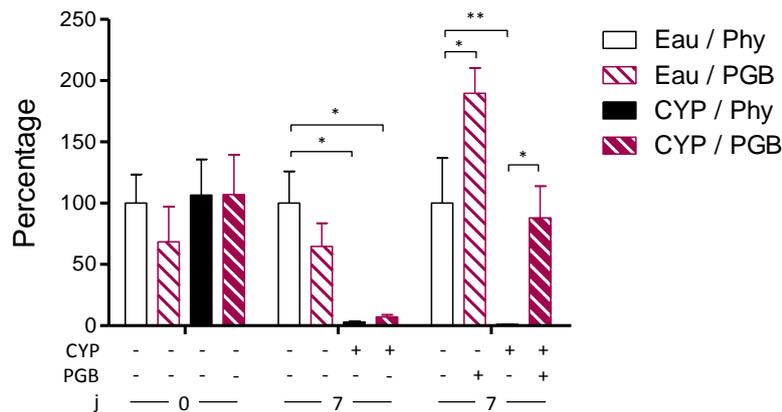
**Figure 60 : Modèle de cystite induit par le cyclophosphamide et protocole d'administration de la PGB**

L'hypersensibilité vésicale est induite par 4 injections de cyclophosphamide (CYP) à la dose de 80 mg/kg en intrapéritonéal à j0, j2, j4 et j6. Le jour suivant la dernière injection (j7), les animaux reçoivent une injection de PGB à la dose de 30mg/kg en sous-cutané (ou d'un volume de sérum physiologique équivalent). La sensibilité des animaux est évaluée par le test de Von Frey abdominal et la méthode « *up and down* » avant la 1<sup>ère</sup> injection de CYP, le jour suivant la dernière injection de CYP (j7) avant l'injection de PGB, et le même jour 1h après l'injection de PGB.

#### *A.1 : Effets de l'injection chronique de PGB sur l'HS viscérale induite par le CYP*

Au niveau basal, les seuils de réponses des animaux sont équivalents entre les 4 groupes. Sept jours après le début du protocole, soit le lendemain de la dernière injection de CYP, les seuils de réponse des animaux qui ont reçu uniquement 4 injections de CYP (côlonne noire et rouge rayée) sont proches de 0 ( $100 \pm 34\%$  vs.  $3,02 \pm 0,59\%$ ,  $p < 0,05$  et  $100 \pm 34\%$  vs.  $7,23 \pm 1,66\%$ ,  $p < 0,05$ , saline/saline vs. CYP/saline et saline/saline vs. CYP/PGB respectivement), ce qui traduit une forte hypersensibilité mécanique au niveau abdominal. A la fin de ce test, les animaux reçoivent une injection de PGB (ou d'un volume équivalent de sérum physiologique), et la sensibilité est à nouveau évaluée 1h après. Les animaux CYP (côlonne noire) qui ont reçu une injection de sérum physiologique présentent toujours une forte hypersensibilité par rapport aux mesures réalisées chez le groupe témoin (côlonne

blanche) ( $100 \pm 34\%$  vs.  $1,06 \pm 0,09\%$ ,  $p < 0,01$  saline/saline vs. CYP/saline). A l'inverse les animaux ayant reçu une injection de CYP et une de PGB (côlonne rouge rayée), ont des seuils de réponse élevés, supérieur à ceux évalués chez les animaux CYP/saline ( $1,06 \pm 0,09\%$  vs.  $88,04 \pm 25,75\%$ ,  $p < 0,05$ , CYP/saline vs. CYP/PGB, respectivement) et redevenus équivalents à ceux des animaux témoins (côlonne blanche) ( $100,25 \pm 43\%$  vs.  $88,04 \pm 25,76\%$ , ns, saline/saline vs. CYP/PGB, respectivement) (Figure 52). De plus, l'injection de PGB chez des animaux naïfs induit le développement d'une forte hyposensibilité, puisque leurs seuils de réponse sont significativement plus élevés que ceux mesurés chez les animaux témoins ( $189,59 \pm 20,81\%$  vs.  $100,25 \pm 43\%$ ,  $p < 0,05$ , saline/PGB vs. saline/saline respectivement).



**Figure 61 : Effet de la PGB sur la sensibilité mécanique évalué par le test de Von Frey abdominal dans un modèle chronique de cystite induit par le cyclophosphamide.**

Les animaux reçoivent 4 injections de cyclophosphamide (CYP) à la dose de 80 mg/kg en intrapéritonéal à j0, j2, j4 et j6. Le jour suivant la dernière injection (j7), les animaux reçoivent une injection de PGB à la dose de 30mg/kg en sous-cutané (ou d'un volume de sérum physiologique équivalent). La sensibilité des animaux est évaluée par le test de Von Frey abdominal et la méthode « up and down » avant la 1<sup>ère</sup> injection de CYP, le jour suivant la dernière injection de CYP (j7) avant l'injection de PGB, et le même jour 1h après l'injection de PGB. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponse par rapport au groupe témoin (pour chaque temps de mesure)

La PGB permet de reverser l'hypersensibilité mécanique induite par des injections répétées de CYP (modèle chronique de cystite), reflétant une propriété antihyperalgique de cette molécule. De plus, une action hypoalgique a pu être mise en évidence chez les animaux naïfs. Par la suite, l'atteinte inflammatoire de ces animaux a été évaluée.

## A.II : Paramètres inflammatoires

A la suite du dernier test de Von Frey (T4h), les animaux ont été sacrifiés et le sang ainsi que les vessies et les rates ont été prélevés. Les paramètres anatomiques (poids de la vessie et de la rate), analyse histologique, dosage ELISA des cytokines pro-inflammatoires (vésicale et plasmatique) et dosage de l'activité enzymatique de la MPO au niveau vésicale, ont été analysés. Cependant le traitement induit une forte baisse de la réponse inflammatoire et le potentiel anti-inflammatoire de la PGB n'a donc pas pu être évalué.



## Annexe 3 : Article 1

Blocking of NF- $\kappa$ B Activation By  $\alpha$ 2 $\delta$  Ligands Reduces C $\acute{o}$ lonic Inflammatory-Associated Hypersensitivity in Mice.

M. MELEINE<sup>1,2+\*</sup>, L. BOUDIEU<sup>1,2†</sup>, A. GELOT<sup>1,2</sup>, E. MULLER<sup>1,2</sup>, L. ULMANN<sup>3</sup>, F. RASSENDREN<sup>3</sup>, C. SILBERBERG<sup>1,2</sup>, V. THEODOROU<sup>4</sup>, L. BUENO<sup>4</sup>, A. ESCHALIER<sup>1,2</sup>, F.A. CARVALHO<sup>1,2†</sup>, D. ARDID<sup>1,2†</sup>.

<sup>1</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, NEURO-DOL, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>2</sup> Inserm, U1107, F-63001 Clermont-Ferrand, France ; <sup>3</sup> Universités de Montpellier 1 et 2, UMR 5203, F-34000 Montpellier, France ; <sup>4</sup> INRA, EI-Purpan, UMR 1054 Neuro-Gastroenterology and Nutrition, F-31000 Toulouse, France. \*To whom correspondence should be addressed: [mathieu.meleine@univ-rouen.fr](mailto:mathieu.meleine@univ-rouen.fr) ; †These authors contributed equally to this work.

**One Sentence Summary:** Effects of  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands on intestinal inflammation and abdominal pain.

**Abstract:** The aim of this study was to compare the beneficial effects of alpha-2-delta ( $\alpha$ 2 $\delta$ ) ligands on inflammation and pain in c $\acute{o}$ lonic hypersensitivity (CHS) mouse models. Abdominal pain is a common feature of patients suffering from Inflammatory Bowel Disease (IBD) or Irritable Bowel Syndrome (IBS) for which current analgesic therapies have limited efficiency. Otherwise, it has been recently characterized that a subset of IBS patients exhibited low-grade intestinal inflammation as observed in IBD patients during remission periods. The effect of two  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands (Gabapentin and Pregabalin) was assessed in non-inflammatory (Neonatal Maternal Separation: NMS) or inflammatory (Dextran Sulfate Sodium: DSS) CHS mouse models. Both Gabapentin and Pregabalin displayed a pronounced antihyperalgesic property, which was even better in the inflammatory model compared to the non-inflammatory one. Interestingly,  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands showed an anti-inflammatory effect in DSS-treated mice by reducing pro-inflammatory cytokine production. According to our results, this anti-inflammatory action involved the blocking of cytoplasmic calcium increase induced by inflammatory stimulus, resulting in the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway activation, in macrophages. This study shows the efficacy of  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands in low-grade intestinal inflammation-associated CHS involving an anti-inflammatory mechanism by blocking NF- $\kappa$ B pathway activation in peritoneal exudate cells. For these reasons, it could be of interest to assess benefit effects of  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands on low-grade inflammation and associated pain in IBD patients in remission or post-infectious IBS patients.

### Introduction

Visceral pain is frequently associated with functional gastrointestinal disorders, such as Irritable Bowel Syndrome (IBS) (Drossman and Dumitrascu, 2006), or with direct inflammation of a visceral organ as observed in Inflammatory Bowel Disease (IBD) (Bielefeldt *et al.*, 2009; Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011). Visceral pain is the apparent reflection of an underlying c $\acute{o}$ lonic hypersensitivity (CHS), clinically revealed by increased perception of colorectal distension (Ritchie, n.d.). This common complaint is a crucial feature because of its significant impact on a patient's quality of life. Regarding IBS treatment, tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors are effective in relieving abdominal pain (Bradesi *et al.*, 2008), but provide strong adverse effects such as sedation, central nervous system dysfunction or anticholinergic symptoms (Clouse, n.d.). As current IBD therapies consist of suppressing or reducing pathophysiological symptoms, treatments mostly target inflammation either via the administration of aminosalicylates compounds, glucocorticoids or anti-Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) strategy (Rutgeerts *et al.*, 2004), or by reducing the immune response using

immunosuppressive thiopurines : azathioprine or 6-mercaptopurine (Beattie, 2006; Rogler, 2010). However, no therapy aiming to relieve abdominal pain associated with IBD is currently available, even though 35% of patients in clinical remission exhibit IBS-like symptoms such as visceral pain (Halpin and Ford, 2012). In this context, development of innovative drugs is needed to treat CHS and associated visceral pain in IBS patients and IBD patients in remission.

Anticonvulsants target neuronal excitability by modulating ion channels, receptors, and intracellular signaling pathways (Landmark, 2007; Johannessen Landmark, 2008). Among them, Gabapentin (GBP) and Pregabalin (PGB) are  $\alpha$ 2 $\delta$  ligands and act on voltage-gated calcium (Ca<sup>2+</sup>) channels (VGCCs) to inhibit pre-synaptic glutamate release (Landmark, 2007; Johannessen Landmark, 2008). These molecules have provided new insight in pain treatment, mainly in neuropathic pain management (Rogawski and L scher, 2004; Lynch III *et al.*, 2006; Johannessen Landmark, 2008). Regarding c $\acute{o}$ lonic pain, all studies were focused on IBS pathology, which shares some features of neuropathic pain, such as an

increase in sensitivity without clear macroscopic organic dysfunction. Some clinical studies have highlighted the beneficial effect of GBP (Lee *et al.*, 2005) and PGB (Houghton *et al.*, 2007) on IBS-associated symptoms and their antihyperalgesic impact on somatic inflammatory pain has been widely described (Field *et al.*, 1997; Vučković *et al.*, 2006), their effects have never been evaluated either in specific inflammatory colonic pain models or in IBD patients. Regarding the link between  $\alpha 2\delta$  ligands and inflammatory pain pathways, it is important to address the question of their effects in a colonic low-grade inflammation pain model compared to a non-inflammatory IBS model.

In this context, we proposed to investigate the potential beneficial effects of  $\alpha 2\delta$  ligands (GBP and PGB) on non-inflammatory and inflammatory CHS in mice, respectively induced by neonatal maternal separation (NMS) and dextran sulfate sodium (DSS) administration. It was recently proposed that GBP and PGB reduce the activation of the transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in neuroblastoma and glioma cells (Park *et al.*, 2008). Consistent with these findings, we further investigated the mechanism of action of  $\alpha 2\delta$  ligands by focusing our study on their interaction with intracellular calcium release and NF- $\kappa$ B pathway activation.

## Results

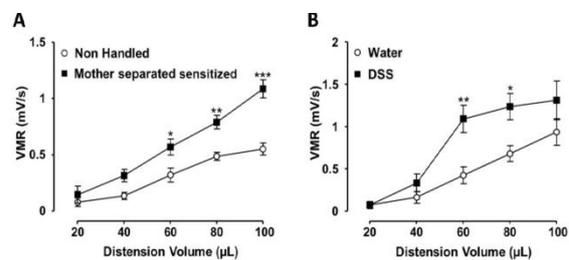
### *Colonic hypersensitivity and inflammation characterization in mouse models*

Neonatal maternal separation (NMS) induced a significant colonic sensitization up to 8 weeks after separation paradigm. When compared to non-handled (NH) mice, maternal deprived mice exhibited a significant increase in visceromotor response (VMR) to colorectal distension (CRD), for the highest distension volumes (80 and 100  $\mu$ L), reflecting CHS (Fig. 1A). Such colonic sensitization was observed in 23 of the 26 (88.5%) mother-separated mice, as three mice were excluded from the analysis because they did not meet inclusion criteria (see material and methods, statistical analysis) (Suppl. Fig. 1A). In this model, colonic histological examination exhibited no inflammatory impairment (Suppl. Fig. 1B). Moreover, assessment of physiological parameters to reveal severe inflammation such as decreased body weight, or increased spleen and colon weight, showed no difference between NH and NMS mice (Suppl. Table 1). Finally, cytokine quantification and colonic myeloperoxidase (MPO) activity confirmed the absence of colonic or systemic inflammation in NMS mice (Suppl. Table 1).

On the other hand, chronic 1% DSS treatment during 14 days significantly increased VMR to CRD compared to control mice. Unlike separated mice, the most significant increase occurred for 60 and 80  $\mu$ L of

analgesic activity was confirmed in models of non-inflammatory visceral pain (Diop *et al.*, 2002; Million *et al.*, 2007; Ravnefjord *et al.*, 2008). Surprisingly, although

distension volumes (Fig. 1B). In contrast with NMS model, all DSS-treated mice were sensitized by the treatment (Suppl. Fig. 1C). As expected, low-dose DSS treatment also induced moderate alterations of colonic mucosa characterized by focused epithelium disorganization and inflammatory cell infiltration (Suppl. Fig. 1D). Moreover, some DSS-treated mice displayed a moderate spleen weight increase, synonym of immune response activation, colon shortening and colon weight increases (Suppl. Table 2). Finally, cytokine production and MPO activity were increased in DSS-treated mice (Suppl. Table 2), highlighting a moderate colonic inflammatory impairment associated to CHS.



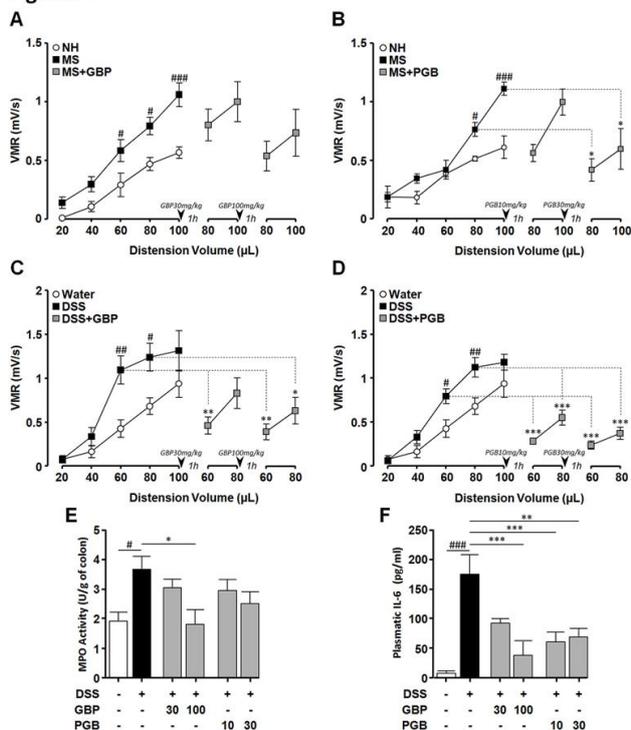
**Fig. 1.** Colonic hypersensitivity mouse models. Visceromotor response to colorectal distension in (A) non-handled (n=7) and mother-separated sensitized (n=23) mice and in (B) water (n=7) and DSS-treated (n=7) mice. \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. mother-separated vs. non-handled and DSS vs. water.

### *Effect of acute treatment with $\alpha 2\delta$ ligands on colonic hypersensitivity and inflammation*

In NMS mice, subcutaneous (s.c.) acute administration of GBP did not affect VMR to CRD (Fig. 2A), whereas only the highest cumulative dose of 30mg/kg of PGB significantly reduced this response (Fig. 2B). In contrast, both GBP and PGB significantly reduced VMR in DSS-treated mice (Fig. 2C-D). Indeed, for a 60  $\mu$ L-distension volume, s.c. acute administration of either  $\alpha 2\delta$  ligands induced a dose-dependent VMR decrease in DSS-treated mice. For an 80  $\mu$ L-distension volume, the highest cumulative dose of GBP (100mg/kg) and both doses of PGB (10 and 30mg/kg) induced a significant reduction of VMR suggesting a better efficacy of  $\alpha 2\delta$  ligands, and particularly of PGB, in an inflammatory context. Finally, we studied the specificity of this class of anticonvulsants on visceral pain relief, by administrating another anticonvulsant, Carbamazepine (CBZ), known as a Na<sup>+</sup> channel blocker, in both CHS models. Our results showed that CBZ failed to reduce CHS in both models (Suppl. Fig.2), suggesting that the antinociceptive effect was specific to the  $\alpha 2\delta$  ligands class.

Côlonic MPO activity tended to decrease after administration of GBP and PGB and this effect was significant for the highest GBP cumulative dose (Fig. 2E). Moreover, a significant reduction of plasmatic IL-6

Figure 2



**Fig. 2.** Acute  $\alpha 2\delta$  ligands treatment reduces colonic hypersensitivity and inflammatory parameters. Effect of Gabapentin (GBP 30 & 100mg/kg) on (A) NMS-induced CHS (Non-Handled n=6; Mother-separated n=8) and (C) DSS-induced CHS (DSS n=7; Water n=7) in response to colorectal distension. Effect of Pregabalin (PGB 10 & 30mg/kg) on (B) NMS-induced CHS (Non-Handled n=6; Mother-separated n=8) and (D) DSS-induced CHS (DSS n=9; Water n=7) in response to colorectal distension. (E) Côlonic MPO activity and (F) levels of plasmatic IL-6 were measured by ELISA. #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ ; ###  $P < 0.001$ . mother-separated vs. non-handled and DSS vs. water. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  post- $\alpha 2\delta$  ligands treatment vs. pre-treatment (A-D) and  $\alpha 2\delta$  ligands treatment vs. control (E,F).

#### Effect of chronic treatment with $\alpha 2\delta$ ligand on colonic hypersensitivity and inflammation

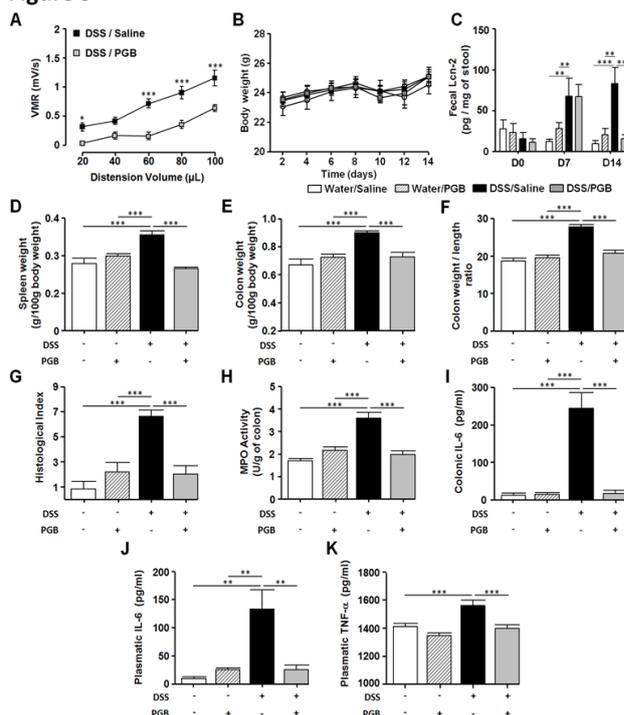
To further investigate the anti-hypersensitive and anti-inflammatory effects of  $\alpha 2\delta$  ligands administration, we performed daily repeated injections of PGB (10 mg/kg) in DSS-treated mice during the seven days preceding CRD. In the following experiments, only PGB administration was investigated, because this drug has more potent anti-hypersensitive effect observed after acute administration. Upon PGB repeated treatment, a significant reduction of VMR to CRD was observed, as in the acute treatment, for 60 $\mu$ L- and 80 $\mu$ L-distension volumes but also for 20 $\mu$ L and 100 $\mu$ L (Fig. 3A). In order to verify if chronic PGB treatment would induce a potential sedative effect that could interfere with VMR measurement, we assessed locomotor activity in mice, after such chronic treatment. Pregabalin

production was observed after administration of either  $\alpha 2\delta$  ligands in DSS-treated mice suggesting an anti-inflammatory effect of these molecules (Fig. 2F).

had no significant impact on mouse locomotion, suggesting that reduction of visceromotor response observed following chronic  $\alpha 2\delta$  ligand treatment is not due to motor impairment (Suppl. Fig. 3). Finally, compared to acute administration, repeated treatment potentiated a colonic antihypersensitive property of PGB.

A low-dose of DSS did not induce significant weight loss (Fig. 3B), revealing the absence of a strong and severe colitis. All mice treated with chronic PGB exhibited reduction of the main typical features of intestinal inflammation including fecal Lipocalin-2 (Lcn-2) expression, spleen and colon weight. Also, chronic PGB induced a reduction of histopathological score and colonic MPO activity (Fig. 3C-H). Côlonic and plasmatic cytokine levels also reflected reduced inflammation, shown by diminished levels of "master pro-inflammatory cytokines" IL-6 and TNF- $\alpha$  (Figure 3I-K). Together, these results suggested that repeated PGB treatment potentiated reduction of intestinal inflammation.

Figure 3

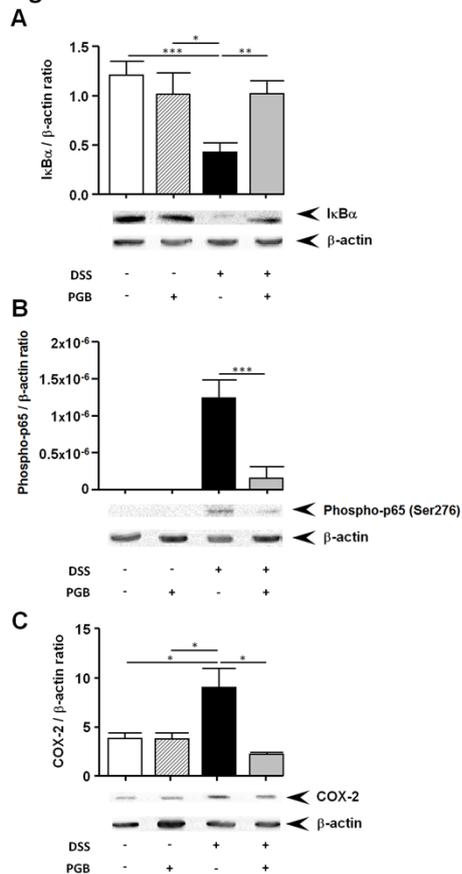


**Fig. 3.** Repeated  $\alpha 2\delta$  ligand treatment reduces inflammatory-associated colonic hypersensitivity and inflammatory parameters. (A) Effect of chronic PGB treatment (10 mg/kg s.c., 7days) on visceromotor response to colorectal distension in DSS-treated mice (n=6-8/group). (B) Body weight. (C) Quantification of fecal lipocalin-2 by ELISA assay. (D) Spleen mass. (E) Colon mass. (F) Colon weight/length ratio. (G) Inflammation severity has been monitored by calculating a histological score as described in Methods. (H) Côlonic MPO activity. (I) Côlon was cultured for 24h, at which time supernatant was assayed for IL-6 by ELISA (J,

K). Levels of plasmatic IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. \* *Effect of  $\alpha 2\delta$  ligand repeated treatment on c $\acute{o}$ lonic NF- $\kappa$ B pathway activation.*

As NF- $\kappa$ B pathway is mainly recruited during inflammation process, its c $\acute{o}$ lonic activation was quantified in DSS group, as well as its modulation by chronic PGB. A strong activation of NF- $\kappa$ B pathway was observed in c $\acute{o}$ lon extracts, after DSS treatment, as revealed by a decrease of the inhibitor protein, I $\kappa$ B $\alpha$  expression (Fig. 4A) and by an increase in the serine 276 phosphorylation of the nuclear factor subunit p65 (phospho-Ser276 p65) (Fig. 4B). This activation was blocked by chronic PGB treatment (Fig. 4A,B), which, in turn, resulted in a strong decrease of COX-2 production (Fig. 4C).

**Figure 4**



**Fig.4.** Repeated  $\alpha 2\delta$  ligand treatment reduces NF- $\kappa$ B pathway activation and cytokine production in inflammatory c $\acute{o}$ lonic hypersensitivity model. Effect of chronic PGB treatment (30 mg/kg s.c., 7days) on : (A) NF- $\kappa$ B inhibitory protein (I $\kappa$ B $\alpha$ ), (B) phospho-p65 (Serine 276) and (C) cyclo-oxygenase-2 expressions assessed by western blot analysis in c $\acute{o}$ lon extracts from DSS-treated mice. \* P<0.05; \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

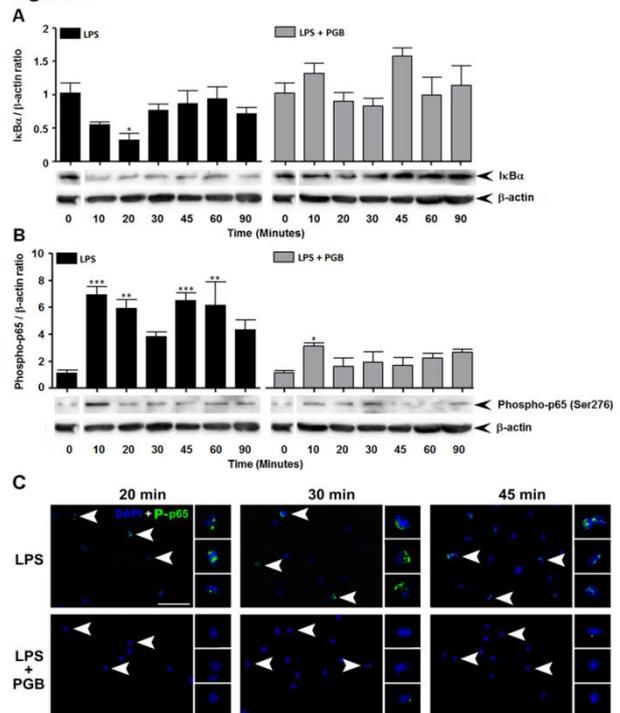
*Effect of  $\alpha 2\delta$  ligands on NF- $\kappa$ B pathway activation in peritoneal exudate cells*

Accumulated evidence suggested that a dysregulated cytokine production and signaling by

P<0.05; \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

macrophages are implicated in the pathogenesis of IBD and that the transcription factor NF- $\kappa$ B is one of the key players in this phenomenon (Atreya *et al.*, 2008; Oeckinghaus *et al.*, 2011). To investigate if PGB could modulate this signaling pathway in macrophages, peritoneal exudate cells were treated with LPS in order to promote NF- $\kappa$ B pathway activation and a kinetic study (from 0 to 90 min) of its modulation by PGB was performed. LPS stimulation revealed a quick and strong decrease of I $\kappa$ B $\alpha$  expression in peritoneal exudate cells (PECs), which returned to normal after 30 min (Fig 5A). I $\kappa$ B $\alpha$  modulation was completely abolished in PECs incubated in presence of PGB (Fig. 5A). Concomitantly, PGB treatment blocked Ser276 phosphorylation of p65 and its subsequent nuclear translocation after LPS stimulation (Fig 5B-C).

