



HAL
open science

Identification d'un nouveau bloqueur peptidique spécifique du canal sodique Nav1.7 avec des propriétés analgésiques

Pierre Lesport

► **To cite this version:**

Pierre Lesport. Identification d'un nouveau bloqueur peptidique spécifique du canal sodique Nav1.7 avec des propriétés analgésiques. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT: 2017MONTT004 . tel-01538304

HAL Id: tel-01538304

<https://theses.hal.science/tel-01538304>

Submitted on 13 Jun 2017

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences
Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)**
Et de l'unité de recherche **CNRS UMR5203-INSERM
U1191**

Spécialité : **Neurosciences**

Présentée par **Pierre LESPORT**

**Identification d'un nouveau bloqueur
peptidique spécifique du canal sodique
Nav1.7 avec des propriétés analgésiques**

Soutenue le 07 Avril 2017 devant le jury composé de

Michel DE WAARD, Directeur de Recherche, INSERM
Denis ARDID, Professeur, Université de Clermont-Ferrand
Emmanuel DEVAL, Chargé de Recherche, CNRS
Michel DESARMENIEN, Directeur de Recherche, CNRS
Frédérique SCAMPS, Chargée de Recherche, INSERM
Emmanuel BOURINET, Directeur de Recherche, CNRS

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice
Directeur de Thèse



*Peace is a lie, there is only passion
Through passion, I gain strength
Through strength, I gain power
Through power, I gain victory
Through victory, my chains are broken
The Force shall free me*

*There is no emotion, there is peace
There is no ignorance, there is knowledge
There is no passion, there is serenity
There is no chaos, there is humanity
There is no death, there is the Force*

Abstract en Français

Identification d'un nouveau bloqueur peptidique du canal sodique Nav1.7 avec des propriétés analgésiques

Les canaux calciques de type T Cav3.2 sont des régulateurs clés des fonctions sensorielles, et de fait sont également des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux composés analgésiques pour le traitement et le management de la douleur. Malgré de récentes avancées dans l'identification de petites molécules organiques ciblant la famille des canaux Cav3.x/Type T, il reste encore à identifier un inhibiteur spécifique de Cav3.2. Le venin d'araignées contient une large diversité de neurotoxines incluant des modificateurs de gating des canaux calciques. En utilisant des canaux calciques recombinants, nous avons procédé à un criblage d'une bibliothèque de venins et avons identifié un nouveau peptide de 28 acides aminés (Psp3Tx1). La forme synthétique de ce peptide a été utilisée pour déterminer son profil de sélectivité sur un panel de membres proches de la famille des canaux calciques (Cav) et sodiques (Nav) dépendants du voltage. Le peptide est sélectif pour le canal Nav1.7 (une cible largement validée dans le contexte des pathologies de la douleur) avec un effet complémentaire sur Cav3.2 à de fortes doses. *In vivo* chez la souris, le peptide possède des propriétés analgésiques avec des effets anti-hyperalgésiques et anti-allodyniques dans un contexte de douleur neuropathique. Ce peptide possède également un pouvoir analgésique dans un contexte de douleur spontanée induit par un agoniste des canaux Nav1.7. Les résultats présentés dans cette thèse sont encourageants pour la mise en place d'un projet amenant Psp3Tx1 au niveau clinique.

Mots Clés : Canaux calciques de type T, Canaux sodiques, Nav1.7, Toxines ICK, Douleur

Abstract in English

Identification of a novel peptidic specific blocker of Nav1.7 sodium channel subtype with analgesic properties

The T-type calcium channel Cav3.2 emerges as a key regulator of sensory functions, and therefore is an interesting drug target to develop innovative analgesic compounds for improved chronic pain management. Despite recent advances in the identification of small organic molecules targeting the Cav3.x/T-type calcium channel family, to date specific Cav3.2 inhibitors remains to be identified. Spider venoms proved to contain a large diversity of neurotoxins including gating modifiers of calcium channels. Using recombinant Cav3.2 channels, we performed a screening of a Tarantula venom library and identified a 28 amino acid peptide (Psp3Tx1). The synthetic form of the peptide was used to determine its selectivity profile over a panel of closely related members of the voltage gated calcium (Cav) and sodium (Nav) channels. The peptide proved to be selective for the Nav1.7 channel (largely validated target in the context of pain pathologies) with an additional effect on Cav3.2 at more elevated doses. *In vivo* in mice, the peptide demonstrated to be an efficient analgesic molecule with anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties in the context of neuropathic pain. This peptide also possess analgesic properties in a context of spontaneous pain induced by a Nav1.7 agonist. The results presented in this these are encouraging for the setup of a project taking psp3Tx1 into clinical tests.

Key Words : T-Type calcium channels, Sodium channel, Nav1.7, ICK Toxins, Pain

Remerciements

Je vais tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail de thèse.

Je ne suis pas un grand fan des étalages sentimentaux, mais je ne vais pas non plus pouvoir passer à côté des remerciements aux personnes qui ont fait partie de mon quotidien durant ces trois dernières années (et quelques...).

Tout d'abord, le Chef, celui sans qui il n'y aurait pas eu cette thèse, qui a fait confiance à un jeune étudiant qui se raccrochait à son envie de faire partie du monde scientifique. Ce Chef que je n'ai jamais pu me résoudre à tutoyer, qui a pris le risque d'accompagner un réfractaire à l'électrophysiologie dans un monde qu'il craignait. Emmanuel, merci pour cette passion du patch que tu as réussi à partager et pour cette curiosité scientifique dont tu fais preuve chaque jour et qui force l'admiration.

Je ne peux bien évidemment pas remercier le chef sans remercier les personnes qui font de l'équipe ce qu'elle est. Merci à Sophie, l'éternelle optimiste, l'organisation incarnée. J'espère au moins avoir pu grappiller quelques miettes de tes compétences dans ces domaines pour m'aider dans le futur. Entre les chansons qui restent en tête et les cafés noisette, tu as beaucoup contribué à me faire me sentir bien dans cette équipe. Merci à Pierre-François, toi qui viens d'une planète où le second degré est le langage courant. Je pense que je me souviendrais longtemps de cette discussion autour d'un petit-déjeuner à Nice. Ce jour-là, tu m'as surpris à beaucoup d'égards et tu m'as donné matière à réfléchir sur moi et ma vie. Dans cette équipe, il y a les jeunes. Antoine, la pile atomique spécialiste de l'autosuggestion de chanson prise de tête, Miriam qui, quelle que soit la situation, arrive à trouver le moyen de sourire, Francina, dans cette courte période depuis ton arrivée dans l'équipe tu m'auras motivé à apprendre une nouvelle langue et tu m'auras fait découvrir le mate. Mention spéciale également pour ceux qui ne sont plus dans l'équipe, Anne, j'espère que tout se passe bien pour toi et Rosanna, bon courage pour ta thèse.

Ma vie dans cet étage de l'institut n'aurait pas été la même sans le crew des pauses café avec tout ce que cela impose de discussion hautement scientifiques et culturelles, de moments contemplatifs sur la vie de chacun. Malik, on aura commencé ensemble et on finira ensemble, en ayant partagé la même vision des choses sur la thèse et le futur. Pour le reste des choses partagées, je pense que j'ai la plupart des souvenirs des soirées que tu as oubliées, « Toi-même tu sais ». Alex, tu auras été le zen incarné, le maître des blagues nulles et un jour toi aussi tu auras le droit de patcher dans la pièce des pros. Pierre, on continuera à jouer aux références, au JohnnyDepp, au Pardon My French ou à parler de projets farfelus juste pour le plaisir de réfléchir. Ca et... le swing. Jean, Hamid, Adèle, Matthias, vous m'aurez fait découvrir de nouvelles choses musicalement et scientifiquement. Zaza, merci pour les discussions au L2 et pour le temps que tu consacres à faire tourner les cellules pour l'étage.

Au bout de ces 3 ans, on se rappelle aussi les premiers pas, les drosophiles, les drosophilistes aussi, Yoan et son implication dans la vie des Master, Sophie, Laurent et Marie-Laure. Finalement de padawan à Jedi ?

Merci aussi aux oubliés du bâtiment Nord, Amélie, Ombeline, Manue et Marco. J'aurais sûrement d'autres aventures marrantes à vous raconter sur mes voyages en congrès à l'avenir.

Un grand merci aux étudiants du LabEx et en particulier aux niçois pour les bons moments passés en soirée et ailleurs.

Montpellier m'aura accueilli pendant tant d'années, mais les dernières auront assurément été les plus marquantes. J'aurais rencontré beaucoup de personnes, beaucoup de danseurs et danseuses. Vous m'aurez permis de me découvrir une nouvelle passion et aussi de beaucoup me défouler. Laurie, Patricia, Antoine, Marc, ce sera toujours un plaisir de vous avoir en cavalières.

Après tout ce petit monde, il reste ceux sans qui je n'aurais même pas eu envie de me lancer, sans qui je n'aurais pas pu me lancer. Les amis de lycée, Victor, Gwen, Morgan, Julien même si on entend plus parler de lui, qui ont été ce que j'ai eu de plus stable durant ces années. Lydia, Morgane, merci pour votre soutien, vous n'avez même pas idée à quel point il a compté pour moi. Stéphane, toi aussi ton soutien aura compté que ce soit par les soirées Skype ou pendant les périodes de vacances.

Je voudrais finalement remercier ma famille, plus particulièrement David et Anne-Sophie, vous avez été des modèles par votre persévérance et votre envie de voyager. Mamé et Tatie pour ces coups de téléphone plus ou moins réguliers qui me rappellent d'où je viens. Et bien sûr mes parents, si j'en suis là c'est grâce à vous. Merci pour tout. Je vous aime.

Table des Matières

Table des Matières	5
Table des Figures.....	8
I. Introduction.....	9
a. La Douleur	9
i. Manifestations Cliniques de la Douleur	9
1. La Douleur Aiguë.....	10
2. La Douleur Spontanée	10
3. La Douleur Chronique	11
ii. Conséquences pour les patients et leur famille/proches.....	12
b. Nociception	12
i. Acteurs Cellulaires	13
1. Neurones sensoriels périphériques (Ganglions dorsaux rachidiens et neurones pseudo unipolaires)	13
II. DRG et influx nerveux	15
a. Différents types de fibres	18
i. Fibres A : Sensorielles ou Motrices.....	18
1. Fibres Aα.....	18
2. Fibres Aβ.....	18
3. Fibres Aγ.....	18
4. Fibres Aδ.....	18
ii. Fibres B : Végétatives.....	19
iii. Fibres C : Sensorielles ou Végétatives	19
b. Modalités de perception.....	19
III. Canaux ioniques	21
a. Canaux TRPs : Transient Receptor Potential	23
b. Canaux sensibles aux protons	25
c. Canaux mécano-sensibles	27
d. Canaux Sodiques dépendants du voltage.....	28
i. Structure générale et sous unités.....	28
ii. Isoformes	32
1. Nav1.1.....	32
2. Nav1.2.....	32

3. Nav1.3.....	33
4. Nav1.4.....	33
5. Nav1.5.....	33
6. Nav1.6.....	34
7. Nav1.7.....	35
8. Nav1.8.....	35
9. Nav1.9.....	36
e. Canaux de fuite	37
f. Canaux potassiques.....	37
i. Structure générale et sous unités.....	37
ii. Isoformes	37
1. HCN.....	37
2. Kv	38
3. KCa.....	40
4. Kir.....	40
5. K2P	41
g. Canaux Calciques dépendants du voltage.....	45
i. Structure générale et Sous unités	45
ii. Activés par une forte dépolarisation (HVA)	47
1. Cav1.x.....	47
2. Cav2.x.....	51
iii. Activés par une faible dépolarisation (LVA)	53
h. Modifications Post-traductionnelles des canaux ioniques	56
i. N-Glycosylation.....	56
ii. O-Glycosylation	57
iii. Ubiquitination.....	57
IV. Nav1.7, Cav3.2 et Douleur.....	59
a. Mutations Nav1.7 chez l'Homme : Insensibilité à la douleur congénitale ou PEPD et Erythromélgie.....	59
b. L'inhibition de l'activité de Cav3.2 induit une analgésie	61
V. Nav1.7 et Cav3.2 sont des cibles thérapeutiques	64
a. Pharmacologie existante pour les Navs	64
i. Tétrodothoxine.....	64
ii. Batrachotoxine.....	65
iii. Veratridine.....	65

iv. Anesthésiques locaux.....	65
v. Saxitoxine	66
b. Pharmacologie existante pour les Cavs	67
i. Inhibiteurs Merck : Série des molécules TTA (T-Type Antagonist)	67
ii. Mibefradil.....	68
iii. Z944	68
iv. Ni ²⁺	69
v. Kurtoxin	69
vi. EGCG	69
c. Venins	70
i. Toxines agissant sur des canaux ioniques	71
1. Non peptidiques.....	71
2. Peptidiques.....	72
VI. Projet de thèse	79
VII. Revue « Rôle des canaux calciques de type T dans les douleurs neuropathiques »..	80
VIII. Article « Identification of a novel peptidic specific blocker of Nav1.7 sodium channel subtype with analgesic properties ».....	92
IX. Discussion / Perspectives	131
X. Annexes	141
XI. Références Bibliographiques.....	175

Table des Figures

Figure 1 : Allodynie et Hyperalgésie

Figure 2 : Schéma de neurone pseudo-unipolaire

Figure 3 : Dessin de neurone sensoriel dans un ganglion dorsal rachidien

Figure 4 : Schéma des voies de la douleur

Figure 5 : Caractéristiques des différents types de fibres sensorielles

Figure 6 : Représentation des homologies de séquence parmi les canaux ioniques

Figure 7 : Structure de l'homotétramère TRPV1

Figure 8 : Rôle des canaux ASIC dans les voies de la douleur

Figure 9 : Schéma de la structure du canal Piezo 1

Figure 10 : Schéma de la structure des canaux sodiques dépendants du voltage

Figure 11 : Représentation de l'homologie de séquence du pore des canaux potassiques

Figure 12 : Schéma de la structure des canaux calciques dépendants du voltage

Figure 13 : Représentation de l'homologie de séquence du pore des canaux calciques

Figure 14 : Structure du canal calcique Cav1.1

Figure 15 : Sensation douloureuse thermique chez des patients CIP

Figure 16 : Test de réaction à la formaline chez des animaux sauvages et Cav3.2 KO

Figure 17 : Effet analgésique d'oligonucléotides antisens des canaux de type T.

Figure 18 : Sites de liaison des toxines aux canaux Nav

Figure 19 : Présentation d'une page internet du site ArachnoServer 3.0

Figure 20 : Structure de la Phrixotoxine 1

Figure 21 : Structure de la ProTxII

Figure 22 : Représentation de la structure de diverses toxines

Table des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres des nerfs afférents sensoriels

Tableau 2 : Récapitulatif des liaisons possibles des sous-unités β des canaux sodiques

Tableau 3 : Caractéristiques biophysiques des canaux de type T

I. Introduction

L'International Association for the Study of Pain a posé en 1979 la définition de la douleur comme étant « **une sensation et une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en ces termes** ». Néanmoins cette sensation étant dépendante du patient, elle est difficile à qualifier, à quantifier et donc à étudier. On peut également noter que cette sensation est à la fois émotionnelle, et à la fois physique. D'un côté nous avons l'intégration du message : la douleur, et de l'autre, la transmission d'une information de danger pour l'organisme jusqu'aux centres intégrateurs : la nociception. En France, 23% des adultes sont diagnostiqués comme ayant une pathologie douloureuse, celle-ci pouvant aller du problème de dos, de migraine, de cycle menstruel aux os cassés, aux cancers et aux douleurs neuropathiques (Source : National Health and Wellness Survey France 2014). Ces douleurs chez les patients occasionnent des gênes dans leurs activités quotidiennes et dans leur travail pouvant occasionner des pertes de productivité allant jusqu'à 26%. Tout cela à forcément un coût important pour la société, au-delà des frais de traitement. Néanmoins, aucun traitement durable et pérenne n'existe pour la douleur.

a. La Douleur

i. Manifestations Cliniques de la Douleur

Selon la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD), il est possible de distinguer trois grands types de douleur : **douleur aiguë, douleur chronique et douleur procédurale**. Cette dernière est imputable aux actes de soins médicaux plutôt qu'à une lésion accidentelle ou une pathologie et ne sera pas détaillée ici.

1. La Douleur Aiguë

La douleur aiguë est indispensable pour protéger l'individu des dangers de son environnement. Ce type de douleur est une sensation rapide et peu durable dans le temps. Celle-ci est en général accompagnée de réflexes d'évitement et de retrait en cas de stimuli externes et d'un réflexe de repli sur soi dans le cas d'une douleur interne. Une fois la cause de ce signal d'alarme traitée, cette douleur aiguë disparaît. Cette douleur est indispensable au praticien (hospitalier ou non) pour pouvoir diagnostiquer le patient. Ils décident alors parfois d'appliquer une « oligo-analgésie » volontaire (dans le cadre d'un passage aux services des urgences d'un hôpital) de cette douleur pour pouvoir procéder au diagnostic tout en soulageant le patient. Cette oligo-analgésie peut également être involontaire dans le cadre d'une peur d'effets secondaires de la médication utilisée. Cela conduit parfois à une insuffisance de traitement des symptômes douloureux et l'établissement d'un déficit thérapeutique.

2. La Douleur Spontanée

La douleur spontanée est souvent étudiée dans le contexte douloureux inflammatoire mais aussi neuropathique et il a été suggéré que la douleur spontanée plutôt que la douleur évoquée serait le problème clinique majeur. Il a aussi été suggéré que le concept de douleur spontanée n'avait pas lieu d'être quand elle était due à une réaction inflammatoire en cours. On peut par exemple retrouver de la douleur spontanée chez une partie des patients atteints de douleur neuropathique. Il a aussi été suggéré que la présence d'allodynie (réponse douloureuse à une stimulation non douloureuse) et d'hyperalgésie (réponse douloureuse exacerbée à une stimulation douloureuse), associée aux nombreux stimuli du quotidien pouvant évoquer de la douleur, applique un niveau constant de désagrément chez les patients qui est souvent pris pour de la douleur spontanée (Bennett 2012).

3. La Douleur Chronique

On distingue habituellement la **douleur aiguë** comme une sensation intense, mais souvent brève. C'est celle que l'on ressent en se coupant le doigt, par exemple. Si une sensation douloureuse persiste quelques heures ou quelques jours après cette coupure, celle-ci a un but protecteur pour permettre la régénération des tissus via des mécanismes tels que l'allodynie et l'hyperalgésie (**Figure 1**). C'est quand cette sensation douloureuse persiste plus de 3 mois que l'on parle de douleur chronique. La douleur devient alors un handicap plutôt qu'une information physiologique pertinente pour la survie et le maintien de l'intégrité de l'organisme.

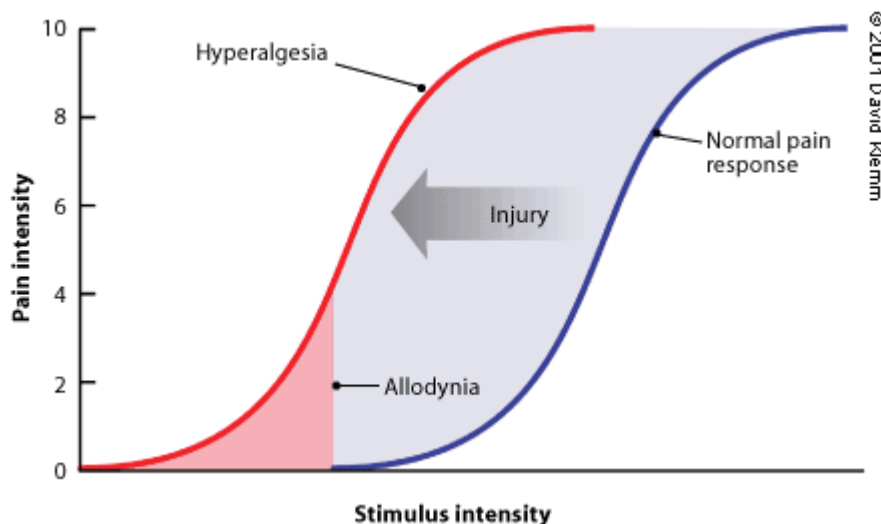


Figure 1 : Diagramme présentant la relation d'intensité de douleur en fonction de l'intensité du stimulus. La courbe bleue située à droite présente la relation normale à l'intensité du stimulus et l'ampleur de la douleur ressentie. La douleur n'est évoquée que par les stimuli d'intensité dépassant la zone rouge. L'amplification pathologique de la perception douloureuse provoque un déplacement vers la gauche de la courbe intensité du stimulus/sensation douloureuse (courbe rouge). Dans ces conditions, un stimulus non douloureux évoque alors une douleur (allodynie) et un stimulus douloureux provoque une réponse douloureuse exacerbée (hyperalgie). Figure tirée de (Gottschalk and Smith 2001).

ii. Conséquences pour les patients et leur famille/proches

La perception de la douleur s'accompagne de modifications du comportement de l'individu qui vont faire transparaître sa douleur. Ces modifications peuvent survenir au niveau du comportement verbal de la personne autant qu'au niveau de ses mimiques, de sa posture ou de ses activités quotidiennes. Ces changements et leur impact peuvent être très différents d'un patient à l'autre, pouvant aller d'une absence totale de signes extérieurs de souffrance à une grande démonstration de celle-ci. C'est suite à ces signes que l'entourage peut réagir, parfois en soutenant le patient, parfois en le rejetant. En fonction de leurs réactions, fussent-elles positives ou négatives, le patient peut se retrouver soulagé ou, au contraire, se retrouver dans une détresse accrue. Ce soulagement ou cette détresse peuvent alors à leur tour jouer un rôle en diminuant la douleur ou en la renforçant. Dans le cadre de douleurs chroniques, les traitements prescrits peuvent également s'accompagner d'une prise en charge psychologique du patient car les douleurs chroniques peuvent être responsables d'états dépressifs ou anxieux.

b. Nociception

La nociception est le mécanisme sensoriel qui permet de transmettre l'information nerveuse au cerveau. La nociception peut être due à des stimuli pouvant porter atteinte à l'organisme tels que la chaleur, le froid nocif, les agents chimiques irritants ou les lésions tissulaires mécaniques (Stemkowski and Smith 2012; Woolf 2010). Elle nous permet aussi d'être alertés des dommages aux organes ou systèmes internes. Ces détériorations peuvent avoir des étiologies diverses comme des infections, des traumatismes, des séquelles de traitements médicamenteux ou des intoxications par des produits toxiques. Cette liste de causes étant bien sûr non exhaustive. Sans cette perception, il n'y aurait rien pour empêcher un individu de continuer à avoir des comportements dangereux pour lui-même, en associant le stimulus nociceptif à une zone atteinte et en la protégeant ou en s'éloignant de la source du stimulus. Ces réactions de protection vont souvent de pair avec un état d'alarme de l'organisme, augmentation de la

pression artérielle, du débit cardiaque ainsi que parfois une analgésie induite par le stress (Faramarzi, Zendehtdel, and Haghparast 2016). Cette nociception est physiologique, et dans le cas où elle perdure bien après la guérison du tissu lésé ou après que le stimulus nociceptif soit éloigné, elle est pathologique. Ces messages, sont transmis par des récepteurs sensoriels situés en périphérie.

i. Acteurs Cellulaires

1. Neurones sensoriels périphériques (Ganglions dorsaux rachidiens et neurones pseudo-unipolaires)

Le premier neurone du système périphérique est le neurone en T, ou neurone afférent primaire. Ces neurones vont permettre la détection et la transmission des informations sensorielles depuis les organes innervés (comme la peau, les muscles, les viscères ou les tendons) jusqu'à la moelle épinière où elles seront transmises jusqu'au système nerveux central. Les neurones en T sont aussi appelés neurones pseudo-unipolaires car ils n'ont qu'une projection axonale qui projette ensuite d'une part vers le système nerveux central (moelle épinière) et d'autre part vers l'organe innervé (**Figure 2**).

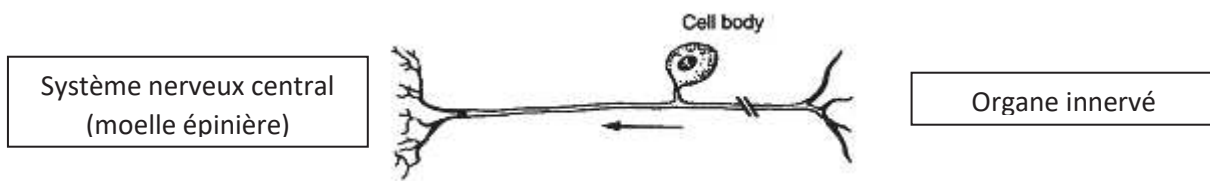


Figure 2 : Schéma d'un neurone pseudo-unipolaire présentant le soma de la cellule. A droite l'organe innervé et la branche axonale du nerf périphérique, à gauche les projections vers le système nerveux central. Le sens de propagation du signal est représenté par la flèche et les doubles traits. Adapté de (Devor 1999).

Les nerfs périphériques regroupent les projections de ces neurones allant vers les organes innervés mais également les axones efférents des motoneurones de la moelle épinière. A l'opposé, les nerfs rachidiens se dirigent vers la moelle épinière et se regroupent dans la corne dorsale de la moelle. Les corps cellulaires de ces neurones pseudo-unipolaires sont regroupés

dans les ganglions dorsaux rachidiens (Dorsal Root Ganglia en anglais : DRG) (**Figure 3 et 4**). Ces ganglions sont situés de part et d'autre de la moelle épinière, en dehors des vertèbres. Il y a 29 paires de ces ganglions chez l'Homme qui innervent des zones précises du corps.

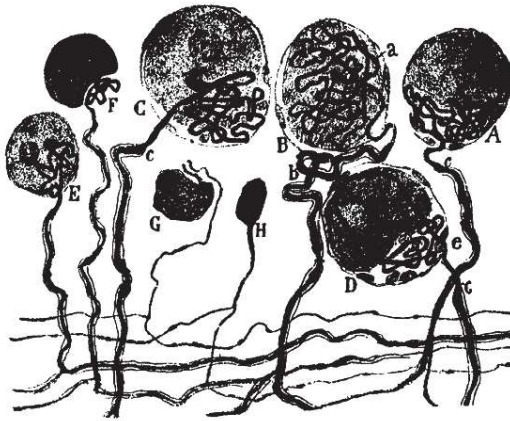
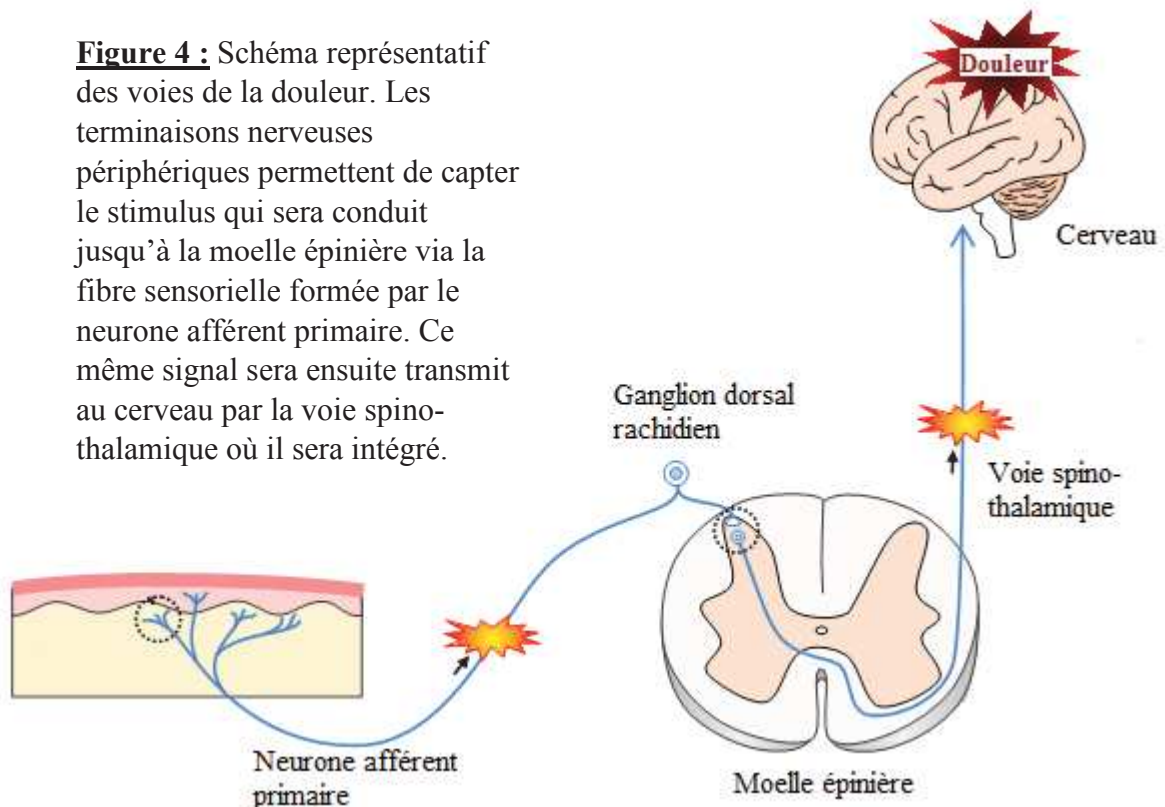


Figure 3 : Dessin de Cajal des corps cellulaires des neurones sensoriels dans un ganglion rachidien dorsal. On peut y voir des neurones de différentes tailles, le départ des axones ainsi que la jonction en T. (Devor 1999)

Figure 4 : Schéma représentatif des voies de la douleur. Les terminaisons nerveuses périphériques permettent de capter le stimulus qui sera conduit jusqu'à la moelle épinière via la fibre sensorielle formée par le neurone afférent primaire. Ce même signal sera ensuite transmis au cerveau par la voie spino-thalamique où il sera intégré.



II. DRG et influx nerveux

Dans ces ganglions, on peut distinguer plusieurs types de neurones afférents primaires qui permettent de distinguer de multiples informations concernant leur environnement. On peut classer ces neurones de plusieurs façons : par rapport à leur anatomie (diamètre, myélinisation ou non), par rapport à leurs caractéristiques fonctionnelles (vitesse de conduction de l'information, modalités de l'activation, seuil de cette activation) ou par rapport à leur composantes moléculaires. La classification la plus utilisée, qui date des années 1920 à 1940 avec les travaux de Gasser est celle basée sur la vitesse de conduction de l'information dans les neurones revue et modifiée en accord avec les critères anatomiques (Gasser 1941). On distingue 3 groupes de fibres nerveuses : A, B et C (**Figure 5 et Tableau 1**) (Perl 2007; McGlone and Reilly 2010), avec dans les fibres afférentes primaires seulement trois grands types de fibres A β , A δ , C. Cette classification fonctionnelle a tout d'abord été complétée par la présence de marqueurs moléculaires de type récepteurs des neurotrophines (récepteurs TrkA, TrkB, TrkC, et RET/GFR) mis en évidence par les études des différents lignages cellulaires au cours du développement de ces neurones (Lallemend and Ernfors 2012). En 2015, l'équipe de Patrik Ernfors a publié un article concernant une classification beaucoup plus précise et non biaisée des neurones sensitifs (Usoskin et al. 2015). Celle-ci se base sur un profilage des ARN messagers exprimés dans des neurones de DRGs de souris par RNA-Seq sur cellules uniques. Lors de cette étude, ils ont examiné presque 1000 neurones différents avec une profondeur de séquençage moyenne mais permettant néanmoins d'identifier environ 10000 transcrits par cellule et de faire une analyse par regroupement des types cellulaires en fonction des profils d'expression des ARNms de chaque cellule. Ils identifient alors ainsi au moins 11 types cellulaires différents dans les ganglions dorsaux rachidiens. Au-delà des limites de l'étude liées au stress cellulaire induit par l'isolement cellulaire et à l'induction de l'expression de

certaines ARNs, cette nouvelle approche moléculaire est très intéressante. Elle est confortée par d'autres travaux récents publiés en 2014 et 2015 relatant des profils transcriptomiques de sous-classes de neurones des DRGs triées par différentes méthodes (Li et al. 2016; Thakur et al. 2014; Chiu et al. 2014; Reynders et al. 2015). Cet ensemble de techniques permet d'aboutir à une classification plus précise mais il reste encore à appliquer ces techniques valables sur l'animal à l'Homme, si possible en condition physiologique et pathologique.

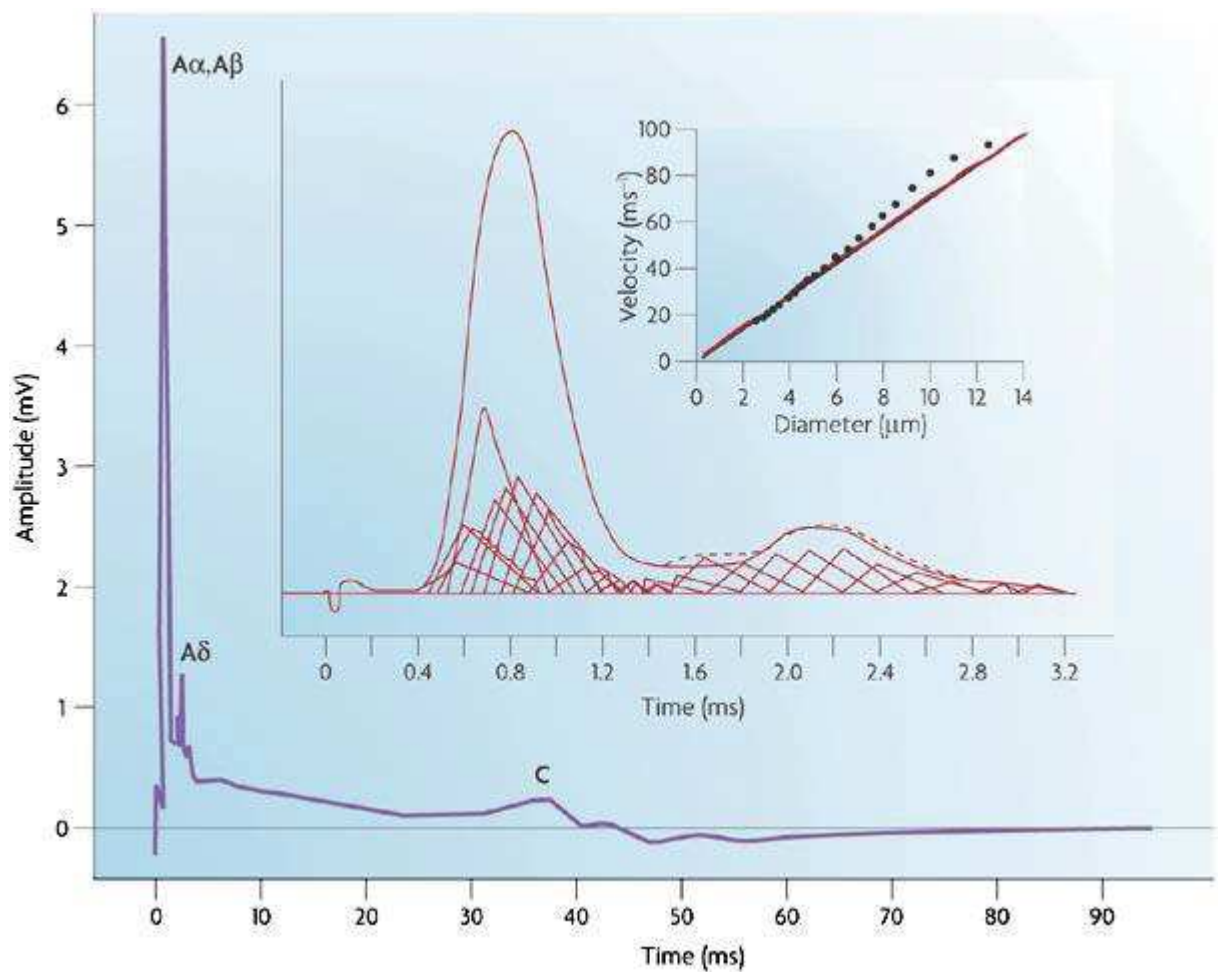


Figure 5 : Cette figure résume les informations concernant les divers types de fibres. En haut à droite le graphique représente le rapport entre la vitesse de conduction de l'information nerveuse et le diamètre des fibres. Le graphique central présente le potentiel d'action dans son ensemble comme la sommation des informations provenant de plusieurs fibres enregistrées et caractérisées (triangles sous la courbe). La courbe mauve représente quant à elle l'enregistrement complet d'un nerf sur une échelle de temps permettant de visualiser les fibres C avec leur vitesse de conduction lente. (Perl 2007)

Nerfs afférents sensoriels			
Catégorie	Modalité	Diamètre de l'axone (µm)	Vitesse de conduction (m/s)
Myélinisés			
Aα	Propriocepteurs des muscles et tendons	20	120
Aβ	Mécanorécepteurs à bas seuil	10	80
Aδ	Sensation thermique nocive ou non (froid et chaud), nociception mécanique	2.5	12
Non-myélinisés			
C-douleur	Stimuli nocifs et non-nocifs thermiques et mécaniques	1	<1
C-tactile	Pression légère, toucher plaisant	1	<1
C- autonome	Système autonome, glandes sudoripares, vasculature	1	<1

Tableau 1 : Ce tableau regroupe les caractéristiques des différentes fibres retrouvées dans les nerfs afférents sensoriels (McGlone and Reilly 2010).

a. Différents types de fibres

i. Fibres A : Sensorielles ou Motrices

1. Fibres A α

Ces fibres regroupent 2 types d'axones. D'une part, les axones des neurones afférents sensoriels véhiculant l'information proprioceptive grâce aux fuseaux neuromusculaires de type Ia et grâce à l'organe tendineux de Golgi (type Ib). D'autre part, les axones des motoneurones permettant le contrôle de la contraction des muscles squelettiques. Ceux-ci proviennent de la corne ventrale de la moelle épinière. Ce sont des fibres myélinisées de gros diamètre ($\sim 15\mu\text{m}$) avec une vitesse de conduction rapide (120m/sec).

2. Fibres A β

Ces fibres sont formées par les afférences des récepteurs de contact et de pression (toucher, tact) situés dans la peau. Elles jouent aussi un rôle dans la proprioception via les fuseaux neuromusculaires de type II. Ce sont des fibres myélinisées de gros diamètre (entre 5 et $12\mu\text{m}$) avec une vitesse de conduction de 80m/sec.

3. Fibres A γ

Ces fibres, contrairement aux autres citées ici, sont uniquement des fibres motrices. Elles sont formées par les motoneurones de la corne ventrale et contrôlent la contraction des fuseaux neuromusculaires. Elles possèdent les mêmes caractéristiques de propagation que les fibres A β .

4. Fibres A δ

Ces fibres jouent un rôle dans plusieurs modalités de perception (Tact, Température, Nociception). Ce sont des fibres de petit diamètre ($2,5\mu\text{m}$) et avec une vitesse de conduction plus faible que les autres fibres A mais néanmoins supérieure aux fibres B et C (12m/sec).

ii. Fibres B : Végétatives

Les fibres B sont des fibres efférentes du système nerveux autonome. Elles sont de petit diamètre (0.1 à 2 μ m), faiblement myélinisées et ont une vitesse de conduction faible, similaire aux fibres A δ (entre 3 et 14m/sec).

iii. Fibres C : Sensorielles ou Végétatives

Tout comme les fibres A α , les fibres C comprennent deux types d'axones. Premièrement, les axones afférents sensoriels qui participent à la perception de la douleur mécanique et thermique, au toucher plaisant et au prurit (Jonsson et al. 2015; Timmes et al. 2013). Ces fibres contiennent aussi des axones efférents provenant du système nerveux autonome. Ce sont des fibres de petit diamètre (~1 μ m) avec une vitesse de conduction inférieure à 1 m/sec.

Il existe une dualité dans les modalités que peuvent percevoir les neurones sensoriels périphériques. L'Homme possède à la fois des fibres permettant le codage rapide de l'information dans le temps et l'espace et à la fois des fibres permettant de véhiculer des messages plus durables et plus lents. D'un côté nous avons les fibres A δ qui vont transmettre les informations concernant les douleurs aiguës, rapide et très localisée et d'un autre côté nous avons les fibres C qui vont permettre de propager les informations douloureuses diffuses et prolongées.

b. Modalités de perception

En plus de la classification précédente, on peut regrouper les fibres sensorielles suivant leurs modalités de perception. Elles peuvent détecter une ou plusieurs modalités et une ou plusieurs intensités de stimulation. Ces fibres sont liées à des organes récepteurs spécifiques de ces modalités mais ce n'est pas toujours le cas, certaines fibres peuvent détecter certains stimuli et jouer le rôle de senseur par elles-mêmes. On peut citer les fibres importantes pour la somesthésie, permettant de ressentir le toucher, la proprioception, la perception thermique ainsi

que la nociception. C'est cette dernière que nous allons détailler dans les sous parties suivantes. Elle est due à des fibres de petit à moyen diamètre (A δ et C) permettant la détection de stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme.

Les fibres A δ présentent deux sous-types de modalités : elles sont capables de ressentir les stimuli mécaniques et thermiques, soit au chaud, soit au froid (Djoughri and Lawson 2004; Zimmermann et al. 2009). Les fibres C sont également très hétérogènes, pouvant à la fois ressentir les stimuli mécaniques et les stimuli thermiques nociceptifs. Il faut néanmoins préciser que certaines fibres C sont sensibles à une seule des modalités citées (mécanique, thermique chaude, thermique froide). Une partie des fibres C sont également capables de ressentir les agents chimiques (Davis, Meyer, and Campbell 1993) et les sensations de démangeaison (Ringkamp et al. 2011; Timmes et al. 2013). En plus de toutes ces sous-catégories de fibre C, on peut trouver une population qui n'est pas sensible aux stimuli mécaniques ni à la chaleur mais qui peuvent le devenir suite à une sensibilisation par l'application locale de capsaïcine ou d'huile de moutarde (AITC) (Schmidt et al. 1995). Ces informations ont pour la plupart été trouvées après des analyses des fibres nociceptives cutanées mais certaines fibres transmettent un autre type de message dans d'autres structures. Par exemple, dans la cornée, les fibres transmettant les informations tactiles non nocives sont également celles qui transmettent les informations douloureuses (Wall, McMahon, and Koltzenburg 2006). Chacun de ces types de fibres à également une anatomie du champ récepteur distincte en fonction du territoire innervé. On peut citer en exemple les différences d'innervation entre peau poilue et glabre mais également avec les muscles, les vaisseaux sanguins, le tube digestif etc... Les déterminants moléculaires permettant d'obtenir ces anatomies spécifiques sont pour l'heure encore mal connus. Dans leur ensemble, ces informations nous permettent de dire qu'il existe une multitude de critères sur lesquels baser une classification et que chaque type de douleur peut avoir son propre réseau neuronal et non-neuronal à étudier.

III. Canaux ioniques

Afin qu'un organisme puisse réagir aux modifications et perturbations de son environnement, il doit pouvoir percevoir ces modifications. Les stimuli sont perçus par les neurones sensoriels primaires. Les protéines situées sur les membranes vont recevoir l'information, permettre son codage en message électrique et sa transmission le long du neurone. Cette transmission est assurée par des canaux ioniques placés tout au long des neurones. Les canaux ioniques sont des protéines formant des pores qui permettent le passage d'ions de part et d'autres des membranes (**Figure 6**). Ce passage d'ions crée un courant, dépolarisant ou hyperpolarisant, qui va moduler le potentiel de membrane de la cellule et permettre la génération d'un potentiel d'action suite à l'activation des canaux ioniques potassiques et sodiques. En fonction du type cellulaire, de la nature et de l'intensité du stimulus, la réponse en potentiel d'action varie en nombre et en fréquence. Ces potentiels d'action sont ensuite propagés dans le neurone puis au suivant via l'activation de canaux calciques qui contrôlent la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

Certains canaux sont activés par des ligands, des seconds messagers, par le voltage ou par des stimuli extérieurs comme l'étirement. Les structures de ces canaux (Potassium, Chlore, Sodium et plus récemment Calcium) sont découvertes petit à petit et grâce à une révolution récente dans le domaine de la biologie structurale des grosses protéines, on constate l'augmentation de la résolution de la technique de cryo-microscopie électronique (ou Cryo EM) (Callaway 2015). Cette dernière a permis la résolution d'un beaucoup de canaux ioniques durant les trois années de ma thèse et permettent de mieux comprendre leur fonctionnement et leur modulation pharmacologique (Doyle et al. 1998; Dutzler et al. 2002; Payandeh et al. 2011; Wu et al. 2016b). L'intérêt plus particulier pour cette étude est le fait que ces protéines membranaires sont la seconde cible la plus visée par les médicaments après les protéines couplées aux protéines G (Overington, Al-Lazikani, and Hopkins 2006).

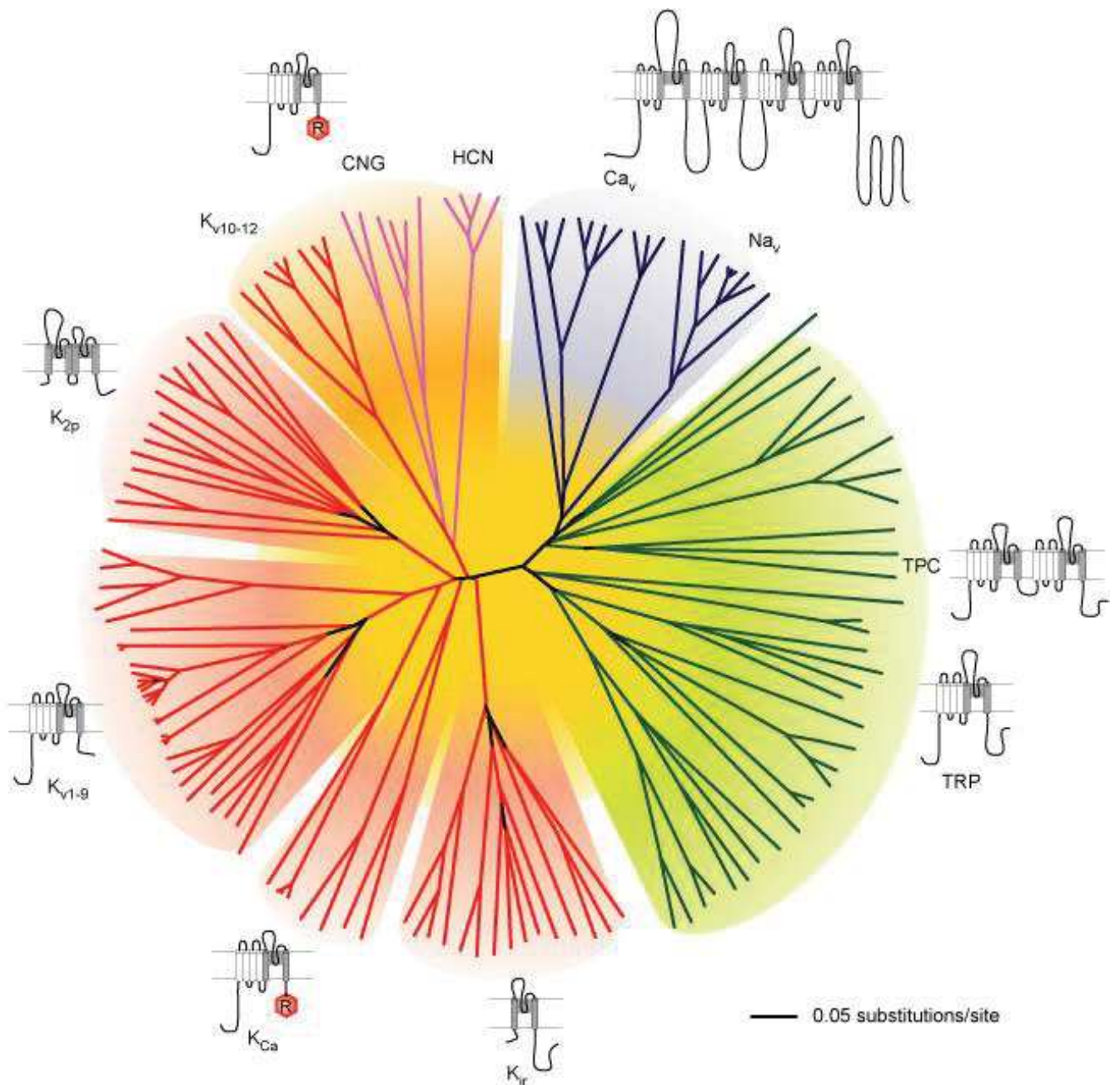


Figure 6 : Ce dessin représente l'homologie des séquences en acides aminés du pore des canaux dépendants du voltage. Cette superfamille rassemble 143 membres répartis en plusieurs sous-familles en fonction de leur sélectivité ionique et de leur structure globale. En bleu, les canaux dépendants du voltage sélectifs au sodium et au calcium (Nav et Cav), les canaux TRP (Transient Receptor Potential) en vert et les canaux sélectifs au potassium en rouge (Yu and Catterall 2004)

a. Canaux TRPs : Transient Receptor Potential

La superfamille des canaux TRP, dont le premier membre est le canal Trp de *Drosophile*, est représentée, chez les mammifères, par 6 familles classées en fonction de leur homologie de séquence : TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML. Il existe une 7^e famille mais elle n'est pas présente chez les mammifères (TRPN). Les sous-unités TRP sont constituées de 6 domaines transmembranaires qui s'assemblent en homo- ou hétérotétramères. Ils forment alors des canaux perméants aux cations qui présentent des modes d'activation variés (Owsianik et al. 2006).

- TRPA (ankyrin) : TRPA1 est le seul membre de cette famille présent chez les mammifères. L'activation de cet homotétramère dans les neurones sensoriels contribue à la nociception. Il est activé par des agents chimiques tels que l'huile de moutarde (AITC) ou la formaline (Macpherson et al. 2007).

- TRPC (canonique) : Ce sont les canaux les plus proches du Trp de *Drosophile*. La plupart des canaux de cette famille sont activés par les cascades déclenchées par les récepteurs couplés aux protéines G_{q/11} ou par les cascades découlant de l'activation des récepteurs à la tyrosine kinase (Abramowitz and Birnbaumer 2009). TRPC1 est également sensible à l'étirement (Kerstein et al. 2013).

- TRPM (melastatin) : Ce groupe est constitué de 8 canaux. TRPM1 est impliqué dans la dépolarisation des cellules de la rétine (Irie and Furukawa 2014). TRPM2 est activé dans des conditions de stress oxydatif ou d'ischémie (Yamamoto, Takahashi, and Mori 2010). TRPM3 est important dans le développement de l'hyperalgésie au chaud suite à une inflammation (Oberwinkler and Philipp 2014). TRPM4 et TRPM5 sont les seuls canaux TRP à être non perméants au calcium. TRPM4 est un important régulateur de l'entrée de calcium dans les mastocytes (Vennekens and Nilius 2007) alors que TRPM5 est présent dans les cellules des

papilles sur la langue et participe à la conduction des informations pour le sucré et l'amer (Liman 2007). TRPM6 et TRPM7 sont appelés des « canaux » (mot-valise pour channel (canal) et enzyme), ils sont perméants aux ions divalents et aux ions monovalents et ont également la particularité de présenter, malgré une conductance élevée en canal unitaire, une très petite conductance quand ils sont exprimés à la membrane. TRPM7 serait également impliqué dans la régulation de la signalisation immunitaire (Zierler et al. 2016). TRPM8 est quant à lui activé par le froid et les composés qui induisent une sensation de froid (Knowlton and McKemy 2011).

- TRPP (polycystine) : Cette sous-famille contient 3 membres : TRPP1, TRPP2 et TRPP3. Ils sont principalement connus pour la pathologie qu'ils induisent lorsqu'ils sont mutés, la polykystose rénale (Wu, Sweet, and Clapham 2010; Nilius 2007).

- TRPV (vanilloïde) : Cette sous-famille contient 6 membres, de TRPV1 à TRPV6. TRPV1 est impliqué dans le développement de l'hyperalgésie au chaud suite à une inflammation et pourrait contribuer à la détection de stimuli de chaleur nocive (Pingle, Matta, and Ahern 2007). Sa structure a notamment été résolue par l'équipe de David Julius en 2013 (**Figure 7**) (Liao et al. 2013). TRPV2 ne présente pas d'activité comme thermosenseur chez l'Homme mais a été pour sa part récemment impliqué dans les mécanismes d'immunité innée (Link et al. 2010). TRPV3 et TRPV4 sont quant à eux bien des chémosenseurs et thermosenseurs impliqués dans la nociception et l'inflammation (Broad et al. 2016; Kanju et al. 2016). TRPV5 et TRPV6 sont eux des canaux impliqués dans l'absorption et la réabsorption du calcium à travers l'intestin et l'épithélium rénal (Fecher-Trost, Weissgerber, and Wissenbach 2014; Na and Peng 2014).

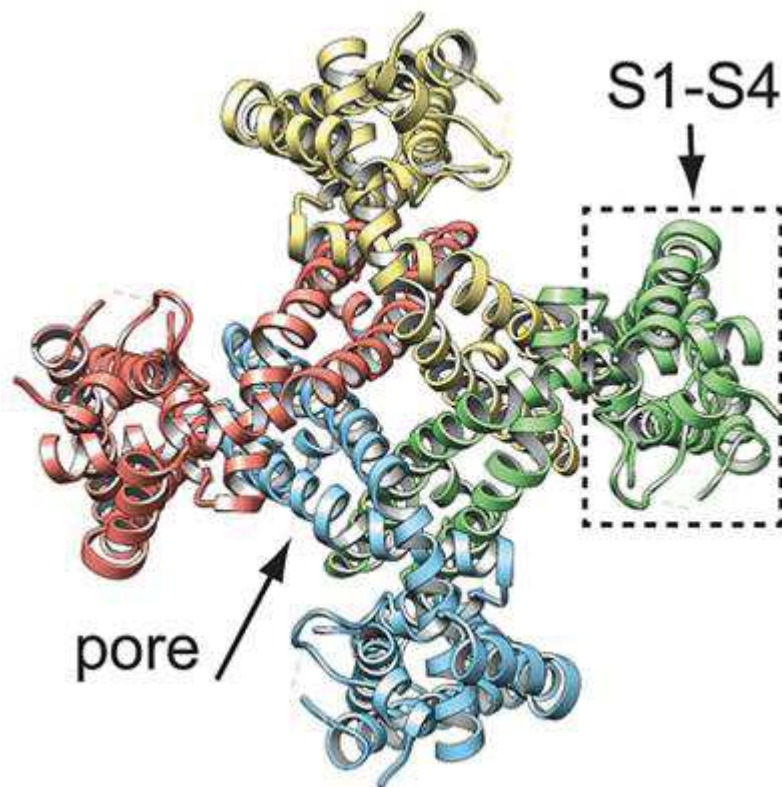


Figure 7 : Schéma de la structure de l'homotétramère TRPV1. Chaque sous-unité formant le tétramère est colorée différemment. Les segments S1 à S4 sont situés à la périphérie. Les segments S5-S6 sont au centre et forment le pore du canal. La structure de ces canaux est très proche de celle des canaux dépendants du voltage. Tiré de (Liao et al. 2013)

-TRPML (mucolipine) : Cette sous-famille contient 3 membres (TRPML1-3) pouvant former des homomères ou des hétéromères. Ce sont des canaux qui jouent un rôle dans le transport et l'adressage des endosomes et lysosomes (Grimm et al. 2012; Curcio-Morelli et al. 2010)

b. Canaux sensibles aux protons

Cette famille de canaux regroupe 4 membres (Acid Sensing Ion Channel (ASIC) 1-4). Pour ASIC 1 et ASIC2 il existe un variant d'épissage donnant un canal fonctionnel. Ils sont alors notés ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a et ASIC2b. Ces sous-unités s'assemblent en trimères et peuvent former des hétéromères (Jasti et al. 2007; Gonzales, Kawate, and Gouaux 2009). ASIC2b ne forme pas d'homomères fonctionnels mais contribue aux modifications et à la régulation de l'activité du canal. ASIC4 quant à lui ne permet pas la formation d'un homomère fonctionnel mais a plutôt la fonction de régulateur de la présence d'ASIC1a et d'ASIC3 (Akopian et al. 2000). Ces canaux sont exprimés dans les neurones périphériques et centraux

où ils jouent un rôle de senseur d'acidité (**Figure 8**). Ils sont activés par les pH acides et présentent une activation et une inactivation rapide.

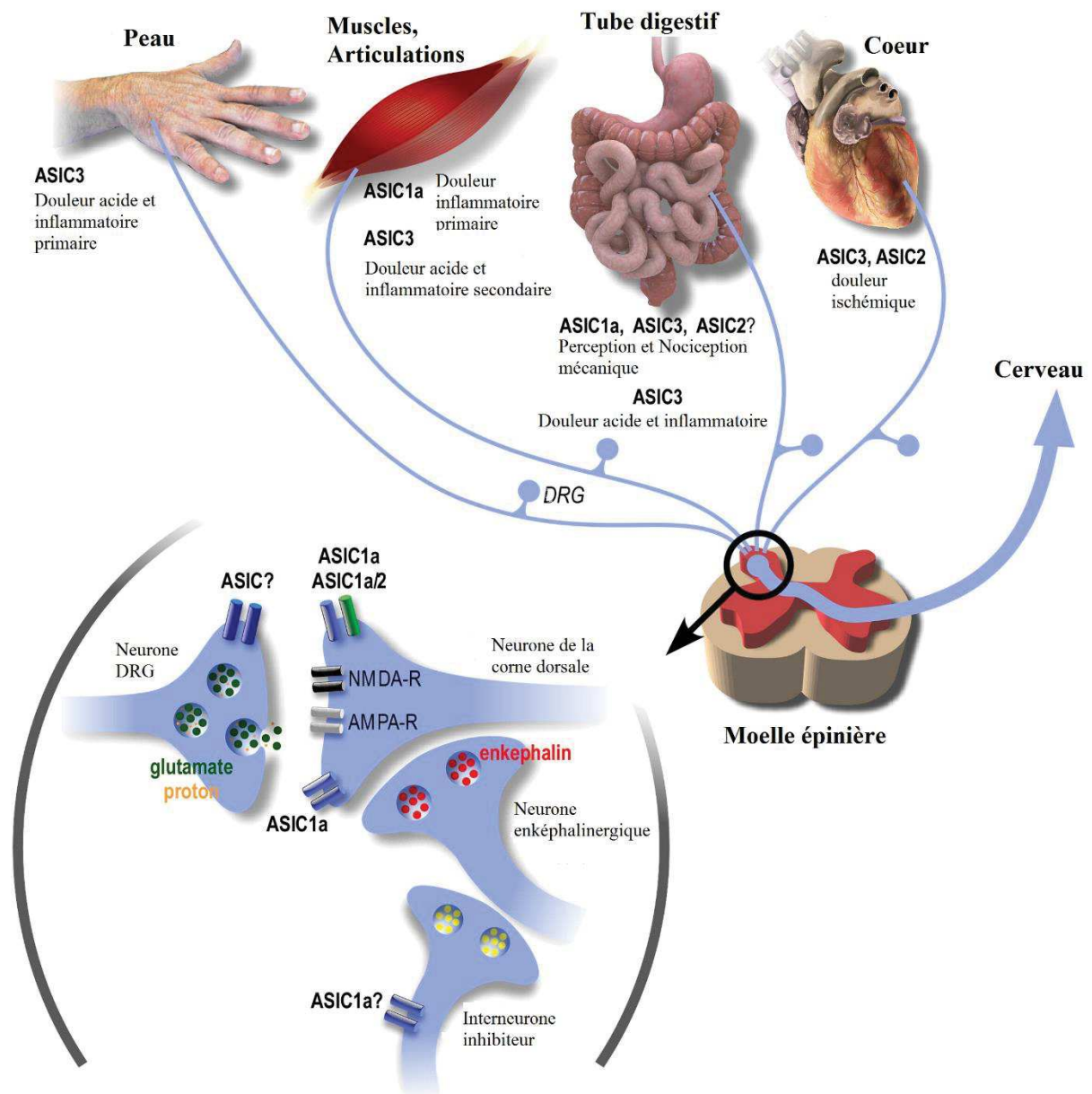


Figure 8 : Rôles des canaux ASIC dans les voies de la douleur. Adapté de (Deval et al. 2010)

c. Canaux mécano-sensibles

La mécano-sensibilité est la capacité pour les cellules à ressentir les stimuli mécaniques externes ou internes (le toucher, la proprioception, l'audition, la douleur et la pression sanguine pour exemple) et à les coupler à des processus cellulaires. Cette capacité à ressentir ces stimuli est due à des canaux ioniques. L'un d'entre eux, Piezo1 est exprimé dans les poumons, la vessie et la peau, mais pas dans les neurones sensoriels comme son homologue Piezo2. Une étude récente a montré également que Piezo1 est sensible à d'autres stimuli que l'étirement (Honore et al. 2015) et sa structure en homotrimer a été résolue récemment par Cryo EM (**Figure 9**) (Ge et al. 2015). Ces canaux Piezo ne sont pas les seuls canaux mécano-sensibles existants, il y a par exemple le canal TRPC1 (cité précédemment) et le canal potassique TREK (détaillé ci-après).

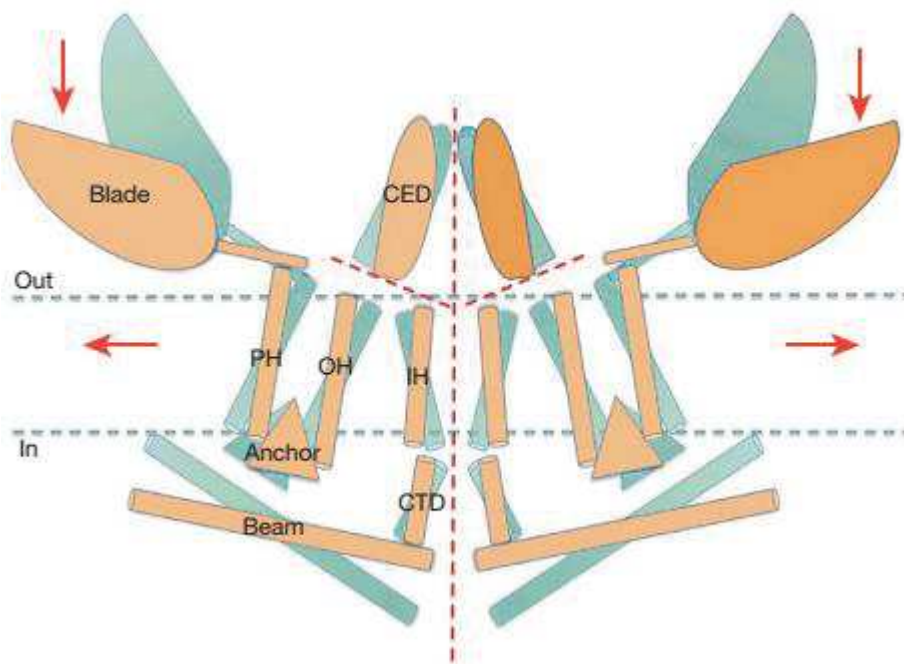


Figure 9 : Schéma de la structure de deux sous-unités de l'homotrimer du canal Piezo 1 vu de côté. En bleu, la position fermée du canal et en orange la position ouverte. La ligne pointillée rouge indique les possibles points de passage des ions. Les flèches rouges indiquent le sens des forces pouvant induire le mouvement des lames (Blade) ou des hélices périphériques (PH) qui contrôlent le gating du canal. Tiré de (Ge et al. 2015)

d. Canaux Sodiques dépendants du voltage

i. Structure générale et sous unités

Les canaux ioniques sodiques dépendants du voltage sont présents dans la membrane de la plupart des cellules excitables et sont indispensables à la génération et à la propagation des potentiels d'action. On peut également les retrouver faiblement exprimés dans une population de cellules non-excitables où leur rôle n'est pas connu (Black and Waxman 2013). Les connaissances actuelles sur la structure de ces canaux découlent des études biochimiques menées par (numa) dans les années 1980 utilisant des ligands à haute affinité pour la purification des sous-unités. Pour les canaux sodiques, ces ligands étaient des toxines montrant leur intérêt précoce pour la recherche sur les canaux ioniques tant pour la structure que l'activité (Noda et al. 1986).

Ils sont constitués d'une sous-unité α formant le pore (~260kDa) qui peut être associé ou non à une ou deux sous-unités β (~33-39kDa) (Isom 2001). La sous-unité α est constituée de 4 domaines homologues (DI – DIV) qui contiennent chacun 6 segments transmembranaires organisés en hélice α (S1-S6). Les extrémités C et N-terminales de la sous-unité α sont intracellulaires. L'organisation des domaines induit la formation de boucles intracellulaires (P-loop) entre le segment S5 et le segment S6 de chaque domaine, ce qui participe à la formation du pore. Le segment S4 est chargé positivement et agit comme un senseur du voltage. C'est ce senseur qui est à l'origine du « gating » du canal (**Figure 10**). Lors de l'activation du canal, ce dernier se déplace vers le compartiment extracellulaire et permet l'ouverture du pore (Catterall 2010). Cette activation très rapide, de l'ordre de la milliseconde, est caractéristique des canaux sodiques. La boucle intracellulaire reliant les domaines homologues III et IV sert à l'inactivation rapide du canal en se repliant à l'intérieur du pore du canal et en l'obturant pendant les dépolarisations membranaires soutenues. La 2^e forme d'inactivation (lente) observée sur les canaux

sodiques dépendants du voltage serait quant à elle due au resserrement du pore du canal (Payandeh et al. 2012).

Il existe 9 isoformes de sous-unité α : Nav1.1 à Nav1.9. La résolution de la structure du canal bactérien NavAb a révélé des spécificités différentes de celles des canaux potassiques précédemment découverts comme un filtre de sélectivité court. Cette sélectivité ionique est due aux interactions avec les chaînes glutamate latérales (Payandeh et al. 2011). La résolution de la structure de ce canal a également apporté la lumière sur les mécanismes de couplage entre le senseur de voltage (segments 1 à 4) et le pore (segments 5 et 6). L'un des senseurs de voltage interagit avec le pore du domaine suivant dans une configuration appelée « domain swapped configuration » pour « configuration domaine interchangé ». Cette configuration peut être retrouvée chez les canaux sodiques et calciques dépendants du voltage. Néanmoins des structures de canaux n'étant pas en configuration « domain swapped » ont été résolues.

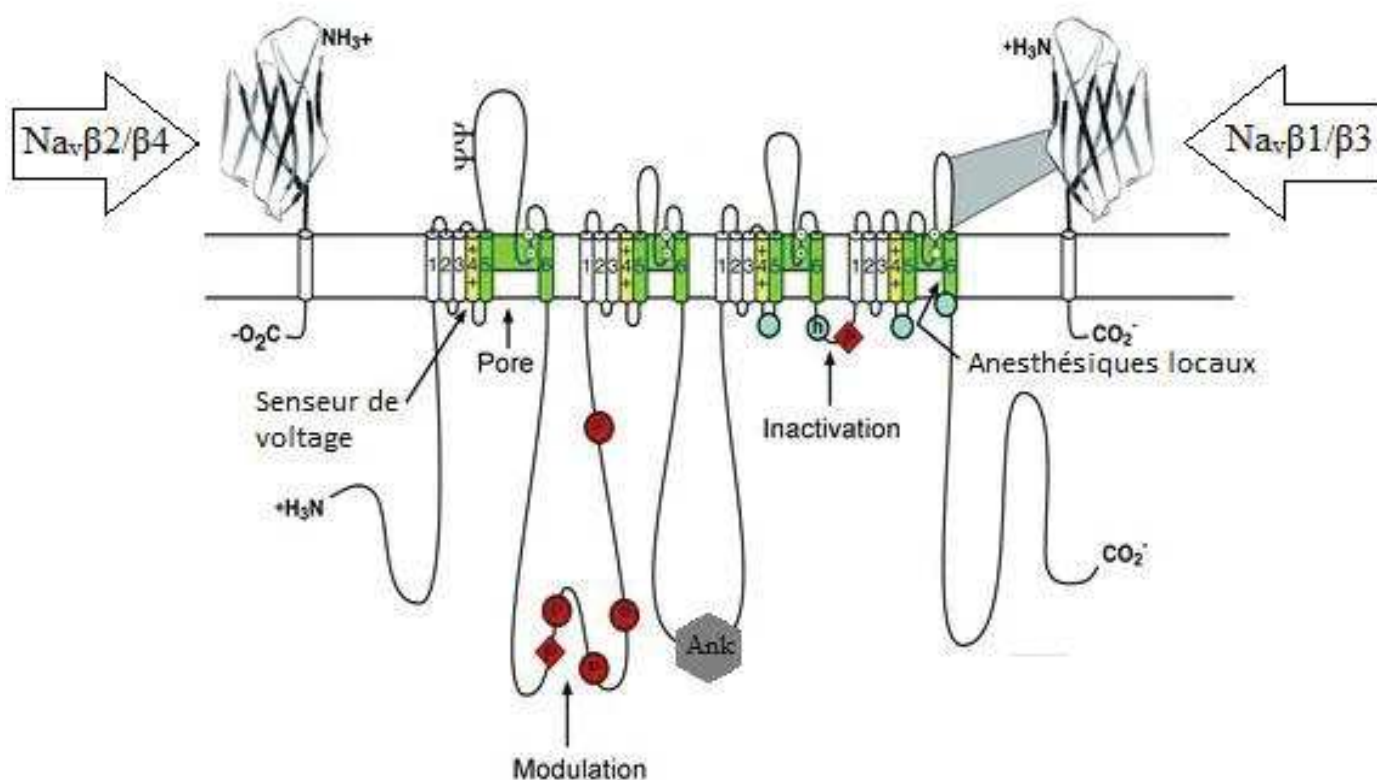


Figure 10 : Structure des canaux ioniques sodiques dépendants du voltage. La sous-unité α est la structure centrale. Chaque domaine (de 1 à 4 de gauche à droite) est constitué de 6 segments transmembranaires. Les sous-unités β sont représentées à droite et à gauche. La liaison entre les sous-unités $\text{Na}_v\beta 1/\beta 3$ et la sous-unité α se fait via un pont disulfure marqué par le parallépipède gris. En jaune, les segments responsables de la dépendance au voltage. En vert, les segments responsables de la formation du pore du canal et possédant le filtre de sélectivité ionique. L'hexagone gris représente la zone de fixation de l'ankyrine G jouant un rôle sur la localisation du canal. Les ronds et losanges rouges représentent les sites de phosphorylation respectivement de la PKA et de la PKC. Les cercles bleus sont les régions impliquées dans le mécanisme d'inactivation rapide du canal. Adapté de (Liu and Wood 2011; Catterall 2012).