**Figure 5**



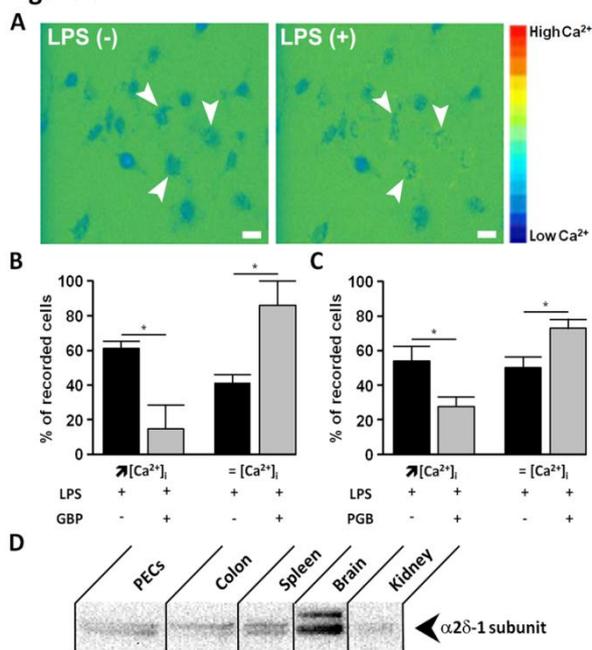
**Fig. 5.** Effects of  $\alpha 2\delta$  ligands on NF- $\kappa$ B pathway activation in LPS-stimulated peritoneal exudate cells. Time course (0 to 90min) western blot analysis of (A) NF- $\kappa$ B inhibitory protein (I $\kappa$ B $\alpha$ ) and (B) phospho-p65 (Serine 276) in LPS-stimulated peritoneal exudate cells treated or not with PGB (17,6mg). (C) Intracellular localisation of phospho-p65 (Serine 276) in LPS-stimulated peritoneal exudate cells was visualized by immunohistochemistry. Arrows head indicate cells which are magnified in side panels (scale bar: 100 $\mu$ m) \* P<0.05; \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

*Effect of  $\alpha 2\delta$  ligands on intracellular calcium increased in peritoneal exudate cells.*

Cellular mechanisms of PGB were further investigated by measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in cultivated PECs, using a Fura-2 probe.

Stimulation with LPS induced an increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Fig. 6A). The number of cells displaying an intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise, in response to LPS, was significantly lowered by  $\alpha 2\delta$  ligands co-application (Fig. 6B-C). Calcium modulation in PECs could be the result of a direct blockade of membrane calcium channels by PGB. To verify this hypothesis, the expression of a  $\alpha 2\delta$  subunit, the  $\alpha 2\delta$ -1 isotype, was compared in PECs and other tissues. Western Blot analysis confirmed the presence of  $\alpha 2\delta$ -1 subunit in PECs protein extraction, in amounts equivalent to the colon or spleen. The major  $\alpha 2\delta$ -1 subunit expression was observed in the brain, whereas kidney protein extraction was used as a negative control (Fig. 6D). These overall results indicated the existence of functional  $\text{Ca}^{2+}$  channel on PECs, which incorporated the  $\alpha 2\delta$  subunit.

**Figure 6**



**Fig. 6.** Effects of  $\alpha 2\delta$  ligands on intracellular calcium concentration in LPS-stimulated PECs. (A) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) visualized using Fura-2 staining in control (left panel) and LPS-stimulated (right panel) peritoneal exudate cells. Arrows head indicate cells in which a potent  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was observed following LPS treatment (scale bars:  $20\mu\text{m}$ ). (B, C) Percentage of LPS-stimulated PECs displaying either  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase or no change in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  when incubated with (B) GBP (60mg) or (C) PGB (17,6mg). (D) Tissue expression of  $\alpha 2\delta$ -1 subunit quantified by Western Blot analysis. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Discussion

Alpha 2 delta ligands were initially developed as anticonvulsants, but they are more frequently being used to treat neuropathic pain. In this study, we show that such molecules also exhibited a potent anti-hypersensitive and anti-inflammatory effect in visceral pain models. Indeed, these compounds are able to decrease CHS and several

inflammatory parameters in preclinical mouse models, associating CHS with low-grade colonic inflammation. This anti-inflammatory effect was confirmed in *in vitro* studies using PEC cultures. Its mechanism likely involved a reduction in cytokine production by macrophages through blockade of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release and subsequent NF- $\kappa\text{B}$  pathway activation.

In the present study, the effects of both acute and chronic treatment with  $\alpha 2\delta$  ligands were investigated on non-inflammatory and inflammatory-associated CHS mouse models. Neonatal maternal separation-induced CHS was initially developed in rats (Coutinho *et al.*, 2002). To our knowledge, we showed here, for the first time, that the same separation paradigm led to the increase of VMR to CRD in a majority of neonatal separated mouse pups at adulthood, without organic injuries of colonic mucosa, mimicking the observations made in some IBS patients. Similarly, to study CHS associated with low-grade inflammation as observed in a subtype of IBS patients (Barbara *et al.*, 2004), mainly post-infectious ones, or in IBD patients during the remission periods, a low-dose of 1% DSS was administered in drinking water. In fact, a recent study has demonstrated that this dose induced low-grade inflammation without severe colon breakdown (Chassaing *et al.*, 2013), whereas higher concentrations induced drastic inflammation without hypersensitivity (Larsson *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2013), probably due to colon desensitization. In this work, we observed that low-grade inflammation induced by 1% DSS-treatment increased VMR to CRD in mice. For the same reason, IBD patients could present such colon hypersensitivity, only in the case of very low-grade inflammation, during long-term remission phase periods. Using this low-grade inflammation model, we pointed out the anti-hypersensitive effect of  $\alpha 2\delta$  ligands, and especially PGB, which was much more efficient than in non-inflammatory mother-separated mouse models, and potentiated by repeated administration.

Alpha-2-delta ligands are known to block VGCCs activation (Gee *et al.*, 1996), which have been identified to play a crucial role in chronic pain development, by increasing primary afferent fiber excitability and promoting synaptic transmission (McGivern, 2006). Four isoforms of  $\alpha 2\delta$ (1-4) subunits are exclusively expressed by high-voltage gated channels (N, L and P/Q types) (Cheng and Chiou, 2006). Alpha-2-delta ligands have a similar affinity for  $\alpha 2\delta$ -1 and  $\alpha 2\delta$ -2 subunits (Cheng and Chiou, 2006), expressed in the central nervous system (CNS), but also in the peripheral nervous system. Compared to GBP, PGB possess a better affinity to  $\alpha 2\delta$  subunits and more linear pharmacokinetics, which explain its better efficacy (Taylor, 2009). These properties could explain differences of efficacy observed between these two molecules in CHS models. Involvement of these subunits in a context of

chronic visceral pain was demonstrated by the spinal upregulation of  $\alpha 2\delta$  subunit and efficacy of GBP in a pancreatitis model in rats (Liao *et al.*, 2010) and by their expression in intestinal primary afferent neurons associated with N-type calcium channels (Gong *et al.*, 2001; Needham *et al.*, 2010). The blockade of neuronal  $\alpha 2\delta$  subunits at both the peripheral and central level may thus explain the anti-hypersensitive effect of PGB in our non-inflammatory visceral pain model (NMS sensitized mice). However, the greater potency of  $\alpha 2\delta$  ligands in a low-grade inflammation context (1% DSS) suggested that these molecules also exerted their anti-hypersensitive effect via a non-neuronal mechanism. Indeed, according to our experiments, we bring out for the first time, to our knowledge, that  $\alpha 2\delta$  ligands exhibited anti-inflammatory properties, which could reduce sensitization of colon afferent nerves. This is suggested by the ability of  $\alpha 2\delta$  ligands to significantly decrease colonic and systemic inflammatory markers after acute treatment. These effects were even greatly marked by repeated injections of PGB. Combined with available data of literature, our results suggest that antihyperalgesic effect of  $\alpha 2\delta$  ligands in an inflammatory context could be a combination of reduced neuronal activity as suggest by previous works (Sikandar and Dickenson, 2011) with the anti-inflammatory property of these molecules.

Since pro-inflammatory mediator production is mainly mediated by NF- $\kappa$ B pathway activation (Hayden *et al.*, 2006), we hypothesized that the anti-inflammatory effect of  $\alpha 2\delta$  ligands could involve this pathway. Although NF- $\kappa$ B is playing a crucial role in host defense and homeostasis, its abnormal activation can lead to the development of pathological inflammation (Kaltschmidt *et al.*, n.d.). We demonstrated that  $\alpha 2\delta$  ligand treatment is able to inhibit NF- $\kappa$ B pathway activation by preventing I $\kappa$ B $\alpha$  (the main negative regulator of NF- $\kappa$ B pathway) degradation, associated with a decreased Ser276 phosphorylation and nuclear translocation of p65 transcription factor in DSS-treated mice. These results are in accordance with a recent study which showed that GBP and PGB binding to  $\alpha 2\delta$  subunit inhibits the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, in neuroblastoma and glioma cells (Park *et al.*, 2008). To further investigate which cell types are affected by  $\alpha 2\delta$  ligands treatment in the visceral inflammatory context, NF- $\kappa$ B activation was assessed in LPS-stimulated PECs. The peritoneal cavity presents various immune-related cells such as lymphocytes, granulocytes, plasma cells and macrophages (Ray and Dittel, 2010). The latter are activated by cytokines, bacterial LPS, extracellular matrix proteins, and other chemical mediators (Fujiwara and Kobayashi, 2005). In turn, they produce various signals involved in inflammation generation mainly dependent upon NF- $\kappa$ B activation (Blackwell and Christman, 1997). In our study, we demonstrated that  $\alpha 2\delta$  ligands are able to inhibit NF-

$\kappa$ B activation, in PECs, after LPS stimulation, as revealed by a restored level of I $\kappa$ B $\alpha$  and reduced nuclear translocation of p65 following  $\alpha 2\delta$  ligands treatment.

The next step of our study was focused on understanding the mechanism by which these molecules act on NF- $\kappa$ B pathway. In macrophages, intracellular calcium, which acts as a second messenger, is crucial for the activation of intracellular function such as phagosome-lysosome fusion, activation of cellular kinases and phosphatases and transcriptional control (Mandeville and Maxfield, 1996). A rise in intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) accompanies LPS stimulation and has been shown to promote NF- $\kappa$ B activation, and subsequently gene transcription involved in inflammatory responses (Chen *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2006). Recently, it has been demonstrated that blockade of Ca<sup>2+</sup> influx in mouse LPS-stimulated PECs, inhibits IL-6 and TNF- $\alpha$  production (Ye *et al.*, 2012). We proposed that  $\alpha 2\delta$  ligands could affect Ca<sup>2+</sup> influx in macrophages leading to reduced NF- $\kappa$ B pathway activation and subsequent diminished production of pro-inflammatory cytokines. This hypothesis was sustained by the expression of  $\alpha 2\delta$ -1 subunit in PECs and reduced intracellular Ca<sup>2+</sup> rise following LPS application in PECs treated with  $\alpha 2\delta$  ligands. In non-excitabile cells, as macrophages, the major Ca<sup>2+</sup> entry pathway involves store-operated calcium channels (SOCC), in which the emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, *i.e.* endoplasmic reticulum, activates Ca<sup>2+</sup> influx (Nunes and Demarex, 2010). These channels have been shown to be involved in LPS-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in macrophages (Letari *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2006a). Little is known about SOCCs structure and the presence of regulatory subunits, such as  $\alpha 2\delta$ , on these channels, has never been characterized. However, recent works also suggested expression of functional VGCCs in non-excitabile cells, such as dendritic cells and macrophages, where they have been shown to be involved in the protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* (Gupta *et al.*, 2009). The presence of  $\alpha 2\delta$ -1 subunit in PECs could thus be related to VGCC expression in macrophages in which, with SOCCs, they could regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. Their blockade by  $\alpha 2\delta$  ligands reduced intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and the subsequent signaling cascades depending on intracellular Ca<sup>2+</sup>.

In summary, our results, combined with available data in the literature, confirmed the beneficial effect of  $\alpha 2\delta$  ligands in the management of visceral hypersensitivity. Moreover, our findings highlight their novel efficacy in inflammatory CHS, which could be, in part, due to an anti-inflammatory effect involving a decrease of NF- $\kappa$ B pathway activation in immune cells. The NF- $\kappa$ B pathway inhibition seemed to depend on blockade of intracellular Ca<sup>2+</sup> release, pointing out a role for non-neuronal VGCCs in pain arising from hollow

organs. However, further studies are needed to investigate the  $\alpha 2\delta$  ligands effect on other intracellular pathways such as Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and on other cell types such as intestinal epithelial cells. Finally, a recent study has pointed out the  $\alpha 2\delta$  protein involvement in IBD patients. They have identified, after genome-wide association, that a mutation in the loci 7q21 (*CACNA2D1* gene encoding the  $\alpha 2\delta$  protein) is associated with early surgery in these patients (Dubinsky *et al.*, 2013). Thus, this work and the present study underline the interest in investigating the clinical relevance of  $\alpha 2\delta$  ligands in IBD patients in remission to alleviate IBS-like symptoms, particularly abdominal pain, but also to increase length of remission periods by preventing initiation or triggering of acute severe inflammation phases.

## Materials and Methods

### *Côlonic hypersensitivity induction*

All experiments were performed according to the ethical guidelines set out by the International Association for the Study of Pain (IASP) and with permits from the local ethical committee (CE110-12 and CE111-12). Pups from C57Bl/6J pregnant mice (Janvier laboratories, Le Genest Saint Isle, France) were isolated from their mother from P2 to P14, three hours per day (from 9:00 a.m. to 12:00 p.m.). Pups were then left with their mothers up to weaning (P21). All experiments were performed on eight-week-old male mice (Suppl. Fig. 4A). For DSS-induced Colitis, C57Bl/6J male mice weighing 20-24g were administered with 1% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, France) in drinking water for 14 days. All experiments were performed on the last day of treatment at D14 (Suppl. Fig. 4B). Finally, côlonic sensitivity was assessed by quantifying visceromotor response with abdominal EMG recordings in response to colorectal distension, as previously described (Christianson and Gebhart, 2007).

### *Alpha-2-delta ligands treatments*

For acute treatment, after basal assessment of visceral sensitivity, mice were s.c. injected with a first dose of anticonvulsants (GBP 30mg/kg, PGB 10mg/kg) and their effects on côlonic sensitivity were assessed one hour later for the two distension volumes, displaying the highest significant differences in VMR between control and sensitized groups (80 and 100 $\mu$ L for NMS model and 60 and 80 $\mu$ L for DSS model). A second subcutaneous injection was performed to reach the second dose of anticonvulsants (GBP 100mg/kg, PGB 30mg/kg). Côlonic sensitivity was assessed one hour later for the same distension volumes (Suppl. Fig. 4A and B). This distension paradigm was chosen in order to avoid sensitization and potential côlonic injuries induced by complete distension range repeated three times in a short duration (two hours). For chronic treatments, a single dose of PGB

(30mg/kg s.c.) was administered daily seven days after DSS treatment onset up to côlonic sensitivity assessment at D14 (Suppl. Fig. 4C).

### *Serum isolation*

Mice were bled via retrobulbar intraorbital capillary plexus. Briefly, mice were anesthetized and bled via the orbital sinus, which surrounds the globe. After collection of 250 $\mu$ L, blood was centrifuged at 5500 rpm for 30 minutes and the supernatant corresponding to the serum was collected.

### *Côlon culture*

Following euthanasia, côlons (1 cm) were removed, cut open longitudinally, washed in PBS and cultured in RPMI 1640 medium containing penicillin and streptomycin (Vijay-Kumar *et al.*, 2007 p.-). After 24h incubation at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the supernatants were centrifuged at 4°C and used for assaying cytokines by ELISA.

### *Enzyme-linked immunosorbent assay*

All ELISA kits are Duoset kits from R&D Systems and assays were performed according to the manufacturer protocol.

### *Tissue myeloperoxidase assay*

Tissue (50mg/mL) was thoroughly washed in PBS and homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma) in 50 mM PBS, (pH 6.0), freeze-thawed 3 times, sonicated and centrifuged. MPO was assayed in the supernatant by adding 1mg/mL of dianisidine dihydrochloride (Sigma) and 5 $\times$ 10<sup>-4</sup>% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the change in optical density measured at 450nm. Human neutrophil MPO (Sigma) was used as standard. One unit of MPO activity was defined as the amount that degraded 1.0 $\mu$ mol of peroxide/min at 25°C (Carvalho *et al.*, 2008).

### *Histology*

Côlons were fixed for 24h in 4% buffered formalin at 4°C and then subjected to Hematoxylin & Eosin (H&E) staining on tissue sections of 5 $\mu$ m thickness. Stained slides were scored, blinded to the study protocol as previously described (Onyeagocha *et al.*, 2009). Briefly, slides were scored for the presence/absence of active inflammation, the intensity of inflammation (average number of neutrophils and the number of fields that were involved), the extent of inflammation (mucosa, submucosa, or serosa), the presence or absence of ulceration, architectural disarray, and the pattern of involvement.

### *In vitro peritoneal exudates cells studies*

Resident PECs were collected from euthanized animals by PBS + 0,5% of fetal bovine serum (FBS) lavage, resuspended in DMEM containing 10% FBS and seeded at the density of 4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well. After overnight incubation, cells were washed to remove non-adherent cells and co-incubated with LPS (100ng/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and

anticonvulsants (PGB: 17,6mg; GBP: 60mg) in serum-free media, according to experiments.

#### Western Blotting

Tissues or cell cultures were homogenized in ice-cold lysis buffer containing stop buffer (50mM Hepes-, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM pyrophosphate, 2mM vanadate, 100mM NaF, pH7.5) and protease inhibitor cocktail (0.5mM PMSF, 100UI/mL aprotinine, 0.02mM leupeptine and 1% triton). Protein extracts were size fractionated by SDS/PAGE on a 10% acrylamide resolving gel and transferred to a PVDF membrane. Blotting was performed by incubating membrane at 4°C overnight with antibodies as follows: I $\kappa$ B $\alpha$  (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) and phospho-p65 (Ser276) (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). After washes in a blocking solution of 5% (w/v) non-fat dry milk in TBS/0.1% Tween 20, membrane were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology) and immunocomplexes were revealed using the ECL detection system (GE Healthcare). Protein bands were quantified by densitometry using ChemiDoc MP imager and Image Lab™ software (Biorad).

#### Immunohistochemistry

After growing on a chamber slide, PECs were fixed with 4% paraformaldehyde in TBS 0,1M for 20min and incubated with freeze methanol for 3min. After blocking with 5% goat serum, Triton 0,1% in TBS 0,1M, cells were incubated with phospho-p65 (Ser276) antibody (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. After washes, slides were incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) for two hours at room temperature. Finally slides were incubated with DAPI for 10min before microscopic observation (ZEISS).

#### Intracellular calcium imaging and measure

Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was evaluated by recording the changes in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration using the ratiometric fluorescent probe Fura-2 in PECs. Cells were loaded with 2 $\mu$ M of Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM, Invitrogen), 0.5% BSA in the recording saline solution (135mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Glucose, 10mM Hepes, pH7.4). After one hour of incubation at room temperature, cells were washed three times and then stimulated with indicated concentration of LPS or LPS and anticonvulsants. The Metaflur Imaging system (Molecular Devices) was used for fluorescence acquisition and analysis of individual cells. Fluorescence was excited by illumination through x20 water immersion objective with a light wavelength switch provided by a DG4 filter wheel and detected with a CCD camera under the Metaflur software control. Pairs of images were acquired every two seconds.

#### Statistical Analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  SEM. For all experiments, sensitized (mother-separated or DSS-treated) mice displaying VMR values lower than mean minus two SEM for all distension volumes were considered as non-sensitized and excluded from the analysis. Differences in VMR to gradual CRD were analyzed using a 2-way ANOVA (Treatment, Volume) followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. The effects of anticonvulsants on each parameter (VMR, MPO, cytokines concentration, weight, morpho-anatomical studies, fecal Lcn-2, histological score and NF- $\kappa$ B pathway activation) were analyzed by performing a 1-way ANOVA (Treatment) followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. For time course NF- $\kappa$ B pathway activation experiments, a 1-way ANOVA (Time) followed by a Dunett post-hoc test for comparisons versus control (T0) were performed. For calcium imaging experiments statistical differences were elicited using a Mann-Whitney U test. P < 0.05 was considered statistically significant.

#### Supplementary Materials

##### Materials and Methods

Fig. S1: Visceromotor response distribution and còlonic examination in CHS mouse models

Fig. S2: Assessment of Carbamazepine treatment on còlonic hypersensitivity.

Fig. S3: Effect of PGB on locomotor activity.

Fig. S4: Experimental design of assessment of  $\mu$ 2 ligands treatment on còlonic hypersensitivity

Table S1: Inflammatory parameters in maternal separation CHS model

Table S2: Inflammatory parameters in Dextran Sulfate Sodium CHS model

#### References and Notes:

1. D. A. Drossman, D. L. Dumitrascu, Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders, *J. Gastrointest. Liver Dis.* JGLD 15, 237–241 (2006).
2. K. Bielefeldt, B. Davis, D. G. Binion, Pain and Inflammatory Bowel Disease, *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 778–788 (2009).
3. B. Chassaing, A. Darfeuille–Michaud, The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases, *Gastroenterology* 140, 1720–1728.e3 (2011).
4. J. Ritchie, Pain from distension of the pelvic còlon by inflating a balloon in the irritable còlon syndrome, *Gut* 14, 125.
5. S. Bradesi, J. Herman, E. A. Mayer, Visceral analgesics: drugs with a great potential in functional disorders?, *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 697–703 (2008).
6. R. E. Clouse, Antidepressants for irritable bowel syndrome, *Gut* 52, 598.

7. P. Rutgeerts, G. van Assche, S. Vermeire, Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 126, 1593–1610 (2004).
8. R. M. Beattie, Inflammatory bowel disease, *Arch. Dis. Child.* 91, 426–432 (2006).
9. G. Rogler, Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 157–165 (2010).
10. S. J. Halpin, A. C. Ford, Prevalence of Symptoms Meeting Criteria for Irritable Bowel Syndrome in Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review and Meta-Analysis, *Am. J. Gastroenterol.* 107, 1474–1482 (2012).
11. C. J. Landmark, Targets for antiepileptic drugs in the synapse, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 13, RA1–7 (2007).
12. C. Johannessen Landmark, Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy, *CNS Drugs* 22, 27–47 (2008).
13. M. A. Rogawski, W. Löscher, The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions, *Nat. Med.* 10, 685–692 (2004).
14. J. J. Lynch III, P. Honore, D. J. Anderson, W. H. Bunnelle, K. H. Mortell, C. Zhong, C. L. Wade, C. Z. Zhu, H. Xu, K. C. Marsh, C.-H. Lee, M. F. Jarvis, M. Gopalakrishnan, (l)-Phenylglycine, but not necessarily other  $\alpha\delta$  subunit voltage-gated calcium channel ligands, attenuates neuropathic pain in rats, *Pain* 125, 136–142 (2006).
15. K. J. Lee, J. H. Kim, S. W. Cho, Gabapentin reduces rectal mechanosensitivity and increases rectal compliance in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 981–988 (2005).
16. L. A. Houghton, C. Fell, P. J. Whorwell, I. Jones, D. P. Sudworth, J. D. Gale, Effect of a second-generation  $\alpha\delta$  ligand (pregabalin) on visceral sensation in hypersensitive patients with irritable bowel syndrome, *Gut* 56, 1218–1225 (2007).
17. L. Diop, F. Raymond, H. Fargeau, F. Petoux, M. Chovet, A. M. Doherty, Pregabalin (CI-1008) Inhibits the Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Chronic C $\delta$ lonic Allodynia in the Rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1013 – 1022 (2002).
18. M. Million, L. Wang, D. W. Adelson, F. Roman, L. Diop, Y. Tache, Pregabalin decreases visceral pain and prevents spinal neuronal activation in rats, *Gut* 56, 1482–1484 (2007).
19. A. Ravnefjord, M. Brusberg, H. Larsson, E. Lindström, V. Martínez, Effects of pregabalin on visceral pain responses and c $\delta$ lonic compliance in rats, *Br. J. Pharmacol.* 155, 407–416 (2008).
20. M. J. Field, R. J. Oles, A. S. Lewis, S. McCleary, J. Hughes, L. Singh, Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents, *Br. J. Pharmacol.* 121, 1513–1522 (1997).
21. S. M. Vučković, M. A. Tomić, R. M. Stepanović-Petrović, N. Ugrešić, M. Š. Prostran, B. Bošković, The effects of  $\alpha 2$ -adrenoceptor agents on anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain, *Pain* 125, 10–19 (2006).
22. S. Park, E. S. Ahn, D. W. Han, J. H. Lee, K. T. Min, H. Kim, Y.-W. Hong, Pregabalin and gabapentin inhibit substance P-induced NF- $\kappa$ B activation in neuroblastoma and glioma cells, *J. Cell. Biochem.* 105, 414–423 (2008).
23. I. Atreya, R. Atreya, M. F. Neurath, NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease, *J. Intern. Med.* 263, 591–596 (2008).
24. A. Oeckinghaus, M. S. Hayden, S. Ghosh, Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways, *Nat. Immunol.* 12, 695–708 (2011).
25. S. V. Coutinho, P. M. Plotsky, M. Sablad, J. C. Miller, H. Zhou, A. I. Bayati, J. A. McRoberts, E. A. Mayer, Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat, *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G307–G316 (2002).
26. G. Barbara, V. Stanghellini, R. De Giorgio, C. Cremon, G. S. Cottrell, D. Santini, G. Pasquinelli, A. M. Morselli-Labate, E. F. Grady, N. W. Bunnett, S. M. Collins, R. Corinaldesi, Activated mast cells in proximity to c $\delta$ lonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome, *Gastroenterology* 126, 693–702 (2004).
27. B. Chassaing, O. Koren, F. A. Carvalho, R. E. Ley, A. T. Gewirtz, AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition, *Gut* (2013), doi:10.1136/gutjnl-2013-304909.
28. M. H. Larsson, L. Rapp, E. Lindström, Effect of DSS-induced colitis on visceral sensitivity to colorectal distension in mice, *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 144–152 (2006).
29. J. Chen, J. H. Winston, S. K. Sarna, Neurological and cellular regulation of visceral hypersensitivity induced by chronic stress and c $\delta$ lonic inflammation in rats, *Neuroscience* 248, 469–478 (2013).
30. N. S. Gee, J. P. Brown, V. U. K. Dissanayake, J. Offord, R. Thurlow, G. N. Woodruff, The Novel Anticonvulsant Drug, Gabapentin (Neurontin), Binds to the Subunit of a Calcium Channel, *J. Biol. Chem.* 271, 5768–5776 (1996).
31. J. G. McGivern, Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain, *Drug Discov. Today* 11, 245–253 (2006).
32. J.-K. Cheng, L.-C. Chiou, Mechanisms of the Antinociceptive Action of Gabapentin, *J. Pharmacol. Sci.* 100, 471–486 (2006).
33. C. Taylor, Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin – Calcium channel  $\alpha 2$ - $\delta$  [Cav $\alpha 2$ - $\delta$ ] ligands, *Pain* 142, 13–16 (2009).
34. X. Liao, M.-T. Zhou, Y.-F. Mao, H. Xu, H. Chen, J.-H. Sun, Y.-C. Xiong, Analgesic effects of gabapentin on mechanical hypersensitivity in a rat model of chronic pancreatitis, *Brain Res.* 1337, 104–112 (2010).