Les canaux ioniques dépendants du voltage sodiques sont également susceptibles d'être liés à des sous unités auxiliaires pouvant moduler les caractéristiques bio-physiques du canal (activation/inactivation, dépendance au voltage) ainsi que leur disponibilité à la membrane et leur expression bien que celles-ci ne soient pas nécessaires à l'activité du canal (**Tableau 2**). Les sous-unités auxiliaires, Nav β 2, Nav β 3 et Nav β 4 sont constituées d'un large domaine N-terminal extracellulaire, d'un segment transmembranaire unique et d'un domaine cytoplasmique court (Goldin et al. 2000).

Sous-unité	Nom du gène	Se lie à
Nav β 1	SCN1B	Nav1.1 à Nav1.7
Nav β 2	SCN2B	Nav1.1, Nav1.2, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7
Nav β 3	SCN3B	Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.7
Nav β 4	SCN4B	Nav1.1, Nav1.2, Nav1.5, Nav1.7

Tableau 2 : Récapitulatif des liaisons entre sous-unités α et β des canaux sodiques.

C'est la répartition variable de chacune de ces sous-unités (α et β) qui participe à donner à chaque neurone sa spécificité de transmission du message nerveux. On retrouve les 4 sous-unités dans le système nerveux et dans le cœur alors que de manière intéressante, on ne retrouve que la sous-unité β 1 dans le muscle squelettique adulte (Brackenbury and Isom 2011).

ii. Isoformes

1. Nav1.1

Cette sous-unité codée par le gène SCN1A peut être retrouvée dans une grande partie des cellules du système nerveux ainsi que dans les myocytes cardiaques (Maier et al. 2003; Whitaker et al. 2001). On la retrouve fréquemment associée avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ (Smith and Goldin 1998). Il est également suggéré que l'association avec les autres sous-unités serait possible mais elle n'a jamais été montrée dans les tissus natifs. Cette sous-unité présente une activation et une inactivation rapide. Elle joue un rôle initiateur dans les potentiels d'actions et permet des décharges répétées dans les neurones centraux. On peut également noter que l'amplitude des courants sodiques dans les neurones GABAergiques et leur excitabilité est diminuée chez les souris présentant une déficience pour ce canal. Celles-ci sont également sujettes à des canalopathies diverses avec des symptômes comme des crises épileptiques, des migraines, et certaines formes d'autisme entre autres. Plus récemment, une équipe a montré l'implication de ce canal dans les douleurs mécaniques par l'utilisation d'une toxine agoniste spécifique (Osteen et al. 2016).

2. Nav1.2

Cette sous-unité codée par le gène SCN2A est exprimée dans le système nerveux central et dans les neurones périphériques (Whitaker et al. 2000). On la retrouve associée avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ (Isom et al. 1992; Isom et al. 1995) et certaines études montrent que les sous-unités $\beta 3$ et $\beta 4$ sont également capables de se lier *in vitro* (Yu et al. 2003; Morgan et al. 2000), aucune donnée *in vivo* n'a cependant été présentée. Comme Nav1.1, cette sous-unité présente une activation et une inactivation rapide. Elle est localisée au niveau du segment initial des axones et participe à la génération du potentiel d'action (Levinson, Luo, and Henry 2012). Cette isoforme est associée à des canalopathies induisant des crises épileptiques (Shi et al. 2009).

3. Nav1.3

Cette sous-unité codée par le gène SCN3A est exprimée dans le système nerveux central et dans les neurones périphériques. On la retrouve associée aux sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ (Meadows et al. 2002). Cette sous-unité présente également une activation et une inactivation rapide. Son expression est très forte durant le développement (expression maximale à la naissance) et diminue durant les deux premières semaines de vie jusqu'à atteindre les niveaux bas rencontrés chez l'adulte. Elle peut néanmoins être fortement réexprimée lors d'une lésion des nerfs périphériques ou de la moelle épinière où elle participe à l'augmentation de l'excitabilité neuronale (Beckh et al. 1989; Felts et al. 1997; Wood et al. 2004; Fukuoka et al. 2008). A l'inverse, on constate qu'une réduction par antisens de son expression réduit les symptômes douloureux chez des animaux présentant une lésion de la moelle épinière (Hains et al. 2003).

4. Nav1.4

Cette sous-unité codée par le gène SCN4A est exprimée dans le muscle squelettique. On la retrouve associée aux sous-unités $\beta 1$ (Cohen-Armon and Sokolovsky 1993). Cette sous-unité présente également une activation et une inactivation rapide. Elle participe à l'initiation et la transmission des potentiels d'action (George et al. 1992). La majorité des mutations retrouvées sur la séquence de la sous-unité α Nav1.4 modifie les caractéristiques de l'inactivation du canal, ce qui cause des périodes d'hyperactivité (causant des myotonies) ou hypoactivité (causant des paralysies) (Cannon 2002; Vicart et al. 2004).

5. Nav1.5

Cette sous-unité codée par le gène SCN5A est exprimée dans les myocytes cardiaques, dans le muscle squelettique lors du développement (Kallen et al. 1990; Cohen 1996; Maier et al. 2004). Elle est également présente au niveau intestinal (Beyder et al. 2014; Osorio, Korogod, and Delmas 2014). On peut la retrouver associée à toutes les sous-unités β , néanmoins toutes les

études relatives à ces associations ont été faites dans des systèmes hétérologues, aucune étude faite à partir de tissu cardiaque purifié n'est recensée. Cette sous-unité présente une activation et une inactivation rapide. Elle joue un rôle dans la génération et la propagation du potentiel d'action dans le cœur. Des mutations sur la séquence de cette sous-unité α sont mises en évidence dans le syndrome de Brugada ainsi que dans le syndrome de Long QT (Hedley et al. 2009; Ruan, Liu, and Priori 2009). Une étude récente montre que l'expression du canal Nav1.5 dans le cœur serait contrôlée par un élément régulateur amplificateur situé dans un intron du gène SCN10A (Nav1.8). Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 3 à proximité l'un de l'autre. Cette étude met en avant un mécanisme expliquant l'impact de Nav1.8 sur la rythmicité cardiaque dans le syndrome de Brugada (van den Boogaard et al. 2014).

6. Nav1.6

Cette sous-unité codée par le gène SCN8A est exprimée dans les neurones myélinisés du système nerveux périphérique au niveau du nœud de Ranvier (neurones des ganglions dorsaux rachidiens, axones des motoneurones) (Fukuoka et al. 2008) ainsi que dans le système nerveux central. On peut la retrouver associée à toutes les sous-unités β . Cette sous-unité présente une activation et une inactivation rapide. Sa localisation au nœud de Ranvier en fait un excellent outil pour la propagation des potentiels d'action le long des fibres myélinisées. Les mutations sur la séquence de cette sous-unité α peuvent induire des encéphalopathies épileptiques (Veeramah et al. 2012) et des ataxies cérébelleuses (Kohrman et al. 1996). Les caractéristiques biophysiques de ce canal font qu'il permet des courants résurgents lors de la repolarisation qui sont propices aux activités rythmiques. Cette propriété est accentuée quand ce canal est lié à la sous-unité β_4 . On retrouve notamment cette combinaison dans les neurones des DRGs (Barbosa et al. 2015).

7. Nav1.7

Cette sous-unité codée par le gène SCN9A est exprimée dans les neurones des ganglions dorsaux rachidiens, les cellules de Schwann et les cellules neuroendocrines (Felts et al. 1997). On peut la retrouver associée à toutes les sous-unités β (Farmer et al. 2012; Eubanks et al. 1997; Theile and Cummins 2011; Laedermann, Syam, et al. 2013). Cette sous-unité présente une activation et une inactivation rapide (Cummins, Dib-Hajj, and Waxman 2004). Les mutations sur cette sous-unité induisent chez l'Homme des altérations de perception de la douleur qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

8. Nav1.8

Cette sous-unité codée par le gène SCN10A est exprimée dans les ganglions dorsaux rachidiens dans environ 90% des nocicepteurs et dans 40% des fibres A myélinisées (incluant les mécanorécepteurs à bas seuil) ainsi que dans le cervelet (Shields et al. 2012). On peut également la retrouver dans le cœur (Verkerk et al. 2012). Elle peut être associée aux sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Vijayaragavan et al. 2004). Contrairement aux isoformes précédentes, celle-ci présente une activation plus lente que les autres sous-unités et une inactivation lente (~ 6 ms) qui varie en fonction du potentiel à laquelle elle est mesurée (Cummins and Waxman 1997). Cette sous-unité participe à la génération des potentiels d'action et par sa cinétique lente d'inactivation supporte le maintien de la dépolarisation du neurone et les décharges répétitives de potentiels d'action (Renganathan, Cummins, and Waxman 2001). On peut également noter que cette sous-unité est toujours active à des températures basses et que, de fait, elle joue un rôle important dans la perception des stimuli de froid nociceptif (Zimmermann et al. 2007). Les animaux knock-out pour cette sous-unité présentent une sensibilité à la douleur mécanique et thermique réduite (Akopian et al. 1999; Abrahamsen et al. 2008). Les mutations gain-de-fonction sur cette sous-unité induisent des syndromes de douleurs épisodiques familiales (Faber, Lauria, et al. 2012). Des mutants de Nav1.8 ont également été mis en cause dans le syndrome de Brugada où

il jouerait une rôle de modulateur de la rythmicité cardiaque (Zimmer, Haufe, and Blechschmidt 2014). En plus de ces effets, Nav1.8 est un outil très intéressant pour étudier la spécificité des fibres C. En effet, la création d'une souris Knock-In, où on place la Cre-recombinase à la place du premier exon de Nav1.8, par le laboratoire de John Wood permet d'étudier, via le système Cre-lox, l'impact de différents gènes dans la perception douloureuse. L'expression de Nav1.8 étant tardive lors du développement, cette souris permet également d'éviter les soucis couramment liés aux KO létaux (Stirling et al. 2005).

9. Nav1.9

Cette sous-unité codée par le gène SCN11A est exprimée dans les neurones des ganglions dorsaux rachidiens, les neurones trijumeaux ainsi que les neurones du plexus myentérique (Dib-Hajj et al. 1999; Fang et al. 2002; Rugiero et al. 2003). Cette sous-unité ne se lie pas aux sous-unités β régulatrices. Contrairement aux isoformes précédentes, celle-ci présente une activation et une inactivation très lente (Cummins et al. 1999) qui s'oppose à la participation de cette sous-unité à la génération d'un potentiel d'action, néanmoins sa dépendance au voltage basse (entre -70 et -60 mV) lui donne un rôle d'amplificateur de signaux infraliminaire. Cette sous-unité contribue au mécanisme d'hypersensibilité à la chaleur et aux stimuli mécaniques suite à une inflammation (Lolignier et al. 2011), et à la perception du froid (Lolignier et al. 2015). On peut également noter que les souris n'exprimant pas cette sous-unité présentent une hypersensibilité à la douleur inflammatoire réduite (Amaya et al. 2006) alors que l'expression de cette sous-unité est augmentée par des médiateurs de l'inflammation comme le GTP et la PGE2 (Baker et al. 2003; Rush and Waxman 2004). Il est intéressant de noter également qu'une mutation gain-de-fonction sur cette sous-unité diminue la perception de la douleur (Leipold et al. 2013).

e. Canaux de fuite

Il existe des canaux de fuite perméants au potassium et au sodium. Les canaux perméants au potassium sont détaillés dans la partie leur étant consacrées plus bas. Le canal de fuite sodique non sélectif NALCN (Sodium Leak Channel) est structurellement très proche des membres de la famille des canaux sodiques dépendants du voltage. On le retrouve exprimé principalement dans le cerveau, en partie dans le cœur et très faiblement dans le pancréas (Lee, Cribbs, and Perez-Reyes 1999). Son rôle physiologique exact n'est pas encore complètement établi mais il est crucial pour l'activité rythmique respiratoire (Lu et al. 2007).

f. Canaux potassiques

i. Structure générale et sous unités

La famille regroupant les canaux potassiques est extrêmement diverse (plus de 80 gènes codant pour ces canaux chez les mammifères), c'est également la plus grande famille (Yu and Catterall 2004). Leur activation permet de réguler l'excitabilité cellulaire de manière large et permet de contrôler la forme du potentiel d'action. On les retrouve dans tous l'organisme où ils régulent des mécanismes aussi diverses que la sécrétion hormonale, la contraction musculaire et la cognition. Ils présentent également une grande hétérogénéité de structure (6,4 ou 2 domaines transmembranaires) et sont alors classés en sous-familles. (**Figure 11**)

ii. Isoformes

1. HCN

Les canaux HCN sont des canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation ($\sim -50\text{mV}$) et modulés par les nucléotides cycliques comme l'AMPc et le GMPc. Ces derniers modifient la courbe d'activation des canaux HCN vers des potentiels plus positifs. La famille des canaux HCN regroupe 4 membres constitués d'un domaine à 6 segments transmembranaires qui

s'assemblent en tétramère pour former un canal fonctionnel. L'existence d'un hétéromère HCN1-HCN4 a également été rapportée (Altomare et al. 2003).

Ces canaux participent à l'activité pacemaker que l'on trouve dans les cellules cardiaques et les neurones (DiFrancesco 1993; Pape 1996). Ils provoquent une dépolarisation de la cellule et ne s'inactivent pas ou peu. Le courant généré par ces canaux (parfois appelé I_f ou I_h) est présent au potentiel de repos des neurones et participe de fait à l'établissement de ce potentiel. Il est également impliqué dans la rythmicité cardiaque en jouant un rôle dans l'établissement de la fréquence des potentiels d'action. Ces canaux sont également impliqués dans les douleurs neuropathiques d'origine traumatique et chimique lors des traitements anticancéreux (Jiang et al. 2008; Descoeur et al. 2011a) mais l'absence de bloqueurs spécifiques de chaque isoforme empêche d'établir leurs rôles respectifs. On peut néanmoins citer l'Ivabradine (Procoralan©) qui par son effet inhibiteur des canaux HCN4 situés dans le cœur induit une bradycardie. Cet effet est intéressant dans le cadre d'un traitement de l'angor stable, mais est gênant pour un traitement de la douleur. Egalement, une étude récente montre que la lidocaïne, analgésique habituellement utilisé pour son effet antagoniste des canaux sodiques, inhibe également le courant HCN dans des neurones de la substantia gelatinosa (Hu et al. 2016).

2. Kv

Cette sous-famille est la plus grande, regroupant 40 canaux dépendants du voltage. Ils sont tous constitués de 6 domaines transmembranaires qui s'assemblent en homotétramères ou hétérotétramères (dans le cas des familles K_v1 , K_v7 , and K_v10). Les propriétés électrophysiologiques des hétérotétramères peuvent être largement différentes de celles des homotétramères. Certaines de ces sous-unités peuvent également avoir un rôle de modulateur (familles K_v5 , 6, 8, et 9), de plus les sous-unités de ces familles ne forment pas d'homomères fonctionnels (ils sont dits silencieux) (Bocksteins and Snyder 2012) mais peuvent former des

hétérotétramères fonctionnels avec les sous-unités de la famille K_v2 augmentant la variété de ces canaux (Gutman et al. 2003).

On peut distinguer 3 types de courants en plus du courant H dû aux canaux HCN :

- M pour les courants qui ne s'inactivent pas ($K_v7.1$ à $K_v7.5$) (Passmore et al. 2003). Ces canaux font partie des « delayed rectifiers » (pour rectification retardée) car ils s'activent après quelques secondes et créent un courant hyperpolarisant stable. La famille des « delayed rectifiers » regroupe d'autres canaux mais ces sous-unités K_v7 sont les seules à présenter une inhibition par l'acétylcholine via le récepteur muscarinique (Brown and Adams 1980).
- A pour les courants transitoires avec inactivation ($K_v1.4$, $K_v3.4$, $K_v4.1$ à $K_v4.3$) (Akins and McCleskey 1993). Ces courants ont une activation et une inactivation rapide. Ils jouent un rôle régulateur de fréquence dans les cellules. Suite à une hyperpolarisation, l'inactivation des canaux A est levée et ainsi, permet le maintien de l'hyperpolarisation pendant laquelle la cellule ne peut pas déclencher de nouveau potentiel d'action. L'inactivation de ces canaux est rapide et dépendante de la taille de la cellule et du courant, elle régule ainsi la fréquence de déclenchement des potentiels d'action (Hille 2001).
- K pour les courants à rectification retardée ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v2.1$, $K_v2.2$, $K_v3.1$ à $K_v3.3$) (Bocksteins et al. 2009; Bocksteins et al. 2012; Luo et al. 2011). Ces courants présentent une activation rapide et une inactivation très lente (>1 sec). Ils s'activent au moment où les canaux sodiques s'inactivent dans la cinétique des potentiels d'action. Ils permettent alors la repolarisation de la cellule ainsi que la phase d'hyperpolarisation après le potentiel d'action. Ils contribuent ainsi au potentiel de repos des cellules et influent sur la durée des potentiels d'action ainsi que la fréquence de déclenchement possible (Catacuzzeno et al. 2008).

3. KCa

Cette famille de canaux peut être à nouveau scindée en trois groupes : BK (ou maxi K) pour les canaux à grande conductance (Big), IK pour les canaux à conductance intermédiaire (Intermediate), et S pour les canaux à petite conductance (Small) (Vergara et al. 1998). Ces trois catégories présentent des caractéristiques biophysiques différentes en termes d'activation, de conductance et de pharmacologie mais ils partagent tous le fait d'être activés quand la concentration en calcium intracellulaire augmente. On peut néanmoins noter une modification des conductances en fonction du voltage pour les canaux BK. Ceux-ci sont les seuls à posséder la structure à 6 domaines transmembranaires des canaux K_v avec le segment S4 comme senseur de voltage et un segment S7 en plus qui rend la partie C-terminale de la protéine extracellulaire. Ce groupe de canaux joue un rôle dans la phase de repolarisation et d'hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action (N'Gouemo 2011) mais sont également inhibiteur de la sécrétion de vésicules dans les cellules GH3 (Gaifullina et al. 2016). De leur côté les canaux IK et SK ont également une structure à 6 domaines transmembranaires mais leur segment S4 est moins chargé que celui des BK ou des K_v ce qui les rend insensibles au voltage. Les canaux SK jouent quant à eux un rôle dans le maintien de l'hyperpolarisation après un potentiel d'action, ils régulent alors la fréquence des potentiels d'action (Faber and Sah 2007) et participent aussi à limiter l'activité sécrétoire dans les cellules adrénocorticales (Yang, Zhang, et al. 2016). Le canal IK est un modulateur important des réponses gliales chez les rongeurs (Blomster et al. 2016).

4. Kir

Les Kir (pour Potassium « Inward Rectifier » ou rectifiant entrant) sont une autre famille de canaux potassiques regroupant les Kir 1 à 7. Leurs sous-unités α sont constituées de 2 domaines transmembranaires qui forment des homotétramères bien qu'à l'intérieur des sous-familles des hétérotétramères soient retrouvés, et ils sont activés par les hyperpolarisations. La concentration

extracellulaire en potassium influe également sur le potentiel auquel ces canaux s'ouvrent. Contrairement aux autres canaux potassiques, ces canaux génèrent un courant entrant (ici entrée de potassium) qui va dépolariser la cellule lors de l'ouverture du canal aux potentiels très hyperpolarisés. Aux potentiels dépolarisés, la conductance de ce canal diminue de façon à ne pas permettre la sortie des ions potassium. Cela permet de protéger la cellule d'une sur-utilisation de ses ressources en énergie et donc d'éviter sa mort. Cette ensemble de cinétiques permet aussi de dire que ces canaux jouent un rôle dans le maintien du potentiel de membrane en dehors des phases de potentiel d'action (où ils se retrouvent non-conductant) (Hille 2001). Dans cette famille, on peut noter la sous-famille $K_{ir}2$ dont les canaux sont constitutivement actifs, la sous-famille $K_{ir}3$ qui est activé par les protéines G et la sous-famille $K_{ir}6$ qui est sensible à l'ATP (Hibino et al. 2010).

5. K2P

Cette sous-famille de canaux potassiques diffère des précédentes par la composition des sous-unités α . Celles-ci sont au nombre de 15, réparties en 6 sous-familles (TWIK, TRESK, TASK, TALK, THIK, TREK), sont constituées de 4 domaines transmembranaires formant 2 boucles P. Ils s'assemblent en dimères fonctionnels plutôt qu'en tétramères comme les autres canaux potassiques. Ces canaux génèrent à tout potentiel des courants dits « de fond » ou « de fuite ». Ces canaux génèrent des courants persistants sortants qui contrôlent le potentiel de la cellule (Enyedi and Czirjak 2010) et certaines isoformes ont été décrites entre autre dans les ganglions dorsaux rachidiens (Marsh et al. 2012; Pollema-Mays et al. 2013), un grand nombre d'entre eux ont également été impliqué dans l'établissement de symptômes douloureux (Li and Toyoda 2015) :

- TWIK (pour Tandem pore domain Weak Inward rectifier K^+ channel): Le canal TWIK1 joue un rôle dans la rythmicité de l'activité cardiaque ainsi que dans la morphologie atriale

(Christensen et al. 2016) Il est également impliqué dans le maintien des douleurs neuropathiques où il est exprimé dans les neurones de grand et de moyen diamètre. Peu de choses sont connues sur l'activité du canal TWIK2. Il générerait un courant rectifiant entrant quand la concentration en potassium est égale de part et d'autre de la membrane, et un courant rectifiant sortant lorsque les concentrations de potassium sont aux niveaux physiologiques. TWIK2 s'inactive lentement et partiellement en condition non physiologique de potassium extracellulaire. Lorsque cette concentration est physiologique le canal est inactivé.

- TRESK (pour TWIK-related spinal cord K⁺ channel) : Ce canal est retrouvé au niveau de la moelle épinière et présente une homologie de séquence forte avec TREK2. Il est également sensible aux variations de pH intracellulaire et extracellulaire (chez la souris) (Sano et al. 2003). Il est surexprimé dans la corne dorsale de la moelle épinière suite à une lésion induisant une douleur neuropathique (Hwang et al. 2015). Ce canal est également inhibé par certains analgésiques (Park et al. 2016).
- TASK (pour TWIK-related acid-sensitive K(+) channel) : les canaux TASK sont activés par un pH alcalin et inhibés par un pH acide. Leur activation est instantanée et ces canaux ne s'inactivent pas. En condition physiologique, ils génèrent un courant rectifiant sortant. Ces canaux sont inhibés par les récepteurs couplés aux protéines Gq et les endocannabinoïdes. On peut les retrouver dans les ganglions dorsaux rachidiens et dans le pancréas (Dadi et al. 2015)
- TALK (pour TWIK-related alkaline pH-activated K₂P) : Ces canaux produisent un courant à activation quasi instantanée par les pH alcalins et qui ne s'inactivent pas (Girard et al. 2001). On les retrouve dans le pancréas où ils jouent un rôle dans la modulation de l'activité

électrique des cellules β , dans la sécrétion d'insuline et dans l'homéostasie du glucose (Vierra et al. 2015).

- THIK (pour Tandem pore domain Halothane Inhibited K(+) channel) : Comme leur nom l'indique, leur caractéristique principale est d'être inhibé par l'halothane. THIK1 est retrouvé ubiquitairement dans l'organisme alors que THIK2 est trouvé principalement dans le cerveau et les reins (Rajan et al. 2001). THIK 1 et THIK 2 peuvent former des hétéromères fonctionnels (Blin et al. 2014).
- TREK (pour TWIK-related K⁺ channel) : Les canaux TREK1 et TREK2 ont en commun d'être activés par des stimuli mécaniques et thermiques. Dans un cadre de douleur neuropathique induite par une chirurgie CCI (Chronic Constriction Injury), bien que l'expression d'ARNm de ces deux canaux soit augmentée, seule l'expression de TREK1 est augmentée alors que celle de TREK2 n'est pas modifiée (Han et al. 2016). Ces deux isoformes peuvent également former des hétérodimères fonctionnels dans les neurones des ganglions dorsaux rachidiens (Lengyel, Czirjak, and Enyedi 2016). TREK2 a néanmoins été mis en cause dans l'établissement de l'allodynie au froid suite à un traitement par l'anti-cancéreux oxaliplatine (Pereira et al. 2014).

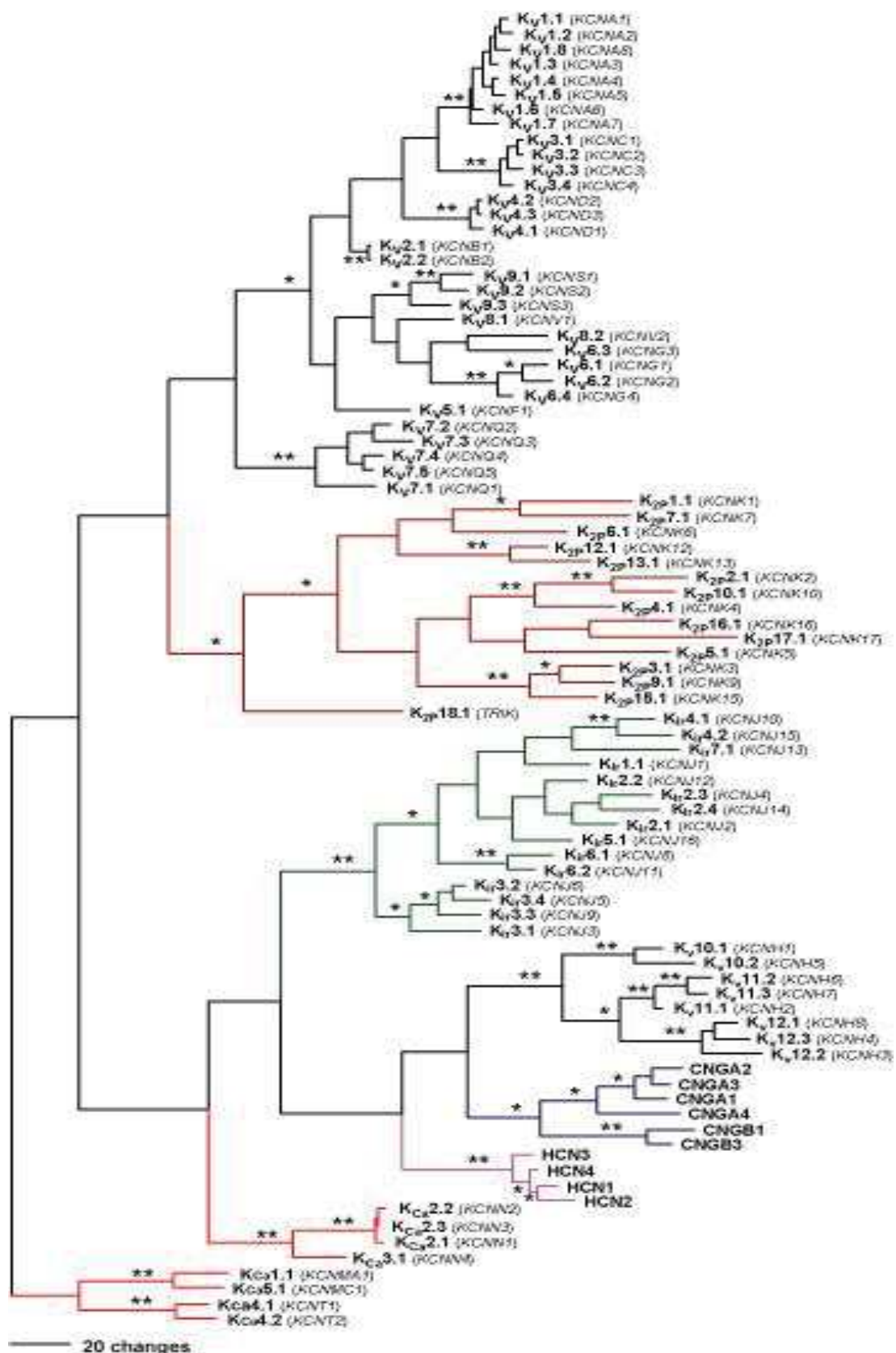


Figure 11 : Représentation de l'homologie de séquence des acides aminés formant le pore des canaux potassiques K_v, K_{Ca}, HCN, K_{ir} et K_{2p}. La barre d'échelle représente le nombre de changements dans la séquence. Les barres verticales ne sont pas à l'échelle. Tiré de (Yu and Catterall 2004)

g. Canaux Calciques dépendants du voltage

i. Structure générale et Sous unités

Les canaux calciques dépendants du voltage permettent un influx de calcium dans la cellule en réponse aux dépolarisations de la membrane. Cela permet à la cellule de réguler des processus tels que la contraction, la sécrétion, la neurotransmission, ainsi que l'expression des gènes dans un grand nombre de type cellulaires différents. Ils sont indispensables pour lier les signaux électriques transmis de cellule à cellule aux processus intracellulaires dépendants du calcium. Ce sont des protéines complexes composées de 4 à 5 sous-unités dont la plus grande est la sous-unité $\alpha 1$ (190 à 250kDa) (**Figure 12**). Celle-ci contient tous les sites principaux de l'activité (le pore, le senseur de voltage sur le segment S4, et les structures permettant le gating du canal). Les sites de régulation du canal par des seconds messagers, des molécules ou des toxines sont également présents sur cette sous-unité. Tout comme les canaux sodiques, cette sous-unité est organisée en 4 domaines homologues (I-IV) constitués de 6 segments transmembranaires chacun. La boucle formée entre le S5 et le S6 est également celle qui permet de créer le pore et de déterminer la spécificité de la conductance. Le filtre de sélectivité est représenté par une succession de 4 glutamates (EEEE) sauf pour les canaux de type T où le motif devient 2 glutamate et 2 aspartates (EEDD). Un changement de quelques acides aminés sur la séquence de ces boucles permet de modifier la sélectivité du canal de calcique à sodique. Ces sous-unités peuvent également être liées à une sous-unité β intracellulaire ainsi qu'à une sous-unité $\alpha 2\delta$ (Dolphin 2016). Pour certains de ces canaux, on peut aussi trouver une sous-unité γ . IL existe 10 isoformes de canaux calciques activés par le voltage que l'on peut classer en deux sous-groupes : les canaux activés par une forte dépolarisation et ceux qui sont activés par une faible dépolarisation (**Figure 13**).

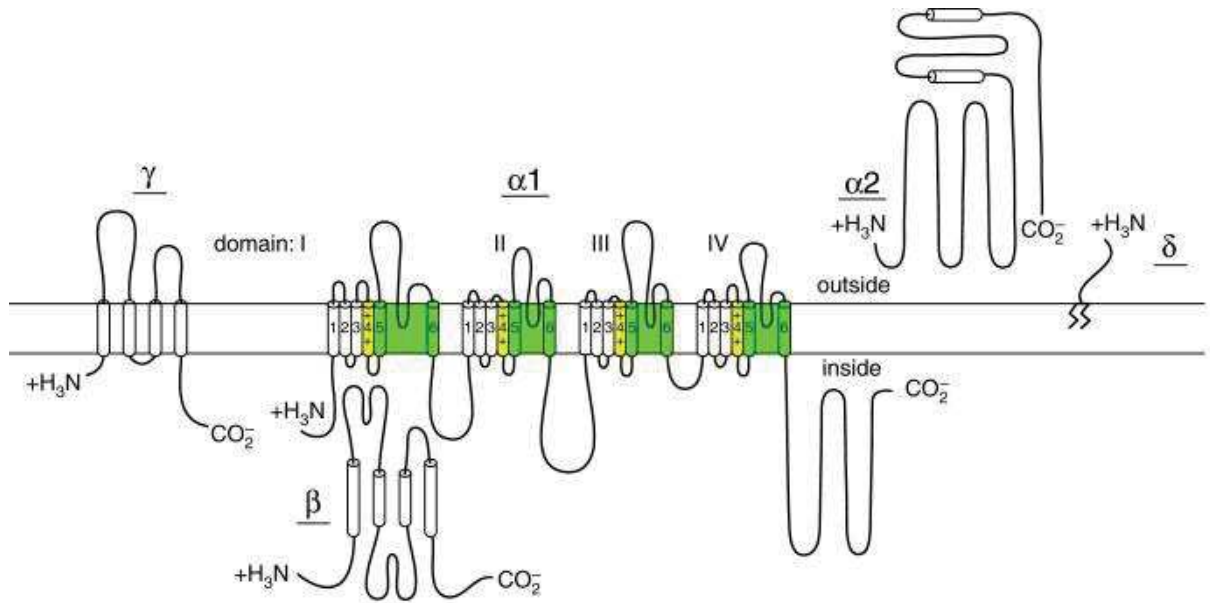


Figure 12 : Structure des canaux calciques dépendants du voltage. Ici sont représentées les 5 sous-unités pouvant constituer les canaux. Les cylindres représentent les hélices α des sous-unités. En jaune les senseurs de voltage (segment S4) et en vert les segments formant le pore (S5-S6 et P-loop). Les traits en zigzag de la sous-unité δ représentent l'ancrage glycophosphatidylinositol. Tiré de (Catterall 2011).