35. H. C. Gong, J. Hang, W. Kohler, L. Li, T.-Z. Su, Tissue-specific Expression and Gabapentin-Binding Properties of Calcium Channel  $\alpha 2\delta$  Subunit Subtypes, *J. Membr. Biol.* 184, 35–43 (2001).
36. K. Needham, R. Bron, B. Hunne, T. V. Nguyen, K. Turner, M. Nash, J. B. Furness, Identification of subunits of voltage-gated calcium channels and actions of pregabalin on intrinsic primary afferent neurons in the guinea-pig ileum, *Neurogastroenterol. Motil.* 22, e301–e308 (2010).
37. S. Sikandar, A. H. Dickenson, Pregabalin modulation of spinal and brainstem visceral nociceptive processing, *PAIN* 152, 2312–2322 (2011).
38. M. S. Hayden, A. P. West, S. Ghosh, NF- $\kappa$ B and the immune response, *Oncogene* 25, 6758–6780 (2006).
39. B. Kaltschmidt, M. Uherek, H. Wellmann, B. Volk, C. Kaltschmidt, Inhibition of NF- $\kappa$ B potentiates amyloid  $\beta$ -mediated neuronal apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9409.
40. A. Ray, B. N. Dittel, Isolation of mouse peritoneal cavity cells, *J. Vis. Exp. JoVE* (2010), doi:10.3791/1488.
41. N. Fujiwara, K. Kobayashi, Macrophages in inflammation, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 281–286 (2005).
42. T. S. Blackwell, J. W. Christman, The Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cytokine Gene Regulation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 3–9 (1997).
43. J. T. Mandeville, F. R. Maxfield, Calcium and signal transduction in granulocytes, *Curr. Opin. Hematol.* 3, 63–70 (1996).
44. B. C. Chen, S. L. Hsieh, W. W. Lin, Involvement of protein kinases in the potentiation of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator formation by thapsigargin in peritoneal macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 69, 280–288 (2001).
45. L. Martin, S. C. Pingle, D. M. Hallam, L. P. Rybak, V. Ramkumar, Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor- $\kappa$ B and extracellular signal-regulated kinase 1/2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 71–78 (2006).
46. Y. Ye, X. Huang, Y. Zhang, X. Lai, X. Wu, X. Zeng, X. Tang, Y. Zeng, Calcium influx blocked by SK&F 96365 modulates the LPS plus IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages, *Int. Immunopharmacol.* 12, 384–393 (2012).
47. P. Nunes, N. Demarex, The role of calcium signaling in phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 88, 57–68 (2010).
48. O. Letari, S. Nicosia, C. Chiavaroli, P. Vacher, W. Schlegel, Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 147, 980–983 (1991).
49. X. Zhou, W. Yang, J. Li, Ca<sup>2+</sup>- and Protein Kinase C-dependent Signaling Pathway for Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation, Inducible Nitric-oxide Synthase Expression, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Lipopolysaccharide-stimulated Rat Peritoneal Macrophages, *J. Biol. Chem.* 281, 31337–31347 (2006).
50. S. Gupta, N. Salam, V. Srivastava, R. Singla, D. Behera, K. U. Khayyam, R. Korde, P. Malhotra, R. Saxena, K. Natarajan, Voltage gated calcium channels negatively regulate protective immunity to Mycobacterium tuberculosis, *PLoS One* 4, e5305 (2009).
51. M. C. Dubinsky, S. Kugathasan, S. Kwon, T. Haritunians, I. Wrobel, G. Wahbeh, A. Quiros, R. Bahar, G. Silber, S. Farrior, M. Stephens, N. Teleten, D. Panikkath, A. Ippoliti, E. Vasilias, P. Fleshner, C. Williams, C. Landers, J. I. Rotter, S. R. Targan, K. D. Taylor, D. P. B. McGovern, Multidimensional prognostic risk assessment identifies association between IL12B variation and surgery in Crohn's disease, *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1662–1670 (2013).
52. J. A. Christianson, G. F. Gebhart, Assessment of colon sensitivity by luminal distension in mice, *Nat. Protoc.* 2, 2624–2631 (2007).
53. M. Vijay-Kumar, H. Wu, J. Aitken, V. L. Kolachala, A. S. Neish, S. V. Sitaraman, A. T. Gewirtz, Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 856–864 (2007).
54. F. A. Carvalho, N. Barnich, P. Sauvanet, C. Darcha, A. Gelot, A. Darfeuille-Michaud, Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin, *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1051–1060 (2008).
55. C. Onyeagocha, M. S. Hossain, A. Kumar, R. M. Jones, J. Roback, A. T. Gewirtz, Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental colitis, *Am. J. Pathol.* 175, 2034–2042 (2009).

**Acknowledgments:** We would like to thank Dr. Claude DARCHA for her expertise in histopathological analysis.  
**Funding:** ANR VISCERALGY (ANR-09-MNPS-037-01) and FEDER. **Author contributions:** M.M and L.B : Study design, experimentations, statistical analysis, writing. A.G. : Study design, writing. E.M., L.U., F.R. and C.S. : experimentations. V.T. and L.B. : visceral pain assessment expertise. A.E : Research direction. F.A.C. : Study design, experimentations, statistical analysis, writing. D.A.: Study design, redaction, research direction. **Competing interests:** The authors have no conflict of interest to declare.

#### Supplementary Materials:

##### Materials and Methods

##### Drugs

Gabapentin (2-[1-(aminomethyl)cyclohexyl]acetic acid; Zhejiang Chiral Medicine Chemicals Co, Ltd, Hangzhou, China) and Pregabalin ((S)-(+)-3-(aminomethyl)-5-

methylhexanoic acid; Pierre Fabre Laboratories, Castres, France) were dissolved in 0.9% saline. Carbamazepine (5-carbamoyl-5H-dibenzo(b,f)azépine; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was suspended in 0.9% saline and sonicated for 45 minutes to allow proper suspension.

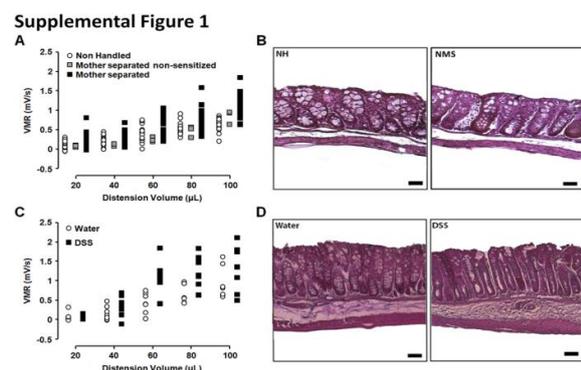
#### Evaluation of Locomotor Activity

To assess potential motor impairment induced by anticonvulsants administration, mice locomotor capacity was measured with an actimetry device (Actisystem, Apelex, Passy, France). Each mouse was placed in a closed Plexiglas (25cm x 20cm) field equipped with a photo-cell on each side. Locomotor activity was determined by quantifying the sum of the recorded photo-cell light interruptions for 15 minutes. In order to follow the same protocol as performed in CRD test, a first dose injection of each anticonvulsant was realized 60 minutes before the test, then, right after, a second injection allowing to reach the highest dose of each drug was realized and behavioral tests were repeated 60 minutes after the second injection. Accordingly, GBP was administered at 30 and 100mg/kg, PGB and CBZ at 10 and 30mg/kg.

#### Histologic Examination

Histologic examination was performed to assess colonic inflammation in both models. After CRD, mice were anaesthetized using Isoflurane and euthanized by decapitation. A one-centimeter area of the distal colon was quickly removed, opened along the mesentery artery, immersed in a 4% formaldehyde solution at 4°C overnight, and in 0.01 mM Phosphate Buffer Saline (PBS) at 4°C until its inclusion in paraffin. Five µm-thick colon slices were then cut longitudinally using a microtome (Microm STP120, Microm, France), stained with Hematoxylin & Eosin, and observed using a light microscope (Axio Scope. A1, Zeiss, Le Pecq, France).

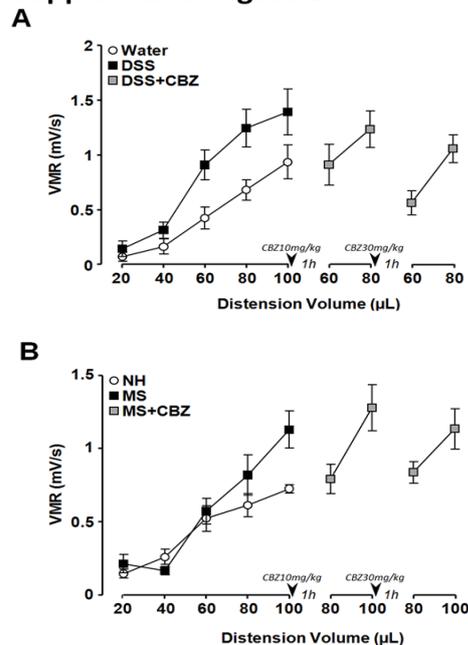
#### Supplementary figures



**Figure S1.** Visceromotor response distribution and colonic examination in CHS mouse models. (A) Distribution of VMR values in non-handled (white circles n=17) and mother-separated mice (black and grey squares n=26). Among separated mice, three animals matched with exclusion criteria (see supplementary methods) and were considered as non-sensitized (grey squares). (B) Representative histologic examinations of

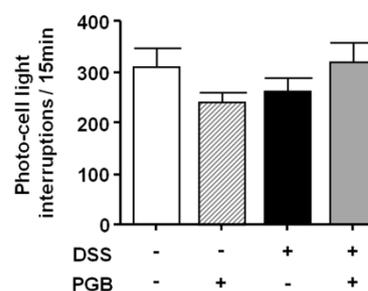
sensitized mother-separated mice colons after H&E-staining. (C) Distribution of VMR values in control (white circles n=7) and DSS-treated animals (black squares n=22). All animals were considered as sensitized by DSS treatment. (D) Representative histologic examinations of DSS-treated mice colons after H&E-staining. (scales bars = 100µm).

#### Supplemental Figure 2



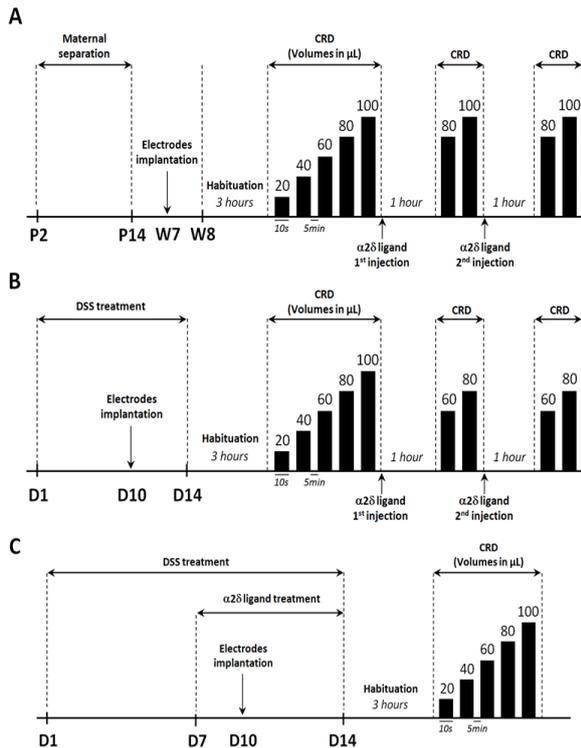
**Figure S2.** Assessment of Carbamazepine treatment on colonic hypersensitivity. (A) Effect of Carbamazepine (CBZ) on NMS-induced CHS (Non-Handled n=6; Mother-separated n=8). (B) Effect of Carbamazepine (CBZ) on DSS-induced CHS (DSS n=7; Water n=7). \* P<0.05 ; \*\* P<0.01, ANOVA 2 Way (Treatment; Volume) followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons.

#### Supplemental Figure 3



**Figure S3.** Effect of PGB on locomotor activity. Pregabalin was injected daily (10mg/kg s.c.) during 7 days. On the last day of treatment, locomotor activity was measured as described in supplemental methods.

## Supplemental Figure 4



**Figure S4.** Experimental design of assessment of  $\alpha 2\delta$  ligands treatment on colonic hypersensitivity (A) Non-inflammatory hypersensitivity was induced by maternal separation from P2 to P14. At week 7, electrodes were surgically implanted in abdominal muscle. On week 8, mice were accustomed to restraint device for three hours before probe insertion for the CRD. Balloon was inflated from 20 to 100 $\mu$ L to assess basal colonic sensitivity. Then mice were subcutaneously injected with a first dose of anticonvulsants (GBP 30mg/kg, PGB 10mg/kg) and colonic sensitivity was assessed one hour later for the two distension volumes displaying the highest significant differences in VMR between control and sensitized groups (80 and 100 $\mu$ L). A second subcutaneous injection was performed to reach the second dose of anticonvulsants (GBP 100mg/kg, PGB 30mg/kg) and the same protocol was repeated. (B) Colitis was induced by replacing drinking water by 1% DSS at D1 for 14 days. At D10, electrodes were surgically implanted in abdominal muscle. Last day of treatment (D14), mice were accustomed to restraint device for three hours before probe insertion for the CRD. Balloon was inflated from 20 to 100 $\mu$ L to assess basal

colonic sensitivity. Then mice were subcutaneously injected with a first dose of anticonvulsants (GBP 30mg/kg, PGB 10mg/kg) and colonic sensitivity was assessed one hour later for the two distension volumes displaying the highest significant differences in VMR between control and sensitized groups (60 and 80 $\mu$ L). A second subcutaneous injection was performed to reach the second dose of anticonvulsants (GBP 100mg/kg, PGB 30mg/kg) and the same protocol was repeated. (C) For chronic  $\alpha 2\delta$  ligands treatment, colitis was induced as previously described and PGB (10mg/kg s.c.) was administered daily from D7 post-DSS treatment onset up to the last day of DSS treatment (D14). At D14, after habituation, CRD from 20 to 100 $\mu$ L was performed.

Parameter	Non Handled	Mother Separated sensitized	P value
Body Weight (g)	23,1 $\pm$ 0,6	22,4 $\pm$ 0,8	ns
Spleen Weight (g/100g BW)	0,280 $\pm$ 0,007	0,309 $\pm$ 0,032	ns
Colon Weight (g/100g BW)	0,875 $\pm$ 0,0,36	0,825 $\pm$ 0,035	ns
Colon Length (cm)	8,1 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,3	ns
Plasmatic IL-6 (pg/mL)	36,2 $\pm$ 1,9	35,2 $\pm$ 2,3	ns
Colonic IL-6 (pg/mL)	143,9 $\pm$ 102,8	126,7 $\pm$ 77,0	ns
MPO activity (U/g of colon)	3,5 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,4	ns

Values are mean  $\pm$  SEM. BW, Body Weight; IL-6, Interleukin-6; MPO, Myeloperoxidase

**Table S1.** Inflammatory parameters in maternal separation CHS model. Student t test.

Parameter	Water (n=7)	DSS (n=7)	P value
DAI	0,1 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,5	< 0,001
Spleen Weight (g/100g BW)	0,365 $\pm$ 0,022	0,587 $\pm$ 0,059	< 0,01
Colon Weight (g/100g BW)	0,745 $\pm$ 0,031	1,349 $\pm$ 0,112	< 0,001
Colon Length (cm)	8,6 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,4	< 0,001
Plasmatic IL-6 (pg/mL)	7,9 $\pm$ 4,3	174,0 $\pm$ 85,0	< 0,001
Colonic IL-6 (pg/mL)	52,3 $\pm$ 32,8	911,9 $\pm$ 141,6	< 0,001
MPO activity (U/g of colon)	2,1 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,5	< 0,001

Values are mean  $\pm$  SEM. DAI, Disease Activity Index; DSS, Dextran Sulfate Sodium; BW, Body Weight; IL-6, Interleukin-6; MPO, Myeloperoxidase

**Table S2.** Inflammatory parameters in Dextran Sulfate Sodium CHS model. P<0.001 : Student t test.

## Annexe 4 : Article 2

## Targeting Cav3.2 calcium channels to treat inflammation and related pain

Nicolas Kerckhove<sup>1,2</sup>, Ludivine Boudieu<sup>1,2</sup>, Justine Bourdier<sup>1,2</sup>, Amaury François<sup>4,5,6,7</sup>, Frédéric A. Carvahlo<sup>1,2</sup>, Denis Ardid<sup>1,2</sup>, Emmanuel Bourinet<sup>4,5,6,7</sup>, Alain Eschalier<sup>\*,1,2,3</sup> and Christophe Mallet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, NEURO-DOL, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>Inserm, U1107, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>3</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service de pharmacologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France. <sup>4</sup>Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, France. <sup>5</sup>CNRS UMR5203, Montpellier, France. <sup>6</sup>INSERM, U661, Montpellier, France. <sup>7</sup>IFR3 Universités Montpellier I&II, Montpellier, France.

**Short title:** Cav3.2 calcium channels and inflammatory pain

**Keywords:** Cav3.2, T-type calcium channel, pain, inflammation, ethosuximide

**\*Corresponding author:** Pr. Alain Eschalier

Unité Inserm/UdA 1107 Neuro-Dol, Faculté de médecine, 28 Place Henri Dunant, BP38 63001 Clermont-Ferrand FRANCE

Phone : +33473178230; Fax : +33473178233

Email: [alain.eschalier@udamail.fr](mailto:alain.eschalier@udamail.fr)

**Conflict of interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

### Abstract

Treat chronic inflammatory pain is a major clinical challenge, because of their many treatments are sparsely effective over the long term, induce adverse effects and its underlying mechanism remains elusive. We hypothesized that chronic inflammation and related pain may involve ion channels in their maintenance and development. Here, we report that T-type calcium channel Cav3.2 plays a crucial role in inflammation and related pain in carrageenan and complete Freund's adjuvant mice models. Indeed, inhibition of Cav3.2 channels, using knock-out mice and antagonists, induced an anti-hypersensitivity effect, as well as a decrease of edema development, pro-inflammatory mediator production and macrophage activation. Moreover, Cav3.2 channels specifically disabled in hematopoietic cells (chimeric mice) decreased edema development, pro-inflammatory mediator production and inflammatory hypersensitivity. Finally, Ethosuximide, an antiepileptic drug marketed in Europe for the treatment of absence seizure and considered as a T-type calcium channels blocker, induces an anti-edematous and anti-hypersensitivity effect in inflammatory pain models.

This work indicates a critical involvement of Cav3.2 channels in mechanism underlying the pathogenesis of inflammation and related pain and suggests that targeting the Cav3.2 channel by ethosuximide may be an effective approach for treating chronic inflammatory pain, including arthritis, in humans.

### Introduction

Pain is a common complaint patients suffering from chronic inflammatory diseases (van der Heijde *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2010). It has a major impact not only on physical but also on mental well-being of patients by altering their quality of life (Giesecke *et al.*, 2005; Conrad *et al.*, 2013) and inducing premature mortality (Wolfe *et al.*, 2003). In addition, inflammatory-related pain is a major human health problem due to its severe economic impact, either directly because of the cost of cares or indirectly due to reduced productivity at work (Bergman, 2006; Lenssinck *et al.*, 2013). However, despite crucial needs of treatment to relieve inflammatory-related pain, the most commonly used drugs (paracetamol, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids) have a non-optimal benefit/risk ratio. The efficacy of paracetamol is often too limited (Graham *et al.*, 2013)

and the beneficial effects of the NSAIDs are counterbalanced by severe adverse effects such as gastric perforation, ulcer, bleeding or renal and cardiovascular troubles due to concomitant inhibition of homeostatic functions of prostanoids (Allison *et al.*, 1992; Samad *et al.*, 2002; Kearney, 2006). Furthermore, prolonged treatments with opioids can induce adverse effects, such as dependency which is becoming a major public health problem in patients with non-cancer chronic pain (Højsted and Sjøgren, 2007). Thus, it is important to propose new pharmacological strategies to treat patients suffering from chronic inflammatory-related pain.

Several data suggest that targeting voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (VGCCs) appear to be a promising new therapeutic approach. Changes in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] are principally set by resting membrane potential and steady state Ca<sup>2+</sup> influx through VGCCs (Knot and Nelson, 1998;

Welsh *et al.*, 2000, 2002). Moreover, a range of VGCCs has been identified as being involved in transmitter release and prolonged excitatory states of the neuronal membrane (Catterall, 2011). Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels are divided into two groups depending on activation threshold, high-voltage (L-, P/Q-, N- and R-type) and low-voltage (T-type) activated channels. Three genes (*Cacna1g*, *Cacna1h* and *Cacna1i*) encode T-type channels, giving rise to voltage-sensing, pore-forming  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  and  $\alpha 1I$  subunits, termed Cav3.1, Cav3.2, and Cav3.3, respectively (Catterall, 2011). Among them, Cav3.2 T-type calcium channels seem particularly involved in pain. Bourinet *et al.* (Bourinet *et al.*, 2005), demonstrated that only oligonucleotides downregulating mRNA encoding Cav3.2 protein, but not Cav3.1 and Cav3.3, present antinociceptive properties by decreasing mechanical hyperalgesia and allodynia in a rat model of mononeuropathy. Moreover, Cav3.2 knockout (Cav3.2 KO) mice were shown to exhibit decrease responses to acute noxious stimuli (Choi *et al.*, 2007; Francois *et al.*, 2013; Kerckhove *et al.*, 2014) and hypersensitivity in animal models of neuropathic pain (Bourinet *et al.*, 2005; Latham *et al.*, 2009; Messinger *et al.*, 2009). Accordingly, pharmacological blockade of T-type channels reduces mechanical and thermal hypersensitivity induced by peripheral nerve injury in rats (Dogrul *et al.*, 2003; Hamidi *et al.*, 2012).

Despite all these strong evidences, the role of Cav3.2 channels is still poorly studied in inflammatory-related pain. In this study, the involvement of Cav3.2 channels in inflammatory process and related pain was investigated by using genetic (Cav3.2 KO mouse) and pharmacological (ethosuximide, a T-type channel blocker, and TTA-A2, a novel selective inhibitor preferentially affecting Cav3.2) tools in inflammatory-related pain models. Cav3.2 calcium channels were demonstrated to participate actively to edema development through the activation of macrophages and pro-inflammatory mediator production and to related pain through both neuron and macrophage-expressed channels. This study highlights T-type calcium channels as a potent target for inflammation and pain related to develop future treatments.

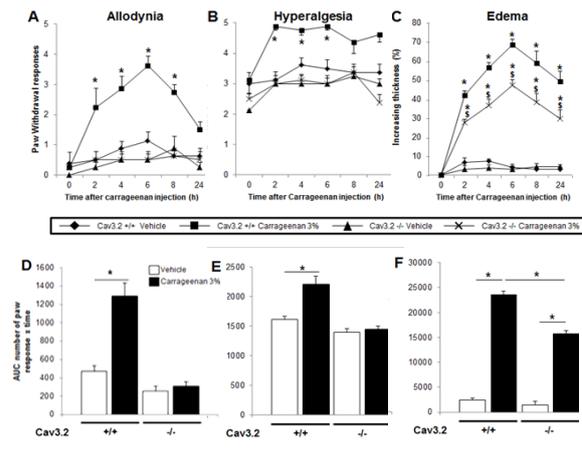
## Results

*Cav3.2 calcium channels contribute to pain, edema development and production of pro-inflammatory mediators.*

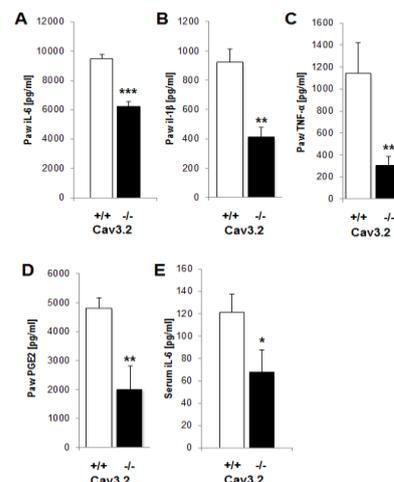
Symptoms of mechanical allodynia and hyperalgesia associated with carrageenan-induced inflammation were assessed by using the von Frey test. Cav3.2 KO mice (Cav3.2<sup>-/-</sup>), unlike their wild type (WT) littermates (Cav3.2<sup>+/+</sup>), did not develop allodynia (Figures 1A and 1D) or hyperalgesia (Figures 1B and 1E). To evaluate the inflammatory state, edema development and the

production of pro-inflammatory mediators were determined.

An edema was elicited in Cav3.2<sup>-/-</sup> mice but its size was significantly decreased by 33.1 ± 2.0% regarding area under the time-course curves of edema thickness compared to Cav3.2<sup>+/+</sup> mice (Figures 1C and 1F). In addition to reduced edema development and painful sensitivity, Cav3.2<sup>-/-</sup> mice also exhibited a strongly decreased production of pro-inflammatory mediators (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>) in the inflamed paw and a decrease in IL-6 serum levels (Figures 2A-E).



**Figure 1.** The Cav3.2 calcium channels are involved in symptoms of tactile allodynia and hyperalgesia and the development of edema associated with inflammation. (A) Carrageenan-induced mechanical allodynia, (B) mechanical hyperalgesia and (C) edema. The areas under the curve of A, B and C are represented in D, E and F, respectively. Tests were performed on Cav3.2 knockout mice (Cav3.2<sup>-/-</sup>) and their wild type littermates (Cav3.2<sup>+/+</sup>). Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. (A and B) \*P < 0.05, compared to respective vehicle groups, (C) P < 0.05, carrageenan Cav3.2<sup>-/-</sup> group compared to carrageenan Cav3.2<sup>+/+</sup> group.