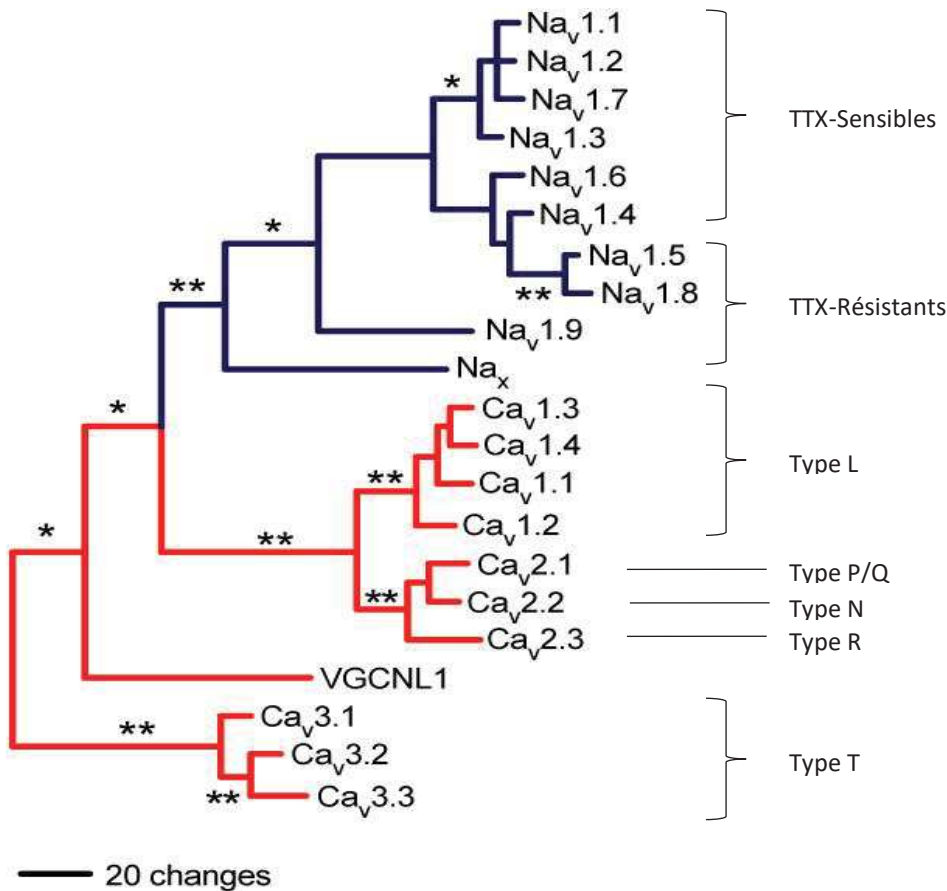


Figure 13 : Représentation de l'homologie de séquence des acides aminés du pore des canaux dépendants du voltage sodiques et calciques. Les barres horizontales sont à l'échelle et représentent le nombre de changements pour arriver à la séquence, les barres verticales ne sont pas à l'échelle. On distingue ici facilement les différentes sous-familles de canaux. Les canaux de type T sont très éloignés des autres isoformes de canaux calciques. Adapté de (Yu and Catterall 2004)

ii. Activés par une forte dépolarisation (HVA)

1. Cav1.x

Ces canaux sont aussi appelés les canaux calciques de type L (pour Long Lasting). Ils requièrent une longue dépolarisation pour être activés, génèrent un courant persistant et sont bloqués par les Dihydropyridines (DHPs), les phenylalkylamines et les benzothiazepines. Comme pour les canaux sodiques dépendants du voltage, les connaissances sur la structure des canaux calciques proviennent des études menées par l'équipe du Dr Numa utilisant des ligands marqués .

a) Cav1.1

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1S. On peut la retrouver liée aux sous-unités γ_1 , β_{1a} , $\alpha_{2\delta}$ ainsi qu'à la protéine AKAP15 (Jay et al. 1990; Ruth et al. 1989; Ellis et al. 1988; Hulme et al. 2002). Elle est activée par des fortes dépolarisations et présente une inactivation dépendante du voltage lente (environ 40% après 5sec) (Freise et al. 2000). Cav1.1 est présent dans le muscle squelettique (Takahashi et al. 2003; Tanabe et al. 1987). Ce canal permet la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique par son interaction directe avec le récepteur à la ryanodine ou par l'entrée de calcium extracellulaire. Il joue donc un rôle important dans le couplage excitation-contraction (Block et al. 1988). Des mutations sur la séquence d'acides aminés de ce canal peuvent conduire au développement de paralysies hypokaliémiques périodiques de type 1 (Caciotti et al. 2003). Le splicing alternatif de ce canal donne lieu à la synthèse de deux variants avec des propriétés de gating très différentes, la sensibilité au voltage serait portée par le segment 4 du domaine 4 et les cinétiques d'activation seraient dépendantes du segment 4 du domaine 1 (Tuluc et al. 2016). La structure de ce canal a récemment été résolue (**Figure 14**) (Wu et al. 2015; Wu et al. 2016b) et les informations apportées par ces études pourraient permettre de raffiner les approches pharmacologiques à visée thérapeutique sur les canaux calciques de type L puis à l'avenir, sur les autres types. Une

des nouveautés structurales apportées par cette étude est l'identification de l'interface entre les sous-unité $\alpha 1$ et $\alpha 2$.

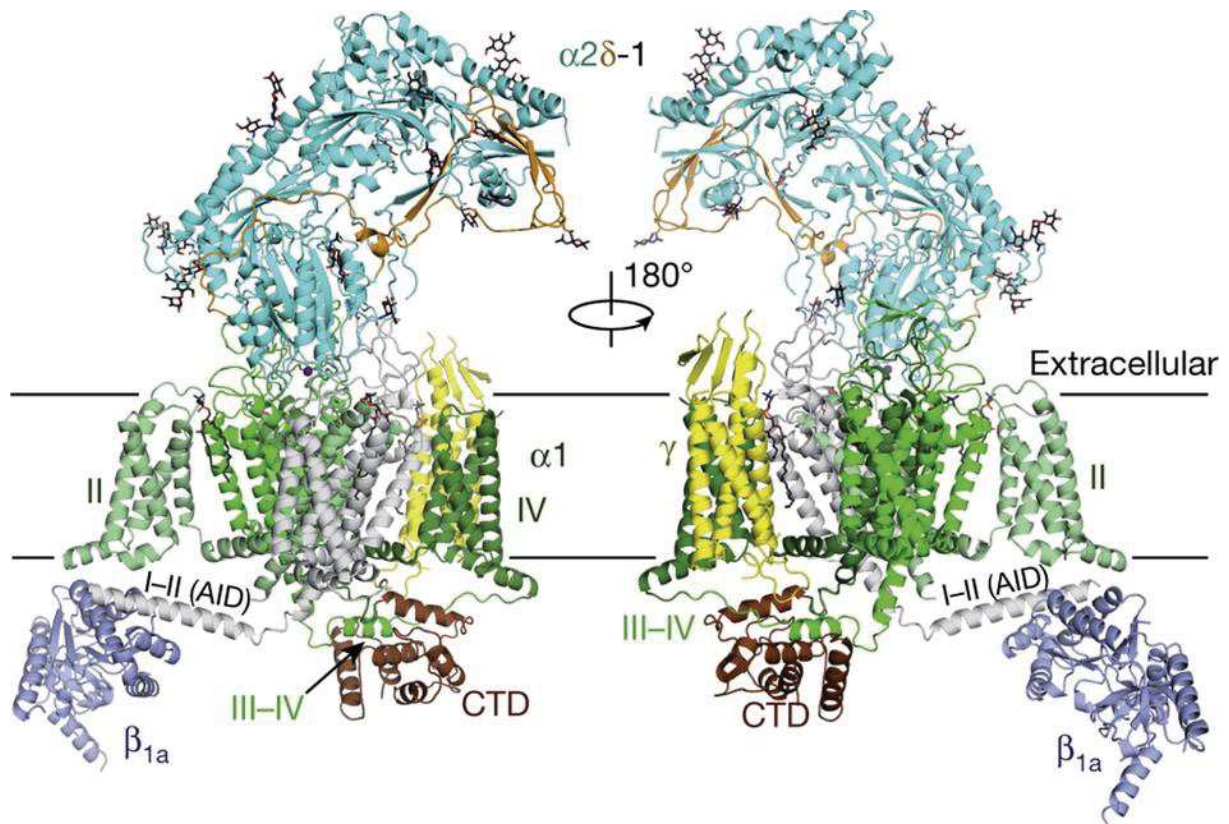


Figure 14 : Reconstruction de la structure du canal calcique Cav1.1 à 3.6 Å après analyse du cristal en cryo-microscopie électronique. Les domaines transmembranaires de la sous-unité $\alpha 1$ sont chacun colorés dans un vert différent et les sous-unités auxiliaires sont colorées en bleu, en jaune et en marron. Tiré de (Wu et al. 2015).

b) Cav1.2

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1C. On peut la retrouver liée aux sous-unités β_{1-4} (Foell et al. 2004) ainsi qu'à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ (Klugbauer, Marais, and Hofmann 2003). Elle est activée par des fortes dépolarisations et présente une inactivation dépendante du voltage lente ainsi qu'une inactivation dépendante du calcium rapide (Charnet et al. 1994). Cette inactivation est ralentie si Cav1.2 est lié à la sous-unité β_{2a} . On la retrouve exprimée chez l'Homme dans le cerveau, le cœur et la moelle épinière entre autre (Haase et al. 1996; Schultz et al. 1993; Splawski et al. 2004). Elle joue un rôle dans un grand nombre de fonctions :

- dans le couplage excitation-contraction du muscle vasculaire lisse cardiaque et intestinal (Moosmang et al. 2003)
- dans la sécrétion d'insuline dans les cellules β du pancréas (Barg et al. 2001)
- dans la mise en place de la mémoire spatiale (Moosmang et al. 2005)
- dans l'établissement des douleurs neuropathiques (Radwani et al. 2016)

Des mutations perte-de-fonction sur la séquence de ce canal sont impliquées dans un grand nombre de pathologies cardiaques (Antzelevitch et al. 2007; Burashnikov et al. 2010) et de troubles autistiques (Bader et al. 2011; Limpitikul et al. 2016).

c) Cav1.3

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1D. Elle peut être liée à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ (Helton, Xu, and Lipscombe 2005) ainsi qu'à la sous-unité β (Singh et al. 2008). Elle est activée par des dépolarisations et présente une inactivation dépendante du voltage lente qu'une inactivation dépendante du calcium plus rapide (Mangoni et al. 2003). Ces propriétés d'activation et d'inactivation varient entre les variants d'épissage (formes longues et courtes du canal) (Tan et al. 2011). La forme d'épissage courte ne possède pas de domaine de modulation C-Terminal ce qui améliore l'inactivation dépendante du calcium ainsi que la sensibilité au voltage (Scharinger et al. 2015). La sensibilité au calcium de Cav1.3 est également régulée par un phénomène d'édition des ARNs dans sa partie C-terminale (Huang et al. 2012). On retrouve ce canal principalement exprimé dans le cerveau, dans l'oreille interne et la cochlée, dans le cœur (Takahashi et al. 2003; Mangoni et al. 2003) ainsi que dans les cellules chromaffines (Marcantoni et al. 2010). Tout comme Cav1.2, ce canal joue un rôle dans un grand nombre de fonctions :

- dans l'activité pacemaker du nœud sino-atrial (Mangoni et al. 2003)

- dans l'activité électrique des cellules de la cochlée et de l'oreille interne (Brandt, Striessnig, and Moser 2003)
- dans la sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines (Perez-Alvarez et al. 2011).
- Dans la modulation homéostatique des réponses autocrines des neurones dopaminergiques (Dragicevic et al. 2014) ainsi que dans l'activité rythmique de ces neurones (Poetschke et al. 2015)

d) Cav1.4

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1F. Elle peut être liée à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ (Klugbauer, Marais, and Hofmann 2003) ainsi qu'à la sous-unité β_2 (Ball et al. 2002; Lee et al. 2015). Ces canaux sont activés par une dépolarisation et présentent une inactivation dépendante du voltage lente (McRory et al. 2004). Contrairement aux autres sous-unités Cav1, l'inactivation de celle-ci n'est pas sensible au calcium en condition physiologique mais peut le devenir si la concentration en calmoduline est artificiellement augmentée (Singh et al. 2006; Liu et al. 2010). Ce canal est également moins sensible à l'inhibition par les dihydropyridines que les autres membres de la sous-famille Cav1. On le retrouve exprimé dans la rétine ainsi que dans les tissus lymphoïdes (Strom et al. 1998; McRory et al. 2004). Un groupe a également rapporté la présence de ces canaux dans les ganglions dorsaux rachidiens (Murakami et al. 2001). Ce canal joue un rôle dans la signalisation au niveau de la rétine, plus principalement dans la libération des neurotransmetteurs des photorécepteurs (Chang et al. 2006) et joue également un rôle dans la signalisation au niveau des lymphocytes T (Omilusik et al. 2011). Une mutation perte-de-fonction sur ces canaux peut aboutir à une pathologie nommée Cécité nocturne congénitale stationnaire (Bech-Hansen et al. 1998).

2. Cav2.x

Les trois canaux présents dans ce sous-groupe sont dits de type P/Q (pour « Purkinje »), N (pour « Neuronal ») et R (pour « Resistant ») respectivement pour Cav2.1, Cav2.2 et Cav2.3. Ces canaux jouent un rôle prépondérant dans la transmission synaptique en régulant la fusion des vésicules synaptiques et en modulant la plasticité synaptique (Takahashi and Momiyama 1993; Zucker and Regehr 2002).

a) Cav2.1

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1A (Mori et al. 1991; Starr, Prystay, and Snutch 1991). Elle peut être liée à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ ainsi qu'aux sous-unités β_{1-4} (Liu et al. 1996). Le canal est activé par des dépolarisations modérées et présente une inactivation voltage-dépendante modérée (Hans et al. 1999) bien que cette dernière soit dépendante de la sous-unité β liée au canal. La dualité de dénomination de ce canal vient du fait qu'il existe plusieurs cinétiques d'inactivation liées à la présence de sous-unités β différentes, avec une cinétique de courant assez lente quand le canal est lié à β_2 (type P) et une cinétique plus rapide quand le canal est lié à β_1 , β_3 et β_4 (type Q) (Mermelstein et al. 1999; Stea et al. 1994; Bourinet et al. 1999). On différencie la pharmacologie des types P et Q par leur sensibilité à la toxine ω -agaIVA de l'araignée *Agelenopsis aperta*. Ces différences viennent de variants d'épissage des transcrits Cav2.1 ((Bourinet et al. 1999). La différence est une insertion de deux acides aminés (Proline et Asparagine) sur une boucle extracellulaire reliant le segment S3 au segment S4 du domaine IV. Cette région est proposée comme site récepteur de la toxine ω -agaIVA. C'est également une région senseur du voltage, et à ce titre la toxine inhibe le canal en diminuant sa sensibilité au voltage. Cette toxine est un « gating modifier » (pour modificateur des mécanismes de gating du canal) par opposition aux molécules bloquant le pore du canal (ou « pore blockers »).

Ces isoformes sont retrouvées dans le cerveau (Hawrylycz et al. 2012), le système auditif (Chen et al. 2011), les reins (Hansen et al. 2000) et les myocytes vasculaires (Andreasen et al. 2006). En plus de son implication dans la transmission synaptique, on peut l'impliquer dans la transmission des messages de douleur aiguë après injection de formaline (Malmberg and Yaksh 1994). Les mutants perte-de-fonction de ce canal conduisent à l'apparition d'hémiplégies alternatives de l'enfance (de Vries et al. 2008), des syndromes de migraine familiale (Adams et al. 2009; Pietrobon 2007) ainsi qu'à des ataxies épisodiques (Adams and Snutch 2007; Ophoff et al. 1996).

b) Cav2.2

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1B (Williams et al. 1992). Elle peut être liée à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ (Witcher, De Waard, and Campbell 1993; Dubel et al. 1992) et aux sous-unités β_{1-4} (Liu et al. 1996). Elle est activée par des fortes dépolarisations et présente une inactivation voltage-dépendante modérée (Bleakman et al. 1995). Plusieurs variants d'épissages existent pour cette sous-unité et ils présentent des caractéristiques de voltage-dépendance et d'inactivation différente (Stea, Dubel, and Snutch 1999). Encore une fois ces caractéristiques d'inactivation dépendent fortement de la sous-unité β associée au canal, avec les cinétiques les plus lentes retrouvées quand le canal est lié à β_2 (Pan and Lipscombe 2000). On retrouve Cav2.2 exprimé dans tout le cerveau (Hawrylycz et al. 2012) et dans la moelle épinière (Westenbroek, Hoskins, and Catterall 1998). Le canal est impliqué dans le contrôle de fonctions physiologiques comme l'homéothermie, la mise en place de la mémoire et la transmission synaptique. Dans notre cas, la fonction physiologique la plus intéressante est sans conteste l'implication dans la transmission des messages douloureux mécaniques et inflammatoires mais non thermiques (Kim et al. 2001). Ce canal est d'ailleurs la cible de la seule toxine animale utilisée comme anti-douleur actuellement (le ziconotide ou ω -conotoxin MVIIA, sous le nom de Prialt©). Cette toxine est un bloqueur du pore du canal.

c) Cav2.3

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1E (Soong et al. 1993). Elle peut être liée à la sous-unité $\alpha_{2\delta}$ et aux sous-unités β_{1-4} . Elle est activée par des dépolarisations modérées et présente une inactivation voltage-dépendante rapide. Les sous unités β associées modifient les caractéristiques d'activation et d'inactivation, β_1 , β_3 et β_4 déplacent les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés alors que β_2 ralentit l'activation et l'inactivation (Parent et al. 1997). Cav2.3 est exprimé dans le poumon lors du développement (Brennan et al. 2013), dans le cerveau (Hawrylycz et al. 2012), dans le cœur (Mitchell, Larsen, and Best 2002) et dans les cellules des îlots pancréatiques (Vajna et al. 1998). Il est impliqué dans la plasticité et la transmission synaptique (Myoga and Regehr 2011), la sécrétion d'hormones et de neuropeptides (Albillos, Neher, and Moser 2000) ainsi que dans la transmission des messages douloureux dans un cadre de douleur neuropathique chronique (Matthews et al. 2007). La toxine SNX-482 de tarentule qui est un « gating-modifier » bloque Cav2.3 (Newcomb et al. 1998). La sélectivité de cette toxine pour les canaux calciques Cav2.3 a été remise en cause récemment par la mise en évidence de son action sur les canaux potassiques Kv4.2 et Kv4.3 (Kimm and Bean 2014). Cav2.3 est exprimé dans les voies descendantes de contrôle de la douleur ciblées par les opioïdes. Bloquer Cav2.3 à ce niveau permet de réduire le phénomène d'apparition d'une tolérance de l'effet analgésique de la morphine (Yokoyama et al. 2004).

iii. Activés par une faible dépolarisation (LVA)

Dans ce dernier sous-groupe des canaux calciques dépendants du voltage, on retrouve trois isoformes (Perez-Reyes 2006; Perez-Reyes et al. 1998; Cribbs et al. 1998; Lee et al. 1999). Ces canaux sont à l'origine de courants calciques de type T (pour « Tiny and Transient », petit et transitoire). Ceux-ci, contrairement aux canaux des autres sous-groupes, sont insensibles aux dihydropyridines inhibant les canaux Cav1.x et aux conotoxines qui bloquent les canaux Cav2.x

(Perez-Reyes 2003). Ils ne possèdent pas de domaine BID (Beta subunit Interacting Domain) permettant la liaison à des sous-unités β régulatrices (Pragnell et al. 1994). Elles sont également différentes dans leurs caractéristiques d'activation et d'inactivation. Les caractéristiques d'activation et d'inactivation présentées ci-dessous sont tirées de travaux effectués par les membres du laboratoire (**Tableau 3**) (Chemin et al. 2002)

	Cav3.1 (α_{1G})	Cav3.2 (α_{1H})	Cav3.3 (α_{1I})	G vs. G vs. I	H vs. I	
Activation						
$V_{0.5}$ (mV)	-49.3 ± 0.7	-48.4 ± 1.2	-41.5 ± 1.1	n.s.	***	***
Pente (mV)	4.6 ± 0.1 (26)	5.2 ± 0.4 (10)	6.2 ± 0.2 (17)	n.s.	***	*
Inactivation						
$V_{0.5}$ (mV)	-74.2 ± 1.1 (8)	-75.6 ± 0.7	-69.8 ± 0.9	n.s.	**	***
Pente (mV)	5.5 ± 0.3 (8)	6.2 ± 0.2 (19)	6.1 ± 0.1 (17)	***	***	n.s.
Cinétique d'activation						
Montée-40mV (ms)	4.4 ± 0.2 (20)	5.7 ± 0.2 (9)	33.9 ± 1.4 (31)	*	***	***
Montée+10mV (ms)	1.2 ± 0.1 (18)	2.1 ± 0.1 (8)	10.5 ± 1.3 (18)	*	***	***
e-fold	14.5 ± 1.2 (17)	11.8 ± 0.8 (9)	14.7 ± 0.8 (29)	n.s.	n.s.	n.s.
Cinétique d'inactivation						
τ -40 mV (ms)	18.8 ± 1.6 (15)	23.4 ± 0.3 (22)	122 ± 5 (30)	*	***	***
τ +10 mV (ms)	12.6 ± 0.6 (16)	18.2 ± 0.4 (20)	84 ± 3 (32)	*	***	***
e-fold (mV)	10.8 ± 0.9 (16)	6.2 ± 0.6 (11)	9.3 ± 0.6 (26)	**	n.s.	**
Cinétique de désactivation						
τ -100 mV (ms)	2.6 ± 0.2 (9)	3.6 ± 0.4 (14)	1.12 ± 0.1 (31)	*	***	***
τ -70 mV (ms)	6.2 ± 0.4 (9)	8.5 ± 1.1 (14)	2.1 ± 0.1 (30)	*	***	***
e-fold (mV)	32.4 ± 2.6 (9)	24.1 ± 1.6 (11)	41 ± 2.6 (30)	n.s.	n.s.	***
τ récupération (ms)	137 ± 5 (12)	448 ± 36 (7)	260 ± 30 (18)	***	**	**

Tableau 3 : Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm s.e.m. et le nombre de cellules analysées est entre parenthèses. Les analyses statistiques ont été faites en utilisant un test ANOVA une voie suivi d'un test *post hoc* de Student-Newman-Keuls avec (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; n.s., non significatif)

1. Cav3.1

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1G. Elle est activée par des dépolarisations faibles et présente une inactivation voltage-dépendante rapide. On retrouve Cav3.1 exprimé dans le cerveau, notamment dans les neurones thalamo-corticaux, et dans la moelle épinière (Talley et al. 1999) mais également dans des tissus non-neuronaux comme les reins, le cœur et les poumons lors du développement (Monteil et al. 2000). Cette sous-unité est impliquée dans l'établissement des épilepsies de type absence (Coulter, Huguenard, and Prince 1989). Son rôle dans la perception douloureuse est proposé dans le thalamus et dans les voies descendantes au niveau du bulbe (Bourinet, Francois, and Laffray 2016).

2. Cav3.2

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1H. Elle est activée par des dépolarisations faibles et présente une inactivation voltage-dépendante rapide alors que sa cinétique de désactivation (passage de l'état activé du canal à son état fermé) est plus lente que les deux autres isoformes de type T. Cette sous-unité est exprimée très fortement dans les reins, le foie, le cœur et le cerveau et faiblement exprimée dans les poumons, le muscle squelettique, le pancréas et le placenta (Cribbs et al. 1998). Les canaux Cav3.2 sont surtout exprimés dans des neurones des ganglions dorsaux rachidiens où ils jouent un rôle dans l'établissement de douleurs aiguës et neuropathiques (Bourinet et al. 2005; Watanabe, Ueda, et al. 2015; Bourinet, Francois, and Laffray 2016; Todorovic, Meyenburg, and Jevtovic-Todorovic 2002) et dans la perception de stimuli mécaniques (Wang and Lewin 2011). Certaines mutations de Cav3.2 sont également mises en cause dans des pathologies de spectre autistique (Splawski et al. 2006), d'épilepsie (Vitko et al. 2005), des pathologies cardiaques (Lalevee et al. 2005) et plus récemment dans des cas d'aldostéronisme primaire (Daniil et al. 2016).

3. Cav3.3

Cette sous-unité est codée par le gène CACNA1I. Elle est activée par des dépolarisations faibles et présente une inactivation voltage-dépendante modérée. Elle diffère des deux autres sous-unités de type T par ses cinétiques d'activation et d'inactivation qui sont plus lentes. Cette sous-unité est exprimée très fortement lors du développement du système nerveux puis son expression diminue jusqu'à disparaître presque complètement chez l'adulte (Yunker et al. 2003). Elle est exprimée dans une sous-catégorie de neurones des ganglions dorsaux rachidiens (Talley et al. 1999; Reynders et al. 2015).

h. Modifications Post-traductionnelles des canaux ioniques

La modulation des canaux ioniques ne passe pas uniquement par des liaisons à des sous-unités régulatrices. Les canaux peuvent également subir une étape de modification post-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi par des glycosylation. Elle consiste en l'ajout de glucides sur les chaînes peptidiques et celle-ci se fait par l'intermédiaire d'enzymes qui peuvent être spécifiquement exprimées dans un sous-type cellulaire. C'est un mécanisme supplémentaire qui apporte de la diversité structurale dans les canaux et, dans une optique d'étude des mécanismes de douleur et des moyens de la traiter, il est important de considérer cette diversité comme un outil pour affiner l'efficacité des traitements.

i. N-Glycosylation

L'un de ces deux mécanismes de glycosylation est la N-glycosylation. Elle consiste en l'ajout d'un oligoside à une Asparagine disponible et présente sur la séquence de la protéine appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X représente n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline pour des raisons d'encombrement stérique). Cette modification peut jouer un rôle important dans la sensibilité des canaux ioniques à certains agonistes ou

antagonistes (Egan et al. 2016), dans l'adressage membranaire des sous-unités des canaux (Hall et al. 2015) et leur trafic intracellulaire (Watanabe, Zhu, et al. 2015). Il faut néanmoins prendre ces informations avec prudence car deux études récentes se contredisent sur les effets des glycosylations sur deux sites sur le canal Cav3.2 (Weiss et al. 2013; Orestes et al. 2013).

ii. O-Glycosylation

Cet autre mécanisme de glycosylation se déroule dans l'appareil de Golgi et il consiste en l'ajout de glucides sur les sérines et les thréonines des chaînes peptidiques après leur passage dans le réticulum endoplasmique où ils peuvent avoir subi une étape de N-glycosylation. Des études récentes ont montré que la présence d'O-glycosylations pouvait moduler les caractéristiques biophysiques des canaux ioniques, en particulier leurs propriétés de gating (Ednie, Harper, and Bennett 2015) suite à la liaison avec des acides sialiques.

iii. Ubiquitination

Un autre mécanisme de modification des canaux ioniques est l'ubiquitination. Ce mécanisme peut prendre place sur les canaux ioniques dépendants du voltage calcique aussi bien que sodique. Il consiste en l'ajout, via une ubiquitine ligase, d'ubiquitine sur des Lysines acceptrices. Le plus connu des rôles de cette ubiquitination est de mener la protéine ainsi modifiée jusqu'au protéasome pour qu'elle y soit dégradée. Dans le cas des canaux sodiques Nav1.7, une dérégulation d'une ubiquitine ligase peut conduire à une hypersensibilité douloureuse thermique et inflammatoire ainsi qu'une sensibilité exacerbée dans le cadre d'une douleur neuropathique induite par la chirurgie SNI (« Spared Nerve Injury ») (Laedermann, Cachemaille, et al. 2013). Les canaux calciques de type-T sont également cible de ce mécanisme, avec par exemple, les canaux Cav3.2 ubiquitinés par WWP1 (Garcia-Caballero et al. 2014). Dans cette étude, l'équipe montre également que la déplétion de la quantité de

déubiquitinase USP5 diminue également la quantité de canaux Cav3.2 et médie une analgésie, appuyant ainsi l'implication des canaux Cav3.2 dans la perception douloureuse.

IV. Nav1.7, Cav3.2 et Douleur

Deux des canaux ioniques présentés dans le chapitre précédent sont d'une importance capitale pour notre étude : Nav1.7 et Cav3.2. Nav1.7 a longtemps été et est toujours une des cibles favorites de la recherche scientifique axée sur le traitement de la douleur de par sa position centrale dans la transmission des messages douloureux.

a. Mutations Nav1.7 chez l'Homme : Insensibilité à la douleur congénitale ou PEPD et Erythromélgie

Cette position centrale est due à la participation de ce canal dans l'apparition d'un potentiel d'action dans les neurones sensoriels périphériques. Ce rôle peut très simplement être mis en avant en étudiant des mutations sur le canal. Ces mutations changent la disponibilité du canal ou son fonctionnement. On peut citer en exemple les patients atteints d'Insensibilité Congénitale à la Douleur (ou CIP) (Danziger and Willer 2009). Ces patients sont porteurs d'une mutation perte-de-fonction sur le gène codant pour la sous-unité principale du canal ionique sodique Nav1.7 qui la rend inactive et sont incapables de ressentir de la douleur aiguë mais restent néanmoins capables de ressentir le toucher, le froid et le chaud. Ils peuvent discriminer ces deux derniers mais sont incapables de ressentir la douleur associée à ces stimuli lorsqu'ils sont nociceptifs. Cette incapacité à ressentir la douleur se traduit aussi par des changements comportementaux lorsque les patients ne sont pas formés à contrôler leur condition physique ou lorsqu'ils ne sont pas conscients de leur état. Les mutations recensées comme cause de la CIP induisent des changements dans la séquence en acide aminés au niveau du domaine 2 de la sous-unité principale (Cox et al. 2006). Outre l'absence d'effets électrogéniques dus à l'absence de Nav1.7, l'étude de la souris KO Nav1.7 a montré une augmentation de l'expression de la Pré-pro-enképhaline qui induit un tonus analgésique important. Il est intéressant de noter que chez les patients homozygotes déficients pour le gène codant pour Nav1.7, l'utilisation de

naloxone, un agoniste des systèmes opioïdes, potentialise les stimuli nocifs et diminue l'analgésie due à l'absence du canal (Figure 15) (Minett et al. 2015).

L'analgésie due à la perte du canal Nav1.7 met en lumière un mécanisme multifactoriel.

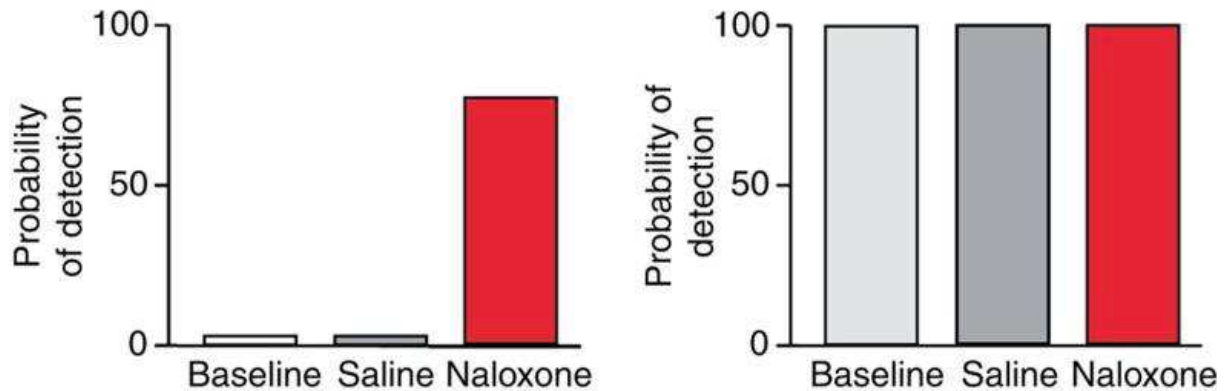


Figure 15 : Probabilité de détection d'une pulsation chaude de 9ms chez un patient atteint de CIP (à gauche) et chez des volontaires sains (à droite). Aucun stimulus n'a été détecté par le patient CIP en condition basale et saline et suite à l'administration de naloxone (12mg) le taux de détection des stimuli est passé à 80% environ. Tiré de (Minett et al. 2015).

A l'inverse, dans le cadre d'une mutation gain-de-fonction sur ce canal, les patients sont atteints de pathologies extrêmement douloureuses comme l'érythromélgie ou le syndrome familial de douleur rectale (ou PEPD pour Paroxysmal Extreme Pain Disorder). L'érythromélgie est caractérisée par une sensation de brûlure intense et d'un œdème associé à des rougeurs. Ces symptômes peuvent survenir suite à une augmentation de la température, à un exercice physique ou à une augmentation de la pression sanguine locale. Les symptômes sont soulagés par l'application de froid sur les zones douloureuses et par une réduction de la pression appliquée quand cela est possible.

Le PEPD est quant à lui caractérisé par des douleurs importantes au niveau des yeux, de la mâchoire et de la zone rectale ainsi que par des rougeurs à ces endroits. La douleur ressentie paraît parfois diffuse pour les patients, pouvant émaner d'une des zones citées jusqu'à une autre. Ces douleurs ne sont pas à prendre à la légère car elles sont régulièrement décrites par des

patientes comme étant pire que les douleurs de l'accouchement (Belfer and Diatchenko 2014). Une mutation induisant une pathologie PEPD a été récemment découverte, les patients de la famille étudiée présentent une résistance aux traitements médicamenteux et une résistance aux effets bénéfiques du froid sur les symptômes (Suter et al. 2015).

Ces deux pathologies se ressemblent dans le fait que les mutations modifient les caractéristiques biophysiques d'inactivation du canal en les ralentissant énormément. Il y a également une modification dans les paramètres d'activation, permettant l'ouverture du canal à des potentiels plus hyperpolarisés et en l'accélération (Choi, Dib-Hajj, and Waxman 2006; Dib-Hajj et al. 2010; Yang, Huang, et al. 2016). Cela conduit à une facilitation de la génération de potentiels d'action suite à des stimulations normalement non douloureuses (allodynie), à une persistance de la sensation de douleur et à une augmentation de son intensité. Ces mutations sont nombreuses et variées (Ahn et al. 2010; Cheng et al. 2011; Faber, Hoeijmakers, et al. 2012; Suter et al. 2015) et sont parfois impliquées dans des neuropathies à petites fibres.

b. L'inhibition de l'activité de Cav3.2 induit une analgésie

Nav1.7 n'est néanmoins pas le seul acteur dans la transmission du message nociceptif. Un grand nombre de canaux sont impliqués et en particulier Cav3.2. Ce dernier, situé à la périphérie joue un rôle de préamplificateur de signalisation de par ses caractéristiques biophysiques. On peut noter que Nav1.7 et Cav3.2 ont une localisation cellulaire et subcellulaire similaire dans le système nerveux périphérique (Francois et al. 2015a; Black et al. 2012). Cav3.2 est activé légèrement avant les canaux sodiques dépendants du voltage dans la succession d'activation menant à la génération d'un potentiel d'action. De fait, il permet de potentialiser la détection de stimuli qui seraient normalement incapables d'induire un potentiel d'action en permettant une dépolarisation de la cellule suffisante pour l'activation des canaux sodiques. L'importance des canaux de type T dans la transmission des messages douloureux a été mise en avant pour la première fois par l'équipe de Todorovic (Todorovic et al. 2001). Depuis, beaucoup d'équipes

ont confirmé cette implication des canaux de type T, en particulier Cav3.2, dans les douleurs mécaniques, thermiques et viscérales aussi bien dans un cadre de douleur aiguë que dans un cadre de douleur chronique (Kim et al. 2003; Bourinet et al. 2005; Barbara et al. 2009; Marger et al. 2011; Francois et al. 2013; Obradovic et al. 2014; Kerckhove et al. 2014) (**Figure 16 et 17**). Parmi ces études, des expériences utilisant des animaux déficients pour Cav3.2 ont montré que l'absence du canal abolissait l'action analgésique d'inhibiteurs spécifiques des canaux de type T plaçant Cav3.2 plutôt que les deux autres isoformes au-devant de la scène pour l'étude de la douleur. De plus, ces études mettent en avant une coopération dans l'effet analgésique entre plusieurs cibles, on peut citer par exemple le cas d'un inhibiteur des récepteurs cannabinoïdes CB2, le NMP-7, dont les effets sont dépendants des canaux Cav3.2 (Berger et al. 2014). Cav3.2 est donc une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies de traitement de la douleur.