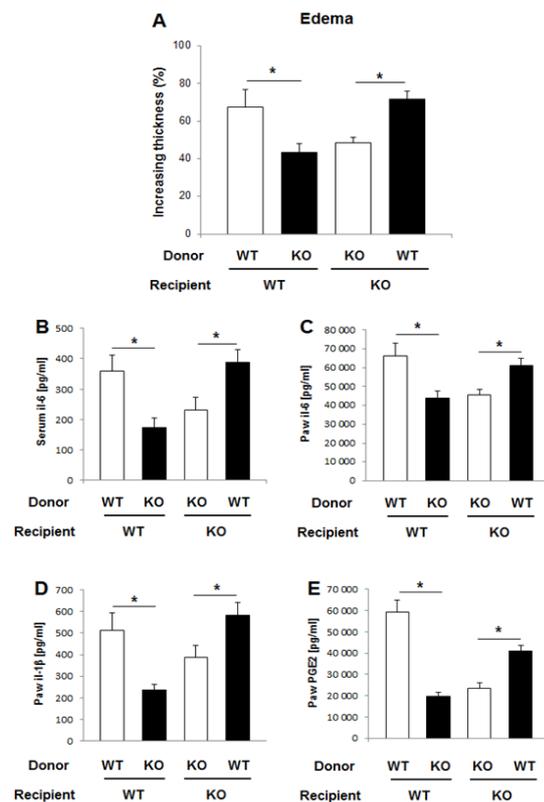


**Figure 2.** Cav3.2 knockout animals produce less pro-inflammatory mediators in response to inflammation (carrageenan model). (A-D) IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> in edema, (A) IL-6 in serum. Serum and edema were sampled from Cav3.2 knockout mice (Cav3.2<sup>-/-</sup>) and their wild type littermates (Cav3.2<sup>+/+</sup>) 4 hours after carrageenan injection. Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05.

### Edema development is dependent on expression of Cav3.2 channels in macrophages.

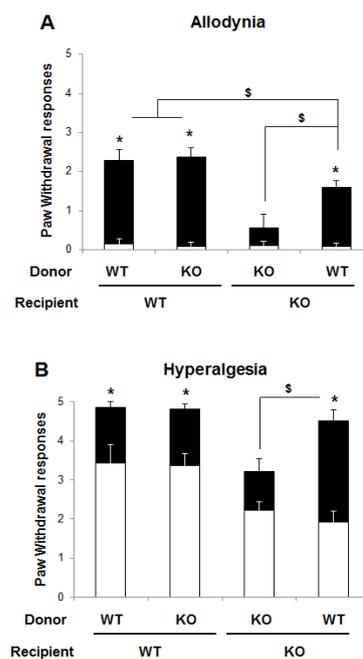
Edema development and pro-inflammatory mediators produced during inflammation are mainly dependent on macrophages recruitment and their activation on the inflammatory site. Before investigating the role of Cav3.2 channels in macrophages, we showed, using quantitative RT-PCR, a *cacna1h* (the gene encoding Cav3.2 channel) mRNA production on cell culture of bone marrow derived macrophages (BMDM) and so, for the first time, the possible expression of voltage-dependent calcium channel on macrophages (Supplementary Figure 1).

To demonstrate the specific involvement of immune cells expressing Cav3.2 in edema development, chimeric mice were generated. These mice were either disabled for the gene encoding the Cav3.2 channel only in the immune system (they were Recipient WT mice which received hematopoietic cells from Donor Cav3.2 KO mice) or invalidated in the entire body except for the immune system (Recipient Cav3.2 KO mice and Donor WT mice) (Supplementary Figure 2). The inflammatory status of these chimeric mice in inflammatory conditions was assessed 4 hours after intraplantar injection of carrageenan. The absence of Cav3.2 channels specifically in the immune system induced a less edema development, similarly to the situation observed with the global Cav3.2 KO mice ( $43.4 \pm 4.7\%$  and  $48.6 \pm 3.0\%$ , respectively). On the opposite, edema was restored in the case of Cav3.2 KO mice receiving WT hematopoietic cells (Figure 3A).



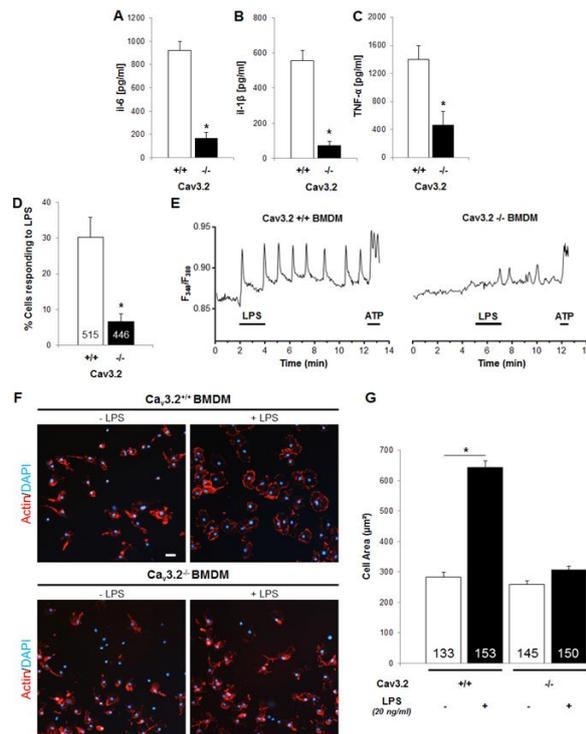
**Figure 3.** Cav3.2 channels specifically expressed by hematopoietic cells are involved in the development of edema and pro-inflammatory mediator release. The assessment of edema development and pro-inflammatory mediator production was performed 4 hours after carrageenan injection. (A) Edema development, (B) IL-6 in serum, (C-E) IL-6, IL-1β and PGE<sub>2</sub> in edema. Tests were performed on chimeric mice, 8 weeks after their irradiation and bone marrow transplantation. Behavioral test, serum and edema sample were performed from chimeric mice 4 hours after carrageenan injection. Donor: mouse bone marrow donor, Recipient: transplanted mouse; KO: Cav3.2 knock-out mice (*Cav3.2*<sup>-/-</sup>) and WT: littermates mice (*Cav3.2*<sup>+/+</sup>). Data are shown as mean (n = 6-8) ± SEM. \*P < 0.05.

Consistently, the absence of Cav3.2 channels only in hematopoietic cells (Recipient WT Donor KO) significantly reduced the production of pro-inflammatory mediators, as previously observed in total Cav3.2 KO mice and conversely (Figure 3B-E). Concerning the painful behavior, the absence of Cav3.2 channels only in hematopoietic cells did not modify mechanical allodynia and hyperalgesia in recipient WT mice (Recipient WT Donor KO), while the presence of Cav3.2 channels exclusively in hematopoietic cells more or less partially restored mechanical allodynia and hyperalgesia in recipient Cav3.2 KO mice (Recipient KO Donor WT) (Figure 4A and B).



**Figure 4.** Cav3.2 channels specifically expressed by hematopoietic cells are involved in carrageenan-induced hypersensitivity. The assessment of carrageenan-induced hypersensitivity was performed before (baseline, white histogram) and 4 hours after carrageenan injection (black histogram). (A) Carrageenan-induced mechanical allodynia, (B) mechanical hyperalgesia. Tests were performed on chimeric mice, 8 weeks after their irradiation and bone marrow transplantation. Donor: mouse bone marrow donor, Recipient: transplanted mouse, KO: Cav3.2 knock-out mice (*Cav3.2*<sup>-/-</sup>) and WT: littermates mice (*Cav3.2*<sup>+/+</sup>). Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05 compared to baseline; <sup>§</sup>P < 0.05.

### *Cav3.2* calcium channels are essential for macrophage activation.



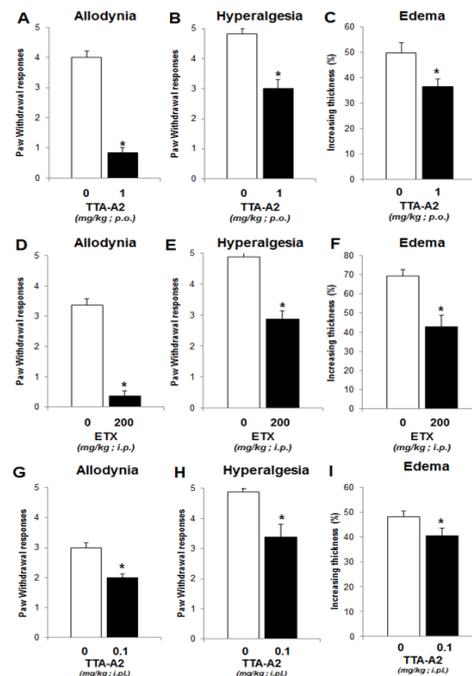
**Figure 5.** *Cav3.2* channels are involved in pro-inflammatory mediator production by bone marrow derived macrophages (BMDM) and their activation in response to LPS. (A-C) IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production, (D) representative percentage of BMDM responding to LPS, (E) representative recording of LPS-induced calcium signals in single *Cav3.2*<sup>+/+</sup> and *Cav3.2*<sup>-/-</sup> BMDM, (F) immunohistochemistry of BMDM (actin [phalloidin toxin] = red and nucleus [DAPI] = blue), scale bar: 20  $\mu$ m, (G) representative BMDM cell area. All tests were performed 24 hours after LPS (20 ng/ml) injection (or during 5 minutes for calcium imaging experiment). (D and F) The number of analyzed cells is shown at the bottom of the histograms. Data are shown as mean (n = 8 for mediators, n = 3 for morphology and n = 4 mice for calcium imaging)  $\pm$  SEM. \**P* < 0.05.

Since previous studies have demonstrated the involvement of *Cav3.2* channels in the production and exocytosis of catecholamines (Carbone *et al.*, 2006) and in regard of our present results, we hypothesized that *Cav3.2* channels expressed in macrophages play a central role in their activation during the inflammatory process. To demonstrate this role, *in vitro* studies were performed on *Cav3.2*<sup>-/-</sup> and *Cav3.2*<sup>+/+</sup> mouse BMDM culture. Following inflammatory-like stimulation (20 ng/ml of LPS during 24 hours), *Cav3.2*<sup>-/-</sup> BMDM produced a less amount of pro-inflammatory mediators (IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) compared to *Cav3.2*<sup>+/+</sup> BMDM (Figure 5A-C). Since calcium was shown to be a major factor in the macrophage activation (Zhou *et al.*, 2006b), the study of intracellular calcium influx, by calcium imaging, was performed on the same condition. Results showed that 30.2  $\pm$  5.6% (156/515) of *Cav3.2*<sup>+/+</sup> BMDM cells and only 6.7  $\pm$  2.1%

(26/446) of *Cav3.2*<sup>-/-</sup> BMDM cells exhibited an intracellular calcium influx in response to LPS stimulation (Figure 5D and E). *Cav3.2* channels were thus involved in calcium influx in LPS-stimulated macrophages. In addition, the study of the macrophage morphology, performed by phalloidin-immunofluorescence labelling of actin, revealed swelling morphology for *Cav3.2*<sup>+/+</sup> BMDM (cells area without LPS = 283  $\pm$  15  $\mu$ m<sup>2</sup>; with LPS = 643  $\pm$  22  $\mu$ m<sup>2</sup>), supposing strong cytoplasmic production of inflammatory mediators. In contrast, *Cav3.2*<sup>-/-</sup> BMDM showed no morphological signs of activation (cells area without LPS = 307  $\pm$  12  $\mu$ m<sup>2</sup>; with LPS = 260  $\pm$  10  $\mu$ m<sup>2</sup>) in response to LPS stimulation (Figure 5F and G).

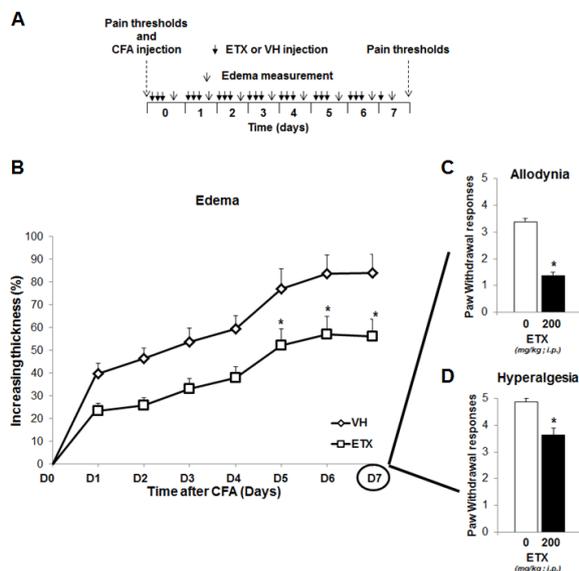
### Pharmacological blockade of T-type calcium channels exhibits anti-allodynia, anti-hyperalgesia and anti-inflammatory effect in sub-acute and chronic inflammatory-related pain.

The analgesic and anti-inflammatory effects of the TTA-A2 (T-type calcium channel inhibitor, preferentially *Cav3.2* isoform) (Francois *et al.*, 2013; Kerckhove *et al.*, 2014), and ethosuximide (T-type calcium channels blocker and marketed antiepileptic), were first evaluated using sub-acute carrageenan-induced paw inflammation. As previously observed with *Cav3.2* KO mice, pharmacological blockade of T-type calcium channels, using systemic administration of TTA-A2 or ethosuximide (1 mg/kg *per os*, 200 mg/kg *i.p.*, respectively), induced an anti-hyperalgesic and anti-allodynic effect (Figure 6A-B and D-E). In addition, an anti-edematous property of these inhibitors was observed (Figure 6C and F). The same result was obtained by intraplantar injection of TTA-A2 (0.1 mg/kg *it.pl.* Figure 6G-I) confirming an involvement of *Cav3.2* channels (more widely T-type calcium channels) in inflammation and related pain.



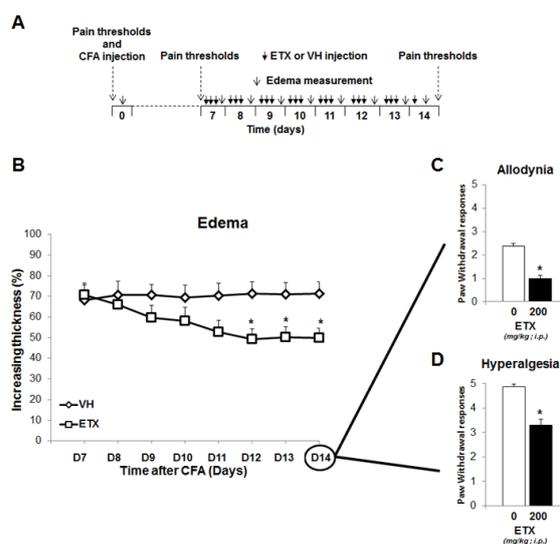
**Figure 6.** Pharmacological inhibition of T-type calcium channels produces anti-allodynia, anti-hyperalgesia and anti-inflammatory effect in sub-chronic inflammatory pain. (A, D and G) Carrageenan-induced mechanical allodynia, (B, E and H) mechanical hyperalgesia and (C, F and I) edema. Mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed 4 hours after carrageenan injection and 30 minutes after drugs administration (TTA-A2 = 1 mg/kg *per os* or 0.1 mg/kg *subcutaneous* intraplantar; ethosuximide [ETX] = 200 mg/kg intraperitoneal; vehicle). Edema development was assessed 2 hours after drugs administration. Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05.

To confirm previous results, inflammation and related pain parameters were assessed in another model, a chronic inflammatory one, using peri-articular complete Freund's adjuvant (CFA) injection. Due to the chronicity of the model and in order to assess the maintenance over time of the clinical used ethosuximide efficacy, the effect of repeated treatments was investigated. Repeated injections (3 times daily) of ethosuximide (200 mg/kg *i.p.*) for 7 days "preventively" (Figure 7A) or curatively (Figure 8A), induced an anti-edematous (Figure 7B and 8B), anti-allodynic (Figure 7C and 8C) and anti-hyperalgesic (Figure 7D and 8D) effect. In addition, to support previous result, *Cav3.2<sup>-/-</sup>* mice developed less edema and did not display mechanical hypersensitivity symptoms at 7 days after CFA injection (Supplementary Figure 3A-C).



**Figure 7.** Preventive pharmacological inhibition of T-type calcium channels produces anti-allodynia, anti-hyperalgesia and anti-inflammatory effect in chronic inflammatory pain. (A) Animals receive repeated administration (3 times daily from D0 to D6 and once on D7 after CFA injection) of the Cav3.2 inhibitor (Ethosuximide [ETX], 200 mg/kg, intraperitoneal) or vehicle. Edema development was assessed before (D0) and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days after peri-articular injection of CFA. Assessment of allodynia and hyperalgesia was performed on the last day (D7) 30 minutes after the last ethosuximide treatment, (B) time course of edema development, (C) mechanical allodynia and (D)

mechanical hyperalgesia. Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05, compared to vehicle groups.



**Figure 8.** Curative pharmacological inhibition of T-type calcium channels produces anti-allodynia, anti-hyperalgesia and anti-inflammatory effect in chronic inflammatory pain. (A) Animals receive repeated administration (3 times daily, from D7 to D13 and once on day 14 after CFA injection) of the Cav3.2 inhibitor (Ethosuximide [ETX], 200 mg/kg, intraperitoneal) or vehicle. Edema development was performed before (D0) and 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14 days after peri-articular injection of CFA. Assessment of allodynia and hyperalgesia was performed on the last day (D14) 30 minutes after the last ethosuximide treatment, (B) time course of edema development, (C) mechanical allodynia and (D) mechanical hyperalgesia. Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05, compared to vehicle groups.

## Discussion

Using *ex vivo* and *in vivo* methods coupled with genetic strategies, this work demonstrated, for the first time, the involvement of Cav3.2 channels in inflammation and inflammatory-related pain by modulating macrophage activation and inflammatory mediator release. This discovery was reinforced by the efficiency of the T-type blocker ethosuximide and the specific Cav3.2 inhibitor TTA-A2 on both inflammation and pain which opens new clinical perspectives for the treatment of inflammatory-related pain.

Total genetic deletion of Cav3.2 reduced edema induced by carrageenan paw injection or CFA peri-articular injection and carrageenan-induced systemic IL-6 and tissue IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> production. Moreover, suspecting the involvement of Cav3.2 channels on macrophages in the inflammatory process, we demonstrated: 1) the presence of Cav3.2 transcripts on BMDM from *Cav3.2<sup>+/+</sup>* mice and 2) the ability of these channels to participate to macrophages activation. These results are in accordance with recent studies which

demonstrated the role of calcium channels and extracellular calcium in macrophage activation by LPS (Zhou *et al.*, 2006b) and the potential role of Cav3.2 channels in exocytose processes (Carbone *et al.*, 2006; Giancippoli *et al.*, 2006; Carabelli *et al.*, 2007; Mahapatra *et al.*, 2012). Thus, expression of functional Cav3.2 calcium channels on macrophages could explain the decrease of pro-inflammatory mediator production by BMDM from Cav3.2<sup>-/-</sup> mice, resulting in a tissue (edema) and systemic reduced inflammatory marker secretion. Although macrophages are non-excitabile, the importance of several voltage gated ion channel in these cells as well as other immune cells (lymphocytes, monocytes, etc) is emerging (Kis-Toth *et al.*, 2011). In that respect, the ability of T-type calcium channels to generate a steady state window current upon little variations of membrane potential could actively participate to macrophage activation, as observed for in differentiation processes of other cell types (Lory *et al.*, 2006). Finally, using chimeric mice, we demonstrated that the unique absence of Cav3.2 channels in hematopoietic cells (progenitors of macrophages) reduced edema development and pro-inflammatory mediator release. Interestingly, this reduction was close to that observed in total Cav3.2 KO mice, suggesting that Cav3.2 channels expressed by hematopoietic cells were involved in the inflammatory process. Accordingly, transplantation of hematopoietic cells expressing Cav3.2 channels in total Cav3.2 KO animals completely restored edema development and inflammatory pro-mediators release. Thus, this chimeric mouse experiment demonstrated that inflammation induced by carrageenan and CFA needed Cav3.2 channels expressed in hematopoietic cells, even if their deletion did not totally suppress the inflammatory process.

Cav3.2 channels may be involved in carrageenan-induced hypersensitivity to noxious or non-noxious stimuli, owing to their neuronal [by modulating nociceptive influx (Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2006; Bender *et al.*, 2012)] or macrophagic (by participating to inflammation, as shown previously) location. Total deletion of Cav3.2 induced a marked reduction of allodynia and hyperalgesia suggesting an important tonic involvement of these channels in hypersensitivity, and thus confirming previous other studies (Bourinet *et al.*, 2005; Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2013; Kerckhove *et al.*, 2014). Regarding the respective role of their locations, deletion of channels only in the hematopoietic cells did not alter mechanical hyperalgesia and allodynia demonstrating that the tonic involvement of Cav3.2 channels in hypersensitivity is mainly due to their presence in sensory neurons. This observation of an unchanged level of pain, in WT mice with absence of Cav3.2 in hematopoietic cells, despite a decreased edema, can be explained by the potential ability of the residual inflammation and pro-inflammatory

mediators to activate nociceptors and induce hyperalgesia/allodynia. Furthermore, the existence of a decoupling of pain and edema has been shown by several studies in the model of inflammation induced by carrageenan (King *et al.*, 2009) and formalin (Lee and Jeong, 2002). Interestingly, transfer of Cav3.2 hematopoietic cells in Cav3.2 KO mice restored edema, partially hyperalgesia and allodynia demonstrating that Cav3.2 expressed by hematopoietic cells could, in a lesser extent, participate to the inflammatory-related pain by inducing inflammation. Taken together, these results demonstrate that Cav3.2 channels are markedly involved in inflammatory pain from their neuronal expression in sensory neurons. However, we cannot exclude a role of Cav3.2 expressed by immune system but their involvement in inflammatory pain is minimal.

In line with the pathophysiological role of both Cav3.2 expressed by immune and neuronal systems demonstrated in the present study, systemic administration of ethosuximide reduced edema, hyperalgesia and allodynia in the carrageenan and CFA models. Interestingly, repeated systemic injection of ethosuximide induced a curative anti-hyperalgesic and anti-edematous effect but was also able to limit development of edema when administered at the same time of CFA injection, these effects being maintained over time. Working more specifically on Cav3.2 channels, we also demonstrated an analgesic and anti-inflammatory effect of systemic administration of TTA-A2, a specific inhibitor of Cav3.2 channels (Francois *et al.*, 2013; Kerckhove *et al.*, 2014). This result validates the concept of Cav3.2 channels as a novel target for inflammation and related pain relief. Moreover, the demonstrated analgesic and anti-edematous effect observed after intraplantar administration of a low dose of TTA-A2 confirmed that peripheral (potentially on immune cells and primary afferent fibers) Cav3.2 channels are involved in the pathophysiology of inflammation and related pain and expands the array of potential clinical use of T-type calcium channel inhibitors.

Overall, present data argue that efforts [this work and others (Bourinet *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007; Francois *et al.*, 2013; François *et al.*, 2014; Kerckhove *et al.*, 2014)] in understanding the role of Cav3.2 channels in inflammation and pain modulation, will yield novel opportunities in treating pain using T-type or specific Cav3.2 inhibitors. This work particularly justifies to perform clinical studies with the marketed drug ethosuximide to demonstrate its ability to improve pain in patients with inflammation and thus to validate the interest of blocking Cav3.2 channels in inflammatory pain. Moreover, our results suggest that peripherally acting Cav3.2 inhibitors could also be effective for pain relief while limiting any potential central adverse effects of Cav3.2 inhibition.

## Methods

### *Animals, study approval, drugs and drugs administrations.*

All experiments were conformed to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Zimmermann, 1983) and approved by our regional ethics committee for animal experiments of the Auvergne region in France (CEMEA Auvergne: CE 55-12, CE 112-12, and CE 07-08). Experiments were carried out using male C57BL6/J mice (20-24 g). Cav3.2 knock-out mice (*Cav3.2<sup>-/-</sup>*) and their wild-type littermates (*Cav3.2<sup>+/+</sup>*) were bred and maintained at the University of Auvergne (Clermont-Ferrand, France). *Cav3.2<sup>-/-</sup>* mice were originally generated by Chen CC et al. (Chen *et al.*, 2003). Mice were housed under controlled environmental conditions (21-22°C; 55% humidity) and kept under a 12/12 hours light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. For all experiments, mice were euthanized by cervical dislocation or CO<sub>2</sub>.

We purchased λ-carrageenan and ethosuximide from Sigma-Aldrich (France). TTA-A2 was generously provided by Merck Laboratories (Pennsylvania, USA). Complete Freund's adjuvant (CFA) was from Difco Laboratories (Detroit, USA). TTA-A2 was administered by subcutaneous intraplantar (20 µl, 0.1 mg/kg) or oral (1 mg/kg) route and ethosuximide was administered by intraperitoneal (200 mg/kg) route to a volume of 10 ml/kg.

In all experiments, randomized block designed were used and the experimenter and drug administration were blind to the mouse genotype and treatments. Drug administration was performed by a different person than the experimenter.

### *Carrageenan and monoarthritic model.*

On the day of the experiment, sub-acute paw inflammation was induced by an intraplantar (left hindpaw) subcutaneous injection of physiologic serum - 3% λ-carrageenan (20 µl). Comparisons of the reaction threshold and edema development were performed before (baseline) and 2, 4, 6, 8 and 24 hours or 4 hours after inflammation induction for *Cav3.2<sup>-/-</sup>* mice and TTA-A2 and ethosuximide experiments, respectively, to ensure mice exhibited related-pain behavior (Morris, 2003).

For monoarthritic model, 5 µl of CFA were injected at the two sides of the left ankle joint under brief anesthesia (halothane/N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>). Comparisons of the reaction threshold and edema development were performed before (baseline) and 7 or 14 days after the inflammation induction to ensure mice exhibited related-pain behavior (Lolignier *et al.*, 2011).

### *Edema measurement.*

Paw edema induced by intraplantar carrageenan and peri-articular CFA injection was measured at 4 hours or every day (from D0 to D7 or D7 to D14), respectively,

after inflammation induction, using a caliper. Assessment of edema was performed before (baseline) and 2 hours after drugs administration.

### *Assessment of mechanical allodynia and hyperalgesia.*

Mice were acclimated to the testing environment before baseline testing. On the behavior testing day, mice were placed in individual compartments on top of a wire surface and allowed to acclimatize for one hour before testing. Mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed with the 0.04 and 1.4 grams calibrated von Frey filaments (Bioseb, France). This 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 and a pain score (from 0 to 5) response was determined. Assessment of mechanical allodynia and hyperalgesia were performed before (baseline) and 30 minutes after drugs administration.