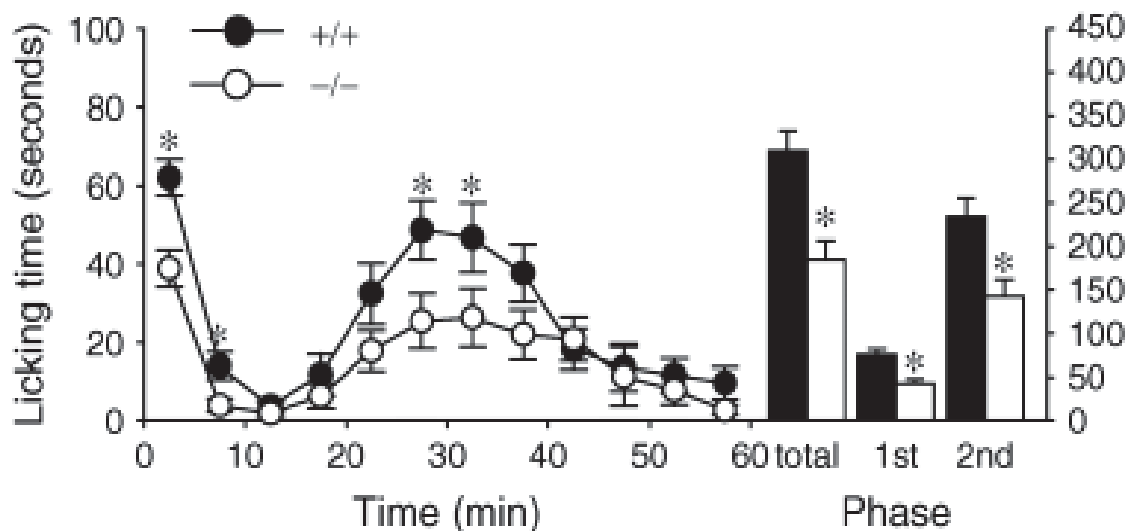


Figure 16 : Test d'injection intraplantaire de formaline chez des animaux sauvages (en noir) et déficients pour Cav3.2 (en blanc). Les valeurs représentent le temps passé à se lécher la patte injectée ou à la mordre par tranche de 5min. On peut voir que les animaux déficients pour Cav3.2 ont une réaction diminuée à la première et à la deuxième phase du test à la formaline. Tiré de (Choi et al. 2007)

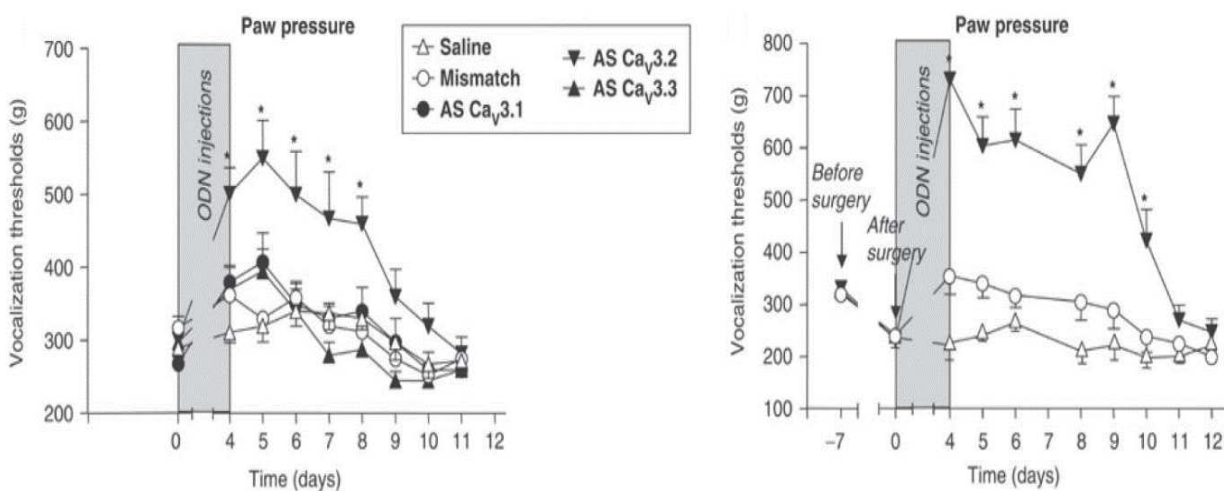


Figure 17 : Effet analgésique d'une injection intrathécale d'oligonucléotides antisens dirigés contre les isoformes des canaux de type T chez des rats. On soumet les animaux à une pression croissante sur la patte arrière jusqu'au seuil douloureux où ils vocalisent. A gauche, des animaux sauvages, à gauche des animaux ayant subi une chirurgie CCI (Chronic Constriction Injury) induisant une douleur neuropathique. Les animaux injectés avec les oligonucléotides antisens dirigés contre Cav3.2 ont un seuil de tolérance plus élevé à la douleur. Tiré de (Bourinet et al. 2005).

V. Nav1.7 et Cav3.2 sont des cibles thérapeutiques

Nav1.7 est vu comme un canal servant d'amplificateur de signal pour permettre la transmission des potentiels d'actions suite à la perception d'un stimulus par les récepteurs placés sur les neurones sensoriels. C'est aussi le cas de Cav3.2.

Bien que des antagonistes Nav1.7 soient déjà utilisés dans une optique de traitement de la douleur ou dans une optique de prévention de la douleur d'une intervention chirurgicale, une petite quantité des molécules étudiées arrivent au point où elles peuvent être testées sur l'Homme à cause de potentiels effets sur d'autres cibles. Amgen, AstraZeneca, Convergence, Merck, Abbott, Pfizer, et Xenon ont déjà proposé des petites molécules inhibitrices de Nav1.7 à visée analgésique mais avec peu d'informations sur la sélectivité de leurs composés sur les sous-types de canaux sodiques dépendants du voltage.

a. Pharmacologie existante pour les Navs

i. Tétrodontoxine

Le bloqueur le plus connu des canaux sodiques est sans conteste la Tétrodontoxine (TTX), issue des poissons de la famille des Tétrodons. Celle-ci a été étudiée en 1964 sur les conductances sodiques dans l'axone géant de homard (Narahashi, Moore, and Scott 1964). Elle inhibe la génération de potentiels d'action dans les nerfs en se liant au site 1 au niveau du pore des canaux sodiques dépendants du voltage et en l'obturant (Bane et al. 2014). L'utilisation de cette toxine animale a permis la distinction entre deux types de canaux sodiques, sensibles à la TTX d'une part (Nav1.1-4, Nav1.6 et Nav1.7) et résistant à celle-ci d'autre part (Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9). La TTX a été testée sur l'Homme en injection sous-cutanée dans le cadre de traitements contre les douleurs dues au cancer (Hagen et al. 2011).

ii. Batrachotoxine

La batrachotoxine est, à l'inverse de la TTX, un agoniste des canaux sodiques de manière large. Elle a été découverte pour la première fois dans les sécrétions cutanées de grenouilles venimeuses. Celle-ci se fixe sur le site 2 des canaux sodiques au niveau du segment S6 du domaine 1 et 4 du canal bien qu'il y ai des études qui mettent en avant d'autres sites d'interaction (Du et al. 2011). En se faisant, elle bloque les canaux sodiques dans un état ouvert et modifie la spécificité de conduction des canaux, changeant les concentrations intracellulaires en ion ainsi que le potentiel membranaire de la cellule. Cela a pour finalité d'empêcher la « remise à zéro » du neurone pour un autre potentiel d'action et résulte en une paralysie. Une étude récente ont montré qu'en utilisant des formes tronquées de cet agoniste des canaux sodiques, on pouvait obtenir des inhibiteurs des canaux sodiques (Toma et al. 2016).

iii. Veratridine

Cet alcaloïde issu des plantes de la famille des Liliacées est un agoniste des canaux sodiques dépendants du voltage. Il se fixe sur le site 2 des canaux sodiques et agit en diminuant la conductance du canal et en abolissant l'inactivation des canaux (Farrag, Bhattacharjee, and Docherty 2008). Cette toxine ayant un profil d'action proche de celui de la batrachotoxine, il n'est pas exclu qu'il soit possible d'isoler un variant de la veratridine avec un effet inhibiteur.

iv. Anesthésiques locaux

Les anesthésiques locaux sont nombreux mais ont tous en commun d'inhiber la transmission des messages nerveux le long des nerfs, pouvant donc induire une analgésie ou une paralysie. L'utilisation de Lidocaïne (ou xylocaïne) ou de ses dérivés en application locale provoque une analgésie de durée variable en fonction du mode de libération utilisé. Le composé agit comme un bloqueur du pore du canal en se liant sur le segment S6 du domaine 4. Il agit principalement sur Nav1.7 et Nav1.4 (Chevrier, Vijayaragavan, and Chahine 2004; Makielski et al. 1999) mais

il affecte aussi dans une moindre mesure d'autres isoformes de canaux sodiques. Ces anesthésiques locaux ont par exemple un effet sur le canal sodique cardiaque Nav1.5 ce qui limite leur utilisation en thérapie. L'utilisation d'un dérivé de la lidocaïne qui ne passe pas les membranes (QX-314) est possible en faisant passer le composé dans la cellule à travers le pore des canaux TRPV1 après leur activation. QX-314 induit alors une analgésie par bloc nerveux spécifique des fibres C exprimant TRPV1 (Binshtok et al. 2009). La même approche est possible en utilisant des activateurs d'autres canaux comme TRPA1 et TRPM8 pour les fibres C mais également pour les fibres A en utilisant l'activation du récepteur Tlr5 (Toll-like receptor 5) (Brenneis et al. 2014; Xu et al. 2015; Nakagawa and Hiura 2013).

v. Saxitoxine

La saxitoxine, ou plutôt les saxitoxines, sont des alcaloïdes issus d'algues dinoflagellées. Il en existe plus de 20 formes différentes mais elles ont toutes en commun d'avoir un effet inhibiteur de l'activité des canaux sodiques. Cet effet inhibiteur passe par un blocage du pore du canal. Malgré une activité à des concentrations nanomolaires sur certains canaux sodiques, les saxitoxines ont un effet faible sur Nav1.7 contrairement à la TTX (Walker et al. 2012).

La **Figure 18** récapitule les sites de liaison des différentes familles de toxines sur la structure des canaux sodiques dépendants du voltage

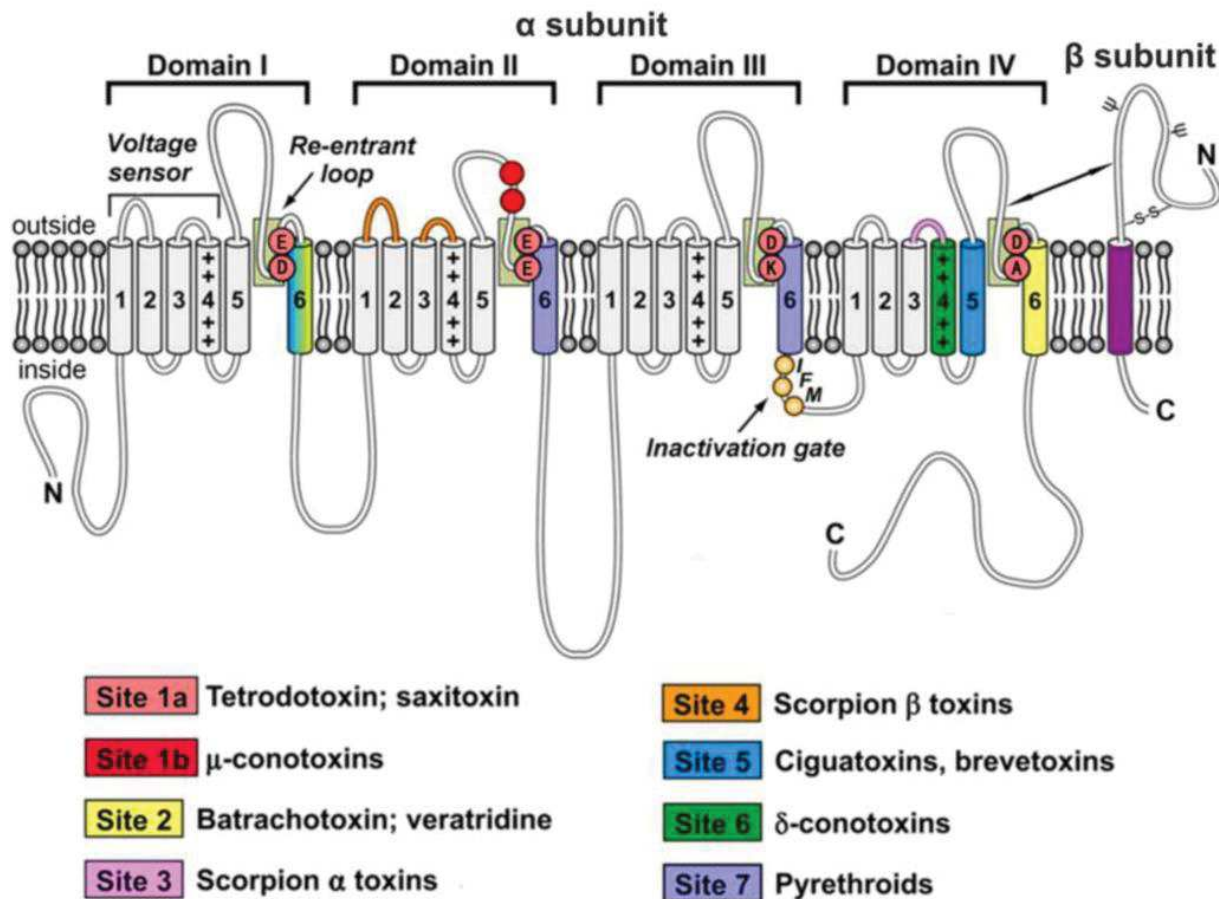


Figure 18 : Diagramme de la structure et de la pharmacologie des canaux Nav. Tiré de (Zhang et al. 2013)

b. Pharmacologie existante pour les Cavs

i. Inhibiteurs Merck : Série des molécules TTA (T-Type Antagonist)

Le TTA-P2 est une petite molécule qui est un inhibiteur sélectif des canaux calciques de type T. Il bloque le canal dans son état inactivé et a montré des effets anti-hyperalgésiques après injection intrapéritonéale dans un contexte de diabète et dans un contexte de douleur inflammatoire induite par la formaline (Choe et al. 2011). Cet effet anti-hyperalgésique est perdu dans des animaux déficients pour le canal Cav3.2.

Le TTA-A2 est également une petite molécule inhibitrice des canaux calciques de type T. Son mode d'action est proche de celui du TTA-P2, avec une plus grande affinité pour les canaux

calciques dans leur état inactivé (Francois et al. 2013; Kraus et al. 2010). Son potentiel analgésique a été testé dans un modèle de douleur viscérale du syndrome du côlon irritable et a montré que le potentiel analgésique de cette molécule était dépendant des canaux Cav3.2.

ii. Mibefradil

Le mibefradil est une molécule inhibitrice des canaux calciques qui ne cible pas uniquement les canaux de type T (Martin et al. 2000; Jimenez et al. 2000; Bezprozvanny and Tsien 1995). Cette drogue a été approuvée par la Food and Drugs Administration américaine pour une mise sur le marché en tant que traitement pour les douleurs induites par les angines de poitrine mais a été retirée par la société Roche suite à des cas de décès dus à des effets indésirables sur des cibles collatérales.

iii. Z944

Le Z944 est une petite molécule inhibitrice spécifique des canaux calciques de type T développée par la société Zalicus. Elle a été testée comme traitement antiépileptique chez le rat (Casillas-Espinosa et al. 2015; Tringham et al. 2012; LeBlanc et al. 2016) mais a aussi été testée chez l'Homme (phase 1a et 1b) comme analgésique suite à l'application locale de capsaïcine mimant les effets d'une douleur neuropathique ou après exposition à de la lumière UV (mimant une douleur inflammatoire) avec des résultats prometteurs. Une étude de phase II est en cours.

Lors de cette étude de la phase II, un effet hallucinogène non-désagréable a été rapporté par les patients à la plus haute dose testée (Communication personnelle au laboratoire du Dr. Terry Snutch, Scientifique à la base de la découverte du Z944).

iv. Ni²⁺

Cet ion divalent a été caractérisé comme inhibiteur des courants de type T (Fox, Nowycky, and Tsien 1987) et son site de liaison, l'Histidine 191, a été dévoilé suite à des études de mutants ponctuels du canal Cav3.2 (Kang et al. 2006). Ces études ont également montré que Cav3.2 était plus sensible au Nickel que les deux autres isoformes de type T. L'injection de Nickel par voie intrathécale diminue les comportements douloureux observés lors de l'injection intraplantaire de formaline chez le rat (Cheng et al. 2007).

v. Kurtoxin

L'activité de cette toxine issue d'un venin de scorpion a tout d'abord été caractérisée sur les canaux Cav3.1 (Chuang et al. 1998) mais une autre étude a montré qu'elle pouvait affecter d'autres isoformes de canaux calciques dépendants du voltage. Son activité inhibitrice via modification du gating du canal est dépendante du voltage et on peut noter également que cette toxine ralentie considérablement les cinétiques d'activation (Sidach and Mintz 2002). Cette toxine est très intéressante dans le fait qu'elle touche aussi les canaux sodiques dépendants du voltage (Olamendi-Portugal et al. 2002), elle joue un double rôle sur les courants sodiques enregistrés dans des myocytes murins, agoniste aux potentiels proches du potentiel de membrane et antagoniste aux potentiels très dépolarisés (Zhu et al. 2009). La présence des canaux sodiques Nav1.6 a été confirmée par la même équipe dans ces myocytes par utilisation d'une souris Knock-Out et d'immunofluorescence (Zhu et al. 2010).

vi. EGCG

L'EGCG (epigallocatechin-3-gallate) est un polyphénol très présent dans le thé vert. Il possède un fort pouvoir anti-oxydant. L'application d'EGCG à des cellules exprimant de manière recombinante Cav3.1 ou Cav3.2 a donné des résultats intéressants, une inhibition de l'activité du canal pour Cav3.1 et une augmentation de cette activité pour Cav3.2 (Ranzato et al. 2014).

Il est suggéré également que cet effet agoniste de Cav3.2 passe par une inhibition des canaux potassiques Kv1.1 induisant une dépolarisation de la membrane suffisante pour activer Cav3.2. Les canaux de type T ne sont pas les seuls affectés par ce composé, les canaux TRPV1 et TRPA1 de neurones des ganglions dorsaux rachidiens sont activés par l'EGCG après incubation (Kurogi et al. 2015). Malgré le fait que l'EGCG induise une augmentation de l'activité de Cav3.2 (normalement liée à la douleur), il montre des effets anti-nociceptifs après une prise chronique dans le cadre d'un cancer des os en réduisant drastiquement l'expression de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (Li and Zhang 2015) et d'une lésion de la moelle épinière en diminuant l'hyperalgésie thermique (Alvarez-Perez et al. 2016; Xifro et al. 2015).

c. Venins

Les animaux venimeux (serpents, scorpions, araignées, cônes marins, etc...) sont souvent regardés avec répulsion ou peur. Malgré tout, ils restent fascinants pour la recherche, ils représentent une source gigantesque de molécules et de protéines que la nature a pris le temps de générer pour nous. Ces composés sont utilisés depuis des années pour décrypter et étudier le rôle de récepteurs physiologiques et certaines des molécules étudiées ont même présenté des propriétés intéressantes dans une optique thérapeutique. Parmi les molécules contenues dans les venins, on retrouve des petites molécules, des alcaloïdes, des polyamines, des enzymes, des peptides et des protéines. Des analyses de protéomique ont montré que le venin d'une araignée ou d'un cône marin pouvait contenir plus de 1000 peptides différents et que les venins de scorpions pouvaient en contenir quelques centaines. Malgré tout, ces chiffres impressionnants ne sont rien en comparaison de la diversité des composés retrouvés chez les araignées. Il en existe plus de 42000 espèces répertoriées et encore beaucoup nous sont inconnues. Si on prend en compte le fait que chacun de ces venins contient environ 200 peptides (estimation basse), nous arrivons tout de même à plusieurs millions de biomolécules actives qui ont été améliorées au fil du temps par la nature et la pression de sélection sur les espèces (King 2011). De plus, les

peptides retrouvés dans ces venins sont en général actifs à des concentrations bien moindres que pour les petites molécules, les pressions de sélection exercées par l'environnement ayant modifié les venins jusqu'à avoir des grandes spécificités et efficacités contre les cibles moléculaires d'intérêt. Parmi ces peptides, certains ont comme cible les canaux ioniques.

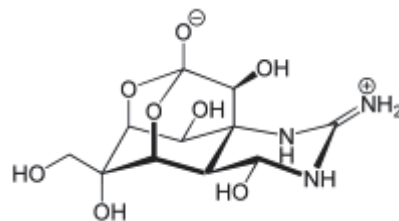
i. Toxines agissant sur des canaux ioniques

La plupart des venins ont évolué dans le sens d'une facilitation de la prédation, mais avec une visée spécifique dépendant du comportement de prédation ou de défense de l'animal (Dutertre et al. 2014). Par exemple, l'immobilisation d'une proie par un animal réduit grandement les risques encourus pour lui et facilite la capture de la proie. Dans ces cas-là, les venins et donc les toxines qui les constituent doivent agir rapidement et influencer directement la mobilité et la coordination des mouvements de la proie. Pour obtenir cet effet, le moyen le plus rapide est d'agir directement sur les canaux ioniques des cellules nerveuses situées à la périphérie.

1. Non peptidiques

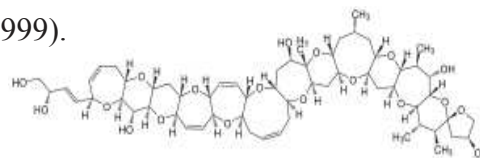
a. Tétrodotoxine

L'exemple de la Tétrodotoxine a déjà été cité précédemment. Elle agit principalement sur les canaux sodiques dépendants du voltage et peut causer la mort après ingestion. Les poissons dans lesquels on la retrouve sont insensibles à son effet car les canaux sodiques chez les poissons sont différents des canaux mammifères.



b. Ciguatoxine

Tout comme la Tétrodotoxine, la Ciguatoxine (CTX) ou plutôt les CTXs sont retrouvées dans les poissons où elles s'accumulent après qu'ils aient ingéré les algues qui la produisent. La CTX est lipophile et peut passer à travers la barrière hémato-encéphalique, causant à la fois des effets périphériques (gastro-intestinaux et cardiovasculaires entre autres) et des effets centraux. Cette toxine est très résistante à la dégradation et n'est pas détruite après cuisson des organes concentrés en toxine (Swift and Swift 1993). Les effets néfastes de ces toxines passent par leur activité sur les canaux sodiques et potassiques dépendants du voltage (Kopljar et al. 2016; Zimmermann et al. 2013; Strachan, Lewis, and Nicholson 1999).



2. Peptidiques

Dans les venins, on trouve également des peptides, ceux-ci ont une spécificité plus grande que les petites molécules et ont des procédés de fabrication plus « simples ». De plus, nous sommes capables de changer la séquence en acides aminés de ces peptides pour changer leur spécificité et ainsi essayer d'approcher d'un peptide avec exactement l'activité qui serait intéressante dans un cadre thérapeutique (Murray et al. 2015).

a) Motif ICK (Inhibitory Cystine Knot)

Les peptides à motif ICK contiennent un assemblage particulier de 3 ponts disulfure reliant les 6 cystéines typiques de ce motif : $CX_{3-7}CX_{3-6}CX_{0-5}CX_{1-4}CX_{4-13}C$ où X peut être n'importe quel acide aminé (Kozlov and Grishin 2005). Les ponts disulfures se forment entre la 1^{ère} et la 4^e Cystéine, la 2^e et la 5^e, et la 3^e et la 6^e. La plupart des toxines peptidiques retrouvées dans les venins des cônes marins et des araignées présentent ce motif. Il confère une structure tridimensionnelle particulière aux toxines qui les rendent très résistantes à la dégradation (Daly and Craik 2011). Comme elles sont les principales actrices du venin sur les canaux ioniques,

ces toxines peptidiques sont activement étudiées dans l'espoir de trouver des traitements à diverses conditions pathologiques (Baeriswyl and Heinis 2013). A l'heure actuelle, ArachnoServer, une base de données regroupant des informations sur les toxines issues de venins d'araignées (<http://www.arachnoserver.org>) recense 177 toxines à motif ICK (avec la recherche « ICK ») sur un total de 1525 (Herzig et al. 2011) (**Figure 18**). Ces toxines proviennent de plus de 90 espèces différentes.


ArachnoServer
SPIDER TOXIN DATABASE

search advanced search

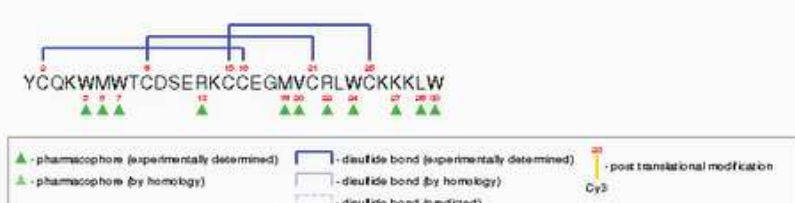
HOME
SEARCH
BROWSE
BLAST
SPIDERP
TOX|NOTE
user manual

Toxin Name	β/ω-theraphotoxin-Tp2a
Source Species	<i>Thrixopelma pruriens</i> (Green velvet tarantula)
Toxin Group	Theraphosid toxin
Description	<p>β/ω-TRTX-Tp2a blocks both tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant human voltage-gated sodium (Nav) channels by shifting the voltage dependence of channel activation to more positive potentials. The toxin is at least 100-fold more potent against Nav1.7 than other human Nav channel subtypes. Has no significant effect on Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, and Kv2.1 channels. Also inhibits activation of human Cav3.1 channels at much higher doses. The pharmacophore shown in the figure below, which is comprised exclusively of hydrophobic and cationic residues, is for interaction with Nav1.5 channels.</p> <p>The binding site(s) for β/ω-TRTX-Tp2a on Nav channels remains to be unequivocally determined, but Nav1.5 chimeras indicate that it does not bind to the pharmacologically defined Nav channel sites 3 or 4. Neutralization of gating charges in the voltage sensor (S4) of domain II of Nav1.2 prevents the effect of the toxin on gating current. Thus, it has been suggested that the toxin acts by trapping the voltage sensor of Nav channel domain II in the resting state, impeding outward gating movement of the II S4 transmembrane segment of the channel.</p> <p>β/ω-TRTX-Tp2a is lethal to rats when injected intravenously at 1.0 mg/kg (although doses of 0.01 and 0.1 mg/kg are well tolerated) or by intrathecal administration at 0.1 mg/kg. The toxin was not efficacious in rodent models of acute and inflammatory pain when administered intravenously at 0.01 or 0.1 mg/kg or intrathecally at 0.001 or 0.01 mg/kg. The latter intrathecal dose transiently reduced muscle tone and impaired motor function even though systemic levels at 4 hours after toxin administration were below the level of detection (3 nM).</p> <p>Toxins with very similar primary structure have been reported from two different theraphosid spiders, <i>Grammostola rosea</i> (α-TRTX-Gr2a, a weak blocker of mechanosensitive channels in rat astrocytes (Kd ~ 6 μM)) and <i>Paraphysa scrofa</i> (α-TRTX-Ps1a, a blocker of vertebrate voltage-gated potassium channels Kv4.2 and Kv4.3).</p>
Discovered	2002

This toxin last updated on Feb 09, 2012



Sex: female, Prosoma length: 27mm
Photo courtesy of Bastien Rest
Use of photo governed by creative commons noncommercial license



▲ - pharmacophore (experimentally determined)	 - disulfide bond (experimentally determined)	 - post translational modification
▲ - pharmacophore (by homology)	 - disulfide bond (by homology)	 - Cy3
	 - disulfide bond (predicted)	

Average Reduced Mass: 2832.04	Average Oxidized Mass: 2820.09	Isoelectric point (pI): 8.89
Monoisotopic Reduced Mass: 2829.71	Monoisotopic Oxidized Mass: 2823.07	Extinction coefficient (280nm): 23905.00

- + Taxonomy
- + Biological Activity
- + Accessions
- + Literature References
- + Protein Information
- + Sequences

Figure 18 : Exemple d'une page Internet du site ArachnoServer 3.0 : Page de la Protoxin II.

Parmi ces toxines à motif ICK, certaines ont une très forte homologie de séquence, j'ai choisi ici de présenter les toxines dont la séquence est proche de celle étudiée dans cette thèse.

Les Phrixotoxines 1, 2 et 3 font partie de cette famille de toxines ICK (**Figure 19**). Elles ont toutes été purifiées depuis le venin de l'araignée *Phrixotrichus auratus* (Diochot et al. 1999) et testées pour leur activité sur des canaux dépendants du voltage potassiques et sodiques (Chagot et al. 2004; Bosmans et al. 2006).

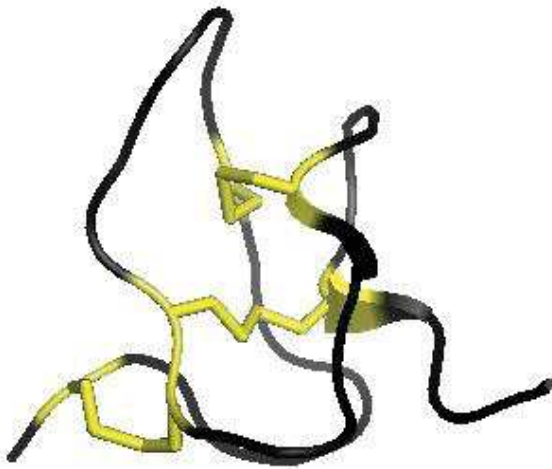


Figure 19: Structure de la Phrixotoxine 1 (PaTx1) faite en utilisant le logiciel PyMol à partir de la structure 1V7F de la base PDB.. Fichier issu de (Chagot et al. 2004)

La Protoxine 2 (ProTxII) qui a été purifiée à partir du venin d'une autre araignée (*Thrixopelma pruriens*) (Middleton et al. 2002) (**Figure 20**). Tout d'abord caractérisée pour son activité inhibitrice de Nav1.8, elle montre également une activité inhibitrice sur plusieurs autres isoformes de canaux dépendants du voltage telles que Nav1.2, Nav1.5, Nav1.7 et Cav3.1 (Edgerton, Blumenthal, and Hanck 2010; Park et al. 2014; Priest et al. 2007; Xiao et al. 2010; Bladen et al. 2014; Edgerton, Blumenthal, and Hanck 2008). Une équipe a montré par l'utilisation de spectroscopie RMN que la liaison de la toxine à la membrane était importante pour son activité sur le canal sodique Nav1.7 en facilitant l'accès de la toxine à son site de liaison sur le senseur de voltage du canal (Henriques et al. 2016). Cette toxine a été testée sur des modèles de douleur aiguë et inflammatoire chez des rongeurs mais n'a pas généré

l'analgésie attendue même si l'application de ProTxII sur des fibres C (à des concentrations où les fibres A β ne sont pas atteintes) bloque la propagation des potentiels d'action (Schmalhofer et al. 2008).

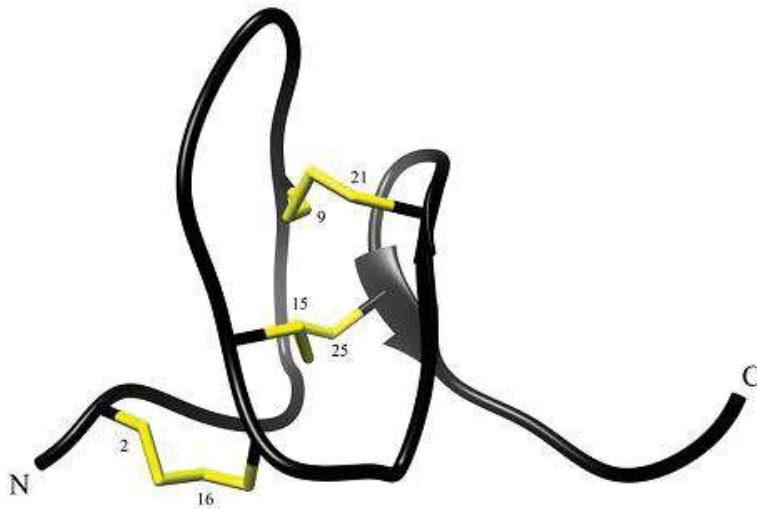


Figure 20 : Représentation de la ProTxII. Les annotations N et C représentent les extrémités N et C-terminales. Les barres jaunes correspondent aux trois ponts disulfures formés entre les Cystéines de la protéine. Celles-ci sont marquées par un numéro indiquant leur position dans la séquence. Cette structure est très proche de celle de la PaTx1. Tiré de (Park et al. 2014).

La GpTx1, isolée de l'araignée *Grammostola porteri*, présente une activité contre un grand nombre de sous-unités des canaux sodiques dépendants du voltage (Nav1.4, Nav1.5, Nav1.7) (Murray et al. 2015; Murray et al. 2016). Cette toxine ICK a été travaillée pour améliorer sa spécificité contre une isoforme particulière des canaux sodiques dépendants du voltage, Nav1.7. La société qui l'a découverte a utilisé l'ingénierie des peptides avec une approche SAR (Structure-Activity Relationship pour Relation Structure-Activité) pour modifier la séquence de la toxine de façon à diminuer également sa spécificité pour les isoformes de canal sodique non-désirée (Nav1.4 et Nav1.5). Une autre équipe a récemment publié une méthode de test *in vitro* à grande échelle pour les toxines à potentiel analgésique en utilisant GpTx1 comme contrôle d'effet inhibiteur sur Nav1.7 (Deuis, Wingerd, et al. 2016). Cette méthode permet de tester rapidement un nombre intéressant de composés *in vivo*.

b) Mélittine

La mélittine est le principal composant du venin des abeilles, c'est un activateur de la phospholipase A2 mais aussi un inhibiteur de l'activité de la protéine kinase C. Elle interagit également avec l'ATPase Na/K (Kamanina et al. 2016). Par elle-même, la mélittine peut aussi jouer le rôle d'un facteur lytique des cellules en activant des mécanismes d'apoptose et de nécrose comme les caspases et les métalloprotéinases (Gajski and Garaj-Vrhovac 2013). Elle est également impliquée dans la mise en place de nombreux mécanismes de douleur suite à une pique d'abeille comme l'activation des canaux sodiques résistants à la TTX (Chen et al. 2016).

c) Autres motifs

Parmi les toxines issues d'araignées on peut citer également les Huwentoxines, retrouvée dans le venin d'*Haplopelma schmidti*. Dans cette famille de toxines, la plupart présentent un motif ICK mais quelques-unes d'entre elles ont une autre structure (**Figure 21**). La Huwentoxine 2 par exemple possède un motif DDH (disulphide-directed β -hairpin) caractérisé par une répartition des ponts disulfures selon ce schéma : C1-C3 , C2-C5 et C4-C6 ainsi qu'une épingle à cheveux β antiparallèle (Shu and Liang 1999). La Huwentoxine 11 (HWTX XI aussi appelée κ -theraphotoxin-Hh1a) possède un autre motif, le repliement Kunitz (Kunitz fold) caractérisé par une courte hélice 3_{10} N-terminale, une hélice α C-terminale et un appariement des cystéines selon ce schéma : C1-C6, C2-C4 et C3-C5 (Peng, Lin, and Liang 2006; Tang et al. 2010). Une autre toxine présentant ce motif Kunitz, la mambaquaretin, possède une sélectivité d'action très intéressante dans le fait qu'elle ne bloque que les récepteurs à la vasopressine de type 2 (V2R) sans affecter d'autres récepteurs couplés aux protéines G ou d'autres canaux ioniques (parmi les principaux canaux cardiaques). Une étude récente met également en avant une toxine isolée dans le cocktail de protéines injecté dans les hôtes par les tiques pour obtenir leur repas sanguin. Celle-ci, nommée ISTX-I présente une activité micromolaire sur le canal Nav1.7 et n'est pas active sur les autres isoformes de canaux sodiques. En plus de cette activité spécifique,

la structure de la toxine est intermédiaire entre les structures ICK et DDH et est un outil intéressant pour comprendre les mécanismes évolutifs des toxines (Rong et al. 2016).

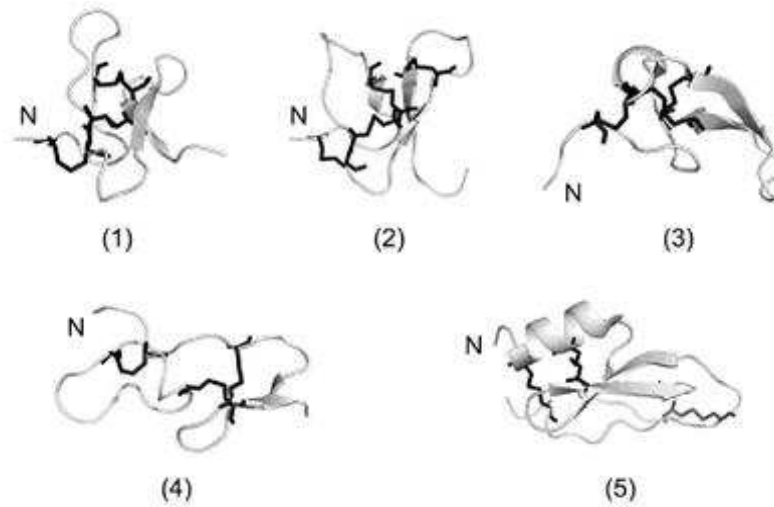


Figure 21 : Représentation de la structure de diverses toxines. Les toxines 1 à 3 sont des toxines à motif ICK : (1) Huwentoxine-IV, (2) Hexatoxine-Hi1a, (3) ω -atracotoxine-Hv1. La Huwentoxine 2 (4) présente un motif DDH et la Huwentoxine 11 (5) présente un repliement Kunitz. Les cystéines de chaque toxine sont marquées en noir.

VI. Projet de thèse

L'étude des canaux ioniques passe par la possibilité de détecter leur activité puis de la moduler via des agents pharmacologiques. Depuis leur découverte, l'utilisation de ligands marqués tels que les toxines a rendu possible l'avancée des connaissances dans des domaines variés de la physiologie. Avec l'avancée de ces connaissances, il y a un besoin de plus en plus important de ligands spécifiques des différentes isoformes de canaux pour pouvoir les étudier plus précisément. Dans l'équipe du Dr. Bourinet, l'un des projets est de trouver un inhibiteur spécifique des canaux calciques de type T à partir de toxines issues de venins. L'implication des canaux de type T dans la douleur a notamment été l'objet de la publication d'une revue dans le journal francophone « Douleur et Analgésie ».

Le but de cette thèse est d'étudier la toxine Psp3Tx1 isolée par le laboratoire dans le venin d'une tarentule pour son activité sur le canal ionique Cav3.2. La détermination de la séquence de cette toxine a montré qu'elle était très proche d'autres toxines connues pour leur activité sur des sous-familles de canaux ioniques autres que les canaux calciques. L'objectif majeur de ce travail de thèse a été d'établir un profil de sélectivité de Psp3Tx1 puis d'explorer les possibilités d'utilisation *in vivo* de cette toxine en tant qu'analgésique.

VII. Revue « Rôle des canaux calciques de type T dans les douleurs neuropathiques »

Rôle des canaux calciques de type T dans les douleurs neuropathiques

Role of T-Type Calcium Channels in Neuropathic Pain

P. Lesport · E. Bourinet

Reçu le 29 novembre 2016 ; accepté le 30 novembre 2016
© Lavoisier SAS 2016

Résumé La douleur est une plainte fréquente accompagnant de multiples pathologies. Parmi elles, on dénombre un nombre important de neuropathies douloureuses avec des étiologies diverses clairement identifiées (séquelles de chirurgie, effet indésirables de chimiothérapie, diabète...), mais également des syndromes douloureux plus diffus comme la fibromyalgie. Plus généralement, la douleur est une des premières conséquences de la majorité des maladies congénitales. Malgré son importance pour la qualité de vie, la prise en charge de la douleur est limitée à des médicaments qui sont soit peu efficaces, soit avec un mauvais rapport bénéfice/risque. Comme aucun nouveau concept pharmacologique n'a abouti à de nouveaux analgésiques dans les dernières années, l'identification de telles molécules antidouleur innovantes est nécessaire et, pour y parvenir, l'identification de nouvelles cibles dans les voies de la perception douloureuse est la première étape. Ainsi, les études sur les canaux ioniques des réseaux neuronaux des voies de la douleur sont extrêmement actives. C'est particulièrement le cas pour les canaux ioniques des neurones sensoriels périphériques présents dans les ganglions de la racine dorsale (*dorsal root ganglia* ou DRG en anglais) connus pour exprimer une panoplie unique de ces canaux, sans oublier ceux présents aux niveaux spinal et supraspinal. Parmi ces canaux ioniques, nous et d'autres avons pu mettre en évidence le rôle des canaux calciques activés par des faibles dépolarisations à différentes étapes de la perception et de l'intégration des informations douloureuses. Ces canaux, en étant actifs aux environs du potentiel de repos des neurones, ont des caractéristiques biophysiques adaptées pour amplifier et faciliter la génération de potentiels d'action et donc l'activité des neurones où ils sont présents. Dans cette revue, nous présenterons les connaissances actuelles sur le rôle de ces canaux dans la perception et la modulation de la douleur.

Mots clés Canaux calciques · Douleur · Mécanorécepteurs à bas seuil · Froid · Neuropathie

Abstract Pain is a quite frequent complaint accompanying numerous pathologies. Among these pathological cases, numerous neuropathies are retrieved with identified etiologies (chemotherapies, diabetes, surgeries...) and also more diffuse syndromes such as fibromyalgia. More broadly, pain is one of the first consequences of the majority of inherited diseases. Despite its importance for the quality of life, current pain management is limited to drugs that are either old, or with a limited efficacy or that possess a bad benefit/risk ratio. As no new pharmacological concept has led to new analgesics in the last decades, the discovery of new medications is needed, and to this aim the identification of new druggable targets in pain transmission is a first step. Therefore studies of ion channels in pain pathways are extremely active. This is particularly true with ion channels in peripheral sensory neurons in Dorsal Root Ganglia (DRG) known now to express unique sets of these channels. Moreover, both spinal and supra spinal levels are clearly important in pain modulation. Among these ion channels, we and others revealed the important role of low voltage-gated calcium channels in cellular excitability in different steps of the pain pathways. These channels, by being activated nearby resting membrane potential, have biophysical characteristics suited to facilitate action potential generation and rhythmicity. In this review we will present the current knowledge on the role of these channels in the perception and modulation of pain.

P. Lesport · E. Bourinet (✉)
Laboratories of excellence,
ion channel science and therapeutics,
Institut de génomique fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille,
F-34094 Montpellier, France
e-mail : emmanuel.bourinet@igf.cnrs.fr

CNRS UMR5203, Montpellier, France

INSERM, U661, Montpellier, France

Université de Montpellier, Montpellier, France

Keywords Calcium channels · Pain · Low-threshold mechanoreceptors · Cold · Neuropathy

Composition moléculaire des canaux calciques dépendants du potentiel

Bien que de nombreuses conductances ioniques contribuent à l'excitabilité neuronale, les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire sont uniques, en étant à la fois impliqués directement dans la genèse du potentiel d'action, mais également en déclenchant une variété de réponses intracellulaires activées par l'influx d'ions calcium. Ces cascades intracellulaires incluent l'activation d'enzymes, la transcription génique, ou encore la libération de neurotransmetteurs depuis les terminaisons présynaptiques. La plupart des neurones possèdent plusieurs types de canaux calciques qui ont été classifiés en deux catégories suivant leur seuil d'activation par la dépolarisation : les canaux à haut seuil et par opposition les canaux à bas seuil d'activation qui nous intéressent dans cette revue [1]. Les canaux calciques à haut seuil d'activation incluent les canaux de type N, P, Q et R qui sont pharmacologiquement distincts. Ce sont tous des hétéromultimères composés d'une sous-unité $\alpha 1$ qui définit le type du canal, plus une des quatre différentes sous-unités β et une des quatre différentes sous-unités $\alpha 2$ - δ . Les canaux calciques à bas seuil d'activation (aussi connus sous le nom de type T) semblent constitués uniquement d'une sous-unité $\alpha 1$ car l'expression de cette sous-unité seule dans un système recombinant permet de retrouver les propriétés des canaux natifs. De plus, aucune preuve de l'existence d'une sous-unité auxiliaire essentielle à l'activité n'a été rapportée à ce jour. Le séquençage de plusieurs génomes de mammifères montre qu'il existe dix différentes sous-unités $\alpha 1$ des canaux calciques qui sont réparties dans trois sous-familles (Cav1, Cav2, and Cav3) en fonction de leur homologie de séquence. Elles correspondent aux canaux calciques natifs fonctionnellement identifiables dans les cellules excitables par les techniques d'électrophysiologie. Ces sous-unités présentent une topologie transmembranaire commune, comprenant quatre domaines homologues chacun composés de six hélices transmembranaires (de S1 à S6) putatives plus une boucle réentrante formant le pore. Les quatre domaines sont reliés par des grandes régions cytoplasmiques qui sont des plateformes moléculaires pour les kinases et qui forment les sites d'interaction pour de multiples protéines régulatrices comme les sous-unités β des protéines G, ou les sous-unités β des canaux calciques dans le cas des sous-unités $\alpha 1$ des canaux Cav2.

Les différentes isoformes des canaux calciques montrent des répartitions cellulaires et sub-cellulaires distinctes et remplissent des rôles fonctionnels spécifiques. La famille Cav1 est plus impliquée dans le couplage excitation-contraction, tandis que les membres de la famille Cav2, qui sont exprimés au niveau des terminaisons présynaptiques, sont plus impliqués dans le contrôle du relargage des neurotransmetteurs des terminaisons nerveuses. Ces deux familles

$\alpha 1$ jouent également un rôle dans l'activation des enzymes dépendantes du calcium et dans la transcription des gènes [2]. Néanmoins, les rôles exacts et la distribution de chacun des canaux sont dépendants du sous-type neuronal, de façon à ce que la plupart des types de canaux ont des localisations sub-cellulaires variées et supportent alors un grand nombre de fonctions. Ces divers rôles fonctionnels représentent un challenge lors du design de nouveaux composés thérapeutiques ciblant les canaux calciques mais avec un risque faible d'effets secondaires.

Au niveau moléculaire et biochimiques, les canaux calciques de type T formés par une seule sous-unité Cav $\alpha 1$ – une protéine d'environ 250 kDa qui est constituée, comme dans le cas des canaux calciques à haut seuil d'activation, de quatre domaines membranaires reliés par des régions cytoplasmiques et dont les N- et C-terminus sont également cytoplasmiques [3]. Chaque domaine membranaire contient six hélices traversant la membrane (de S1 à S6) qui incluent une région senseur de voltage plus un motif ré-entrant en boucle p qui définit le pore du canal et contrôle la sélectivité ionique. Le génome mammifère contient trois gènes codants pour des sous-unités $\alpha 1$ de canaux calciques de type T nommés Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 [4-7] et qui présentent une répartition différente dans les structures du cerveau [8,9]. En plus d'un grand nombre de gènes, toutes les sous-unités Cav $\alpha 1$ connues subissent une étape d'épissage alternatif qui peut, dans certains cas, donner lieu à la production de canaux avec des propriétés et un fonctionnement drastiquement différent [10-15]. Chacune des sous-unités Cav3.x subit également l'épissage alternatif [16-20] avec une altération des propriétés fonctionnelles. Les conséquences de l'épissage sur la localisation sub-cellulaire ou tissu spécifique de Cav3.x sont, pour le moment, encore largement non connus.

Les neurones afférents primaires tout comme les neurones spinaux et supraspinaux des circuits de la douleur expriment de multiples canaux calciques dépendant du voltage, dont les trois isoformes Cav3 des canaux de type T. Nous mettrons en lumière les rôles des canaux Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 dans la transmission de la douleur ainsi que leur utilité comme cible d'analgésiques.

Canaux calciques de type T et la signalisation douloureuse

De par leur potentiel d'activation hyperpolarisé et leur courant de fenêtre, les canaux calciques de type T (Cav3) sont parfaitement adaptés pour réguler l'excitabilité neuronale, comme preuve, leur rôle dans le développement de pics et vagues de décharges dans le cerveau épileptique (pour revue, voir [21,22]). Ils partagent cette particularité avec d'autres canaux ioniques de « seuil », tous importants dans l'initiation et

l'amplification de l'excitabilité cellulaire. Parmi ceux-ci, les canaux HCN, quelques isoformes de canaux potassiques comme les KCNQs ainsi que le canal sodique Nav1.7, célèbre pour être étudié de manière extensive dans le contexte de la douleur physiopathologique en raison des gains ou pertes de fonction du canal retrouvés respectivement dans les pathologies de douleur congénitale qui augmentent ou diminuent la nociception. En comparant les effets électrogéniques des canaux de type T aux autres canaux « seuil », on peut noter que leur gamme d'activation, plus basse encore que celle de Nav1.7 par exemple, suggère un rôle de pré-amplificateur qui favorise la génération des potentiels d'actions sodiques. En plus de leur rôle électrogénique direct via la régulation d'autres conductances, comme les conductances potassiques, par l'influx calcique [23,24], les canaux calciques de type T supportent également les mécanismes de sécrétion dans les cellules neuroendocrines [25,26] et sont associés à la machinerie de relargage des vésicules synaptiques [27]. Les canaux de type T ont été décrits fonctionnellement pour la première fois dans les neurones sensoriels primaires [28-31]. À la suite de cette découverte initiale, il a été montré que les sous-types de neurones des DRG exprimaient différemment les canaux calciques de type T. Les neurones de moyen calibre en expriment le plus et sont suivis par les neurones nocicepteurs de petit calibre [32]. Les différences de cinétique suggèrent également la présence de deux canaux de type T distincts dans ces neurones [33,34]. Avec l'identification moléculaire des gènes de la famille Cav3.x et l'analyse d'hybridation *in situ* subséquente, il a clairement été montré que Cav3.2 est fortement exprimé dans les neurones des DRG de petit et de moyen calibres et que Cav3.3 est exprimé dans les neurones de petit calibre [9,35] (*Allen Brain Atlas* : www.brain-map.org). La popularisation des profilages transcriptomiques à grande échelle combinée à l'analyse de cellules uniques ou le tri de neurones des DRG via des marqueurs génétiques a récemment confirmé que Cav3.2 et Cav3.3 étaient sélectivement exprimés dans une sous-classe de neurones sensoriels primaires [36,37]. De la même manière, les canaux calciques de type T ont été impliqués dans la transmission synaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière [38,39]. Les canaux calciques Cav3.2 sont exprimés dans des sous-populations variées de neurones afférents primaires [40,41]. Prises ensemble, ces données suggèrent un rôle de ces canaux dans le traitement des informations sensorielles douloureuses. En suivant cette idée, l'injection systémique ou intrathécale de bloqueurs des canaux calciques de type T, tels que l'ethosuximide ou le mibefradil, est analgésique chez les rongeurs [42,43]. D'autre part, l'activité des canaux calciques de type T est augmentée dans les fibres afférentes sensorielles dans un grand nombre d'états de douleur chronique, par exemple à la suite de différents types de traumatismes nerveux [44-46], lors d'une altération du métabolisme des nerfs dans une neuropathie diabétique [47,48], ou dans le cas de neuro-

pathies déclenchées par la toxicité des chimiothérapies [39,49,50]. Au moins dans le cas des neuropathies diabétiques, bloquer l'activité des canaux de type T restaure un phénotype douloureux normal [51-53]. De manière intéressante, l'activité de Cav3.2 est modulée par la glycosylation, elle-même altérée en contexte diabétique [54,55], offrant un substrat moléculaire pour contrôler pharmacologiquement l'expression de Cav3.2 à la surface de la cellule dans une optique thérapeutique. Renforçant la notion de l'effet pro-nociceptif de Cav3.2, l'agoniste des canaux de type T ST101, efficace sur Cav3.2, augmente l'excitabilité des neurones des DRG [56], même si la sélectivité de ce composé reste à démontrer. La modulation Rédox est un autre mécanisme qui affecte efficacement le fonctionnement de Cav3.2 et pourrait être un composant majeur des douleurs inflammatoires ou neuropathiques via l'action de la L-cystéine ou du gasotransmetteur sulfide d'hydrogène (H₂S) [57,58], bien que les effets pronociceptifs du H₂S soient controversés [59]. En conséquence, les antioxydants ciblant Cav3.2 pourraient être utilisés comme analgésiques [60-62]. Les augmentations des courants Cav3.2 dans les neurones en contexte pathologique résultent de multiples mécanismes commençant par une augmentation de la transcription [63] impliquant Egr1, un facteur de transcription activé par l'activité électrique plus particulièrement dans un contexte douloureux [64], jusqu'à l'augmentation du trafic du canal à la membrane [65]. Récemment, les bases moléculaires de cette augmentation de Cav3.2 à la membrane des neurones des DRG dans les syndromes douloureux ont été identifiées comme résultant d'un mécanisme de déubiquitination orchestré par la déubiquitinase USP5 formant un complexe moléculaire avec le canal [66]. Ces découvertes offrent une opportunité de découvrir de nouveaux analgésiques pensés pour diminuer la présence des canaux Cav3.2 à la membrane en perturbant leur interaction avec USP5. Le Dr Zamponi et ses collaborateurs ont validé cette approche élégante à la fois dans un modèle de douleur inflammatoire et dans un modèle de douleur neuropathique [67].

In vivo, nous ainsi que d'autres groupes avons pu montrer que l'inhibition directe des canaux calciques Cav3.2 (mais pas des autres canaux calciques de type T), via l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou siRNA, réduisait la nociception mécanique ainsi que l'allodynie tactile provenant de lésions nerveuses métaboliques ou issues d'un trauma [40,52,68]. Cela conforte les observations montrant que les canaux Cav3.2 régulent la mécanosensibilité des fibres à bas seuil mécanoréceptrices A δ (A δ -LTMR) [69,70], mais la notion que l'impact principal de Cav3.2 sur la somatosensation est dû à leur présence uniquement dans les A δ -LTMRs est certainement excessive. De plus, cette classe de fibres, bien que présente chez les rongeurs, n'a pas été identifiée fonctionnellement chez l'Homme contrairement aux autres sous-types de LTMR (A β and C) [71,72]. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons créé une lignée de souris Knockin/

Flox où Cav3.2 est remplacé par un canal Cav3.2 fusionné à la protéine eclipticGFP et présentant un exon floxé [73]. En utilisant cette approche, nous avons démontré que Cav3.2 est en effet un marqueur sélectif de deux catégories majeures de mécanorécepteurs à bas seuil, A δ - et C-LTMRs, innervant la plupart des follicules pileux les plus abondants de la peau. En générant un Knock-out conditionnel de Cav3.2 spécifique des C-LTMRs, nous avons découvert que Cav3.2 dans ces fibres C-LTMR régulait la perception du toucher léger, la perception du froid nocif mécanique, les sensations chimiques et qu'il était essentiel à l'établissement des symptômes allodyniques des douleurs neuropathiques, un mécanisme rapporté dans la littérature comme étant entièrement dû aux A-LTMR. Collectivement, ces recherches aident à mieux comprendre le rôle fondamental de Cav3.2 dans les pathophysiologies du toucher et de la douleur, validant leur importance pharmacologique critique dans le soulagement des allodynies mécaniques et thermiques au froid. Ces données confirment la description récente d'un grand nombre de gènes spécifiques des C-LTMR par une technique de RNA-SEQ à grande profondeur d'analyse de séquençage après un tri par FACS des sous-types de neurones des DRG où l'isolement des neurones des DRG uniques montrant que Cav3.2 est effectivement un marqueur de ces neurones [36,37]. Ces découvertes sur la nociception somatique peuvent être étendues aux contextes douloureux d'origine viscérale. Dans un modèle murin d'hypersensibilité viscérale imitant le syndrome du côlon irritable [74], le knock-down *in vivo* des canaux Cav3.2 diminue l'hypersensibilité douloureuse en réponse à une distension colorectale [65]. Les analyses d'autres modèles de douleur chronique viscérale confortent ces conclusions [54,75-77]. Ensemble, ces données indiquent que l'expression du canal de type T à la membrane est régulée dynamiquement et qu'elle augmente dans des conditions de douleurs chroniques, et que contrer cette régulation positive pourrait être une méthode analgésique efficace. Il est intéressant de noter que les souris déficientes pour Cav3.2 dans le knock-out constitutif [78] montrent une hypersensibilité à la nociception basale, à la douleur induite par la formoline dans les deux phases, et dans une moindre mesure dans un cadre de douleur neuropathique [79] suggérant donc un possible phénomène de compensation. La disponibilité du modèle Cav3.2 floxé ouvre des perspectives intéressantes dans la production d'un KO inductible localisé qui pourrait limiter ces compensations.

Comparativement avec les neurones des DRG dans la moelle épinière, l'impact des canaux de type T est peu connu mais les relargages de neurotransmetteurs spontanés et évoqués sensibles au nickel ont été décrits entre les neurones afférents primaires et les neurones de projection de la lamina externe ou les interneurons [80]. Des données récentes, utilisant la lignée de souris Cav3.2 KO, ont confirmé ces résultats [38,66]. De plus, l'implication de

Cav3.2 dans la machinerie de relargage des neurotransmetteurs au niveau présynaptique est un concept émergent [27,81,82]. Dans ce contexte, nos données morphologiques avec la souris Cav3.2-eGFP vont dans le sens d'une expression spécifique de Cav3.2 dans la lamina II intérieure qui reçoit les fibres mécanoréceptrices à bas seuil C-LTMRs et A δ - LTMRs [73]. L'analyse par microscopie électronique des synapses a également révélé la présence de Cav3.2 aux niveaux pré- et post-synaptique [73]. Les projections spinales et/ou les interneurons expriment également des canaux de type T fonctionnels en situation post-synaptique [83-85] avec une expression sélective dans une sous-classe d'interneurones de la lamina II dont la fonction reste à établir [85]. En prenant en compte que la vaste majorité des neurones spinaux sont des interneurons, les relations sous-jacentes des réseaux de signalisation sensorielle au niveau spinal ne sont pas encore complètement comprises. Dans ce contexte, un grand nombre d'études restent encore à faire. Est-ce que les canaux de type T sont exprimés dans les interneurons inhibiteurs ou excitateurs, dans les neurones de projection ? Des inactivations génétiques spécifiques dans la moelle épinière épargnant les neurones afférents primaires restent à faire à ce jour.

Anatomiquement, plusieurs voies ascendantes spinales se dirigent vers le cerveau. Ces voies ne desservent pas uniquement des cibles thalamiques mais également un grand nombre d'autres noyaux clés du cerveau, tels que le noyau parabrachial et la substance grise périaqueducule, qui projettent tous deux dans des structures supérieures du cerveau. De plus, les changements fonctionnels liés à la douleur dans les régions cérébrales sont liés à une activation du thalamus, du cortex somatosensoriel, du cortex antérieur cingulaire, du cortex préfrontal, de l'insula et de l'amygdale, formant alors une « matrice de la douleur ». L'excitabilité de la boucle thalamocorticale est basée sur des connections réciproques entre le thalamus et le cortex. Les neurones thalamocorticaux (TC) projettent vers le cortex et reçoivent en retour une information excitatrice importante en provenance du cortex. Dans cette boucle, un noyau particulier, le Noyau Réticulaire Thalamique (NRT), exclusivement composé de neurones GABAergiques exprimant une grande densité de canaux Cav3.2, est considéré comme « l'horloge » du système [86] de par sa localisation anatomique. En effet, les neurones NRT reçoivent les inputs excitateurs à la fois des collatérales thalamocorticales et des afférences corticales et procurent un input inhibiteur aux neurones TC. Le noyau ventral postérieur thalamique reçoit des voies afférentes spinothalamiques et projette vers le cortex somatosensoriel primaire, impliqué dans la discrimination sensorielle des stimuli nocifs. D'autres noyaux thalamiques projettent vers d'autres structures cérébrales gouvernant les aspects émotionnels de la douleur, comme l'insula et le cortex cingulaire antérieur [59]. Le cortex insulaire a également été décrit

comme un intégrateur essentiel des inputs provenant des fibres C-LTMR exprimant Cav3.2 [73,88]. En plus, l'information nociceptive arrive au thalamus par des voies parallèles via l'hypothalamus latéral ou l'amygdale [89,90], deux zones également impliquées dans les aspects émotionnels de la douleur.

Sur le plan mécanistique, la neuroplasticité associée aux neuropathies diminue les seuils de décharge des neurones, augmentant les décharges spontanées et augmentant les décharges évoquées par des stimulations répétées [91,92]. Néanmoins, l'implication des canaux calciques de type T dans ces changements de l'excitabilité est mal connue, malgré leur abondance dans presque toutes les régions des réseaux de la douleur [9]. Dans le thalamus, il est bien connu que les neurones TC et les neurones NRT présentent deux modes de décharge, le mode tonique et le mode burst [91]. En effet, la propriété la plus remarquable caractérisant la transition de l'activité thalamocorticale de l'éveil au sommeil est le changement des patrons de décharge des neurones thalamiques, qui est finement corrélé aux propriétés biophysiques des canaux calciques de type T. Durant le sommeil, l'hyperpolarisation prolongée des neurones thalamiques déinactivent massivement les canaux de type T et promeut la génération des pics de calcium à bas seuil (Low Threshold Spike : LTS) et l'occurrence des activités en burst rythmique à haute fréquence [93]. Les conséquences corticales de ce mode burst dépendant des canaux de type T sont reflétées dans l'électroencéphalogramme (EEG) qui est dominé durant le sommeil par des activités oscillatoires à basse fréquence de haute amplitude (<15 Hz) et par des activités oscillatoires à haute fréquence de faible amplitude dans la bande gamma (30–50 Hz) durant l'éveil. Néanmoins, il est important de noter que les études cliniques rapportent la présence anormale d'oscillations TC lentes dans la bande de fréquence thêta (4-8Hz) chez les patients neuropathiques éveillés [94-96]. De plus, les bouffées d'activités thalamiques peuvent mener à des potentialisations synaptiques dans le cortex cingulaire antérieur, avec des conséquences importantes concernant l'intégration de l'input nociceptif et la formation de mémoire liée aux événements douloureux et aux comorbidités comme l'anxiété [97,98]. Alors que la plasticité de ces synapses semble reposer sur des mécanismes multiples, il convient de citer également un rapport récent indiquant le rôle potentiel des canaux de type T dans ces neurones avec une augmentation de l'expression de Cav3.2 dans un contexte d'état neuropathique [99]. Une couche de régulation supplémentaire provient de l'interconnectivité des zones corticales qui amplifie la douleur chronique dans le cas des connexions de l'aire somatosensorielle S1 au cortex cingulaire antérieur [100]. À l'inverse, l'inhibition des neurones du cortex cingulaire antérieur avec des opsines inhibitrices ciblées montre un effet analgésique [101]. Ceci est largement dû au fait que l'output augmenté du cortex cingu-

laire dans un cadre de douleur chronique influence de multiples cibles sous-corticales telles que la substance grise périaqueducule (PAG) et le noyau mésolimbique, participant ainsi à l'aspect multidimensionnel de la douleur en incluant l'intégration motivationnelle de la valeur hédonique de la douleur et de son soulagement [102].

L'altération des bursts thalamiques, soutenue par les courants de type T, est donc mécanistiquement un élément clé des dysrythmies des réseaux de la douleur comme montré chez des patients [103-105] en association avec la rythmicité theta [106,107]. Les études sur animaux confirment ces résultats en mettant en avant l'augmentation des bursts associée avec des oscillations rythmiques lentes spontanées [108,109], des pertes de cohérence entre l'électrocorticogramme et les potentiels de champ thalamiques, ainsi que l'augmentation de la puissance des oscillations thêta [110] dans les modèles neuropathiques. De manière similaire, les bursts dans le cortex cingulaire antérieur de rats neuropathiques ont été reliés à la surexpression de Cav3.2 et sont modulés par les bloqueurs des canaux de type T [99]. En conclusion, ces données montrent un rôle crucial des canaux calciques de type T supraspinaux, à la fois dans la transmission de l'information nociceptive et dans le développement des activités cérébrales anormales.

Une façon plus directe d'estimer l'implication des canaux T dans les réponses douloureuses est l'utilisation d'une lignée de souris génétiquement modifiées pour chacune des trois isoformes de canaux de type T. Néanmoins, les expériences réalisées jusqu'à maintenant ont impliqué des KO totaux des canaux Cav3.1 ou Cav3.2 et principalement de la pharmacologie non spécifique des canaux de type T (Mibefradil, Ethosuximide). Le modèle Cav3.3 KO n'a pas encore été testé pour son comportement douloureux. Une hyperalgésie a été rapportée en réponse à des stimulations viscérales chez les souris Cav3.1^{-/-} [111] présentant une absence totale de courants de type T dans les neurones somatosensoriels TC [112,113]. Tandis que le KO total Cav3.2 présente un phénotype d'analgésie dans plusieurs modèles de douleur différents [48,79,114,115]. De plus, nos travaux récents montrent que les effets analgésiques d'un nouvel antagoniste des canaux de type T (qui affecte toutes les isoformes Cav3) administré per os chez des souris déficientes pour ce canal sont abolis, montrant que le blocage général des canaux de type T est analgésique [116]. Une preuve directe du rôle pronociceptif des canaux Cav3.x demanderait soit des approches pharmacologiques locales avec des antagonistes spécifiques des canaux T [116-118] ou des lignées de souris KO conditionnel Cav3.x. Cette conclusion est également valable pour déchiffrer l'impact de Cav3.x dans les autres régions de la *pain matrix*, autant dans les voies ascendantes que dans les voies descendantes. Même si peu de choses sont connues sur l'impact des canaux Cav3.x dans la modulation des voies descendantes de la douleur, il est

intéressant de noter que dans l'aire bulbospinale, plus précisément dans les neurones inhibiteurs de la substance grise périaqueducule (SGPA), l'absence de Cav3.1 perturbe l'effet analgésique de la morphine [119]. Ces informations indiquent que les canaux Cav3.1 localisés dans la SGPA pourraient limiter les douleurs persistantes, mais l'utilisation de TTA-A2, un antagoniste pan-Cav3.x, ne récapitule pas ces effets. Des études supplémentaires sont requises pour clarifier cet aspect. Nous avons également rapporté récemment que des injections intracérébroventriculaires (ICV) de TTA-A2 induisent une analgésie qui dépend de l'expression de Cav3.2 [120]. De plus, cette étude démontre que le blocage de Cav3.2 au niveau supraspinal est une étape clé du mécanisme analgésique du paracétamol, le remède le plus utilisé pour le traitement des douleurs légères [120]. De manière intéressante, cette étude montre que l'inhibition de Cav3.2 subséquente à l'action de l'AM404, le métabolite actif du paracétamol, est due à l'activation de canaux TRPV1 exprimés au niveau central qui mènent à une inhibition de Cav3.2. Cette régulation a également été proposée dans les neurones afférents primaires de rat [121].

Pour tous les aspects présentés, la résolution spatiale et temporelle précise de l'expression des canaux Cav3.x dans les voies neuronales de la douleur aux niveaux cellulaire et sub-cellulaire est cruciale. Jusqu'à récemment, l'état de l'art sur cet aspect était inexistant. Néanmoins, deux groupes indépendants ont rapporté récemment que les canaux calciques de type T sont concentrés dans le segment initial de l'axone (*Axon Initial Segment* : AIS), où ils contribuent aux dépolarisations infraliminaires locales et ainsi influencent l'initiation des potentiels d'action. Ces données sont fondées sur les conclusions d'études fonctionnelles de neurones isolés en utilisant la technique de patch clamp en mode cellule attachée ainsi que des techniques d'imagerie calcique et sodique. Ces études montrent également que la localisation de ces canaux est un processus dynamique régulé, permettant un contrôle fin de la plasticité intrinsèque de l'excitabilité neuronale [122-124]. Ce contrôle de la localisation des canaux de type T est de plus régulé par des récepteurs

membranaires comme les récepteurs à la dopamine également exprimés dans les régions enrichies en Cav3.2 [9,125,126]. Les altérations plastiques de la distribution des canaux de type T sont probablement impliquées dans les états de douleur chronique. Pour l'étude de cet aspect, l'utilisation de la lignée de souris knock-in Cav3.2-eGFP sera très importante. Tandis que la plasticité de la distribution des canaux dans un contexte de douleur pathologique reste à étudier, cet outil a permis de découvrir que les protéines Cav3.2 sont exprimées dans les champs récepteurs des fibres LTMR proches des follicules pileux dans la putative zone gâchette des potentiels d'action (contribuant ainsi à la sensibilité extrême de ces fibres aux forces mécaniques faibles), ainsi que le long des axones de ces neurones avec une présence spécifique aux nœuds de Ranvier des fibres A δ -LTMR et dans les clusters situés le long des fibres C-LTMR où ils accélèrent la vitesse de conduction [73]. Ce dernier effet a été retrouvé récemment dans les neurones hippocampiques et cérébelleux qui expriment respectivement Cav3.2 et Cav3.1 [23,127]. L'impact des canaux de type T sur l'excitabilité axonale en est à ses débuts mais attire de plus en plus l'attention.

Pharmacologie des canaux de type T : vers une nouvelle classe d'analgésiques ?

La majeure partie du travail effectué jusqu'à présent valide l'isoforme Cav3.2 comme cible de nouveaux analgésiques, spécifiquement en agissant à la périphérie. Il serait alors possible d'exploiter l'inhibition préférentielle de certain ligands pour l'état inactivé du canal, qui est favorisé par l'activité électrique neuronale intense comme un moyen d'inhiber préférentiellement les canaux calciques de type T dans les fibres douloureuses très actives. En effet, une nouvelle génération de bloqueurs est apparue dans les dernières années avec différentes architectures [94,128-134] (Fig. 1).