### *Bone-marrow derived macrophage and edematous tissue culture.*

Bone-marrow derived macrophage (BMDM) cells were prepared and cultured as previously described (Carvalho *et al.*, 2011). Briefly, mouse femurs were washed out and flushed with DMEM and bone-marrow cells were plated at an initial density of 10<sup>6</sup> cells/ml. Then, cells were cultured and differentiated into BMDM using DMEM supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 1% antibiotic (neomycin) and 50% L929 supernatants containing macrophage-stimulating factor (M-CSF). For *in vitro* experiments, BMDMs were cultured for at least 5 days before LPS stimulation by in serum-free BMDM culture medium.

To perform edematous tissues culture, edema (30 mg tissue / mouse) was withdrawn 4 hours after carrageenan injection and cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% glutamine and 1% antibiotic. After 24 hours, the medium was harvested and supernatant used to quantify pro-inflammatory factors by ELISA.

### *ELISA assay.*

Cytokine production (IL-1β, IL-6, TNF-α) and PGE<sub>2</sub> were assessed by ELISA assays 4 hours after carrageenan hindpaw injection in serum and 24 hours after edema culture. All ELISA kits were Duoset kits from R & D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and assays performed according to the manufacturer protocol. The minimum detectable doses were 15.6 pg/ml for IL-1β, 15.6 pg/ml for IL-6, 31 pg/ml for TNF-α, and 15.6 pg/ml for PGE<sub>2</sub>.

### *Immunocytochemistry.*

Mouse macrophages *Cav3.2<sup>-/-</sup>* and *Cav3.2<sup>+/+</sup>* were activated by contact with LPS (20 ng/ml) for 24 hours.

Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 Phalloidin antibody was purchased from Invitrogen and used at the indicated dilution of 5/200. BMDM plated on cover slips were fixed for 5 minutes with 4% paraformaldehyde in PBS. After three washes in PBS, cells were incubated 1 hour with PBS-BSA 3% solution for saturation. Cells were permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 15 minutes at room temperature and, after washes, were incubated 20 minutes at room temperature with Phalloidin toxin in PBS-BSA 3% solution. After three washes and DAPI staining, BMDM plated cover slips were mounted and observed. Image acquisitions were performed with Axio Scope A.1 (Zeiss).

#### *Calcium imagery.*

Mouse macrophages *Cav3.2*<sup>-/-</sup> and *Cav3.2*<sup>+/+</sup> were activated by contact with LPS (20 ng/ml) during 5 minutes. The involvement of Cav3.2 channels on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was evaluated by recording the changes in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration using the radiometric fluorescent probe Fura-2 in BMDMs purified from *Cav3.2*<sup>-/-</sup> and *Cav3.2*<sup>+/+</sup> mice. Cells were loaded with 2 μM of Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM, Invitrogen), 0.5% BSA in the recording saline solution (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 10 mM Hepes, pH7.4). After one hour of incubation at room temperature, cells were washed three times and then stimulated with indicated concentration of LPS. The Metafluor Imaging system (Molecular Devices) was used for fluorescence acquisition and analysis of individual cells. Fluorescence was excited by illumination through x20 water immersion objective with a light wavelength switch provided by a DG4 filter wheel and detected with a CCD camera under the Metafluor software control. Pairs of image were acquired every 2 seconds.

#### *Generation of chimeric mice.*

The objective was to determine the role of Cav3.2 channels expressed by hematopoietic cells in inflammation and related pain. For that, bone marrow (BM) chimeric mice generation was performed by: 1) irradiating WT and Cav3.2 KO mice (recipient) with a total dose of 10 Gy (1 Gy/min) by the X-RAD 320 irradiator (320kV, 45mAmp, Precision X-RAY Inc. Brandford-CT) performed at the PAVIRMA platform (University Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France); 2) transferring in these irradiated mice, by i.v injection, 100 μl Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10<sup>7</sup> total BM cells retrieved from un-irradiated WT or Cav3.2 KO mouse (donor) immediately after irradiation (Supplemental Figure 2). This procedure led us to obtain four experimental groups of irradiated mice including controls [WT mice transferred with BM cells from WT donors (Recipient WT/Donor WT); Cav3.2 KO mice transferred with BM cells from KO donors (Recipient KO/Donor KO)] and chimeric animals [WT mice transferred with BM cells

from Cav3.2 KO (Recipient WT/Donor KO) ; Cav3.2 KO mice transferred with BM cells from WT donors (Recipient KO/Donor WT)]. During 2 weeks after the irradiation, mice received a drinking water complemented with 2 mg/ml of neomycin. At 8 weeks after the BM transplantation, chimeric mice were used for experiments.

#### *RT-PCR and quantitative RT-PCR.*

RNA was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions, including a 15 min DNase incubation step. Purified RNA was quantified by measuring the 260 nm absorbance (A260) with the Epoch<sup>®</sup> spectrophotometer (Biotek) and quality was assessed by analyzing the A260/A280 and A260/A230 ratios. Integrity of RNA samples was confirmed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Before quantitative PCR analysis, 1 mg of total RNA was submitted to reverse transcription with MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) in a 20 μl volume, using the supplier's procedure. PCR amplifications were performed using a Mastercycler ep realplex (Eppendorf). All samples were run in triplicate in a final volume of 6.3 μl containing 1.3 μl of 1/40 diluted cDNA, 0.5 μM primers, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and LightCycler Fast-Start SYBR Green reaction mix (Roche), according to manufacturer protocol. Prior to PCR, a 5 min enzyme activation step was done at 95°C. The PCR protocol consisted of 10 s denaturation at 95°C, 10 s at annealing temperature (62°C) and 10 s elongation at 72°C for 60 cycles. Optimal annealing temperature was preliminary determined by gradient PCR. The primers sequences used were the following: ACACAACGTGAGCCTCTCTG (forward) and AGCAGTGTGACCAGGATTCG (reverse) for Cav3.2 (NM\_021415.4, 8,240 bp) and TCCAGGCTTTGGGCATCA (forward) and CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA (reverse) for 36B4 (NM\_007475.5, 1,360 bp). Amplification specificity was assessed by melting curve analysis and PCR products were run on a 1.5% agarose gel to confirm amplicons sizes. Primers were designed on intron-flanking sequences to prevent genomic contamination. Cav3.2 and 36B4 cDNA relative amounts were calculated function of the samples cycle threshold (Ct) using a standard concentration curve constructed with a serial dilution from 1/10 to 1/640 of a total cDNA mix. For each sample, the relative amount of Cav3.2 cDNA was normalized by the 36B4 cDNA amount.

#### *Statistics.*

Data are expressed as mean ± SEM and recorded using SigmaStats 3.5 software. Data was tested for normality and for equal variance. Simple measurements were compared by Student test (independent sample) or by Mann-Whitney test in case of data that were not

normally or equal variance distributed. Multiple measurements were compared by one-way or two-way ANOVA or by Kruskal-Wallis or Friedman test in case of data that were not normally or equal variance distributed. The post hoc comparisons were performed by the Bonferroni method. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

#### Acknowledgements:

We are grateful to Dr. V. Uebele (Merck and Co., Inc.) for the TTA-A2 molecule, to Dr. E. Bourinet for the Cav3.2 KO mice and to Pr. S. Alziari (PAVIRMA platform, Laboratoire Réparation du Génome Mitochondrial, EA 4645, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France) for the generation of chimeric mice.

*Grant Support:* Kerckhove N. is supported by fellowships from the European Fund for Regional Economic Development (FEDER), the regional council of Auvergne, the French chapter of IASP and the “Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur” (SFETD). François A. is supported by fellowship from the “Association Française de lutte contre les Myopathies” (AFM).

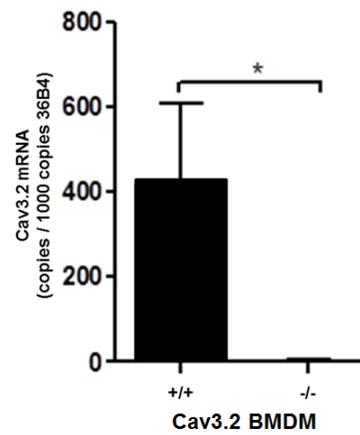
#### References

1. Van der Heijde D et al. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum.* 2005;52(2):582–591.
2. Da Silva JAP et al. Patients- and physicians- priorities for improvement. The case of rheumatic diseases. *Acta Reumatol Port.* 2010;35(2):192–199.
3. Conrad R, Wegener I, Geiser F, Kleiman A. Temperament, character, and personality disorders in chronic pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2013;17(3):318.
4. Giesecke T et al. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1577–1584.
5. Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Choi HK. Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1530–1542.
6. Bergman MJ. Social and economic impact of inflammatory arthritis. *Postgrad Med.* 2006;Spec No:5–11.
7. Lenssinck M-LB et al. Consequences of inflammatory arthritis for workplace productivity loss and sick leave: a systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(4):493–505.
8. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* [published online ahead of print: May 30, 2013]; doi:10.1007/s10787-013-0172-x
9. Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2002;8(8):390–396.
10. Kearney PM. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2006;332(7553):1302–1308.
11. Allison MC, Howatson AG, Torrance CJ, Lee FD, Russell RI. Gastrointestinal Damage Associated with the Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N Engl J Med.* 1992;327(11):749–754.
12. Højsted J, Sjøgren P. Addiction to opioids in chronic pain patients: a literature review. *Eur J Pain Lond Engl.* 2007;11(5):490–518.
13. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 1998;508(1):199–209.
14. Welsh DG, Nelson MT, Eckman DM, Brayden JE. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol.* 2000;527(1):139–148.
15. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. *Circ Res.* 2002;90(3):248–250.
16. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8):a003947.
17. 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.* 2005;24(2):315–324.
18. Choi S et al. Attenuated pain responses in mice lacking Ca<sub>v</sub>(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav.* 2007;6(5):425–431.
19. Francois A et al. State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca<sub>v</sub>(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain.* 2013;154(2):283–293.
20. Kerckhove N et al. Cav3.2 calcium channels: The key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *Pain.* 2014;155(4):764–772.
21. Latham JR et al. Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes.* 2009;58(11):2656–2665.
22. Messinger RB et al. In vivo silencing of the Ca<sub>v</sub>(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain.* 2009;145(1-2):184–195.
23. Dogrul A et al. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain.* 2003;105(1-2):159–168.
24. Hamidi GA et al. Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2012;674(2-3):260–264.

25. Carbone E, Giaccipoli A, Marcantoni A, Guido D, Carabelli V. A new role for T-type channels in fast “low-threshold” exocytosis. *Cell Calcium*. 2006;40(2):147–154.
26. Zhou X, Yang W, Li J. Ca<sup>2+</sup>- and Protein Kinase C-dependent Signaling Pathway for Nuclear Factor-κB Activation, Inducible Nitric-oxide Synthase Expression, and Tumor Necrosis Factor-α Production in Lipopolysaccharide-stimulated Rat Peritoneal Macrophages. *J Biol Chem*. 2006;281(42):31337–31347.
27. Giaccipoli A et al. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (α1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J*. 2006;90(5):1830–1841.
28. 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 Ca<sup>2+</sup>-dependence. *Eur Biophys J EBJ*. 2007;36(7):753–762.
29. Mahapatra S et al. Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium*. 2012;51(3-4):321–330.
30. Kis-Toth K et al. Voltage-gated sodium channel Nav1.7 maintains the membrane potential and regulates the activation and chemokine-induced migration of a monocyte-derived dendritic cell subset. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(3):1273–1280.
31. Lory P, Bidaud I, Chemin J. T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium*. 2006;40(2):135–146.
32. Bender KJ, Uebele VN, Renger JJ, Trussell LO. Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *J Physiol*. 2012;590(Pt 1):109–118.
33. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. The role of T-type calcium channels in peripheral and central pain processing. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006;5(6):639–653.
34. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. *Pflug Arch Eur J Physiol*. 2013;465(7):921–927.
35. King JN et al. Preclinical pharmacology of robenacoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *J Vet Pharmacol Ther*. 2009;32(1):1–17.
36. Lee IO, Jeong YS. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. *J Korean Med Sci*. 2002;17(1):81–85.
37. François A, Laffray S, Pizzoccaro A, Eschalier A, Bourinet E. T-type calcium channels in chronic pain: mouse models and specific blockers. *Pflug Arch Eur J Physiol*. 2014;466(4):707–717.
38. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109–110.
39. Chen C-C et al. Abnormal coronary function in mice deficient in α1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*. 2003;302(5649):1416–1418.

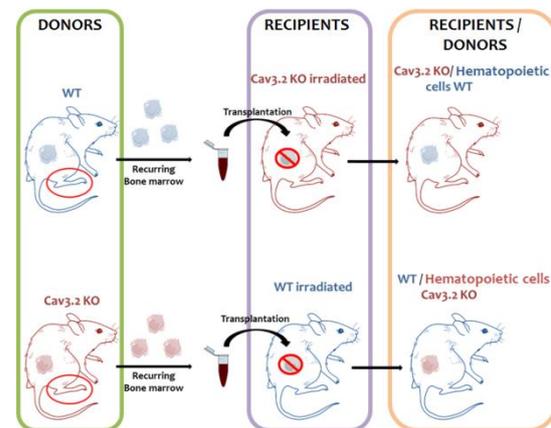
40. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2003;225:115–121.
41. Lolignier S et al. Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation. *PLoS One*. 2011;PloS one(8):e23083.
42. Carvalho FA, Aitken JD, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. TLR5 activation induces secretory interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage. *Mucosal Immunol*. 2011;4(1):102–111.

### Supplemental information



### Supplementary Figure 1

*Cav3.2* calcium channel are expressed by bone marrow-derived macrophages. RT-q-PCR on bone marrow-derived macrophages (BMDM) of *Cav3.2*<sup>-/-</sup> and *Cav3.2*<sup>+/+</sup> mice. Data are shown as mean (n = 3) ± SEM. \*P < 0.05.

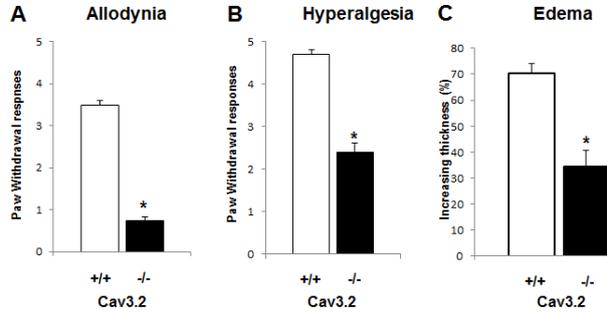


### Supplementary Figure 2

Representation of chimeric mice generation. WT and Cav3.2 KO mice (recipients) are irradiated with a total dose of 10 Gy. In these irradiated mice, 10<sup>7</sup> total bone marrow (BM) cells retrieved from un-irradiated WT or Cav3.2 KO mouse (donors) are transplanted by i.v injection immediately after irradiation. This procedure led us to obtain four experimental groups of irradiated mice including chimeric mice [WT mice transplanted with BM cells from Cav3.2 KO (Recipient WT/Donor KO); Cav3.2 KO mice

transferred with BM cells from WT donors (Recipient KO/Donor WT) and control mice (not represented) [WT mice transferred with BM cells from WT donors (Recipient WT/Donor WT); Cav3.2 KO mice transferred with BM cells from KO donors (Recipient KO/Donor KO)].

*Cav3.2* knock-out mice develop less mechanical hypersensitivity and edema in chronic inflammatory pain. (A) CFA-induced mechanical allodynia, (B) mechanical hyperalgesia and (C) edema. Tests were performed at 7 day after peri-articular injection of CFA on Cav3.2 knockout mice (*Cav3.2*<sup>-/-</sup>) and their wild type littermates (*Cav3.2*<sup>+/+</sup>). Data are shown as mean (n = 8) ± SEM. \*P < 0.05.



Supplementary Figure 3



# *Glossaire*



## Glossaire

### A

---

Allodynie	Douleur induite par un stimulus qui n'est normalement pas ressenti comme douloureux.
Analgésie	Interruption de la transmission du message douloureux par l'utilisation d'analgésiques.
Anamnèse	C'est l'histoire de la maladie. Elle consiste en un interrogatoire mené par le professionnel de santé pour retracer à la fois les antécédents médicaux de son patient et l'historique de la pathologie actuelle. Première étape du diagnostic, l'anamnèse repose sur des questions précises allant des motifs de la consultation aux habitudes de vie et une écoute attentive du médecin.
Auerbach (plexus de)	Ce plexus est un ganglion nerveux entérique situé dans la musculature intestinale. Il assure la coordination motrice et sécréto-motrice.

### C

---

CCI « <i>Chronic constriction injury</i> »	Modèle animal de neuropathie dans lequel le nerf sciatique a été ligaturé.
Cellules caliciformes	Egalement appelées cellules en gobelet, elles produisent du mucus au sein de l'épithélium intestinal (et pulmonaire).
Cellules de Paneth	Cellules différenciées de la muqueuse intestinale et se trouvant dans les cryptes intestinales de Lieberkuhn. Ces cellules épithéliales sécrètent des facteurs de croissance, des enzymes digestives (lysozymes) et des peptides antimicrobiens (tel que les défensines) dans la lumière de la crypte.
Cellules présentatrices d'antigène (CPA)	Ces cellules peuvent être des monocytes, des macrophages, des lymphocytes B ou encore des cellules dendritiques, et ont la capacité de présenter des macromolécules d'organismes étrangers au Soi, via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).
Cytokines	Ce sont des protéines sécrétées par les leucocytes inflammatoires et quelques cellules non-leucocytaires. Elles agissent comme des médiateurs intercellulaires de la réaction inflammatoire.

### D

---

Défensine	C'est une famille de protéines qui possède des propriétés bactéricides. Elles sont sécrétées par les cellules immunitaires, les cellules de Paneth et autres cellules épithéliales.
-----------	---

Dysbiose Définit une l'altération de l'équilibre normal de la flore bactérienne intestinale.

## **E**

---

Etiologie Etude des causes et des facteurs d'une maladie.

## **H**

---

Hyperalgie C'est une sensation douloureuse d'intensité anormalement élevée à la suite d'une stimulation douloureuse.

## **I**

---

*In vitro* Analyses pratiquées en dehors d'un organisme vivant (ici majoritairement sur des cultures cellulaires).

*In vivo* Recherches ou examen réalisés sur un organisme vivant (ici modèles animaux).

## **K**

---

*Knock-out / Knock-in* Ce sont des modèles animaux générés par des expériences de biologie moléculaire et qui permettent de déléter (Knock out) ou de modifier (Knock in) l'expression d'un gène endogène.

## **L**

---

*Lamina propria* C'est une couche de tissu muqueux qui se situe sous la surface épithéliale du tractus digestif et qui abrite les cellules immunitaires effectrices.

## **M**

---

Meissner (plexus de) Ce plexus est un ganglion nerveux entérique situé dans la sous-muqueuse intestinale. Il assure la communication entre les terminaisons nerveuses de la *lamina propria* et les *plexus* d'Auerbach.

Méta-analyse C'est une démarche statistique combinant les résultats de plusieurs études indépendantes sur un sujet commun.

## **N**

---

Neuropathie Douleur consécutive à une lésion du système nerveux.

Nociception Ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux *via* l'activation des nocicepteurs en périphérie.

## **P**

---

PAMP « *Pathogen-* Ce sont des motifs moléculaires associés aux pathogènes qui sont reconnus

*associated molecular patterns* » par les cellules du système immunitaire inné *via* des récepteurs spécifiques appelés PRR (tel que les récepteurs TLR).

Physiopathologie Etude des effets d'une maladie sur l'organisme et des mécanismes qui engendrent ces effets

PRR « *pattern recognition receptor* » Ce sont des récepteurs reconnaissant des motifs pathogènes exprimés par les cellules du système immunitaire inné. Ils permettent d'identifier les motifs PAMP.

Probiotique Produit contenant des micro-organismes vivants et utilisé comme agent thérapeutique pour induire un effet bénéfique en modifiant l'équilibre des populations bactériennes intestinales.

## S

---

SNL « *Spinal Nerve Ligation* » Modèle animal de neuropathie dans lequel les nerfs spinaux L5 et L6 sont ligaturés.

Synaptogenèse Formation de nouvelles synapses.

Système immunitaire adaptatives Partie du système immunitaire qui contient les lymphocytes T (contribuent à l'immunité à médiation cellulaire), et les lymphocytes B (responsables de l'immunité à médiation humorale). Ces cellules entraînent une réaction immunitaire spécifique contre un pathogène identifié, et une réponse mémoire.

Système immunitaire inné Système composé des mastocytes, des phagocytes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires) et les *natural killer*. Ces cellules génèrent une réaction immunitaire rapide mais non-spécifique contre une pathogène potentiel.



# *Références Bibliographiques*



## Références bibliographiques

- Aamann L, Vestergaard EM, Grønbaek H (2014) Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20:3223–3230.
- Abraham C, Cho J (2009a) Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15:1090–1100.
- Abraham C, Cho JH (2009b) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361:2066–2078.
- Ahl A, Mikocka-Walus A, Gordon A, Andrews JM (2013) Are self-administered or minimal therapist contact psychotherapies an effective treatment for irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review. *J Psychosom Res* 75:113–120.
- Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Brydon WG, Walters JRF, Anand P, Ghosh S (2010) Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain. *Gut* 59:767–774.
- Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JRF, Anand P, Ghosh S (2008) Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 57:923–929.
- Alayed N, Alghanaim N, Tan X, Tulandi T (2014) Preemptive use of gabapentin in abdominal hysterectomy: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 123:1221–1229.
- Alden KJ, García J (2001) Differential effect of gabapentin on neuronal and muscle calcium currents. *J Pharmacol Exp Ther* 297:727–735.
- Allegretti JR, Hamilton MJ (2014) Restoring the gut microbiome for the treatment of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 20:3468–3474.
- Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, Ondo WG, Walters AS, Winkelman JW, Zucconi M, Ferri R, Trenkwalder C, Lee HB, International Restless Legs Syndrome Study Group (2014) Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria - history, rationale, description, and significance. *Sleep Med* 15:860–873.
- Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ (2006) The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 26:12852–12860.
- Amouretti M, Pen CL, Gaudin A-F, Bommelaer G, Frexinos J, Ruszniewski P, Poynard T, Maurel F, Priol G, Hasnaoui AE (2006) Impact of irritable bowel syndrome (IBS) on health-related quality of life (HRQOL). <http://www.em-premium.com/data/revues/03998320/00300002/241/> Available at: <http://www.em-premium.com/article/129763/> [Accessed June 23, 2014].
- Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjønneland A, Vogel U (2012) Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 44:185–194.
- Anderson JL, Edney RJ, Whelan K (2012) Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 36:503–516.
- Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A (2001) Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344:808–814.

- Annaházi A, Róka R, Rosztóczy A, Wittmann T (2014) Role of antispasmodics in the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:6031–6043.
- Ardizzone S, Bianchi Porro G (2005) Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* 65:2253–2286.
- Arikkath J, Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298–307.
- Arikkath J, Chen C-C, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP (2003) Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 278:1212–1219.
- Assimakopoulos SF, Papageorgiou I, Charonis A (2011) Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2:123–137.
- Astori S, Wimmer RD, Prosser HM, Corti C, Corsi M, Liaudet N, Volterra A, Franken P, Adelman JP, Lüthi A (2011) The Ca(V)3.3 calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:13823–13828.
- Augé C, Chene G, Dubourdeau M, Desoubzdanne D, Corman B, Palea S, Lluet P, Vergnolle N, Coelho A-M (2013) Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *Eur J Pharmacol* 707:32–40.
- Avitzur Y *et al.*, (2014) Mutations in tetratricopeptide repeat domain 7A result in a severe form of very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 146:1028–1039.
- Baccini F, Pallotta N, Calabrese E, Pezzotti P, Corazziari E (2003) Prevalence of sexual and physical abuse and its relationship with symptom manifestations in patients with chronic organic and functional gastrointestinal disorders. *Dig Liver Dis* 35:256–261.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915–1920.
- Bain CC, Mowat AM (2014a) The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cell Immunol*.
- Bain CC, Mowat AM (2014b) Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* 260:102–117.
- Ballou SK, Keefer L (2013) Multicultural considerations in the diagnosis and management of irritable bowel syndrome: a selective summary. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25:1127–1133.
- Bannister K, Sikandar S, Bauer CS, Dolphin AC, Porreca F, Dickenson AH (2011) Pregabalin suppresses spinal neuronal hyperexcitability and visceral hypersensitivity in the absence of peripheral pathophysiology. *Anesthesiology* 115:144–152.
- Bannister RA, Beam KG (2013) Ca(V)1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *Biochim Biophys Acta* 1828:1587–1597.
- Barbara G, Cremon C, Pallotti F, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R (2009) Postinfectious irritable bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48 Suppl 2:S95–S97.
- Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R (2004) Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126:693–702.

- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander ES, Frankel WN, Gardiner RM, Dolphin AC, Rees M (2001) Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6095–6104.
- Barclay J, Rees M (2000) Genomic organization of the mouse and human alpha2delta2 voltage-dependent calcium channel subunit genes. *Mamm Genome* 11:1142–1144.
- Barnich N, Darfeuille-Michaud A (2010) Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive *E. coli*. *Virulence* 1:281–282.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284.
- Bashashati M, Rezaei N, Shafieyoun A, McKernan DP, Chang L, Öhman L, Quigley EM, Schmulson M, Sharkey KA, Simrén M (2014) Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 26:1036–1048.
- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC (2009) The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *J Neurosci* 29:4076–4088.
- Bauer CS, Tran-Van-Minh A, Kadurin I, Dolphin AC (2010) A new look at calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits. *Curr Opin Neurobiol* 20:563–571.
- Baumgart DC, Sandborn WJ (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369:1641–1657.
- Beatty JK, Bhargava A, Buret AG (2014) Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection. *World J Gastroenterol* 20:3976–3985.
- Bellini M, Gambaccini D, Stasi C, Urbano MT, Marchi S, Usai-Satta P (2014) Irritable bowel syndrome: A disease still searching for pathogenesis, diagnosis and therapy. *World J Gastroenterol* 20:8807–8820.
- Belliotti TR, Capiris T, Ekhatov IV, Kinsora JJ, Field MJ, Heffner TG, Meltzer LT, Schwarz JB, Taylor CP, Thorpe AJ, Vartanian MG, Wise LD, Zhi-Su T, Weber ML, Wustrow DJ (2005) Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the alpha(2)-delta protein. *J Med Chem* 48:2294–2307.
- Benchimol EI, Mack DR, Nguyen GC, Snapper SB, Li W, Mojaverian N, Quach P, Muisé AM (2014) Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*.
- Bengtson MB, Rønning T, Vatn MH, Harris JR (2006) Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 55:1754–1759.
- Bennett EJ, Tennant CC, Piesse C, Badcock CA, Kellow JE (1998) Level of chronic life stress predicts clinical outcome in irritable bowel syndrome. *Gut* 43:256–261.
- Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V (2014) Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World J Gastroenterol* 20:3231–3244.
- Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, Pamukcu R, Moore S, Lynch RG (2002) Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* 123:1527–1542.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium—a life and death signal. *Nature* 395:645–648.

- Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, Leroi A-M, Déchelotte P, Ménard J-F, Ducrotté P, Coëffier M (2011) The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol* 106:2165–2173.
- Bevins CL, Salzman NH (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9:356–368.
- Bezaniilla F, Perozo E (2002) Structural biology. Force and voltage sensors in one structure. *Science* 298:1562–1563.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD (2012) CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol* 99:1–14.
- Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, Walker LC (2006) Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res* 1075:68–80.
- Bian ZX, Li Z, Huang ZX, Zhang M, Chen HL, Xu HX, Sung JJY (2009) Unbalanced expression of protease-activated receptors-1 and -2 in the colon of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients. *J Gastroenterol* 44:666–674.
- Bixquert Jiménez M (2009) Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? *Rev Esp Enferm Dig* 101:553–564.
- Bi Y, Chen H, Su J, Cao X, Bian X, Wang K (2011) Visceral hyperalgesia induced by forebrain-specific suppression of native Kv7/KCNQ/M-current in mice. *Mol Pain* 7:84.
- Blackshaw LA, Brierley SM, Hughes PA (2010) TRP channels: new targets for visceral pain. *Gut* 59:126–135.
- Blackshaw LA, Brookes SJH, Grundy D, Schemann M (2007) Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 19:1–19.
- Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P (2010) A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. *Clin Pharmacokinet* 49:661–669.
- Boesmans W, Owsianik G, Tack J, Voets T, Vanden Berghe P (2011) TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 162:18–37.
- Bøggild H, Tüchsen F, Orhede E (1996) Occupation, employment status and chronic inflammatory bowel disease in Denmark. *Int J Epidemiol* 25:630–637.
- Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O (2003) Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol* 37:42–47.
- Boroujerdi A, Zeng J, Sharp K, Kim D, Steward O, Luo ZD (2011) Calcium channel alpha-2-delta-1 protein upregulation in dorsal spinal cord mediates spinal cord injury-induced neuropathic pain states. *Pain* 152:649–655.
- Boudes M, Uvin P, Kerselaers S, Vennekens R, Voets T, De Ridder D (2011) Functional characterization of a chronic cyclophosphamide-induced overactive bladder model in mice. *NeuroUrol Urodyn* 30:1659–1665.

- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrère C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 24:315–324.
- Braak B, Klooker TK, Wouters MM, Welting O, van der Loos CM, Stanisor OI, van Diest S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE (2012) Mucosal immune cell numbers and visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome: is there any relationship? *Am J Gastroenterol* 107:715–726.
- Brakenhoff LKPM, van der Heijde DM, Hommes DW, Huizinga TWJ, Fidder HH (2010) The joint-gut axis in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 4:257–268.
- Brandtzaeg P (2010) Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol* 26:554–563.
- Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS (2006) The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 579:149–167.
- Brierley SM, Jones RCW, Gebhart GF, Blackshaw LA (2004) Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology* 127:166–178.
- Brierley SM, Linden DR (2014) Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- Brint EK, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley EMM (2011) Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 106:329–336.
- Brodbeck J, Davies A, Courtney J-M, Meir A, Balaguero N, Canti C, Moss FJ, Page KM, Pratt WS, Hunt SP, Barclay J, Rees M, Dolphin AC (2002) The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. *J Biol Chem* 277:7684–7693.
- Brown JP, Gee NS (1998) Cloning and deletion mutagenesis of the alpha2 delta calcium channel subunit from porcine cerebral cortex. Expression of a soluble form of the protein that retains [3H]gabapentin binding activity. *J Biol Chem* 273:25458–25465.
- Brun-Strang C, Dapoigny M, Lafuma A, Wainsten JP, Fagnani F (2007) Irritable bowel syndrome in France: quality of life, medical management, and costs: the Encoli study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19:1097–1103.
- Buckley MM, O'Mahony SM, O'Malley D (2014) Convergence of neuro-endocrine-immune pathways in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:8846–8858.
- Bueno L, de Ponti F, Fried M, Kullak-Ublick GA, Kwiatek MA, Pohl D, Quigley EMM, Tack J, Talley NJ (2007) Serotonergic and non-serotonergic targets in the pharmacotherapy of visceral hypersensitivity. *Neurogastroenterol Motil* 19:89–119.
- Buraei Z, Yang J (2010) The  $\beta$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Physiol Rev* 90:1461–1506.
- Buraei Z, Yang J (2013) Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1530–1540.
- Burgoyne RD, Clague MJ (2003) Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641:137–143.
- Burisch J *et al.*, (2014) Environmental factors in a population-based inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe--an ECCO-EpiCom study. *J Crohns Colitis* 8:607–616.

- Butcher AJ, Leroy J, Richards MW, Pratt WS, Dolphin AC (2006) The importance of occupancy rather than affinity of CaV(beta) subunits for the calcium channel I-II linker in relation to calcium channel function. *J Physiol (Lond)* 574:387–398.
- Cader MZ, Kaser A (2013) Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* 62:1653–1664.
- Câmara CC, Ramos HF, da Silva AP, Araújo CV, Gomes AS, Vale ML, Barbosa ALR, Ribeiro RA, Brito GAC, Costa CMC, Oriá RB (2013) Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in Wistar rats. *Neurosci Lett* 556:93–98.
- Camilleri M, Acosta A (2014) Re: Halmos et al, A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146:1829–1830.
- Camilleri M, Busciglio I, Carlson P, McKinzie S, Burton D, Baxter K, Ryks M, Zinsmeister AR (2009) Pharmacogenetics of low dose clonidine in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 21:399–410.
- Cantí C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11230–11235.
- Carbone E, Calorio C, Vandael DHF (2014) T-type channel-mediated neurotransmitter release. *Pflugers Arch* 466:677–687.
- Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, Cosnes J (2009) Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroenterol Clin Biol* 33 Suppl 3:S145–S157.
- Carlton SM, Zhou S (1998) Attenuation of formalin-induced nociceptive behaviors following local peripheral injection of gabapentin. *Pain* 76:201–207.
- Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 206:2179–2189.
- Cash BD, Chey WD (2005) Diagnosis of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 34:205–220, vi.
- Cash B, Sullivan S, Barghout V (2005) Total costs of IBS: employer and managed care perspective. *Am J Manag Care* 11:S7–S16.
- Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, Pratt WS, Dolphin AC (2014) Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary  $\alpha\delta$ -1 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:8979–8984.
- Catterall WA, Striessnig J (1992) Receptor sites for Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 13:256–262.
- Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I (2002) Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 122:1778–1783.
- Chamberlain SM, Rao SSC (2012) Safety evaluation of lubiprostone in the treatment of constipation and irritable bowel syndrome. *Expert Opin Drug Saf* 11:841–850.
- Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK (2013) Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD000545.

- Chang FY (2014) Irritable bowel syndrome: the evolution of multi-dimensional looking and multidisciplinary treatments. *World J Gastroenterol* 20:2499–2514.
- Chang L, Munakata J, Mayer EA, Schmulson MJ, Johnson TD, Bernstein CN, Saba L, Naliboff B, Anton PA, Matin K (2000) Perceptual responses in patients with inflammatory and functional bowel disease. *Gut* 47:497–505.
- Chao G, Zhang S (2013) A meta-analysis of the therapeutic effects of amitriptyline for treating irritable bowel syndrome. *Intern Med* 52:419–424.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55–63.
- Chassaing B, Koren O, Carvalho FA, Ley RE, Gewirtz AT (2014) AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* 63:1069–1080.
- Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del'homme C, Marquet P, Martin JC, Pickering G, Ardid D, Eschalier A, Dubray C, Flint HJ, Bernalier-Donadille A (2012) Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 35:828–838.
- Chen BC, Lin WW (2001) PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. *Br J Pharmacol* 134:1055–1065.
- Chen SL, Wu XY, Cao ZJ, Fan J, Wang M, Owyang C, Li Y (2008) Subdiaphragmatic vagal afferent nerves modulate visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G1441–G1449.
- Cheng JK, Chen C-C, Yang J-R, Chiou L-C (2006) The antiallodynic action target of intrathecal gabapentin: Ca<sup>2+</sup> channels, KATP channels or N-methyl-d-aspartic acid receptors? *Anesth Analg* 102:182–187.
- Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY (2001) Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 96:1499–1506.
- Choi S, Na HS, Kim J, Lee J, Lee S, Kim D, Park J, Chen C-C, Campbell KP, Shin H-S (2007) Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)<sub>3.2</sub> T-type channels. *Genes Brain Behav* 6:425–431.
- Cho JH (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8:458–466.
- Cho JH, Abraham C (2007) Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu Rev Med* 58:401–416.
- Christianson JA, Gebhart GF (2007) Assessment of colon sensitivity by luminal distension in mice. *Nat Protoc* 2:2624–2631.
- Christofi FL (2008) Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 4:213–236.
- Chu PJ, Robertson HM, Best PM (2001) Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 280:37–48.
- Cizkova D, Marsala J, Lukacova N, Marsala M, Jergova S, Orendacova J, Yaksh TL (2002) Localization of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in the rat spinal cord following chronic constrictive nerve injury. *Exp Brain Res* 147:456–463.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641–683.

- Cole RL, Lechner SM, Williams ME, Prodanovich P, Bleicher L, Varney MA, Gu G (2005) Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta (alpha2delta) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 491:246–269.
- Collins SM (2014) A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:497–505.
- Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D’Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P, SONIC Study Group (2010) Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn’s disease. *N Engl J Med* 362:1383–1395.
- Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP (2008) The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 103:2394–2400.
- Cosnes J (2010) Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD. *Dig Dis* 28:411–417.
- Costa M, Glise H, Sjodahl R (2000) The enteric nervous system in health and disease. *Gut* 47:iv1.
- Coste B, Crest M, Delmas P (2007) Pharmacological dissection and distribution of Na<sup>v</sup>1.9, T-type Ca<sup>2+</sup> currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. *J Gen Physiol* 129:57–77.
- Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, Santini D, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara G (2009) Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol* 104:392–400.
- Cremon C, Stanghellini V, Pallotti F, Fogacci E, Bellacosa L, Morselli-Labate AM, Paccapelo A, Di Nardo G, Cogliandro RF, De Giorgio R, Corinaldesi R, Barbara G (2014) Salmonella gastroenteritis during childhood is a risk factor for irritable bowel syndrome in adulthood. *Gastroenterology* 147:69–77.
- Cremonini F, Camilleri M, McKinzie S, Carlson P, Camilleri CE, Burton D, Thomforde G, Urrutia R, Zinsmeister AR (2005) Effect of CCK-1 antagonist, dexloxiglumide, in female patients with irritable bowel syndrome: a pharmacodynamic and pharmacogenomic study. *Am J Gastroenterol* 100:652–663.
- Cross RK, Wilson KT (2003) Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 9:179–189.
- Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RSG (2004) Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *Eur J Neurosci* 20:1566–1576.
- Cuomo R, Andreozzi P, Zito FP, Passananti V, De Carlo G, Sarnelli G (2014) Irritable bowel syndrome and food interaction. *World J Gastroenterol* 20:8837–8845.
- Cupi ML, Sarra M, Marafini I, Monteleone I, Franzè E, Ortenzi A, Colantoni A, Sica G, Sileri P, Rosado MM, Carsetti R, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G (2014) Plasma cells in the mucosa of patients with inflammatory bowel disease produce granzyme B and possess cytotoxic activities. *J Immunol* 192:6083–6091.
- Däbritz J, Musci J, Foell D (2014) Diagnostic utility of faecal biomarkers in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:363–375.
- Dahan S, Roda G, Pinn D, Roth-Walter F, Kamalu O, Martin AP, Mayer L (2008) Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 134:192–203.
- Dai C, Jiang M (2012) The incidence and risk factors of post-infectious irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology* 59:67–72.

- Dai C, Zheng C-Q, Jiang M, Ma X-Y, Jiang L-J (2013) Probiotics and irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 19:5973–5980.
- Dalal SR, Chang EB (2014) The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest*:1–7.
- Dale C, Vergnolle N (2008) Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications for inflammation and pain. *J Recept Signal Transduct Res* 28:29–37.
- Dapoigny M (2009) [Irritable bowel syndrome: epidemiology/economic burden]. *Gastroenterol Clin Biol* 33 Suppl 1:S3–S8.
- Dapoigny M, Stockbrügger RW, Azpiroz F, Collins S, Coremans G, Müller-Lissner S, Oberndorff A, Pace F, Smout A, Vatn M, Whorwell P (2003) Role of alimentation in irritable bowel syndrome. *Digestion* 67:225–233.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115:1405–1413.
- Darvish-Damavandi M, Nikfar S, Abdollahi M (2010) A systematic review of efficacy and tolerability of mebeverine in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 16:547–553.
- Davies A, Douglas L, Hendrich J, Wratten J, Tran Van Minh A, Foucault I, Koch D, Pratt WS, Saibil HR, Dolphin AC (2006) The calcium channel  $\alpha_2\delta_2$  subunit partitions with  $\text{CaV}2.1$  into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J Neurosci* 26:8748–8757.
- Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC (2007) Functional biology of the  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28:220–228.
- De Cruz P, Kamm MA, Prideaux L, Allen PB, Desmond PV (2012) Postoperative recurrent luminal Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 18:758–777.
- De Garavilla L, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, Steinhoff M, Ossovskaya VS, D'Andrea MR, Mayer EA, Wallace JL, Hollenberg MD, Andrade-Gordon P, Bunnett NW (2001) Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol* 133:975–987.
- De Jager PL *et al.*, (2007) The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 8:387–397.
- De Jongh KS, Warner C, Catterall WA (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265:14738–14741.
- Denning TL, Wang Y, Patel SR, Williams IR, Pulendran B (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8:1086–1094.
- De Roest RH, Dobbs BR, Chapman BA, Batman B, O'Brien LA, Leeper JA, Hebblethwaite CR, Geary RB (2013) The low FODMAP diet improves gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: a prospective study. *Int J Clin Pract* 67:895–903.
- Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1:254–268.
- De Schepper HU, De Man JG, Van Nassauw L, Timmermans J-P, Herman AG, Pelckmans PA, De Winter BY (2007) Acute distal colitis impairs gastric emptying in rats via an extrinsic neuronal reflex pathway involving the pelvic nerve. *Gut* 56:195–202.

- De Silva AP, Nandasiri SD, Hewavisenthi J, Manamperi A, Ariyasinghe MP, Dassanayake AS, Jewell DP, de Silva HJ (2012) Subclinical mucosal inflammation in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS) in a tropical setting. *Scand J Gastroenterol* 47:619–624.
- Devani M, Vecchi M, Ferrero S, Avesani EC, Arizzi C, Chao L, Colman RW, Cugno M (2005) Kallikrein-kinin system in inflammatory bowel diseases: Intestinal involvement and correlation with the degree of tissue inflammation. *Dig Liver Dis* 37:665–673.
- De Waard M, Gurnett CA, Campbell KP (1996) Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. *Ion Channels* 4:41–87.
- De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ (2012) Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta* 1822:66–73.
- Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K (2009) Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* 1:123–135.
- Dhillon SS, Mastropaolo LA, Murchie R, Griffiths C, Thöni C, Elkadri A, Xu W, Mack A, Walters T, Guo C, Mack D, Huynh H, Baksh S, Silverberg MS, Brumell JH, Snapper SB, Muise AM (2014) Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol* 5:e46.
- Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M, Pereverzev A, von der Brelie C, Schneider T, Beck H (2003) Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 39:483–496.
- Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel J-F, Allez M, D’Haens G, D’Hoore A, Mantzaris G, Novacek G, Oresland T, Reinisch W, Sans M, Stange E, Vermeire S, Travis S, Van Assche G (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* 6:991–1030.
- Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D’Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O’Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SPL, European Crohn’s and Colitis Organisation (ECCO) (2010) The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn’s disease: Current management. *J Crohns Colitis* 4:28–62.
- Di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopanos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A, Büchler MW (2000) Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 46:670–679.
- Diop L, Raymond F, Fargeau H, Petoux F, Chovet M, Doherty AM (2002) Pregabalin (CI-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1013–1022.
- Dirks J, Petersen KL, Rowbotham MC, Dahl JB (2002) Gabapentin suppresses cutaneous hyperalgesia following heat-capsaicin sensitization. *Anesthesiology* 97:102–107.
- Dixon RE, Cheng EP, Mercado JL, Santana LF (2012) L-type Ca<sup>2+</sup> channel function during Timothy syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 22:72–76.
- Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441–462.
- Doering CJ, Peloquin JB, McRory JE (2007) The Ca(v)1.4 calcium channel: more than meets the eye. *Channels (Austin)* 1:3–10.
- Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F (2003) Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105:159–168.

- Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599–620.
- Dolphin AC (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 19:237–244.
- Dolphin AC (2012a) Calcium channel  $\alpha\delta$  subunits in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 4th ed. (Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98177/> [Accessed August 13, 2014].
- Dolphin AC (2012b) Calcium channel auxiliary  $\alpha\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13:542–555.
- Dolphin AC (2013) The  $\alpha\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1541–1549.
- Dong W, Li Z, Zou D, Xu G, Zou X, Zhu A, Yin N, Gong Y (2003) [The changes of mucosal mast cells and substance P in patients with irritable bowel syndrome]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42:611–614.
- Dooley DJ, Taylor CP, Donevan S, Feltner D (2007) Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha\delta$  ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 28:75–82.
- Dretzke J, Edlin R, Round J, Connock M, Hulme C, Czczot J, Fry-Smith A, McCabe C, Meads C (2011) A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease. *Health Technol Assess* 15:1–244.
- Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, Whitehead WE (2002) AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123:2108–2131.
- Duboc H, Rainteau D, Rajca S, Humbert L, Farabos D, Maubert M, Grondin V, Jouet P, Bouhassira D, Seksik P, Sokol H, Coffin B, Sabaté JM (2012) Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 24:513–520, e246–e247.
- Duitman EH, Orinska Z, Bulfone-Paus S (2011) Mechanisms of cytokine secretion: a portfolio of distinct pathways allows flexibility in cytokine activity. *Eur J Cell Biol* 90:476–483.
- Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC (2003) Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 98:1578–1583.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638.
- Edelblum KL, Turner JR (2009) The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol* 9:715–720.
- El-Salhy M, Ostgaard H, Gundersen D, Hatlebakk JG, Hausken T (2012) The role of diet in the pathogenesis and management of irritable bowel syndrome (Review). *Int J Mol Med* 29:723–731.
- Elsenbruch S (2011) Abdominal pain in Irritable Bowel Syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. *Brain Behav Immun* 25:386–394.
- Elsenbruch S, Holtmann G, Oezcan D, Lysson A, Janssen O, Goebel MU, Schedlowski M (2004) Are there alterations of neuroendocrine and cellular immune responses to nutrients in women with irritable bowel syndrome? *Am J Gastroenterol* 99:703–710.

- Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380–392.
- Eugene C (2011a) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease (part 4). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35:518–520.
- Eugene C (2011b) The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35:257–259.
- Eugène C (2011c) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35:340–343.
- Eugene C (2011d) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease (part 3). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35:516–517.
- Eugene C (2012) Ulcerative colitis practice guidelines in adults. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36:10–12.
- Eutamene H, Coelho AM, Theodorou V, Toulouse M, Chovet M, Doherty A, Fioramonti J, Bueno L (2000) Antinociceptive effect of pregabalin in septic shock-induced rectal hypersensitivity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 295:162–167.
- Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H (2014) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res* 7:113–120.
- Farmer AD, Aziz Q (2013) Gut pain & visceral hypersensitivity. *British Journal of Pain*:2049463713479229.
- Farrokhyar F, Marshall JK, Easterbrook B, Irvine EJ (2006) Functional gastrointestinal disorders and mood disorders in patients with inactive inflammatory bowel disease: prevalence and impact on health. *Inflamm Bowel Dis* 12:38–46.
- Felix R, Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 17:6884–6891.
- Feng Y, Cui M, Willis WD (2003) Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 98:729–733.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su T-Z, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17537–17542.
- Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L (1999) Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80:391–398.
- Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, Göthert M (2002) Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* 42:229–236.
- Fiocchi C (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182–205.
- Foley S, Garsed K, Singh G, Duroudier NP, Swan C, Hall IP, Zaitoun A, Bennett A, Marsden C, Holmes G, Walls A, Spiller RC (2011) Impaired uptake of serotonin by platelets from patients with irritable bowel syndrome correlates with duodenal immune activation. *Gastroenterology* 140:1434–1443.e1.

- Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P (2011) Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106:590–599; quiz 600.
- Ford AC, Brandt LJ, Young C, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, Moayyedi P (2009a) Efficacy of 5-HT<sub>3</sub> antagonists and 5-HT<sub>4</sub> agonists in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 104:1831–1843; quiz 1844.
- Ford AC, Talley NJ, Quigley EMM, Moayyedi P (2009b) Efficacy of probiotics in irritable bowel syndrome: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Dis Colon Rectum* 52:1805; author reply 1806.
- Ford AC, Talley NJ, Schoenfeld PS, Quigley EMM, Moayyedi P (2009c) Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* 58:367–378.
- Fossat P, Dobremez E, Bouali-Benazzouz R, Favereaux A, Bertrand SS, Kilk K, Léger C, Cazalets J-R, Langel U, Landry M, Nagy F (2010) Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci* 30:1073–1085.
- Fox CC, Lazenby AJ, Moore WC, Yardley JH, Bayless TM, Lichtenstein LM (1990) Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 99:119–124.
- Francois A, Kerckhove N, Meleine M, Alloui A, Barrere C, Gelot A, Uebele VN, Renger JJ, Eschalier A, Ardid D, Bourinet E (2013) State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca<sub>v</sub>3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* 154:283–293.
- Frank DN, Pace NR (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 24:4–10.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13780–13785.
- Fries W, Belvedere A, Vetrano S (2013) Sealing the broken barrier in IBD: intestinal permeability, epithelial cells and junctions. *Curr Drug Targets* 14:1460–1470.
- Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A (2011) Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 60:1580–1588.
- Fuller-Bicer GA, Varadi G, Koch SE, Ishii M, Bodi I, Kadeer N, Muth JN, Mikala G, Petrashevskaya NN, Jordan MA, Zhang S-P, Qin N, Flores CM, Isaacsohn I, Varadi M, Mori Y, Jones WK, Schwartz A (2009) Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel alpha<sub>2</sub>/delta-1-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H117–H124.
- Fu Y, Tong J-J, Pan Q, Wang W-F, Zou K-F, Qian W, Hou X-H (2009) [Phenotypic analysis of Th cells in colon and peripheral blood in patients with irritable bowel syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89:2120–2123.
- Gale JD, Houghton LA (2011) Alpha 2 Delta ( $\alpha$ (2) $\delta$ ) Ligands, Gabapentin and Pregabalin: What is the Evidence for Potential Use of These Ligands in Irritable Bowel Syndrome. *Front Pharmacol* 2:28.
- Galligan JJ (2004) Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 141:1294–1302.
- Gálvez J (2014) Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm* 2014:928461.
- Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH (2010) Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140:859–870.

- Gaynes BN, Drossman DA (1999) The role of psychosocial factors in irritable bowel syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 13:437–452.
- Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L (2008) Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57:591–599.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271:5768–5776.
- Gerards C, Leodolter A, Glasbrenner B, Malfertheiner P (2001) *H. pylori* infection and visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis* 19:170–173.
- Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A (2014) Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 13:3–10.
- Gershon MD (2005) Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 39:S184–S193.
- Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, Maté J, Gomollón F (2009) Meta-analysis: the efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 30:126–137.
- Goepp J, Fowler E, McBride T, Landis D (2014) Frequency of abnormal fecal biomarkers in irritable bowel syndrome. *Glob Adv Health Med* 3:9–15.
- Gonzalez-Gutierrez G, Miranda-Laferte E, Nothmann D, Schmidt S, Neely A, Hidalgo P (2008) The guanylate kinase domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14198–14203.
- Gover TD, Kao JPY, Weinreich D (2003) Calcium signaling in single peripheral sensory nerve terminals. *J Neurosci* 23:4793–4797.
- Graham DB, Xavier RJ (2013) From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 34:371–378.
- Greenwood-Van Meerveld B, Venkova K, Hicks G, Dennis E, Crowell MD (2006) Activation of peripheral 5-HT receptors attenuates colonic sensitivity to intraluminal distension. *Neurogastroenterol Motil* 18:76–86.
- Gross S, Bakker SF, van Bodegraven AA, van Hoogstraten IMW, Gelderman KA, Bouma G, Mulder CJ, von Blomberg BME, Bontkes HJ (2014) Increased IgA glycoprotein-2 specific antibody titres in refractory celiac disease. *J Gastrointest Liver Dis* 23:127–133.
- Grundy D (1988) Vagal control of gastrointestinal function. *Baillieres Clin Gastroenterol* 2:23–43.
- Grundy D (2002) Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 51 Suppl 1:i2–i5.
- Grunkemeier DMS, Cassara JE, Dalton CB, Drossman DA (2007) The narcotic bowel syndrome: clinical features, pathophysiology, and management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:1126–1139; quiz 1121–1122.
- Gschossmann JM, Mayer EA, Miller JC, Raybould HE (2002) Subdiaphragmatic vagal afferent innervation in activation of an opioidergic antinociceptive system in response to colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* 14:403–408.

- Guardiola J, Lobatón T, Rodríguez-Alonso L, Ruiz-Cerulla A, Arajol C, Loayza C, Sanjuan X, Sánchez E, Rodríguez-Moranta F (2014) Fecal Level of Calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients With Ulcerative Colitis in Clinical and Endoscopic Remission. *Clin Gastroenterol Hepatol*.
- Guarner F, Malagelada J-R (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512–519.
- Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR (2007) Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 56:203–209.
- Guilera M, Balboa A, Mearin F (2005) Bowel habit subtypes and temporal patterns in irritable bowel syndrome: systematic review. *Am J Gastroenterol* 100:1174–1184.
- Gupta S, Salam N, Srivastava V, Singla R, Behera D, Khayyam KU, Korde R, Malhotra P, Saxena R, Natarajan K (2009) Voltage gated calcium channels negatively regulate protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 4:e5305.
- Gurnett CA, Felix R, Campbell KP (1997) Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta and alpha1 subunits. *J Biol Chem* 272:18508–18512.
- Haddley K (2014) Vedolizumab for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drugs Today* 50:309–319.
- Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU (1996) Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 49:65–67.
- Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG (2014) A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146:67–75.e5.
- Hansen MB (2003a) The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* 92:105–113.
- Hansen MB (2003b) The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 92:249–257.
- Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129:50–65.
- Hashash JG, Regueiro MD (2012) The evolving management of postoperative Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 6:637–648.
- Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* 12:2423–2427.
- Hayashida KI, DeGoes S, Curry R, Eisenach JC (2007a) Gabapentin activates spinal noradrenergic activity in rats and humans and reduces hypersensitivity after surgery. *Anesthesiology* 106:557–562.
- Hayashida KI, Parker R, Eisenach JC (2007b) Oral gabapentin activates spinal cholinergic circuits to reduce hypersensitivity after peripheral nerve injury and interacts synergistically with oral donepezil. *Anesthesiology* 106:1213–1219.
- Hayes PA, Fraher MH, Quigley EMM (2014a) Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 10:164–174.
- Hayes P, Corish C, O'Mahony E, Quigley EMM (2014b) A dietary survey of patients with irritable bowel syndrome. *J Hum Nutr Diet* 27 Suppl 2:36–47.