En particulier, le TTA-P2 et le TTA-A2, ce dernier interagissant préférentiellement avec les canaux calciques de

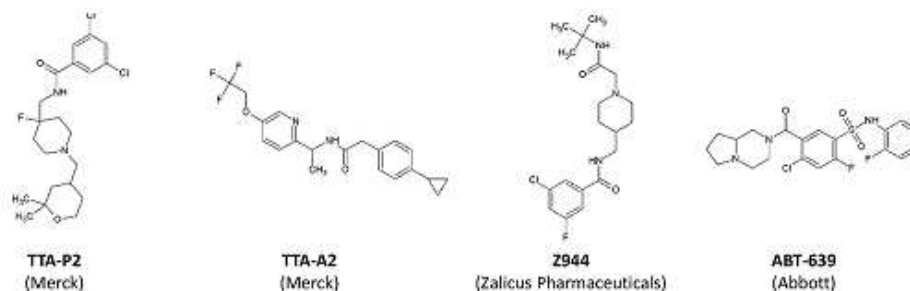


Fig. 1 Structure des molécules inhibitrices des canaux calciques de type-T testées pour leurs propriétés analgésiques. Les composés Z944 et ABT-639 font l'objet de développements cliniques à l'heure actuelle

type T dans leur état inactivé, qui sont tous deux analgésiques en préclinique [116-117]. Le Z123212, un bloqueur mixte des canaux sodiques dépendant du voltage et des canaux calciques de type T est analgésique en ciblant sélectivement l'état inactivé lent de ces canaux [135]. Dans ce contexte, c'est intéressant de noter que le domaine de liaison des anesthésiques locaux des canaux sodiques dépendant du voltage est partiellement conservé dans les canaux calciques de type T [136]. En considérant la résolution récente d'un cristal de structure du canal sodique dépendant du voltage bactérien [137,138], cette information peut aider au développement de bloqueurs des canaux calciques de type T. Pour terminer, le Z944, un autre inhibiteur des canaux de type T dépendant de l'état du canal est actuellement en phase I de tests cliniques contre la douleur. Un grand nombre de compagnies pharmaceutiques ont les canaux de type T dans leur liste de cibles d'étude et nous verrons peut être émerger de nouvelles molécules thérapeutiques dans un futur proche.

L'utilisation de peptides thérapeutiques dérivés de toxines animales est également une voie de recherche prometteuse pour la pharmacopée antalgique. Ainsi le seul exemple de développement de molécule analgésique ciblant un canal ionique ces dernières années est le Prialt[®] qui est le nom commercial du Ziconotide, une toxine sélective des canaux calciques présynaptiques Cav2.2 dont le blocage limite la transmission synaptique des neurones afférents primaires vers la corne dorsale de la moelle épinière. Le Prialt[®] a cependant un index thérapeutique faible qui limite son utilisation. La recherche de toxines sélectives de la famille Cav3.x et en particulier spécifiques de Cav3.2 est une perspective intéressante. Comme dans le cas des anesthésiques locaux, il semble qu'il existe une promiscuité des sites récepteurs des toxines entre les canaux sodiques et les canaux calciques de type-T puisque que les protoxines I et II, découvertes dans le venin de la tarentule *Thrixopelma pruriens*, sont des bloqueurs efficaces des canaux sodiques [139,140] avec un effet inhibiteur sur les canaux calciques Cav3.x [141,142]. La Protoxin I bloque préférentiellement Cav3.1 par rapport à Cav3.3 avec une affinité plus forte d'un ordre de grandeur [143]. Cette toxine semble interagir avec des résidus situés dans le domaine IV avec une contribution des sites localisés dans le domaine II des canaux Cav3.1. Les canaux Cav3.2 sont également affectés mais avec une affinité 100 fois moins forte. Il semble également qu'il y ait une conservation des sites de liaison de cette toxine entre les canaux Cav3 et Nav. La Protoxin II agit préférentiellement sur les canaux calciques Cav3.2 et cause un changement dans le potentiel de demi-inactivation du canal [141] qui reste à étudier. D'autres toxines ont été isolées du venin du scorpion *Parabuthus transvaalicus* (i.e., KLI et KLII), de la tarentule *Paraphysa sp3* (Psp3Tx1). Les premiers bloquent les canaux calciques de type T et les canaux sodiques

[144] tandis que Psp3Tx1 a été découverte dans un crible sur le canal Cav3.2 [145].

L'utilisation d'une lignée de souris Cav3.x KO conditionnelle est une belle perspective d'avenir pour déchiffrer les structures importantes pour les effets analgésiques des bloqueurs des canaux de type T. La valeur translationnelle des recherches précliniques dans le domaine de la douleur est toujours controversée en regard du grand nombre de molécules qui n'ont pas été développées jusqu'en clinique. Passer de la souris à l'Homme en ciblant les canaux de type T pourrait être une voie fructueuse. Le Dr David Mahns et ses collègues ont récemment utilisé le TTA-A2 chez l'Homme en injection locale dans la peau. Ils ont démontré que le blocage des canaux de type T diminuait de manière efficace l'allodynie au froid et l'allodynie mécanique en affectant les C-LTMR (C-Tactile chez l'Homme), un parallèle frappant à nos données obtenues chez la souris [146,147]. Cela contraste avec les conclusions d'un test clinique sur des patients atteints de neuropathie diabétique où la molécule ABT-639 [148], un bloqueur sélectif des canaux de type T avec une faible affinité, a montré un manque d'efficacité décevant même si l'utilisation de doses plus élevées étaient requises pour juger pleinement de l'efficacité du composé [149,150].

Conclusions

Un grand nombre de questions concernant le rôle des canaux de type T dans la douleur restent à élucider. Premièrement, la contribution de ces canaux dans la signalisation douloureuse reste floue. Ils pourraient agir : 1) en diminuant le seuil de décharge des fibres douloureuses afférentes ; 2) en contribuant directement au relargage des neurotransmetteurs aux synapses des afférents primaires ; 3) en agissant directement comme mécanosenseurs ; 4) en activant des voies telles que la voie ERK qui sont liées à l'augmentation de la douleur ; et 5) peut-être via l'interaction avec d'autres types de canaux ioniques tels que les canaux potassiques dépendant du voltage ou activés par le calcium comme il a été décrit dans différents types de neurones du système nerveux central. Deuxièmement, le mécanisme par lequel l'activité des canaux calciques de type T est augmentée dans des conditions de douleur chronique reste encore à déterminer, par exemple une modulation directe, des modifications post-traductionnelles et un recyclage des canaux à la membrane modifié. Cela pourrait inclure également la sous-unité Cava2 δ qui augmente l'amplitude des courants de type T dans des systèmes d'expression [151]. Également, un nombre de mutations congénitales ont été décrites pour le gène codant pour Cav3.2 chez le rat [19] et, de manière plus importante, chez l'Homme [126,152-154]. Bien qu'ils soient liés à des formes d'épilepsie, d'autisme ou de désordres

métaboliques, il reste à déterminer si ces patients souffrent d'une perception douloureuse modifiée.

En résumé, parmi les canaux calciques, les canaux calciques de type T et en particulier l'isoforme Cav3.2 semblent jouer un rôle critique dans les circuits neuronaux de la douleur, et sont en conséquence activement étudiés comme cible thérapeutique.

Remerciements Nous remercions les membres de l'équipe Bourinet, et nos collaborateurs (Drs A Eschalier, A Moqrich, O Pongs, GW Zamponi) pour leur contributions directes aux travaux sur l'étude des canaux calciques de type T dans la physiopathologie de la douleur. Les travaux relatifs à l'étude de la douleur menés dans le laboratoire des auteurs ont été financés par l'Agence Nationale pour la Recherche, l'Association Française pour les Myopathies, l'Institut UPSA de la Douleur, et la Fondation pour la Recherche Médicale.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440–3
- Wheeler DG, Groth RD, Ma H, et al (2012) Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell* 149:1112–24
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3:a003947
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, et al (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103–9
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, et al (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912–21
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117–61
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896–900
- McKay BE, McRory JE, Molineux ML, et al (2006) Ca(V)3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci* 24:2581–94
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, et al (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895–911
- Allen SE, Darnell RB, Lipscombe D (2010) The neuronal splicing factor Nova controls alternative splicing in N-type and P-type CaV2 calcium channels. *Channels (Austin)* 2010 4:483–9
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, et al (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2:407–15
- Lipscombe D, Andrade A, Allen SE (2013) Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta* 1828:1522–9
- Shen Y, Yu D, Hiel H, et al (2006) Alternative splicing of the Ca(v)1.3 channel IQ domain, a molecular switch for Ca²⁺-dependent inactivation within auditory hair cells. *J Neurosci* 26:10690–9
- Tan GM, Yu D, Wang J, Soong TW (2012) Alternative splicing at C terminus of Ca(V)1.4 calcium channel modulates calcium-dependent inactivation, activation potential, and current density. *J Biol Chem* 287:832–47
- Tang ZZ, Liang MC, Lu S, et al (2004) Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human l-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2 alpha1 subunit. *J Biol Chem* 279:44335–43
- Chemin J, Monteil A, Bourinet E, et al (2001) Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys J* 80:1238–50
- David LS, Garcia E, Cain SM, et al (2010) Splice-variant changes of the Ca(V)3.2 T-type calcium channel mediate voltage-dependent facilitation and associate with cardiac hypertrophy and development. *Channels (Austin)* 4:375–89
- Murbartian J, Arias JM, Lee JH, et al (2002) Alternative splicing of the rat Ca(v)3.3 T-type calcium channel gene produces variants with distinct functional properties(1). *FEBS Lett* 528:272–8
- Powell KL, Cain SM, Ng C, et al (2009) A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 29:371–80
- Senatore A, Spafford JD (2012) Gene transcription and splicing of T-type channels are evolutionarily-conserved strategies for regulating channel expression and gating. *PLoS one* 7:e37409
- Khosravani H, Zamponi GW (2006) Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86:941–66
- Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E (2010) Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* 460:395–403
- Martinello K, Huang Z, Lujan R, et al (2015) Cholinergic afferent stimulation induces axonal function plasticity in adult hippocampal granule cells. *Neuron* 85:346–63
- Turner RW, Zamponi GW (2014) T-type channels buddy up. *Pflugers Arch* 466:661–75
- Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, et al (2008) CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283:10162–73
- Okayama S, Imagawa K, Naya N, et al (2006) Blocking T-type Ca²⁺ channels with efonidipine decreased plasma aldosterone concentration in healthy volunteers. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 29:493–7
- Weiss N, Hameed S, Fernandez-Fernandez JM, et al (2012) A Ca(v)3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem* 287:2810–8
- Bossu JL, Feltz A, Thomann JM (1985) Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones. *Pflugers Arch* 403:360–8
- Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501–2
- Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1985) Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359:431–46
- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* 394:173–200
- Scroggs RS, Fox AP (1992) Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol* 445:639–58
- Coste B, Crest M, Delmas P (2007) Pharmacological dissection and distribution of Na_v/Nav1.9, T-type Ca²⁺ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. *J Gen Physiol* 129:57–77

34. Pinchenko VO, Kostyuk PG, Kostyuk EP (2005) Influence of external pH on two types of low-voltage-activated calcium currents in primary sensory neurons of rats. *Biochim Biophys Acta* 1724:1-7
35. Shin JB, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA, Lewin GR (2003) A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6:724-30
36. Reynders A, Mantilleri A, Malapert P, et al (2015) Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell Rep* 10:1007-19
37. Usoskin D, Furlan A, Islam S, et al (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 18:145-53
38. Jacus MO, Uebele VN, Renger JJ, Todorovic SM (2012) Presynaptic Cav3.2 Channels Regulate Excitatory Neurotransmission in Nociceptive Dorsal Horn Neurons. *J Neurosci* 32:9374-82
39. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2013) Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. *Pflugers Arch* 465:921-7
40. Bourinet E, Alloui A, Monteil A, et al (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 24:315-24
41. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2006) The role of T-type calcium channels in peripheral and central pain processing. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:639-53
42. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, et al (2003) Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105:159-68
43. Flatters SJ, Bennett GJ (2004) Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109:150-61
44. Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, et al (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99:3151-6
45. Wen XJ, Xu SY, Chen ZX, et al (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
46. Yue J, Liu L, Liu Z, et al (2013) Upregulation of T-type Ca²⁺ Channels in Primary Sensory Neurons in Spinal Nerve Injury. *Spine* 38:463-70
47. Cao XH, Byun HS, Chen SR, Pan HL (2011) Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca²⁺ channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons. *J Neurochem* 119:594-603
48. Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, et al (2007) Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* 27:3305-16
49. Kawabata A (2013) Targeting Ca(v)3.2 T-type calcium channels as a therapeutic strategy for chemotherapy-induced neuropathic pain]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica* 141:81-4
50. Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, et al (2011) Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 188:148-56
51. Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, et al (2009) Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 58:2656-65
52. Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, et al (2009) In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* 145:184-95
53. Obradovic A, Hwang SM, Scarpa J, et al (2014) Cav3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons are important for mibefradil-induced reversal of hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy. *PLoS one* 9:e91467
54. Orestes P, Osuru HP, McIntire WE, et al (2013) Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Cav3.2 T-type calcium channels. *Diabetes* 62:3828-38
55. Weiss N, Black SA, Bladen C, et al (2013) Surface expression and function of Ca_v3.2 T-type calcium channels are controlled by asparagine-linked glycosylation. *Pflugers Arch* 465:1159-70
56. Du X, Hao H, Gigout S, et al (2014) Control of somatic membrane potential in nociceptive neurons and its implications for peripheral nociceptive transmission. *Pain* 155:2306-22
57. Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, et al (2009) Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* 142:127-32
58. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, et al (2001) Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31:75-85
59. Elies J, Scragg JL, Huang S, et al (2014) Hydrogen sulfide inhibits Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels. *FASEB J* 28:5376-87
60. Lee WY, Orestes P, Latham J, et al (2009) Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway. *J Neurosci* 29:9500-9
61. Nelson MT, Joksovic PM, Su P, et al (2007) Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J Neurosci* 27:12577-83
62. Nelson MT, Woo J, Kang HW, et al (2007) Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *J Neurosci* 27:8250-60
63. van Loo KM, Schaub C, Pernhorst K, et al (2012) Transcriptional regulation of T-type calcium channel Cav3.2: bi-directionality by early growth response 1 (Egr1) and repressor element 1 (RE-1) protein-silencing transcription factor (REST). *J Biol Chem* 287:15489-501
64. Mamet J, Klukinov M, Yaksh TL, et al (2014) Single intrathecal administration of the transcription factor decoy AXX1 prevents acute and chronic pain after incisional, inflammatory, or neuropathic injury. *Pain* 155:322-33
65. Marger F, Gelot A, Alloui A, et al (2011) T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11268-73
66. Garcia-Caballero A, Gadotti VM, Sternkowski P, et al (2014) The Deubiquitinating Enzyme USP5 Modulates Neuropathic and Inflammatory Pain by Enhancing Cav3.2 Channel Activity. *Neuron* 83:1144-58
67. Gadotti VM, Caballero AG, Berger ND, et al (2015) Small organic molecule disruptors of Cav3.2 - USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain* 11:12
68. Takahashi T, Aoki Y, Okubo K, et al (2010) Upregulation of Ca(v)3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain* 150:183-91
69. Dubreuil AS, Boukhaddaoui H, Desmadril G, et al (2004) Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* 24:8480-4
70. Wang R, Lewin GR (2011) The Cav3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors. *J Physiol* 589:2229-43
71. Lechner SG, Lewin GR (2013) Hairy sensation. *Physiology* 28:142-50
72. McGlone F, Wessberg J, Olausson H (2014) Discriminative and affective touch: sensing and feeling. *Neuron* 82:737-55
73. Francois A, Schuetter N, Laffray S, et al (2015) The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep* 10:370-82

74. Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, et al (2005) Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 128:1996–2008
75. Matsunami M, Kirishi S, Okui T, Kawabata A (2011) Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. *Neuroscience* 181:257–64
76. Murakami-Nakayama M, Tsubota M, Hiruma S, et al (2015) Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice. *J Pharmacol Sci* 127:223–8
77. Terada Y, Fujimura M, Nishimura S, et al (2015) Roles of Cav3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis. *Journal of neuroscience research* 93:361–9
78. Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, et al (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302:1416–8
79. Choi S, Na HS, Kim J, et al (2007) Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)_{3.2} T-type channels. *Genes Brain Behav* 6:425–31
80. Bao J, Li JJ, Perl ER (1998) Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II. *J Neurosci* 18:8740–50
81. Huang Z, Lujan R, Kadurin I, et al (2011) Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci* 14:478–86
82. Weiss N, Zamponi GW (2012) Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1579–86
83. Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299:1237–40
84. Ku WH, Schneider SP (2011) Multiple T-type Ca²⁺ current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration. *J Neurophysiol* 106:2486–98
85. Walsh MA, Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2009) Evidence for a critical period in the development of excitability and potassium currents in mouse lumbar superficial dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 101:1800–12
86. Crick F (1984) Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4586–90
87. Jones EG (1998) Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85:331–45
88. Olausson H, Lamarre Y, Backlund H, et al (2002) Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci* 5:900–4
89. Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel “pain” pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787–93
90. Shelton L, Becerra L, Borsook D (2012) Unmasking the mysteries of the habenula in pain and analgesia. *Progress in neurobiology* 96:208–19
91. Saab CY (2012) Pain-related changes in the brain: diagnostic and therapeutic potentials. *Trends Neurosci* 35:629–37
92. Woo CW, Roy M, Buhle JT, Wager TD (2015) Distinct brain systems mediate the effects of nociceptive input and self-regulation on pain. *PLoS biology* 13:e1002036
93. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679–85
94. Bladen C, McDaniel SW, Gadotti VM, et al (2015) Characterization of novel cannabinoid based T-type calcium channel blockers with analgesic effects. *ACS chemical neuroscience* 6:277–87
95. Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, et al (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15222–7
96. Walton KD, Llinas RR (2010) Central Pain as a Thalamocortical Dysrhythmia: A Thalamic Efference Disconnection? In: L Kruger, AR Light, editors. *Translational Pain Research: From Mouse to Man*. Boca Raton, FL
97. Koga K, Descalzi G, Chen T, et al (2015) Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron* 85:377–89
98. Shyu BC, Vogt BA (2009) Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. *Mol Pain* 5:51
99. Shen FY, Chen ZY, Zhong W, et al (2015) Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 11:7
100. Eto K, Wake H, Watanabe M, et al (2011) Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *J Neurosci* 31:7631–6
101. Gu L, Uhelski ML, Anand S, et al (2015) Pain inhibition by optogenetic activation of specific anterior cingulate cortical neurons. *PLoS one* 10:e0117746
102. Navratilova E, Porreca F (2014) Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci* 17:1304–12
103. Lenz FA, Gracely RH, Rowland LH, Dougherty PM (1994) A population of cells in the human thalamic principal sensory nucleus respond to painful mechanical stimuli. *Neurosci Lett* 180:46–50
104. Lenz FA, Kwan HC, Dostrovsky JO, Tasker RR (1989) Characteristics of the bursting pattern of action potentials that occurs in the thalamus of patients with central pain. *Brain Res* 496:357–60
105. Modesti LM, Waszak M (1975) Firing pattern of cells in human thalamus during dorsal column stimulation. *Applied neurophysiology* 38:251–8
106. Jeanmonod D, Magnin M, Morel A (1996) Low-threshold calcium spike bursts in the human thalamus. Common physiopathology for sensory, motor and limbic positive symptoms. *Brain* 119:363–75
107. Samthein J, Stern J, Aufenberg C, et al (2006) Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain. *Brain* 129:55–64
108. Gerke MB, Duggan AW, Xu L, Siddall PJ (2003) Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience* 117:715–22
109. Iwata M, LeBlanc BW, Kadasi LM, et al (2011) High-frequency stimulation in the ventral posterolateral thalamus reverses electrophysiological changes and hyperalgesia in a rat model of peripheral neuropathic pain. *Pain* 152:2505–13
110. Leblanc BW, Lii TR, Silverman AE, et al (2014) Cortical theta is increased while thalamocortical coherence is decreased in rat models of acute and chronic pain. *Pain* 155:773–82
111. Kim D, Park D, Choi S, et al (2003) Thalamic control of visceral nociception mediated by T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302:117–9
112. Kim D, Song I, Keum S, et al (2001) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31:35–45
113. Tschertner A, David F, Ivanova T, et al (2011) Minimal alterations in T-type calcium channel gating markedly modify physiological firing dynamics. *J Physiol* 589:1707–24
114. Barbara G, Alloui A, Nargeot J, et al (2009) T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipopeptides. *J Neurosci* 29:13106–14
115. Chen WK, Liu IY, Chang YT, et al (2010) Ca(v)_{3.2} T-type Ca²⁺ channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *J Neurosci* 30:10360–8
116. Francois A, Kerckhove N, Meleine M, et al (2013) State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)_{3.2} selectivity and support analgesic effects. *Pain* 154:283–93

117. Choe W, Messinger RB, Leach E, et al (2011) TTA-P2 is a Potent and Selective Blocker of T-type Calcium Channels in Rat Sensory Neurons and a Novel Antinociceptive Agent. *Mol Pharmacol* 80:900–10
118. Dreyfus FM, Tschertner A, Errington AC, et al (2009) Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window. *J Neurosci* 30:99–109
119. Park C, Kim JH, Yoon BE, et al (2010) T-type channels control the opioidergic descending analgesia at the low threshold-spiking GABAergic neurons in the periaqueductal gray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14857–62
120. Eschalier A, Mallet C, Dubray C, et al (2015) Use of ethosuximide for treating or preventing pain of inflammatory type, inflammation, migraine, cephalalgia, myalgia, tendinitis, dorsal pain, intestinal inflammatory disease and irritable bowel syndrome: CNRS CENT NAT RECH SCI (CNRS-C) Univ Auvergne Clermont 1 (UYAU-Non-standard) univ cent hospitalier Clermont Ferrand (UYHO-non standard), p. 41
121. Comunanza V, Carbone E, Marcantoni A, et al (2011) Calcium-dependent inhibition of T-type calcium channels by TRPV1 activation in rat sensory neurons. *Pflugers Arch* 462:709–22
122. Bender KJ, Ford CP, Trussell LO (2010) Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation. *Neuron* 68:500–11
123. Bender KJ, Trussell LO (2009) Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing. *Neuron* 61:259–71
124. Grubb MS, Burrone J (2010) Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465:1070–4
125. Bergquist F, Nissbrandt H (2003) Influence of R-type (Cav2.3) and T-type (Cav3.1-3.3) antagonists on nigral somatodendritic dopamine release measured by microdialysis. *Neuroscience* 120:757–64
126. Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, et al (2006) CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J Biol Chem* 281:22085–91
127. Grundemann J, Clark BA (2015) Calcium-Activated Potassium Channels at Nodes of Ranvier Secure Axonal Spike Propagation. *Cell Rep* 12:1715–22
128. Kim HS, Kim Y, Doddareddy MR, et al (2007) Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-dioxoisindoline-5-carboxamide derivatives as T-type calcium channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett* 17:476–81
129. Park JH, Choi JK, Lee E, et al (2007) Lead discovery and optimization of T-type calcium channel blockers. *Bioorg Med Chem* 15:1409–19
130. Rhim H, Lee YS, Park SJ, et al (2005) Synthesis and biological activity of 3,4-dihydroquinazolines for selective T-type Ca(2+) channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett* 15:283–6
131. Shipe WD, Barrow JC, Yang ZQ, et al (2008) Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca²⁺ channel antagonist. *J Med Chem* 51:3692–5
132. Uebele VN, Nuss CE, Fox SV, et al (2009) Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists. *Cell Biochem Biophys* 55:81–93
133. Yang ZQ, Barrow JC, Shipe WD, et al (2008) Discovery of 1,4-substituted piperidines as potent and selective inhibitors of T-type calcium channels. *J Med Chem* 51:6471–7
134. Zhang Q, Xia Z, Joshi S, et al (2015) Optimization of ADME Properties for Sulfonamides Leading to the Discovery of a T-Type Calcium Channel Blocker, ABT-639. *ACS medicinal chemistry letters* 6:641–4
135. Hildebrand ME, Smith PL, Bladen C, et al (2011) A novel slow-inactivation-specific ion channel modulator attenuates neuropathic pain. *Pain* 152:833–43
136. Bladen C, Zamponi GW (2012) Common mechanisms of drug interactions with sodium and T-type calcium channels. *Mol Pharmacol* 82:481–7
137. Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, et al (2012) Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486:135–9
138. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475:353–8
139. Middleton RE, Warren VA, Kraus RL, et al (2002) Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* 41:14734–47
140. Schmalhofer WA, Calhoun J, Burrows R, et al (2008) ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol* 74:1476–84
141. Bladen C, Hamid J, Souza IA, Zamponi GW (2014) Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Mol Brain* 7:36
142. Edgerton GB, Blumenthal KM, Hanck DA (2010) Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel Ca(V)_{3.1} by ProTxII. *Toxicol* 56:624–36
143. Ohkubo T, Yamazaki J, Kitamura K (2010) Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca²⁺ Channels Cav3.1 and Cav3.2. *J Pharmacol Sci* 112:452–8
144. Olamendi-Portugal T, Ines Garcia B, Lopez-Gonzalez I, et al (2002) Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca(2+) and Na(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 299:562–8
145. Bourinet E, Escoubas P, Marger, et al (2010) Identification of novel antagonist toxins of T-type calcium channel for analgesic purposes. Patent No: US8664179B2, PCT Pub No: WO2010/081971
146. Nagi SS, Dunn JS, Birznies I, et al (2015) The effects of preferential A- and C-fibre blocks and T-type calcium channel antagonist on detection of low-force monofilaments in healthy human participants. *BMC neuroscience* 16:52
147. Samour MS, Nagi SS, Mahns DA (2015) Cav3.2-expressing low-threshold C fibres in human hairy skin contribute to cold allodynia-a non-TRPV1- and non-TRPM8-dependent phenomenon. *Pain* 156:1566–75
148. Jarvis MF, Scott VE, McGaraughty S, et al (2014) A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats. *Biochem Pharmacol* 89:536–44
149. Serra J, Duan WR, Locke C, et al (2015) Effects of a T-type calcium channel blocker, ABT-639, on spontaneous activity in C-nociceptors in patients with painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Pain* 156:2175–83
150. Ziegler D, Duan WR, An G, et al (2015) A randomized double-blind, placebo- and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in diabetic patients with peripheral neuropathic pain. *Pain* 156:2013–20
151. Dubel SJ, Altier C, Chaumont S, et al (2004) Plasma Membrane Expression of T-type Calcium Channel {alpha}1 Subunits Is Modulated by High Voltage-activated Auxiliary Subunits. *J Biol Chem* 279:29263–9
152. Khosravani H, Altier C, Simms B, et al (2004) Gating Effects of Mutations in the Cav3.2 T-type Calcium Channel Associated with Childhood Absence Epilepsy. *J Biol Chem* 279:9681–4
153. Scholl UI, Stölting G, Nelson-Williams C, et al (2015) Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife* 4:e06315
154. Vitko I, Bidaud I, Arias JM, et al (2007) The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* 27:322–30

VIII. Article « Identification of a novel peptidic specific blocker of Nav1.7 sodium channel subtype with analgesic properties »

Identification of a novel peptidic specific blocker of Nav1.7 sodium channel subtype with analgesic properties

Pierre Lesport^{a,b}, Mickael Deage^{a,b}, Abdelkrim Alloui^c, Fabrice Marger^{a,b}, Fernanda Caldas Cardoso^d, Isabelle Bidaud^{a,b}, Alain Eschalier^c, Michel Lazdunski^e, Richard Lewis^d, Pierre Escoubas^{e,f}, Nicolas Gilles^g, Emmanuel Bourinet^{a,b,c,d}

Authors affiliations:

(a) IGF, CNRS, INSERM, Univ. Montpellier, F-34094 Montpellier, France ; (b) Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, F-34094 Montpellier, France ; (c) NeuroDol, Université d'Auvergne, UMR1107 INSERM, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; (d) IMB Centre for Pain Research, The University of Queensland, St Lucia, Queensland, 4072, Australia ; (e) Université de Nice Sophia Antipolis, IPMC, UMR6097 CNRS, F-06560 Valbonne, France, (f) Venomtech, F-06560 Valbonne, France ; (g) Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), IBITECS, CEA, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

Address for correspondance:

Dr E Bourinet, IGF CNRS UMR5203, 141 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier, France

Email : emmanuel.bourinet@igf.cnrs.fr Tel 33(0)4 34 35 92 48 Fax 33 (0)4 67 54 24 32

Running title: Psp3Tx1 block of Nav1.7 channel

Abstract

xxx

Introduction

Chronic pain is a major health problem affecting ~20% of the population in developed countries. Despite high prevalence and considerable impairment of quality of life, the treatments are empirical, often poorly effective, and the disorder remains a challenge to clinicians (Bouhassira et al. 2008). Although pain is a complex sensation supported by a complex network of neuronal and non-neuronal cells from the periphery to the central nervous system that can become pathologically dysregulated in relation with an array of etiologies, there is a great emphasis for a more thorough understanding of the sensors at the origin of pain in the peripheral nervous system. Numerous evidences show that specific sets of ion channels are confined to primary afferent neurons where they mediate the detection of nociceptive stimuli and their transmission to the CNS (Waxman and Zamponi 2014). Moreover, pathological remodeling of ion channel expression patterns has been linked to the hyperexcitability of primary afferents nociceptors. Among these channels, those activated nearby resting membrane potentials are ideally suited to regulate neuronal excitability since they act as threshold amplifiers of nociceptive signals. Their tight pharmacological control by innovative analgesics could help to attenuate pathological nociceptive inputs to the brain. These “threshold” channels expressed specifically or enriched in nociceptive primary afferences include the famous Nav1.7 sodium channel largely studied in the context of pain pathophysiology owing its gain or loss of function in congenital pain diseases that respectively increase or dampen nociception, as well as the Cav3.2 calcium channel that has a range of activation that is even lower than Nav1.7 for example suggesting a role of preamplifier that favors sodium spike generation.

In terms of structure, these two channels isoforms belong to the unique family of voltage-gated ion channels formed of 4 non identical homologous domains all linked in a single

polypeptide chain. In mammals, this superfamily contains respectively 9 voltage-gated sodium channels (Nav) and 10 calcium channels (Cav) isoforms with distinct cellular and subcellular distributions. However, the high level of homology with these channels pose a challenge when designing new therapeutics with a low risk of side effects. This is a clear limitation to identify specific pharmacological tools targeting only one channel subtype over the others with conventional medicinal chemistry, even if ligands for Nav1.7 and/or Cav3.2 have been actively screened with some success for analgesics purposes (McCormack et al. 2013; Bregman et al. 2011; Francois et al. 2014). In contrast, biological resources offer level of ligand specificity that often outmatch synthetic ligand properties (Wood 2013). One of the best example is the peptidic toxins from the venoms of predator animals such as snake, bees, molluscs, scorpions, or spiders. These venoms contain an array of peptides with often unique properties selected through the evolution to tightly occupy their binding pocket on the channel pore forming subunit of one specific channel to efficiently fulfill predatory or defensive roles (Escoubas and Rash 2004; Dutertre et al. 2014). Identification of such ligands has been instrumental, first to channel identification and purification, but these ligands have long been explored as possible therapeutics. This resulted in the development of Ziconotide (Prialt©), a Cav2.2 blocker from cone snail to treat intractable pain despite a limited therapeutic index. A number of recent reports described the identification of Nav1.7 blocking peptides isolated from their majority from Theraphosidae spiders with the potential therapeutic application to treat pathological pain.

In the present study, using a Cav3.2 screening assay, we identified Psp3Tx1, a phrixotoxin like 28 amino acid peptide from the venom of *Paraphysa Sp3* spider. Synthetic peptide selectivity *in vitro* revealed that Psp3Tx1 is a selective Nav1.7 channel blocker in the nanomolar range over all other Nav1.x isoforms. In addition Psp3Tx1 revealed promiscuous pharmacological effects on the pronociceptive Cav3.2 low threshold calcium channels as well as on the Kv4.3 potassium channels albeit at higher doses. We assessed the therapeutic

analgesic potential of Psp3Tx1 in mice. In a pharmacological model of Nav1.7 gain of function (Cardoso et al. 2015; Deuis, Wingerd, et al. 2016), Psp3Tx1 strongly reduced spontaneous pain at low doses in peripheral application. Similarly, in a model of neuropathic pain, Psp3Tx1 reversed mechanical hypersensitivity as well as allodynia consistent with a utility of Nav1.7 blockade to mediate pain relief. Finally, Psp3Tx1 showed no side effect on electrical cardiac activity at high doses after systemic injection. Overall our results suggest that the Psp3Tx1 holds potential therapeutic efficacy for the development of analgesics aimed at treating at its peripheral source in the receptive field.

Results

Psp3Tx1 identification

We screened a tarantula spider venoms library on recombinant calcium channel Cav3.2 expressed in xenopus oocyte to gain from the low venom quantity used and the robustness of the assay. *Paraphysa Sp3* venom was identified as a source of blocking activity at Cav3.2 channels. Upon venom application, inhibition of Cav3.2 currents developed with a rapid onset and washout of the effect had a slow offset consistent with a good affinity of the channel blocking peptide. The venom was firstly fractionated by reverse phase liquid chromatography, then by cation exchange chromatography (RP-HPLC and CE-HPLC respectively) with a concomitant exploration of Cav3.2 blocking activity within each fraction. Figure 1A represent the RP-HPLC elution profile of the entire venom with the active fraction pool shown in the boxed gray area. The CE-HPLC analysis of the active pool is presented in Figure 1B with the boxed area highlighting the active fraction containing the pure Psp3Tx1 peptide. As for the venom, the purified fraction induced a rapid and potent fast inhibition of Cav3.2 with slow washout kinetics. Moreover, native toxin application slows Cav3.2 activation kinetics and shifts the voltage dependence of activation consistent with a gating-modifier mode of action typical of a majority of spider toxins (Figure S1). The full sequence was obtained in a single run of Edman sequencing and confirmed by mass spectrometry. Psp3Tx1 is a 28 amino acid peptide reticulated by three disulfide bridges (Fig1C). Its measured monoisotopic molecular mass (3392Da) is in accordance with the value calculated for an amidated C-terminus. Although the pairing of cysteines was not determined experimentally, the high homology of structure with previously described tarantula toxins strongly suggests that the peptides conform to the canonical inhibitor cystine knot (ICK) Cys1-Cys4/Cys2-Cys5/Cys3-Cys6 disulfide bridge pattern (Norton and Pallaghy 1998), and with the closest relation to the subfamily of short loop ICK toxins (Escoubas and Rash 2004). Psp3Tx1 has the closest homology (85%) with PaTx1, a Kv4.2/4.3 potassium channel blocker (Diochot et al. 1999) with promiscuous activity on

Nav1.7 sodium channel and Cav3.1 calcium channels (Park et al. 2014), (Salari et al. 2016). Similarly, a high homology is retrieved with ProTxII, GsAF-I, GsAF-II, all characterized by inhibitory action on several Nav isoforms as well as on Cav3.x channels (Bladen et al. 2014; Salari et al. 2016; Flinspach et al. 2017; Park et al. 2014). Other short loop ICK toxins in the ~75% homology range (JzTx5, Pmr2a, GrTx1) also acts as Nav blockers (Clement et al. 2007; Zeng et al. 2007; Zimmermann et al. 2007). For comparison, the distantly related sequence of GpTx1, a Nav1.7 blocker with extensive structural activity relationship data is added to the Figure 1C (Murray et al. 2015; Murray et al. 2016). The homology tree of the compared sequences is presented on Figure 1D. To provide sufficient material for further functional investigations, synthetic Psp3Tx1 was produced by chemical synthesis (Figure 2A-B). The proper peptide folding was checked by comparison of native and synthetic form with electrophysiology tests on recombinant Cav3.2 on tsa201 cells (Figure 2C). Synthetic Psp3Tx1 and the natural polypeptide were equally active. Moreover both polypeptides had the same retention time on RP-HPLC (not shown).