- Heblich F, Tran Van Minh A, Hendrich J, Watschinger K, Dolphin AC (2008) Time course and specificity of the pharmacological disruption of the trafficking of voltage-gated calcium channels by gabapentin. *Channels (Austin)* 2:4–9.
- Heinemann SH, Schlieff T, Mori Y, Imoto K (1994) Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Braz J Med Biol Res* 27:2781–2802.
- Heinke B, Balzer E, Sandkühler J (2004) Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci* 19:103–111.
- Hendrich J, Bauer CS, Dolphin AC (2012) Chronic pregabalin inhibits synaptic transmission between rat dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture. *Channels (Austin)* 6:124–132.
- Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3628–3633.
- Herschbach P, Henrich G, von Rad M (1999) Psychological factors in functional gastrointestinal disorders: characteristics of the disorder or of the illness behavior? *Psychosom Med* 61:148–153.
- Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS (2012) A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol* 107:1399–1406.
- Hirano K, Kuratani K, Fujiyoshi M, Tashiro N, Hayashi E, Kinoshita M (2007) Kv7.2-7.5 voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neurosci Lett* 413:159–162.
- Hisamatsu T, Hibi T (2012) Is the dendritic cell a missing piece in the pathogenesis model of post-infectious irritable bowel syndrome? *J Gastroenterol Hepatol* 27:847–848.
- Holtmann G, Goebell H, Jockenhoevel F, Talley NJ (1998) Altered vagal and intestinal mechanosensory function in chronic unexplained dyspepsia. *Gut* 42:501–506.
- Holzer P (2011a) Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol (Oxf)* 201:63–75.
- Holzer P (2011b) TRP channels in the digestive system. *Curr Pharm Biotechnol* 12:24–34.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22:283–307.
- Hotoleanu C, Popp R, Trifa A-P, Nedelcu L, Dumitrascu D-L (2008) Genetic determination of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 14:6636–6640.
- Houghton LA, Fell C, Whorwell PJ, Jones I, Sudworth DP, Gale JD (2007) Effect of a second-generation alpha2delta ligand (pregabalin) on visceral sensation in hypersensitive patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 56:1218–1225.
- Huang BL, Chandra S, Shih DQ (2012) Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Front Physiol* 3:13.
- Hughes PA, Harrington AM, Castro J, Liebrechts T, Adam B, Grasby DJ, Isaacs NJ, Maldeniya L, Martin CM, Persson J, Andrews JM, Holtmann G, Blackshaw LA, Brierley SM (2013a) Sensory neuro-immune interactions differ between irritable bowel syndrome subtypes. *Gut* 62:1456–1465.
- Hughes PA, Zola H, Penttila IA, Blackshaw LA, Andrews JM, Krumbiegel D (2013b) Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? *Am J Gastroenterol* 108:1066–1074.

- Hungin APS, Whorwell PJ, Tack J, Mearin F (2003) The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 17:643–650.
- Hyland NP, Quigley EM, Brint E (2014) Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: Epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions. *World J Gastroenterol* 20:8859–8866.
- Iturrino J, Camilleri M, Busciglio I, Burton D, Zinsmeister AR (2011) Effect of the  $\alpha 2\delta$  ligand, pregabalin, on colonic sensory and motor functions in healthy adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G377–G384.
- Iturrino J, Camilleri M, Busciglio I, Burton D, Zinsmeister AR (2014) Pilot trial: pregabalin on colonic sensorimotor functions in irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 46:113–118.
- Jäger S, Stange EF, Wehkamp J (2013) Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg* 398:1–12.
- Jagodich MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99:3151–3156.
- Jeffery IB, O’Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, Simrén M (2012a) An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61:997–1006.
- Jeffery IB, Quigley EMM, Öhman L, Simrén M, O’Toole PW (2012b) The microbiota link to irritable bowel syndrome: an emerging story. *Gut Microbes* 3:572–576.
- Jeong YC, Pyun K, Kwon YB (2014) Inhibition of mitogen-activated protein kinases phosphorylation plays an important role in the anti-nociceptive effect of pregabalin in zymosan-induced inflammatory pain model. *Biol Pharm Bull*.
- Jing X, Li D-Q, Olofsson CS, Salehi A, Surve VV, Caballero J, Ivarsson R, Lundquist I, Pereverzev A, Schneider T, Rorsman P, Renström E (2005) CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115:146–154.
- Johanson JF (2004) Options for patients with irritable bowel syndrome: contrasting traditional and novel serotonergic therapies. *Neurogastroenterol Motil* 16:701–711.
- Johansson MEV (2014) Mucus Layers in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*.
- Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:352–361.
- Johnston JM, Shiff SJ, Quigley EMM (2013) A review of the clinical efficacy of linaclotide in irritable bowel syndrome with constipation. *Curr Med Res Opin* 29:149–160.
- Joshi I, Taylor CP (2006) Pregabalin action at a model synapse: binding to presynaptic calcium channel  $\alpha 2$ -delta subunit reduces neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol* 553:82–88.
- Jostins L *et al.*, (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491:119–124.
- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T (2008) Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *J Clin Invest* 118:2269–2280.
- Kamkin AG, Kiseleva IS, Kirishchuk SI, Lozinskiĭ IT (2007) [Voltage-gated calcium channels]. *Usp Fiziol Nauk* 38:14–38.

- Kanagavelu S, Flores C, Termini JM, Riveron R, Romero L, Chung K, Ruiz J, Hyun J, Yuan X, Dagvadorj J, Fukata M (2014) TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) regulates Th17-mediated intestinal immunopathology in colitis. *Mucosal Immunol*.
- Kaneko M, Mestre C, Sánchez EH, Hammond DL (2000) Intrathecally administered gabapentin inhibits formalin-evoked nociception and the expression of Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 292:743–751.
- Kang MG, Campbell KP (2003) Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 278:21315–21318.
- Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y, Campbell KP (2001) Biochemical and biophysical evidence for gamma 2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 276:32917–32924.
- Kania BF, Kowalczyk M, Brytan M, Tomaszewska D, Przekop F (2009) The inhibition of experimentally induced visceral hyperalgesia by nifedipine - a voltage-gated Ca(2+) channels blocker (VGCCs) in sheep. *Res Vet Sci* 86:285–292.
- Kania BF, Sutiak V (2011) Influence of centrally administered diltiazem on behavioural responses, clinical symptoms, reticulo-ruminal contractions and plasma catecholamine level after experimentally induced duodenal distension in sheep. *Res Vet Sci* 90:291–297.
- Kaplan GG, McCarthy EP, Ayanian JZ, Korzenik J, Hodin R, Sands BE (2008) Impact of hospital volume on postoperative morbidity and mortality following a colectomy for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 134:680–687.
- Karatzas PS, Gazouli M, Safioleas M, Mantzaris GJ (2014) DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 27:125–132.
- Karunasekara Y, Dulhunty AF, Casarotto MG (2009) The voltage-gated calcium-channel beta subunit: more than just an accessory. *Eur Biophys J* 39:75–81.
- Kaser A, Blumberg RS (2011) Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140:1738–1747.
- Kaser A, Blumberg RS (2014) ATG16L1 Crohn's disease risk stresses the endoplasmic reticulum of Paneth cells. *Gut* 63:1038–1039.
- Kattah MG, Mahadevan U (2014) Insights Into the Molecular Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: ATG16L1 Suppresses Nod-Driven Inflammation. *Gastroenterology* 147:528–530.
- Kawalec P, Mikrut A, Łopuch S (2014) Systematic review of the effectiveness of biological therapy for active moderate to severe ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 29:1159–1170.
- Kawalec P, Mikrut A, Wiśniewska N, Pilc A (2013) Tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies (infliximab, adalimumab and certolizumab) in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* 9:765–779.
- Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Yano T, Oishi R (2012) L type Ca<sup>2+</sup> channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain* 8:7.
- Keating C, Pelegrin P, Martínez CM, Grundy D (2011) P2X7 receptor-dependent intestinal afferent hypersensitivity in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome. *J Immunol* 187:1467–1474.

- Keohane J, O'Mahony C, O'Mahony L, O'Mahony S, Quigley EM, Shanahan F (2010) Irritable bowel syndrome-type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation? *Am J Gastroenterol* 105:1788, 1789–1794; quiz 1795.
- Khan KJ, Dubinsky MC, Ford AC, Ullman TA, Talley NJ, Moayyedi P (2011a) Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106:630–642.
- Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Abadir A, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P (2011b) Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106:661–673.
- Khoshoo V, Armstead C, Landry L (2006) Effect of a laxative with and without tegaserod in adolescents with constipation predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 23:191–196.
- Kim C, Jun K, Lee T, Kim SS, McEnery MW, Chin H, Kim HL, Park JM, Kim DK, Jung SJ, Kim J, Shin HS (2001) Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol Cell Neurosci* 18:235–245.
- Kim DS, Yoon CH, Lee SJ, Park SY, Yoo HJ, Cho HJ (2001) Changes in voltage-gated calcium channel alpha(1) gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 96:151–156.
- Kindt S, Van Oudenhove L, Broekaert D, Kasran A, Ceuppens JL, Bossuyt X, Fischler B, Tack J (2009) Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil* 21:389–398.
- King TS, Elia M, Hunter JO (1998) Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 352:1187–1189.
- Kirchgessner AL, Liu MT (1999) Differential localization of Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits in the enteric nervous system: presence of alpha1B channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. *J Comp Neurol* 409:85–104.
- Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE (2010) The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 59:1213–1221.
- Klooker TK, Kuiken SD, Lei A, Boeckxstaens GE (2007) Effect of long-term treatment with octreotide on rectal sensitivity in patients with non-constipated irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 26:605–615.
- Klugbauer N, Lacinová L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19:684–691.
- Klugbauer N, Marais E, Hofmann F (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 35:639–647.
- Knowles CH, Aziz Q (2009) Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain. *Pain* 141:191–209.
- Knowles SR, Monshat K, Castle DJ (2013) The efficacy and methodological challenges of psychotherapy for adults with inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 19:2704–2715.
- Koeppen BM, Stanton BA (2008) *Berne & Levy Physiology, Updated Edition, 6th Edition*

- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ (2011) Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol* 62:591–599.
- Koon HW, Pothoulakis C (2006) Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci* 1088:23–40.
- Koyuncu T, Oğuz G, Akben S, Nas S, Ünver S (2013) [The effects of pregabalin on postoperative pain and opioid consumption used perioperatively in patients undergoing modified radical mastectomy]. *Agri* 25:169–178.
- Kristjánsson G, Venge P, Wanders A, Lööf L, Hällgren R (2004) Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut* 53:1806–1812.
- Kukkar A, Bali A, Singh N, Jaggi AS (2013) Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Arch Pharm Res* 36:237–251.
- Kume A (2014) Gabapentin enacarbil for the treatment of moderate to severe primary restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease): 600 or 1,200 mg dose? *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:249–262.
- Kump PK, Gröchenig H-P, Lackner S, Trajanoski S, Reicht G, Hoffmann KM, Deutschmann A, Wenzl HH, Petritsch W, Krejs GJ, Gorkiewicz G, Högenauer C (2013) Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 19:2155–2165.
- Kunde S, Pham A, Bonczyk S, Crumb T, Duba M, Conrad H, Cloney D, Kugathasan S (2013) Safety, tolerability, and clinical response after fecal transplantation in children and young adults with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56:597–601.
- Kusunose N, Koyanagi S, Hamamura K, Matsunaga N, Yoshida M, Uchida T, Tsuda M, Inoue K, Ohdo S (2010) Molecular basis for the dosing time-dependency of anti-allodynic effects of gabapentin in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain* 6:83.
- Lacy BE, Chey WD (2009) Lubiprostone: chronic constipation and irritable bowel syndrome with constipation. *Expert Opin Pharmacother* 10:143–152.
- Lacy BE, Lembo AJ, Macdougall JE, Shiff SJ, Kurtz CB, Currie MG, Johnston JM (2014) Responders vs clinical response: a critical analysis of data from linaclotide phase 3 clinical trials in IBS-C. *Neurogastroenterol Motil* 26:326–333.
- Lai HC, Jan LY (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7:548–562.
- Lakatos PL (2009) Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 27:215–225.
- Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L (2007) Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 13:6134–6139.
- Lanzarotto F, Carpani M, Chaudhary R, Ghosh S (2006) Novel treatment options for inflammatory bowel disease: targeting alpha 4 integrin. *Drugs* 66:1179–1189.
- Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A (2008) Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:401–407.
- Layer P, Stanghellini V (2014) Review article: Linaclotide for the management of irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 39:371–384.

- Lazaraki G, Chatzimavroudis G, Katsinelos P (2014) Recent advances in pharmacological treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:8867–8885.
- Lee B-S, Jun I-G, Kim S-H, Park JY (2013) Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. *J Korean Med Sci* 28:308–314.
- Lee KJ, Kim JH, Cho SW (2005) Gabapentin reduces rectal mechanosensitivity and increases rectal compliance in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 22:981–988.
- Lee KN, Lee OY (2014) Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:8886–8897.
- Lee MS (2014) Recent progress in the discovery and development of N-type calcium channel modulators for the treatment of pain. *Prog Med Chem* 53:147–186.
- Lee YJ, Park KS (2014) Irritable bowel syndrome: emerging paradigm in pathophysiology. *World J Gastroenterol* 20:2456–2469.
- Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J (2011) New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 60:1739–1753.
- Lembo A, Zaman M, Jones M, Talley NJ (2007) Influence of genetics on irritable bowel syndrome, gastro-oesophageal reflux and dyspepsia: a twin study. *Aliment Pharmacol Ther* 25:1343–1350.
- Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, Salomez JL, Hellot MF, Dupas JL, Colombel JF, Cortot A, Benichou J (2007) Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 102:122–131.
- Leserman J, Drossman DA (2007) Relationship of abuse history to functional gastrointestinal disorders and symptoms: some possible mediating mechanisms. *Trauma Violence Abuse* 8:331–343.
- Levy D, Strassman AM (2004) Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J Neurophysiol* 92:766–772.
- Levy RL, Jones KR, Whitehead WE, Feld SI, Talley NJ, Corey LA (2001) Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* 121:799–804.
- Levy RL, Olden KW, Naliboff BD, Bradley LA, Francisconi C, Drossman DA, Creed F (2006) Psychosocial aspects of the functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 130:1447–1458.
- Liao X, Zhou M-T, Mao Y-F, Xu H, Chen H, Sun J-H, Xiong Y-C (2010) Analgesic effects of gabapentin on mechanical hypersensitivity in a rat model of chronic pancreatitis. *Brain Res* 1337:104–112.
- Li CY, Song Y-H, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24:8494–8499.
- Li CY, Zhang X-L, Matthews EA, Li K-W, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20–34.
- Li KW, Yu YP, Zhou C, Kim D-S, Lin B, Sharp K, Steward O, Luo ZD (2014) Calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  proteins mediate trigeminal neuropathic pain states associated with aberrant excitatory synaptogenesis. *J Biol Chem* 289:7025–7037.

- Li L, Cao X-H, Chen S-R, Han H-D, Lopez-Berestein G, Sood AK, Pan H-L (2012) Up-regulation of Cav $\beta$ 3 subunit in primary sensory neurons increases voltage-activated Ca $^{2+}$  channel activity and nociceptive input in neuropathic pain. *J Biol Chem* 287:6002–6013.
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725–734.
- Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J (2008) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol* 126:67–80.
- Li Z, Taylor CP, Weber M, Piechan J, Prior F, Bian F, Cui M, Hoffman D, Donevan S (2011) Pregabalin is a potent and selective ligand for  $\alpha(2)\delta$ -1 and  $\alpha(2)\delta$ -2 calcium channel subunits. *Eur J Pharmacol* 667:80–90.
- Liebregts T, Adam B, Bredack C, Röth A, Heinzel S, Lester S, Downie-Doyle S, Smith E, Drew P, Talley NJ, Holtmann G (2007) Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132:913–920.
- Lilienbaum A, Israël A (2003) From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* 23:2680–2698.
- Lobatón T, Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P (2014) Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 39:579–594.
- Long MD, Barnes EL, Herfarth HH, Drossman DA (2012) Narcotic use for inflammatory bowel disease and risk factors during hospitalization. *Inflamm Bowel Dis* 18:869–876.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 130:1480–1491.
- Lory P, Nargeot J (2004) [Genetic diversity of voltage-gated calcium channels]. *Rev Neurol (Paris)* 160:S7–S15.
- Lovell RM, Ford AC (2012a) Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107:991–1000.
- Lovell RM, Ford AC (2012b) Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:712–721.e4.
- Lu SG, Zhang X-L, Luo ZD, Gold MS (2010) Persistent inflammation alters the density and distribution of voltage-activated calcium channels in subpopulations of rat cutaneous DRG neurons. *Pain* 151:633–643.
- Lu Y, Westlund KN (1999) Gabapentin attenuates nociceptive behaviors in an acute arthritis model in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 290:214–219.
- Luo JL, Qin H-Y, Wong C-K, Tsang S-Y, Huang Y, Bian Z-X (2011) Enhanced excitability and down-regulated voltage-gated potassium channels in colonic drg neurons from neonatal maternal separation rats. *J Pain* 12:600–609.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL (2001) Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 21:1868–1875.
- Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB (2007) Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2:204.
- Lynch JJ, Wade CL, Zhong CM, Mikusa JP, Honore P (2004) Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *Pain* 110:56–63.

- Magro F *et al.*, (2013) European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 7:827–851.
- Mahadevan U, Kane S (2006) American gastroenterological association institute medical position statement on the use of gastrointestinal medications in pregnancy. *Gastroenterology* 131:278–282.
- Mandeville JT, Maxfield FR (1996) Calcium and signal transduction in granulocytes. *Curr Opin Hematol* 3:63–70.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J (2003) Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5543–5548.
- Marchioni Beery R, Kane S (2014) Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis. *Clin Exp Gastroenterol* 7:111–132.
- Marger F, Gelot A, Alloui A, Matricon J, Ferrer JFS, Barrère C, Pizzoccaro A, Muller E, Nargeot J, Snutch TP, Eschalier A, Bourinet E, Ardid D (2011) T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11268–11273.
- Margolis KG, Gershon MD (2009) Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 25:503–511.
- Marineață A, Rezuș E, Mihai C, Prelipcean CC (2014) Extra intestinal manifestations and complications in inflammatory bowel disease. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 118:279–288.
- Marshall JK (2014) The origins of irritable bowel syndrome: experience of a lifetime. *Gastroenterology* 147:18–20.
- Marsilio S, Kleinschmidt S, Nolte I, Hewicker-Trautwein M (2014) Immunohistochemical and morphometric analysis of intestinal full-thickness biopsy samples from cats with lymphoplasmacytic inflammatory bowel disease. *J Comp Pathol* 150:416–423.
- Martin A (2014) [Nutritional recommendations in cases of IBD]. *Rev Infirm* 199:22.
- Martin L, Pingle SC, Hallam DM, Rybak LP, Ramkumar V (2006) Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* 316:71–78.
- Martínez C, González-Castro A, Vicario M, Santos J (2012) Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 6:305–315.
- Martínez C, Lobo B, Pigrau M, Ramos L, González-Castro AM, Alonso C, Guilarte M, Guilá M, de Torres I, Azpiroz F, Santos J, Vicario M (2013) Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut* 62:1160–1168.
- Mason BJ, Quello S, Goodell V, Shadan F, Kyle M, Begovic A (2014) Gabapentin treatment for alcohol dependence: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* 174:70–77.
- Matricon J, Barnich N, Ardid D (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* 1:299–309.
- Matthews EA, Bee LA, Stephens GJ, Dickenson AH (2007) 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.

- Matthews EA, Dickenson AH (2001) Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 92:235–246.
- Mättö J, Maunuksela L, Kajander K, Palva A, Korpela R, Kassinen A, Saarela M (2005) Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome--a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:213–222.
- Maunder RG (2005) Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflamm Bowel Dis* 11:600–608.
- Maxwell PR, Mendall MA, Kumar D (1997) Irritable bowel syndrome. *Lancet* 350:1691–1695.
- McClelland D, Evans RM, Barkworth L, Martin DJ, Scott RH (2004) A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. *BMC Pharmacol* 4:14.
- McCombie AM, Mulder RT, Gearry RB (2013) Psychotherapy for inflammatory bowel disease: a review and update. *J Crohns Colitis* 7:935–949.
- McDonald JW, Wang Y, Tsoulis DJ, MacDonald JK, Feagan BG (2014) Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD003459.
- McDonald JWD, Feagan BG, Jewell D, Brynskov J, Stange EF, Macdonald JK (2005) Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000297.
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G (2009) Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 15:100–113.
- McKendrick MW, Read NW (1994) Irritable bowel syndrome--post salmonella infection. *J Infect* 29:1–3.
- McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW, Snutch TP (2004) The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* 24:1707–1718.
- Mearin F, Pérez-Oliveras M, Perelló A, Vinyet J, Ibañez A, Coderch J, Perona M (2005) Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a Salmonella gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology* 129:98–104.
- Menees SB, Maneerattannaporn M, Kim HM, Chey WD (2012) The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107:28–35; quiz 36.
- Mete R, Tulubas F, Oran M, Yılmaz A, Avci BA, Yildiz K, Turan CB, Gurel A (2013) The role of oxidants and reactive nitrogen species in irritable bowel syndrome: a potential etiological explanation. *Med Sci Monit* 19:762–766.
- Meymandi MS, Keyhanfar F (2013) Assessment of the antinociceptive effects of pregabalin alone or in combination with morphine during acetic acid-induced writhing in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305713001895> [Accessed August 12, 2013].
- Michalski CW, Autschbach F, Selvaggi F, Shi X, Di Mola FF, Roggo A, Müller MW, Di Sebastiano P, Büchler MW, Giese T, Friess H (2007) Increase in substance P precursor mRNA in noninflamed small-bowel sections in patients with Crohn's disease. *Am J Surg* 193:476–481.
- Middendorp S, Nieuwenhuis EES (2009) NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2:393–402.

- Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ (2006) Antidepressants and inflammatory bowel disease: a systematic review. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2:24.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164.
- Million M, Wang L, Adelson DW, Roman F, Diop L, Taché Y (2007) Pregabalin decreases visceral pain and prevents spinal neuronal activation in rats. *Gut* 56:1482–1484.
- Minderhoud IM, Oldenburg B, Schipper MEI, ter Linde JJM, Samsom M (2007) Serotonin synthesis and uptake in symptomatic patients with Crohn's disease in remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:714–720.
- Minderhoud IM, Oldenburg B, Wismeijer JA, van Berge Henegouwen GP, Smout AJPM (2004) IBS-like symptoms in patients with inflammatory bowel disease in remission; relationships with quality of life and coping behavior. *Dig Dis Sci* 49:469–474.
- Mönnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglu E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Mönnikes I (2001) Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 19:201–211.
- Monsbakken KW, Vandvik PO, Farup PG (2006) Perceived food intolerance in subjects with irritable bowel syndrome-- etiology, prevalence and consequences. *Eur J Clin Nutr* 60:667–672.
- Montell C (2011) The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch* 461:499–506.
- Morcos A, Dinan T, Quigley EMM (2009) Irritable bowel syndrome: role of food in pathogenesis and management. *J Dig Dis* 10:237–246.
- Morris-Yates A, Talley NJ, Boyce PM, Nandurkar S, Andrews G (1998) Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am J Gastroenterol* 93:1311–1317.
- Moskwa A, Bożnańska P (2007) [Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome]. *Wiad Lek* 60:371–376.
- Motzer SA, Jarrett M, Heitkemper MM, Tsuji J (2002) Natural killer cell function and psychological distress in women with and without irritable bowel syndrome. *Biol Res Nurs* 4:31–42.
- Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho G-T, Satsangi J, Bloom S, IBD Section of the British Society of Gastroenterology (2011) Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 60:571–607.
- Mullin GE, Shepherd SJ, Chander Roland B, Ireton-Jones C, Matarese LE (2014) Irritable Bowel Syndrome: Contemporary Nutrition Management Strategies. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*.
- Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T (2004) Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res* 1024:122–129.
- Mykletun A, Jacka F, Williams L, Pasco J, Henry M, Nicholson GC, Kotowicz MA, Berk M (2010) Prevalence of mood and anxiety disorder in self reported irritable bowel syndrome (IBS). An epidemiological population based study of women. *BMC Gastroenterol* 10:88.
- Needham K, Bron R, Hunne B, Nguyen TV, Turner K, Nash M, Furness JB (2010) Identification of subunits of voltage-gated calcium channels and actions of pregabalin on intrinsic primary afferent neurons in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol Motil* 22:e301–e308.

- Neely GG *et al.*, (2010) A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies  $\alpha 2\delta 3$  as an evolutionarily conserved pain gene. *Cell* 143:628–638.
- Nellesen D, Yee K, Chawla A, Lewis BE, Carson RT (2013) A systematic review of the economic and humanistic burden of illness in irritable bowel syndrome and chronic constipation. *J Manag Care Pharm* 19:755–764.
- Neurath MF (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14:329–342.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 95:1–8.
- Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV, Tysk C, O’Morain C, Moum B, Colombel J-F, Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) (2013) Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62:630–649.
- Nieminen JK, Sipponen T, Färkkilä M, Vaarala O (2014) Monocyte-derived dendritic cells from Crohn’s disease patients exhibit decreased ability to activate T helper type 17 responses in memory cells. *Clin Exp Immunol* 177:190–202.
- Noomen CG, Hommes DW, Fidder HH (2009) Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 23:233–243.
- Ochoa-Cortes F, Liñán-Rico A, Jacobson KA, Christofi FL (2014) Potential for developing purinergic drugs for gastrointestinal diseases. *Inflamm Bowel Dis* 20:1259–1287.
- Ohashi-Doi K, Gale JD, Kurebayashi Y (2010) Pregabalin inhibits accelerated defecation and decreased colonic nociceptive threshold in sensitized rats. *Eur J Pharmacol* 643:107–112.
- Ohashi K, Kawai M, Ninomiya N, Taylor C, Kurebayashi Y (2008) Effect of a new  $\alpha 2\delta$  ligand PD-217014 on visceral hypersensitivity induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Pharmacology* 81:144–150.
- Ohman L, Isaksson S, Lindmark A-C, Posserud I, Stotzer P-O, Strid H, Sjövall H, Simrén M (2009) T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 104:1205–1212.
- Ohman L, Lindmark A-C, Isaksson S, Posserud I, Strid H, Sjövall H, Simrén M (2012) Increased TLR2 expression on blood monocytes in irritable bowel syndrome patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24:398–405.
- Ohman L, Simrén M (2010) Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:163–173.
- Olesen SS, Graversen C, Olesen AE, Frøkjær JB, Wilder-Smith O, van Goor H, Valeriani M, Drewes AM (2011) Randomised clinical trial: pregabalin attenuates experimental visceral pain through sub-cortical mechanisms in patients with painful chronic pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 34:878–887.
- O’ Mahony SM, Coelho A-M, Fitzgerald P, Lee K, Winchester W, Dinan TG, Cryan JF (2011) The effects of gabapentin in two animal models of co-morbid anxiety and visceral hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 667:169–174.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mührenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the  $Ca^{2+}$  channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543–552.

- Osterman MT, Sandborn WJ, Colombel J-F, Robinson AM, Lau W, Huang B, Pollack PF, Thakkar RB, Lewis JD (2014) Increased risk of malignancy with adalimumab combination therapy, compared with monotherapy, for Crohn's disease. *Gastroenterology* 146:941–949.
- Pajak R, Lackner J, Kamboj SK (2013) A systematic review of minimal-contact psychological treatments for symptom management in irritable bowel syndrome. *J Psychosom Res* 75:103–112.
- Paragomi P, Rahimian R, Kazemi MH, Gharedaghi MH, Khalifeh-Soltani A, Azary S, Javidan AN, Moradi K, Sakuma S, Dehpour AR (2014) Antinociceptive and antidiarrheal effects of pioglitazone in a rat model of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: role of nitric oxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:118–126.
- Parekh AB, Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757–810.
- Park JH, Rhee P-L, Kim HS, Lee JH, Kim Y-H, Kim JJ, Rhee JC (2006) Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 21:71–78.
- Park JY, Jeong S-W, Perez-Reyes E, Lee J-H (2003) Modulation of Ca(v)3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C. *FEBS Lett* 547:37–42.
- Park S, Ahn ES, Han DW, Lee JH, Min KT, Kim H, Hong Y-W (2008) Pregabalin and gabapentin inhibit substance P-induced NF-kappaB activation in neuroblastoma and glioma cells. *J Cell Biochem* 105:414–423.
- Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, Margas W, Ferron L, Chaggar K, Crews K, Ramirez JD, Bennett DLH, Schwartz A, Dickenson AH, Dolphin AC (2013)  $\alpha 2\delta$ -1 gene deletion affects somatosensory neuron function and delays mechanical hypersensitivity in response to peripheral nerve damage. *J Neurosci* 33:16412–16426.
- Patel V, Macdonald JK, McDonald JW, Chande N (2009) Methotrexate for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006884.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EEL, Wising C, Johansson MEV, Hansson GC (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 260:8–20.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117–161.
- Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A (2005) Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium* 38:161–169.
- Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 3:417–427.
- Peterson LW, Artis D (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14:141–153.
- Pham CQD, Efros CB, Berardi RR (2006) Cyclosporine for severe ulcerative colitis. *Ann Pharmacother* 40:96–101.
- Piche T (2014) Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol Motil* 26:296–302.

- Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M (2009) Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58:196–201.
- Pietrobon D (2013) Calcium channels and migraine. *Biochim Biophys Acta* 1828:1655–1665.
- Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, Shaw AL, Bortey E, Forbes WP, TARGET Study Group (2011) Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 364:22–32.
- Pitz M, Cheang M, Bernstein CN (2005) Defining the predictors of the placebo response in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:237–247.
- Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemona H (2009) [The cytokines in inflammatory bowel disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63:389–394.
- Popadiuk S, Renke J, Gleń J, Landowski P, Kamińska B, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Szumera M, Ulko P, Korzon M (2006) [Tryptase activity in colon mucosal samples of children with inflammatory bowel disease]. *Med Wieku Rozwoj* 10:437–443.
- Porcelli P (2004) Psychological abnormalities in patients with irritable bowel syndrome. *Indian J Gastroenterol* 23:63–69.
- Prantera C, Scribano ML (2009) Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Curr Opin Gastroenterol* 25:329–333.
- Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR (2010) Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000545.
- Qian A, Song D, Li Y, Liu X, Tang D, Yao W, Yuan Y (2013) Role of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels in rat visceral hypersensitivity change induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Mol Pain* 9:15.
- Quigley EMM (2005) Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated diseases? *Chin J Dig Dis* 6:122–132.
- Quigley EMM, Flourie B (2007) Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. *Neurogastroenterol Motil* 19:166–172.
- Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M (2009) Efficacy of tricyclic antidepressants in irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 15:1548–1553.
- Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, Hahn EG (2001) Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 36:174–179.
- Rajakulendran S, Kaski D, Hanna MG (2012) Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. *Nat Rev Neurol* 8:86–96.
- Raschi E, De Ponti F (2014) Lubiprostone: pharmacokinetic, pharmacodynamic, safety and regulatory aspects in the treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10:293–305.
- Ravnefjord A, Brusberg M, Larsson H, Lindström E, Martínez V (2008) Effects of pregabalin on visceral pain responses and colonic compliance in rats. *Br J Pharmacol* 155:407–416.
- Regnard C, Twycross R, Mihalyo M, Wilcock A (2011) Loperamide. *J Pain Symptom Manage* 42:319–323.

- Reinisch W, Van Assche G, Befrits R, Connell W, D'Haens G, Ghosh S, Michetti P, Ochsenkühn T, Panaccione R, Schreiber S, Silverberg MS, Sorrentino D, van der Woude CJ, Vermeire S, Panes J (2012) Recommendations for the treatment of ulcerative colitis with infliximab: a gastroenterology expert group consensus. *J Crohns Colitis* 6:248–258.
- Richards MW, Leroy J, Pratt WS, Dolphin AC (2007) The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cavbeta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation. *Channels (Austin)* 1:92–101.
- Rijnierse A, Nijkamp FP, Kraneveld AD (2007) Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther* 116:207–235.
- Roberts PJ, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ (2001) Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease. *Gut* 48:468–472.
- Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E (2010) Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 16:4264–4271.
- Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT (2009) Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58:1629–1636.
- Ruepert L, Quartero AO, de Wit NJ, van der Heijden GJ, Rubin G, Muris JW (2013) Bulking agents, antispasmodics and antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003460.
- Rush AM, Waxman SG (2004) PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Res* 1023:264–271.
- Rychter J, Espín F, Gallego D, Vergara P, Jiménez M, Clavé P (2014) Colonic smooth muscle cells and colonic motility patterns as a target for irritable bowel syndrome therapy: mechanisms of action of otilonium bromide. *Therap Adv Gastroenterol* 7:156–166.
- Sabaté J-M, Bouhassira D, Poupardin C, Wagner A, Loria Y, Coffin B (2008) Sensory signalling effects of tegaserod in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Neurogastroenterol Motil* 20:134–141.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *EMBO J* 20:2349–2356.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Minowa O, Kazuno A, Han W, Matsuda Y, Yamanaka H, Osanai M, Noda T, Tanabe T (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6132–6137.
- Saegusa H, Matsuda Y, Tanabe T (2002) Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission. *Neurosci Res* 43:1–7.
- Saitz R (2014) ACP Journal Club. Gabapentin increased complete abstinence in alcohol-dependent patients seeking treatment. *Ann Intern Med* 160:JC10.
- Salman AE, Camkiran A, Oğuz S, Dönmez A (2013) Gabapentin premedication for postoperative analgesia and emergence agitation after sevoflurane anesthesia in pediatric patients. *Agri* 25:163–168.
- Salvemini D, Kim SF, Mollace V (2013) Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:R473–R487.

- Sandborn WJ (2014) Crohn's Disease Evaluation and Treatment: Clinical Decision Tool. *Gastroenterology* Available at: [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(14\)00918-4/abstract?rss=yes?rss=yes](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(14)00918-4/abstract?rss=yes?rss=yes) [Accessed August 12, 2014].
- Sarantopoulos C, McCallum B, Kwok W-M, Hogan Q (2002) Gabapentin decreases membrane calcium currents in injured as well as in control mammalian primary afferent neurons. *Reg Anesth Pain Med* 27:47–57.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55:749–753.
- Savage DC (2001) Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. *Curr Issues Intest Microbiol* 2:1–15.
- Scaldaferri F, Fiocchi C (2007) Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 8:171–178.
- Scaldaferri F, Gerardi V, Lopetuso LR, Del Zompo F, Mangiola F, Boškoski I, Bruno G, Petito V, Laterza L, Cammarota G, Gaetani E, Sgambato A, Gasbarrini A (2013) Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res Int* 2013:435268.
- Schroeder CI, Doering CJ, Zamponi GW, Lewis RJ (2006) N-type calcium channel blockers: novel therapeutics for the treatment of pain. *Med Chem* 2:535–543.
- Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M (2009) Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1165:294–300.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90:859–904.
- Senatore A, Colleoni S, Verderio C, Restelli E, Morini R, Condliffe SB, Bertani I, Mantovani S, Canovi M, Micotti E, Forloni G, Dolphin AC, Matteoli M, Gobbi M, Chiesa R (2012) Mutant PrP suppresses glutamatergic neurotransmission in cerebellar granule neurons by impairing membrane delivery of VGCC  $\alpha(2)\delta-1$  Subunit. *Neuron* 74:300–313.
- Shamshiri H, Paragomi P, Paydar MJ, Moezi L, Bahadori M, Behfar B, Ardalan FA, Dehpour AR (2009) Antinociceptive effect of chronic lithium on visceral hypersensitivity in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: The role of nitric oxide pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 24:672–680.
- Shamsi Meymandi M, Keyhanfar F (2013) Relative potency of pregabalin, gabapentin, and morphine in a mouse model of visceral pain. *Can J Anaesth* 60:44–49.
- Shanahan F, Bernstein CN (2009) The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 25:301–305.
- Sharma A, Ghoshal UC (2014) Low FODMAP diet in the treatment of irritable bowel syndrome: is it the end of the road or the beginning of a journey? *Gastroenterology* 146:1830.
- Sharma R, Tepas JJ (2010) Microecology, intestinal epithelial barrier and necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 26:11–21.
- Sharp AH, Black JL, Dubel SJ, Sundarraj S, Shen JP, Yunker AM, Copeland TD, McEnery MW (2001) Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience* 105:599–617.

- Shaw RM, Colecraft HM (2013) L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 98:177–186.
- Sherid M, Sifuentes H, Samo S, Deepak P, Sridhar S (2013) Lubiprostone induced ischemic colitis. *World J Gastroenterol* 19:299–303.
- Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM, Inturrisi CE, Elliott KJ (1997) Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. *Neurosci Lett* 222:65–67.
- Shinoda M, Feng B, Gebhart GF (2009) Peripheral and central P2X receptor contributions to colon mechanosensitivity and hypersensitivity in the mouse. *Gastroenterology* 137:2096–2104.
- Shutov L, Kruglikov I, Gryshchenko O, Khomula E, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, Voitenko N (2006) The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol* 26:1541–1557.
- Siddiqui NT, Fischer H, Guerina L, Friedman Z (2014) Effect of a preoperative gabapentin on postoperative analgesia in patients with inflammatory bowel disease following major bowel surgery: a randomized, placebo-controlled trial. *Pain Pract* 14:132–139.
- Sikandar S, Bannister K, Dickenson AH (2012) Brainstem facilitations and descending serotonergic controls contribute to visceral nociception but not pregabalin analgesia in rats. *Neurosci Lett* 519:31–36.
- Sikandar S, Dickenson AH (2011) Pregabalin modulation of spinal and brainstem visceral nociceptive processing. *Pain* 152:2312–2322.
- Sikander A, Rana SV, Prasad KK (2009) Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta* 403:47–55.
- Simms BA, Zamponi GW (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82:24–45.
- Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG, Rome Foundation Committee (2013) Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 62:159–176.
- Simrén M, Månsson A, Langkilde AM, Svedlund J, Abrahamsson H, Bengtsson U, Björnsson ES (2001) Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 63:108–115.
- Sitges M, Galindo CA (2005) Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated changes in internal Ca<sup>2+</sup> and glutamate release in depolarised brain nerve terminals. *Neurochem Int* 46:53–60.
- Skaper SD (2012) The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 846:1–12.
- Sohn W, Lee OY, Lee SP, Lee KN, Jun DW, Lee HL, Yoon BC, Choi HS, Sim J, Jang K-S (2014) Mast cell number, substance P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with diarrhea. *Scand J Gastroenterol* 49:43–51.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J (2009) Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15:1183–1189.
- Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG (2012) The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 12:51.

- Spiller RC (2007) Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 42 Suppl 17:41–47.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR (2000) Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47:804–811.
- Spiller R, Garsed K (2009) Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136:1979–1988.
- Stadnicki A (2011) Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 17:645–654.
- Stanley AC, Lacy P (2010) Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda)* 25:218–229.
- Stasi C, Bellini M, Bassotti G, Blandizzi C, Milani S (2014) Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech Coloproctol* 18:613–621.
- Steck N, Mueller K, Schemann M, Haller D (2012) Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* 61:1610–1618.
- Stenton GR, Nohara O, Déry RE, Vliagoftis H, Gilchrist M, Johri A, Wallace JL, Hollenberg MD, Moqbel R, Befus AD (2002) Proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR-1 and PAR-2. *J Pharmacol Exp Ther* 302:466–474.
- Stepanovic-Petrovic RM, Tomic MA, Vuckovic SM, Paranos S, Ugresic ND, Prostran MS, Milovanovic S, Boskovic B (2008) The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesth Analg* 106:1897–1903.
- Striessnig J, Hoda J-C, Koschak A, Zaghetto F, Müllner C, Sinnegger-Brauns MJ, Wild C, Watschinger K, Trockenbacher A, Pelster G (2004) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in Ca<sup>2+</sup> channelopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1341–1346.
- Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A (2010) The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 160:386–393.
- Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, Khrantsova EA, Khrantsova G, Tsai P-Y, Fu Y-X, Abraham C, Turner JR (2013) TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 145:407–415.
- Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, Abraham C, Turner JR (2009) Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 136:551–563.
- Sutton KG, Martin DJ, Pinnock RD, Lee K, Scott RH (2002) Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* 135:257–265.
- Suzuki R, Rahman W, Rygh LJ, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH (2005) Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain* 117:292–303.
- Swensen AM, Herrington J, Bugianesi RM, Dai G, Haedo RJ, Ratliff KS, Smith MM, Warren VA, Arneric SP, Eduljee C, Parker D, Snutch TP, Hoyt SB, London C, Duffy JL, Kaczorowski GJ, McManus OB (2012) Characterization of the substituted N-triazole oxindole TROX-1, a small-molecule, state-dependent inhibitor of Ca(V)<sub>2</sub> calcium channels. *Mol Pharmacol* 81:488–497.
- Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A (2008) Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 151:34–41.

- Takahashi N, Arai I, Kayama S, Ichiji K, Fukuda H, Kaga T, Konno S-I (2014) Therapeutic efficacy of pregabalin in patients with leg symptoms due to lumbar spinal stenosis. *Fukushima J Med Sci* 60:35–42.
- Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Nomoto K, Tanaka R, Hibi T (2008) Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 298:463–472.
- Taverniti V, Guglielmetti S (2014) Methodological issues in the study of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20:8821–8836.
- Taylor CP (2009) Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin--calcium channel alpha2-delta [Cavalpha2-delta] ligands. *Pain* 142:13–16.
- Taylor CP, Garrido R (2008) Immunostaining of rat brain, spinal cord, sensory neurons and skeletal muscle for calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) type 1 protein. *Neuroscience* 155:510–521.
- Te HS, Schiano TD, Kuan SF, Hanauer SB, Conjeevaram HS, Baker AL (2000) Hepatic effects of long-term methotrexate use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 95:3150–3156.
- Ter Beek WP, Biemond I, Muller ESM, van den Berg M, Lamers CBHW (2007) Substance P receptor expression in patients with inflammatory bowel disease. Determination by three different techniques, i.e., storage phosphor autoradiography, RT-PCR and immunohistochemistry. *Neuropeptides* 41:301–306.
- Thabane M, Kottachchi DT, Marshall JK (2007) Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 26:535–544.
- Thanos D, Maniatis T (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80:529–532.
- Timmer A, McDonald JWD, Tsoulis DJ, Macdonald JK (2012) Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 9:CD000478.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2007) Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway. *Channels (Austin)* 1:238–245.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2011) T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br J Pharmacol* 163:484–495.
- Todorovic SM, Pathirathna S, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V (2004) Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci Lett* 360:57–60.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117:244–279.
- Tran-Van-Minh A, Dolphin AC (2010) The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *J Neurosci* 30:12856–12867.
- Traub RJ (2000) Evidence for thoracolumbar spinal cord processing of inflammatory, but not acute colonic pain. *Neuroreport* 11:2113–2116.
- Tung C-C, Wong J-M, Lee W-C, Liu H-H, Chang C-H, Chang M-C, Chang Y-T, Shieh M-J, Wang C-Y, Wei S-C (2014) Combining TNFSF15 and ASCA IgA can be used as a predictor for the stenosis/perforating phenotype of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 29:723–729.
- Uchitel OD, Di Guilmi MN, Urbano FJ, Gonzalez-Inchauspe C (2010) Acute modulation of calcium currents and synaptic transmission by gabapentinoids. *Channels (Austin)* 4:490–496.

- Uchitel OD, Inchauspe CG, Urbano FJ, Di Guilmi MN (2012) CaV2.1 voltage activated calcium channels and synaptic transmission in familial hemiplegic migraine pathogenesis. *J Physiol Paris* 106:12–22.
- Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, Ouahed J, Wilson DC, Travis SP, Turner D, Klein C, Snapper SB, Muise AM (2014) The Diagnostic Approach to Monogenic Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514009196> [Accessed August 13, 2014].
- Van Assche G *et al.*, (2010a) The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis* 4:63–101.
- Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinskis L, Mantzaris G, Travis S, Stange E, European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) (2010b) The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 4:7–27.
- Van der Veek PPJ, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AAM (2005) Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 100:2510–2516.
- Van Diest SA, Stanisor OI, Boeckstaens GE, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM (2012) Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. *Biochim Biophys Acta* 1822:74–84.
- Van Hooft JA, Dougherty JJ, Endeman D, Nichols RA, Wadman WJ (2002) Gabapentin inhibits presynaptic Ca(2+) influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex. *Eur J Pharmacol* 449:221–228.
- Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans J-P (2007) The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 133:91–103.
- Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671–675.
- Vavricka SR, Spigaglia SM, Rogler G, Pittet V, Michetti P, Felley C, Mottet C, Braegger CP, Rogler D, Straumann A, Bauerfeind P, Fried M, Schoepfer AM, Swiss IBD Cohort Study Group (2012) Systematic evaluation of risk factors for diagnostic delay in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18:496–505.
- Vergnolle N (2003) The enteric nervous system in inflammation and pain: the role of proteinase-activated receptors. *Can J Gastroenterol* 17:589–592.
- Vergnolle N, Cellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Bunnett NW, Hollenberg MD, Wallace JL, Cirino G, Fiorucci S (2004) A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 114:1444–1456.
- Vergnolle N (2005) Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1:173–176.
- Vermeulen W, De Man JG, Pelckmans PA, De Winter BY (2014) Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J Gastroenterol* 20:1005–1020.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328:228–231.
- Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V, Hébuterne X, Piche T (2014) Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 63:744–752.

- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005) Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* 1:85–92.
- Walker D, De Waard M (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21:148–154.
- Wallace KL, Zheng L-B, Kanazawa Y, Shih DQ (2014) Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20:6–21.
- Wang M, Offord J, Oxender DL, Su TZ (1999) Structural requirement of the calcium-channel subunit alpha2delta for gabapentin binding. *Biochem J* 342 ( Pt 2):313–320.
- Weiergräber M, Kamp MA, Radhakrishnan K, Hescheler J, Schneider T (2006) The Ca(v)2.3 voltage-gated calcium channel in epileptogenesis--shedding new light on an enigmatic channel. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1122–1144.
- Wen X-J, Xu S-Y, Chen Z-X, Yang C-X, Liang H, Li H (2010) 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.
- Whitehead WE, Drossman DA (2010) Validation of symptom-based diagnostic criteria for irritable bowel syndrome: a critical review. *Am J Gastroenterol* 105:814–820; quiz 813, 821.
- Whitehead WE, Palsson O, Jones KR (2002) Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? *Gastroenterology* 122:1140–1156.
- Whiteside ST, Israël A (1997) I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8:75–82.
- Whorwell PJ, McCallum M, Creed FH, Roberts CT (1986) Non-colonic features of irritable bowel syndrome. *Gut* 27:37–40.
- Williams JA, Day M, Heavner JE (2008) Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacother* 9:1575–1583.
- Wycisk KA, Budde B, Feil S, Skosyrski S, Buzzi F, Neidhardt J, Glaus E, Nürnberg P, Ruether K, Berger W (2006a) Structural and functional abnormalities of retinal ribbon synapses due to Cacna2d4 mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3523–3530.
- Wycisk KA, Zeitz C, Feil S, Wittmer M, Forster U, Neidhardt J, Wissinger B, Zrenner E, Wilke R, Kohl S, Berger W (2006b) Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *Am J Hum Genet* 79:973–977.
- Wynn G, Rong W, Xiang Z, Burnstock G (2003) Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* 125:1398–1409.
- Xiao W, Boroujerdi A, Bennett GJ, Luo ZD (2007) Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience* 144:714–720.
- Yamamoto T, Sakashita Y (1998) Differential effects of intrathecally administered N- and P-type voltage-sensitive calcium channel blockers upon two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Brain Res* 794:329–332.
- Yamashita T (2012) Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Neurosci Res* 73:1–7.
- Yang J-L, Xu B, Li S-S, Zhang W-S, Xu H, Deng X-M, Zhang Y-Q (2012) Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. *Mol Brain* 5:18.

- Yazar A, Büyükafpar K, Polat G, Pata C, Kanýk A, Tiftik EN, Bađdatođlu O (2005) The urinary 5-hydroxyindole acetic acid and plasma nitric oxide levels in irritable bowel syndrome: a preliminary study. *Scott Med J* 50:27–29.
- Yazdanyar S, Nordestgaard BG (2010) NOD2/CARD15 genotype and common gastrointestinal diseases in 43,600 individuals. *J Intern Med* 267:228–236.
- Yazdanyar S, Weischer M, Nordestgaard BG (2009) Genotyping for NOD2 genetic variants and crohn disease: a metaanalysis. *Clin Chem* 55:1950–1957.
- Ye Y, Huang X, Zhang Y, Lai X, Wu X, Zeng X, Tang X, Zeng Y (2012) Calcium influx blocked by SK&F 96365 modulates the LPS plus IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol* 12:384–393.
- Yiangou Y, Facer P, Baecker PA, Ford AP, Knowles CH, Chan CL, Williams NS, Anand P (2001a) ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil* 13:365–369.
- Yiangou Y, Facer P, Smith JA, Sangameswaran L, Eglén R, Birch R, Knowles C, Williams N, Anand P (2001b) Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:891–896.
- Yoon MH, Yaksh TL (1999) The effect of intrathecal gabapentin on pain behavior and hemodynamics on the formalin test in the rat. *Anesth Analg* 89:434–439.
- Yusaf SP, Goodman J, Gonzalez IM, Bramwell S, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K (2001) Streptozocin-induced neuropathy is associated with altered expression of voltage-gated calcium channel subunit mRNAs in rat dorsal root ganglion neurones. *Biochem Biophys Res Commun* 289:402–406.
- Yu Y-B, Zuo X-L, Zhao Q-J, Chen F-X, Yang J, Dong Y-Y, Wang P, Li Y-Q (2012) Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gut* 61:685–694.
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha$ 1 subunit. *Nature* 385:442–446.
- Zar S, Mincher L, Benson MJ, Kumar D (2005) Food-specific IgG4 antibody-guided exclusion diet improves symptoms and rectal compliance in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 40:800–807.
- Zbar AP, Simopoulos C, Karayiannakis AJ (2004) Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. *J Gastroenterol* 39:413–421.
- Zeissig S, Blumberg RS (2014) Commensal microbial regulation of natural killer T cells at the frontiers of the mucosal immune system. *FEBS Lett*.
- Zhang H, Yan Y, Shi R, Lin Z, Wang M, Lin L (2008) Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome. *Digestion* 78:72–76.
- Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin H-S, Chiamvimonvat N (2002) Functional Roles of Ca(v)1.3 ( $\alpha$ 1D) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 90:981–987.
- Zhou C, Luo ZD (2014) Electrophysiological characterization of spinal neuron sensitization by elevated calcium channel  $\alpha$ -2- $\delta$ -1 subunit protein. *Eur J Pain* 18:649–658.

- Zhou X, Yang W, Li J (2006) Ca<sup>2+</sup>- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 281:31337–31347.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.





# Intérêt des ligands $\alpha_2\delta$ dans le traitement de la douleur viscérale inflammatoire

---

Thèse de Doctorat d'Université (Décret du 5 juillet 1984),  
Soutenue par Ludivine Boudieu, à Clermont-Ferrand, le 14 novembre 2014

Membres du jury : Pr. Alain Eschalié (Président), Pr. Denis Ardid (Directeur de thèse), Pr. Jean Marc Sabaté (Rapporteur), Dr. Laurent Diop (Rapporteur), Dr. Nathalie Vergnolle (Rapporteur) et Dr. Lauriane Ulmann (examineur).

## Résumé :

La douleur abdominale, reflet d'une hypersensibilité viscérale (HSV), est une caractéristique commune aux patients souffrant de Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) ou de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), dont la prise en charge thérapeutique est limitée. Il a récemment été mis en évidence que certains patients atteints du SII présentaient une inflammation intestinale à bas bruit, similaire à celle retrouvée chez les patients en phase de rémission de MICI.

L'effet des ligands  $\alpha_2\delta$  (prégabaline et gabapentine), a été évalué sur deux modèles murins d'HSV, l'un non-inflammatoire (induit par stress néonatal de séparation maternelle) et l'autre inflammatoire (induit par un traitement de 14 jours au Dextran Sulfate Sodium, DSS, à 1%). Ces molécules ont montré un fort potentiel antalgique, mais de manière intéressante, se sont révélées être bien plus efficaces dans le modèle d'origine inflammatoire que dans le modèle non-inflammatoire.

Ces données ont mené à l'étude du potentiel effet anti-inflammatoire de ces ligands  $\alpha_2\delta$ . Ces molécules ont permis de diminuer les marqueurs inflammatoires (atteintes histologiques, cytokines pro-inflammatoires, myéloperoxydase, COX-2) sur deux modèles d'HSV inflammatoire (DSS1% et dans un modèle de cystite induit au cyclophosphamide) et sur deux types de cultures cellulaires (macrophages péritonéaux, PEC's et cellules épithéliales murines, MODE-K).

De plus, il a été mis en évidence que cet effet anti-inflammatoire des ligands  $\alpha_2\delta$  passait par une diminution de l'expression membranaire de cette sous-unité, permettant ainsi de limiter l'augmentation des concentrations intracellulaires en calcium induite lors d'une stimulation nociceptive. Cette diminution des concentrations calciques a pour conséquence une moindre activation de la voie intracellulaire NF- $\kappa$ B, qui est une voie essentielle de la réponse inflammatoire.

Enfin, l'intérêt de la modulation pharmacologique de cette sous-unité  $\alpha_2\delta$  par ces ligands a été confirmé en clinique. En effet, une augmentation de l'expression de cette protéine a pu être mise en évidence sur des biopsies coliques de patients atteints du SII.

Ainsi l'effet antalgique de ces ligands  $\alpha_2\delta$ , associé à leur potentiel anti-inflammatoire, en font de bons candidats pour limiter l'HSV particulièrement chez les patients atteints de MICI en phase de rémission et du SII présentant une micro-inflammation.

Mots-Clés : Douleur viscérale, hypersensibilité colique, inflammation, ligands  $\alpha_2\delta$ , Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, NF- $\kappa$ B, Syndrome de l'Intestin Irritable.