Psp3Tx1 is a selective Nav1.7 sodium channel isoform blocker

According to the promiscuous pharmacological properties of homologous peptides of Psp3Tx1, a detailed channel subtype selectivity characterization was performed using whole cell electrophysiology in mammalian cells (Figure 3). Psp3Tx1 shows the most potent effect on hNav1.7 with nanomolar affinity (IC₅₀ 17.5nM manual patch (Figure 3A-B) and 5.8nM in Q-Patch (Figure 3C-D, table 1). Over all sodium channel subtypes, the peptide shows a selectivity profile of 10-fold over hNav1.1, 78 to 100-fold selectivity over hNav1.6, hNav1.2 and hNav1.4, 198-fold over hNav1.5, 2562-fold over hNav1.3, and without activity on rNav1.8 and native Nav1.9 from mouse DRG neurons making Psp3Tx1 one of the most selective Nav1.7 inhibitors reported to date (see Table 1 for IC₅₀ values). Considering the homology with PaTx1,

the activity on the low threshold potassium channel Kv4.2 and Kv4.3 was also assessed. Indeed, Psp3Tx1 effectively blocks Kv4.3 albeit less potently than Nav1.7 (7-fold selectivity) but is much less effective on Kv4.2 (828-fold selective) (Figure 4A). In the low threshold calcium channel family that served as initial target for the toxin identification, Psp3Tx1 inhibits Cav3.2 in the micromolar range (IC₅₀ 3.8 μ M) and less potently affect the two other isoforms Cav3.1 and Cav3.3. Of note, hCav3.2 current kinetics are slowed by the toxin consistent with a gating effect and hindrance of the channel activation (Figure 4B). This effect much less pronounced on the two other Cav3 isoforms. In comparison, the high threshold calcium channel isoform hCav2.2 is insensitive in the μ M range.

Further examination of Psp3Tx1 effects revealed a typical block of Nav1.7 activation gating with a typical more pronounced effect at weak depolarizations compared to strong ones (Fig5A). The 75% block of inward currents produced by 100nM Psp3Tx1 also shifts positively the current-voltage curve by \sim 7mV and reduces the steepness of the activation (Fig5B). Similar current-voltage curve obtained from a holding potential of -75mV resulted in similar block magnitude and shift in activation (not shown). Kinetics of toxin effect shows a moderately fast onset of channel block, but a very strong binding hardly reversible from a negative resting potential as in the typical trace showed in Figure 5C. Inversely, for the other channel isoforms, the degrees of inhibitions produced by Psp3Tx1 are reversible. For example, in the case of Kv4.3, even if Psp3Tx1 produces an inhibition with an EC₅₀ only 10-fold greater than for Nav1.7, the reversal upon wash out is fast and complete even for saturating peptide concentration as in Fig5D (washout time constant of 50s, n= 4 for 1 μ M).

Psp3Tx1 mediated analgesia in the periphery depend on Nav1.7 blockade

The pIC₅₀ representation of the *in vitro* results further illustrate the strongest activity of Psp3Tx1 for Nav1.7 (Fig6A). To verify that this *in vitro* activity results in a Nav1.7 blockade mediated analgesia *in vivo*, we used the recently developed Nav1.7 specific pain test. The use of

the alpha scorpion toxin OD1 with agonist properties on Nav1.7, induces spontaneous pain when injected in the paw. Although this agonist affects both Nav1.7 and Nav1.6, the spontaneous pain induced by intraplantar injection primarily depends on Nav1.7 and was used for *in vivo* profiling of Nav1.7 blocking molecules (Deuis et al. 2017; Deuis, Yin, et al. 2016; Cardoso et al. 2015). The kinetics slowing and the negative shift in activation typical of OD1 action is a pharmacological mimicking of the some of the Nav1.7 pronociceptive congenital mutations. Accordingly this is transduced in spontaneous activity of primary afferent fibers when applied to their receptive fields (Deuis, Wingerd, et al. 2016). We first verified that the batch of synthetic OD1 used effectively produced the agonist effect on recombinant hNav1.7 at the expected concentrations as in published work (Motin, Durek, and Adams 2016) (not shown). As previously described, OD1 (40 μ l at 300nM) resulted in bouts of spontaneous licking, flinching, shaking and biting of the injected paw all counted as pain behaviors in periods of five minutes following the start of the procedure. The acme of the effect occurs between five and ten minutes and progressively disappears over 40min (Fig6B). When co-injected with OD1, Psp3Tx1 resulted in a dose dependent analgesic effect (Fig6B histogram). We obtained similar results with male and female mice (n=6/treatment/sex) and therefore data were pooled (n=12/treatment). Considering a dilution effect by a 100-fold factor in the *in vivo* test compared to *in vitro* data on recombinant channels, the maximal dose used of 3 μ M correspond to 30nM that blocks 70 to 90% of hNav1.7 with no more than 25% inhibition on all other channels tested. This suggest a clear on target activity of Psp3Tx1 for Nav1.7 within the sensory fibers receptive fields.

The translationability of the results obtained with low doses of Nav1.7 selective toxin in the OD1-induced pain test into similar analgesic effects in more classical preclinical rodent models of pain is not yet established. We tested Psp3Tx1 in the chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain monitoring the mechanical tactile/pain perception. We used three von Frey

filaments corresponding to innocuous, intermediate, and noxious stimulations (0.07, 0.6, and 1.4g, respectively) as described previously (Descoeur et al. 2011b). Pain threshold was considered to be reached for two withdrawals out of five consecutive filament applications. CCI resulted in an increase in nociceptive scores typical of the neuropathic state for all filament tested reflecting a mechanical allodynia (0.07g stimulus), and a mechanical hyperalgesia (0.6 and 1.4g) (Figure 6C, Ctrl vs t0). Intraplantar injection of 10nmol of Psp3Tx1 (10 μ l at 1mM) was performed in comparison of a control group receiving morphine by the same route of administration (10 μ g/10 μ l). Mechanical allodynia and hyperalgesia were completely alleviated by Psp3Tx1 treatment and tactile/mechanical pain scores reached below control values 10min after injection with a total duration of peptide effect of 40 to 50min (Fig 6C). Calculation of the areas under the curves showed significant effects for the three filaments tested (Fig6C histograms). Comparatively Psp3Tx1 mediated analgesia was similar to the one produced by a control dose of morphine (10 μ g) as seen from the time courses and area under the curves (Fig6C). To test whether central administration of the peptide would result in analgesic effect, we tested a similar high dose via intrathecal (it) route in naive animals. As seen on the Figure 6D, 1nmol of Psp3Tx1 did not significantly affect the mechanical pain produced by the 1.4g von Frey stimulus, while 10 μ g morphine had its control analgesic effect. Similar observations were made in Cav3.2 KO animals (not shown). Finally, even if the selectivity of Psp3Tx1 is high including against the cardiac sodium channel isoform (Nav1.5), for safety profile we verified that systemic application of elevated doses of PsP3Tx1 (1 and 10 μ M final in the animal) via intravenous route did not affect the global heart electrical activity in anaesthetized mice (not shown).

Discussion

In this study, we identify Psp3Tx1, a 28 amino acid long toxin from the venom of the Theraphosidae spider *Paraphysa Sp3*. Determination of Psp3Tx1 selectivity profile revealed that the peptide is a sodium channel blocker that potently and selectively target the Nav1.7/SCN9a isoform. The peptide acts primarily by hindering the channel activation by stabilizing the closed state. Consistent with the *in vitro* selectivity, we confirmed that a Nav1.7 specific dose of Psp3Tx1 is effective in alleviating spontaneous pain *in vivo* in a pharmacological model of Nav1.7 acute peripheral nociception. Moreover, Psp3Tx1 potently reversed chronic neuropathic pain by interfering with peripherally located Nav1.7 channels.

The isolated sequence is closely related to the Phrixotoxin PaTx1, isolated initially for its potent inhibition of Kv4.2/4.3 potassium channels (Diochot et al. 1999) with promiscuous activity on Nav1.7 sodium channel and Cav3.1 calcium channels (Park et al. 2014; Salari et al. 2016). Similarly, Psp3Tx1 is a short ICK folded peptide with internal loops with the same residue number in-between the distinct cysteines. Although tertiary structure of Psp3Tx1 was not determined in the present study, the analogy with the NMR based tertiary structure of PaTx1 (Chagot et al. 2004) can predict that Psp3Tx1 contain a similar surface pattern comprising a hydrophobic patch composed of Leu6, Phe5, Trp7, Trp24 (with the Phe5 substitution in Psp3Tx1 to the Trp5 in Patx1 that could be of importance) that is associated with a dipole moment emerging through Lys26 in Patx1. Although Lys26 is conserved in Psp3Tx1, the neighboring additional Lys27 residue found in PaTx1 is not present in the PspTx1 sequence that is shorter. Here again this difference could contribute to the unique Psp3Tx1 interaction surface with ion channels. Additionally, within the loop 2, Psp3Tx1 Glu12 and Pro14 are substituted to Ala12 and Lys14 in PaTx1. This suggests first a distinct electrostatic effect (difference of 2 charges), and second a distinct structural constrain to the toxin backbone provided by Pro14 just before the Cys15 engaged in the third disulfide bridge of the ICK fold.

SAR studies of distinct toxins acting on Nav1.7 revealed that modifying both the hydrophobic patch in the first loop and the C-terminal tail between PaTx1 and ProTxII largely impact Nav1.7 block efficacy and selectivity for Nav1.7 (Park et al. 2014). Single mutants within these two regions in ProTxII also contribute to the improved properties of the JNJ63955918 peptide from Janssen laboratories (Flinspach et al. 2017). Moreover, SAR studies on GpTx1, another ICK toxin more distantly related to Psp3Tx1 reaches similar conclusions about the role of the loop 1 and C-terminus (Murray et al. 2015). Altogether, the peculiar residues of Psp3Tx1 in these two spots are certainly important for the peptide properties.

Assessment of Psp3Tx1 blocking properties revealed that it falls in the very short list of potent Nav1.7 inhibitors with a 10-fold selectivity over Nav1.1, 78-fold over Nav1.6, and more than 100-fold over all the other subtypes. As for the recently reported Pn3a toxin (Deuis et al. 2017) or ProTxII derivative JNJ63955918 (Flinspach et al. 2017), the selectivity of Psp3Tx1 predicts analgesic effects from Nav1.7 blockade while limiting unwanted side effects. Unsurprisingly the close similarity of Psp3Tx1 with PaTx1 results in some degree of Kv4 inhibition limited to the Kv4.3 isoform and with a potency largely inferior to PaTx1. Kv4.3 is the pore forming subunit of the cardiac I_{to} potassium channel. While Kv4.3 inhibition could have been a limitation for the *in vivo* use, a systemic dosage of Psp3tx1 at a final concentration of 1 and 10 μ M of the peptide did not modify significantly heart electrical activity. The apparent lack of off-target effect of Psp3Tx1 reside probably in the different rates of toxin unbinding from the distinct channels tested. We found that, as expected from such toxin sequence, Psp3Tx1 is a gating modifier with the classical biophysical hallmarks. One unique characteristic of Psp3Tx1, specific of Nav1.7 target compared to other channels tested, is however the kinetics of channel block. On-rate is moderately rapid and off-rate is markedly slow. Comparatively to other gating modifiers of ion channels where the toxin unbinding can be greatly accelerated by stepping membrane potential with brief train of depolarization to very positive potentials (for

distinct calcium channel toxin for example (Bourinet et al. 1999; Bourinet et al. 2001)), this procedure did not accelerate washout of Nav1.7 block (not shown). Similarly washout of JNJ63955918 mediated block of Nav1.7 was described as a slow process only accelerated by holding the membrane potential for long period at 0mV (Flinspach et al. 2017). This suggests that Psp3Tx1 is able to dock deeper into a molecular cavity in one of Nav1.7 voltage sensing domain (VSD) compared to its binding on other channels. In that scenario, toxin access to its receptor site requires a bit more time, but once bound, Psp3Tx1 remains stably anchored. This remains to be confirmed by structural data as it has been recently done for crystals of aryl sulfonamide antagonists in complex with a chimeric Nav1.7-NavAb channels (Ahuja et al. 2015). These type of data are likely to emerge rapidly considering the evolution of structural biology using cryo electron microscopy (Wu et al. 2016a). It could be predicted however that the VSD targeted by Psp3Tx1 is likely in the fourth domain of the channel as for other Nav1.7 blocking peptide (Ahern et al. 2016). The level of promiscuity of gating modifier toxins is further exemplified in our study. It reveals a degree of structural homology of VSDs. For the Kv4.3 channel however, even if the degree of block obtained is not negligible, the four-fold channels symmetry with up to four potential Psp3Tx1 peptides bound per channel suggests that the toxin effect is largely weaker on this channel in comparison to Nav1.7. Effects on Cav3.x channels results certainly from the level of VSD similarity between Navs and Cav3.x. It should be noted that recently, Cav3.1 block by ProTxII and Patx1 was found to depend on the third VSD (Salari et al. 2016) while the effect of ProTxI depends on the fourth VSD (Bladen et al. 2014). Thus additional detailed structure function analysis will be required to have a clear picture of Psp3Tx1 binding on the distinct Nav and Cav channels. Noteworthy, the expression system used for performing the experiments could also impact the pharmacological properties of the channels. We used *Xenopus* oocytes for the initial screening, a system known to differentially glycosylate proteins compared to mammalian cells with sometime some impact

on toxin potency (Bourinet et al. 1999). Therefore we investigated whether N-glycosylation could modulate Psp3Tx1 effects by expressing channels in GnTI-HEK cells deficient in N-acetyl-glucosaminyltransferase I (GnTI) activity resulting in recombinant membrane proteins lacking complex N-glycans. While the magnitude of Nav1.7 inhibition by Psp3Tx1 in this cell line was nearly the same, interestingly the kinetics of block were speeded up with a marked increase of block reversal (not shown), suggesting that the toxin-Nav1.7 strong interaction results from multiple structural determinants.

Our study reveals that Psp3Tx1 has analgesic properties when injected in the peripheral receptive field of neuropathic mice. Previous studies have shown that Nav1.7 specific peptides effectively reduce spontaneous pain resulting from Nav1.7 pharmacological peripheral activation (Deuis et al. 2017; Deuis, Wingerd, et al. 2016; Cardoso et al. 2015). Globally, Psp3Tx1 give similar results in this model. For Nav1.7 toxins analgesic effects regarding acute, neuropathic, or inflammatory pain, the picture is more contrasted. For example, Flinspach *et al.* described a potent ProTxII derivative mediated analgesia on hot evoked acute pain or formalin evoked spontaneous pain when injected intrathecally or perineurally around the sciatic nerve (Flinspach et al. 2017). The native ProTxII peptide sequence analgesia is more controversial with possible penetration issues through blood-nerve barrier (Schmalhofer et al. 2008). The impact of Nav1.7 on pain sensing neurons does not only result from its electrogenic activity but also from modulating intracellular signaling cascades of G-protein coupled receptors (Minett et al. 2015; Emery, Luiz, and Wood 2016; Isensee et al. 2017). In agreement, Deuis *et al.* demonstrated that systemic dosing of Pn3a as well as Phlo toxin1 or the small organic Nav1.7 blocker PF-04856264 synergize with opioids to produce analgesia in inflammatory pain while they have limited analgesic potential alone (Deuis et al. 2017). Our data contrast with these findings since Psp3Tx1 alone injected in the receptive field is sufficient to elicit an analgesic effect in a model of neuropathic pain. However the route of injection and

the pain models are different and would need a side by side comparison in the same conditions. This finding is encouraging to further explore the efficacy of the peptide in a range of conditions.

In summary, our results suggest that Psp3Tx1 is a promising close state Nav1.7 channel blocker for the development of novel analgesics potentially useful for treating pain syndromes by acting locally in the peripheral receptive field. Compared to the short list of potent and selective Nav1.7 peptidic blocker, this new sequence could be a promising starting point for sequence optimization for drug development.

Materials and methods

Purification of Psp3Tx1 toxin.

The venom from *Paraphysa sp3* (Theraphosidae) was purchased from Spider Farm (Feasterville, PA, U.S.A.). In a first screening attempt, we identified inhibitory activities of diluted venom (1 : 1000) for Cav3.2 currents, and purified the responsible peptides. Venom preparation for activity analysis and for chromatographic separation consist in a dissolution of the dried venom in ultra-pure water to a volume of 10 times the initial volume of venom, a centrifugation (14000rpm, 20min) and a filtration on a 0,45µm membrane (SJHVL04NS Millipore). Purification of the active fraction of the venom with chromatography : First, a 100µl aliquot of the diluted venom (equivalent of 10µl of raw venom) is fractionated by RP-HPLC on a C8 semipreparative column (5C8MS, 10x250mm, Waters). The gradient used is composed of water + 0,1% trifluoroacetic acid (TFA) (solvent A) / acetonitrile + 0,1% TFA (solvent B). The gradient is programmed as follow : 0% B during 5min, 0 to 60% B in 60min, 60 to 90% B in 10min, flow 2 mL/min. The fractions are manually collected at the end of the column, while looking at the variations in the 215nm UV absorbance. The active fraction on Cav3.2 activity were further purified on a cation-exchange chromatography (Tosoh SP5PW column, 4,6x70mm), with an ammonium acetate in water linear gradient (from 20mM to 1M in 50min) with a flow of 0.5 mL/min.

Peptide sequencing and mass determination

Lyophilized Psp3-213 peptide was reduced with DTT (Dithiothreitol 10mM, 55°C, 45min) and alkylated with IAA (iodoacetic acid, 50mM, 20°C, 30min) The reduced/alkylated peptide was desalted by RP-HPLC C18 chromatography on a Merck Chromolith Speed-Rod column (0,46x50mm) before sequencing. It was submitted to Edman degradation on an Applied

Biosystems model 477 A microsequencer. Purity and molecular weight of the peptide forming the active fraction were determined using MALDI-TOF Mass Spectrometry (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Mass spectrometry measures are realized by MALDI-TOF Mass Spectrometry on a Voyager DE-Pro Mass Spectrometer (Applied Biosystems) on reflector mode. The peptides are mixed with the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (α -CHCA, Sigma), 5mg/mL in 50 : 50 : 0,1, water : acetonitrile : TFA) and analyzed. Mass specters are calibrated with internal standards and analyzed with the Data Explorer Software.

Sequence alignment

The sequence alignment of spider toxins with an ICK motif and three disulfide bridges that targets Nav, Cav or Kv channels is done using peptides sequences that were obtained from ArachnoServer Database (www.arachnoserver.org) (Herzig *et al.* 2011). The phylogenetic tree of the toxins sequences is reconstructed using the BioEdit Sequence Alignment Editor software. Identity values were obtained using the protein BLAST tool from the NCBI website with the blastp algorithm.

Solid-phase peptide synthesis

Fmoc protected amino acids and HCTU were purchased at Activotec (Cambridge, UK). Wang-PS functionalized resins preloaded with protected amino acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). N-methylmorpholine (NMM) and acetic anhydride (Ac_2O) were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin-en-Fallavier, France). N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). The toxins were synthesized on a 25 μmol scale using Fmoc chemistry on a Prelude synthesizer (Protein Technologies®) using Wang-PS resin functionalized with the asparagin amino acid (AA). Each coupling step was carried out twice 5min using a mixture 10 eq. : 10

eq. : 20 eq. Fmoc-AA/HCTU/NMM in NMP (0.1M final) followed by a capping step of 5min with a solution of Ac₂O/NMM 1 : 1 v/v in NMP (2.5mL). Fmoc deprotection was performed twice 2min using 2mL of a 20% piperidine solution in NMP. After concomitant cleavage from the resin and amino acid side chains deprotection using TFA/H₂O/TIS 90 : 5 : 5 solution, the crude peptide was precipitated in cold Et₂O followed by a centrifugation (2000rpm) and the removal of the supernatant. The precipitate was washed twice following the same procedure and lyophilized from 15mL of 10% acetic acid solution.

Purification of the folded peptide

Linear peptide purities were analysed using a Waters Alliance e2695 system on a reverse phase column Waters XBridge C18 BEH300Å using a gradient from 80 : 20 A/B (A=H₂O, 0.1% TFA and B=CH₃CN, 0.1% TFA) to 50 : 50 in 30min. Linear peptide (30mg) was purified using a Merck Prep system and a sunfire column C18 30*250mm, 10µm using the gradient from 90 : 10 A/B (A=H₂O, 0.1% TFA and B=CH₃CN, 0.1% TFA) to 50 : 50 in 40min. 9mg of the linear peptide was folded in the buffer 20% ACN / EDTA 1mM / Tris HCl 100mM / pH 8, GSH/GSSG 1mM, at a final concentration of 20µM, for 24h at RT. The oxidized toxin was purified using a Merck Prep system and a Waters XBridge C18 BEH300Å 19*250mm, 5µm using the gradient from 85 : 15 A/B (A=H₂O, 0.1% TFA and B=CH₃CN, 0.1% TFA) to 50 : 50 in 35min. 0.7mg of pure and fully oxidized PsP3Tx1 was obtained. Similar peptide batch production was obtained commercially from Synprosis (Marseille, France). Both source resulted in similar efficiency.

Plasmid constructions

The following cDNA sequences inserted in expression vectors were used (Genbank™ accession numbers are in parentheses): Cav3.2 (NM_021098.2), Cav3.1 (NM_018896.4),

Cav3.3 (NM_021096.3), Cav2.2 (NM_000718.3), Cav α_{1b} (NM_017346), Cav α_2 - α_{1-b} (AF286488), Nav1.3 (NM_001081677.1), Nav1.4 (NM_000334.4), Nav1.5 (AB158470.2), Nav1.7 (NM_002977.3), Nav1.8 (NM_017247.1), Nav α_1 (NM_001037.4), Nav α_2 (NM_004588.4), Kv4.2 (S64320), and Kv4.3 (U75448). High voltage activated calcium channel auxiliary subunits Cav α_{1b} and Cav α_2 - α_{1-b} were cloned together in a single dual expression plasmid (pDuo, Invivogene). Similarly, sodium channel auxiliary subunits Nav α_1 and Nav α_2 were inserted in a single vector together with GFP coding sequence to facilitate transfected cells identification (Cox et al. 2006).

Recombinant channels

For transient expression in *Xenopus* oocytes, stage V and VI oocytes were prepared as described (Altier et al. 2002), and nuclear injection was performed with 10nl of Cav3.2 / GFP cDNA mix (1 : 0.1 molar ratio). Oocytes were then incubated at 18°C for 3 to 5 days in ND96 medium on rotating platform.

For mammalian cell transient expression, tsA-201 or G α TI β HEK cells were cultivated in DMEM supplemented with GlutaMax and 10% fetal bovine serum (Invitrogen) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Transfections were performed using jet-PEI (Polyplus transfection). cDNA molar ratios were as follow: for sodium channels (Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5 or Nav1.7), Nav1.X/Nav α_1 -Nav α_2 -GFP cDNA molar ratio of 1 : 0.1 ; for Kv4.2 or Kv4.3 channels, a Kv4.X / GFP cDNA molar ratio of 1 : 0.1 ; for N-type calcium channels, a Cav2.2 / Cav α_{1b} -Cav α_2 - α_{1-b} / GFP molar ratio of 1 : 1 : 0.1 ; and for T-type calcium channels a Cav3.X / GFP molar ratio of 1 : 0.1. Nav1.8 was transiently expressed in F-11 DRG cell line cultured in DMEM supplemented with GlutaMax and 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 200 μ g/ml hydroxyproline. Transfection was performed using jet-PEI with a Nav1.8 / GFP molar ratio of

1 : 0.1. Two days after transfection, cells were dissociated with Versene (Invitrogen), and plated at low density in poly-ornithine coated 35mm Petri dish for electrophysiological recordings. In addition, Cav3.2 and Cav3.3 stable HEK cells were used. For Q-Patch experiments, stable HEK293 cell line expressing Nav1.1, Nav1.2, Nav1.6, and Nav1.7 (SB Drug Discovery, Glasgow, UK) were used.

DRG isolation

Lumbar DRGs with attached roots were dissected from adult mice and were collected in Hank's balanced salt solution (HBSS) medium without calcium (Invitrogen). DRGs were prepared as in (Francois et al. 2015b). Patch-clamp recordings were performed 12–28h after plating on small diameter neurons.

Electrophysiological measurements

Macroscopic oocyte currents were recorded using two electrode voltage-clamp with a GeneClamp500 amplifier (Axon Instruments) in a solution containing (in mM) : 5 BaOH₂, 25 TEAOH, 25 NaOH, 2 CsOH, 30 NMDG, 5 HEPES (pH to 7.3 with methanesulfonic acid). The endogenous oocyte Ca²⁺-activated Cl⁻ current was completely suppressed by injection of a BAPTA solution. Oocytes were continuously perfused by a gravity driven perfusion system. Whole-cell currents from recombinant channels expressed in mammalian cells were recorded at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices), the extracellular solution contained the following (in mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10, Glucose 10; pH 7,3 with NaOH; osmolarity 320mOsm. For Nav and Cav currents, the internal solution contained the following (in mM): CsCl 130, EGTA 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, MgATP 4, TrisGTP 0,3; pH adjusted to 7,3 with NaOH; osmolarity 300mOsm. For Kv currents, the internal solution contained the following (in mM): K Aspartate 105, NaCl 10, KCl 27,

EGTA 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, MgATP 4, NaGTP 0,4, Creatine Phosphate 5; pH adjusted to 7,2 with KOH; osmolarity 329mOsm. Borosilicate glass pipettes with a typical resistance of 2–4 MΩ were used. For Nav1.9 sodium current recordings in small sized DRG neurons, the extracellular solution contained (in mM): 2 CaCl₂, 5 TEACl, 130 NaCl, 1 MgCl₂, 4.8 KCl, 1CsCl, 0.5 CdCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, 0.0005 TTX, 0.5 mg/ml BSA (pH 7.3 with NaOH, 295 mOsM). Pipettes with a resistance of 1–1.5MΩ were filled with an internal solution containing (in mM): 100 CsCl, 30 CsF, 0.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.4 Na GTP (pH 7.3 with CsOH, 297mOsM). Recordings were sampled at 8-100kHz and filtered at 2–5kHz. Data were analyzed using pCLAMP (MolecularDevices), and GraphPad Prism (GraphPad) software. Psp3Tx1 was diluted in extracellular solution with 0,5% BSA to prevent fixation on the tubing of the gravity driven perfusion. All Psp3Tx1 effects were compared to pre-toxin control parameters on the same cell. Automated patch clamp experiments were performed on a QPatch-16 electrophysiology platform (Sophion Bioscience, Ballerup, Denmark). The extracellular solution contained in mM: NaCl 145, KCl 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10 and glucose 10; pH 7.4; osmolarity 305 mOsm. The intracellular solution contained in mM: CsF 140, EGTA/CsOH 1/5, HEPES 10 and NaCl 10; pH 7.3 with CsOH; osmolarity 320mOsm. Psp3Tx1 was diluted in extracellular solution with 0.1% BSA at the concentrations stated. All Psp3Tx1 effects were compared to pre-toxin control parameters within the same cell.

Electrocardiography (ECG)

Experiments were conducted at room temperature with 8-12 weeks littermate C57Bl6 male mice. One-lead surface ECG measurements were recorded from sedated mice (isoflurane 1.5%). Ag/AgCl gel-coated ECG electrodes (Emka Technologies, France) were attached to the superior right and both inferior limbs of mice. The electrodes were connected to a standard one-lead ECG amplifier module (Emka Technologies, France). Signals were digitized continuously

at 1 kHz and recorded using an IOX data acquisition system (Emka Technologies, France). The recordings were carried out from 10min baseline before Psp3Tx1 injection, and for 30min after drug treatment. Administration of vehicle or toxin were performed by IV route in the tail vein with an insulin syringe with a 30 gauge needle with 20 μ l bolus. The control group received the saline vehicle (NaCl 0.9%), the two Psp3Tx1 groups received 20 μ l at 0.1 and 1mM respectively corresponding to a final concentration in the animals of 1 and 10 μ M (estimated 1/100 dilution in the ~2ml blood volume of a mouse). The software ecgAUTO (Emka Technologies, France) was used to perform offline analysis of the data recorded.

Behavioral Assays

Experiments were conducted at room temperature with 8-12 weeks C57Bl6 mice. Animals were acclimated to their testing environment prior to all experiments. Pain scores were determined with strict adherence to ethical guidelines (Zimmermann 1983) and to the local ethical committee following an approved procedure (APAFIS#747, French Ministry of Education and Research). For experiments on naive mice, acute noxious and non-noxious mechanical perception was assessed using the von Frey hair filaments of three different bending forces (0.07, 0.6 and 1.4 g) (Descoeur et al. 2011b). Animals were habituated to manipulation two days before experiment.

To establish a neuropathic pain, animals were deeply anesthetized with Ketamine-Xylazine (respectively 100mg/kg and 10mg/kg) and unilateral chronic constriction injury (CCI) surgery was performed. Four chromic gut ligatures were tied loosely (with about 1mm spacing) around the left common sciatic nerve. The nerve was constricted to a barely discerning degree, so that circulation through the epineural vasculature was not interrupted. A sc. injection of NaCl 0.9% (10 ml/1 kg) was finally performed to prevent dehydration. At Day 7, pharmacological treatments were performed. Von Frey filaments scores were evaluated in baseline condition and

then every 10min for an hour after intraplantar injections (i.pl) in the ipsilateral paw (10 μ l using a 30 gauge needle connected to a 20 μ l Hamilton syringe). Treatments consisted of a control group (vehicle), a Psp3Tx1 group (10nmol/10 μ l, 1mM resulting in an estimated final concentration of 1 μ M in the paw), and reference morphine group (10 μ g/10 μ l).

For OD1 induced pain, 8 weeks adult male and female C57BL6 mice were used. Animals were housed in groups of 3-4 per cage, under 12h light-dark cycles with standard rodent chow and water *ad libitum*. The Nav1.7 activator OD1 (300nM, Smartox Biotechnology, France) was administered by i.pl injection in mice as described in (Deuis, Wingerd, et al. 2016). Psp3Tx1 (12, 40, 120 μ mol/40 μ l ; 0,3 μ M, 1 μ M, and 3 μ M respectively resulting in estimated final concentrations of 0.3nM, 1nM, and 3nM in the paw) was diluted in saline and administered at the same time as OD1. Experiments were video recorded and spontaneous pain behaviors were counted offline by a blinded observer unaware of the treatment that each animal received. Experiments were conducted at room temperature.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and posthoc analysis performed using Tukey's, Newman-Keuls or Mann-Whitney U test using the GraphPad prism software.

Author Contributions: P.L., M.D., F.M., A.A., F.C.C.,P.E.,N.G. and E.B. designed the experiments. P.L., M.D., F.M., A.A., F.C.C.,P.E.,N.G. and E.B. performed the experiments. P.L., M.D., F.M., A.A., F.C.C.,A.E., M.L., R.L., P.E.,N.G. and E.B. analyzed the data. P.L., xxxxxxx and E.B. wrote the manuscript.

Acknowledgements: We are grateful to JN Wood for the Nav1.7 and Navb1-b2 cDNAs, to S Diochot the Kv4.2 and Kv4.3 cDNA, to M Mantegazza for the Nav1.3 cDNA, and to S Laffray for assistance. This work was supported by grants from the ANR (ANR-10-BIOT-0010 to E Bourinet/N Gilles/P Escoubas, LabEx ICST, to E Bourinet), the AFM (AFM-PainT, to E Bourinet), the Australian whatever agency.... to Richard Lewis. P Lesport, Fabrice Marger, Michael Deage are supported by fellowships or salary-grants from the LabEx ICST, ANR-10-BIOT-0010, CNRS valorisation. None of the authors have a financial interest related to this work.

References

1. Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, & Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136(3):380-387.
2. Waxman SG & Zamponi GW (2014) Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci* 17(2):153-163.
3. McCormack K, *et al.* (2013) Voltage sensor interaction site for selective small molecule inhibitors of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(29):E2724-2732.
4. Bregman H, *et al.* (2011) Identification of a potent, state-dependent inhibitor of Nav1.7 with oral efficacy in the formalin model of persistent pain. *J Med Chem* 54(13):4427-4445.
5. Francois A, Laffray S, Pizzoccaro A, Eschalier A, & Bourinet E (2014) T-type calcium channels in chronic pain: mouse models and specific blockers. *Pflugers Arch* 466(4):707-717.
6. Wood JN (2013) Results in analgesia--Darwin 1, pharma 0. *N Engl J Med* 369(26):2558-2560.
7. Escoubas P & Rash L (2004) Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* 43(5):555-574.
8. Dutertre S, *et al.* (2014) Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature communications* 5:3521.
9. Cardoso FC, *et al.* (2015) Identification and Characterization of ProTx-III [μ -TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelma pruriens*. *Mol Pharmacol* 88(2):291-303.

10. Deuis JR, *et al.* (2016) Analgesic Effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a Mouse Model of Nav1.7-Mediated Pain. *Toxins (Basel)* 8(3).
11. Norton RS & Pallaghy PK (1998) The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36(11):1573-1583.
12. Diochot S, Drici MD, Moinier D, Fink M, & Lazdunski M (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 126(1):251-263.
13. Park JH, *et al.* (2014) Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels. *J Med Chem* 57(15):6623-6631.
14. Salari A, Vega BS, Milescu LS, & Milescu M (2016) Molecular Interactions between Tarantula Toxins and Low-Voltage-Activated Calcium Channels. *Scientific reports* 6:23894.
15. Bladen C, Hamid J, Souza IA, & Zamponi GW (2014) Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Mol Brain* 7:36.
16. Flinspach M, *et al.* (2017) Insensitivity to pain induced by a potent selective closed-state Nav1.7 inhibitor. *Scientific reports* 7:39662.
17. Clement H, *et al.* (2007) Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels. *Toxicon* 50(1):65-74.
18. Zeng X, *et al.* (2007) Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon* 49(3):388-399.
19. Zimmermann K, *et al.* (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447(7146):855-858.

20. Murray JK, *et al.* (2015) Engineering potent and selective analogues of GpTx-1, a tarantula venom peptide antagonist of the Na(V)1.7 sodium channel. *J Med Chem* 58(5):2299-2314.
21. Murray JK, *et al.* (2016) Single Residue Substitutions That Confer Voltage-Gated Sodium Ion Channel Subtype Selectivity in the NaV1.7 Inhibitory Peptide GpTx-1. *J Med Chem* 59(6):2704-2717.
22. Deuis JR, *et al.* (2017) Pharmacological characterisation of the highly NaV1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Scientific reports* 7:40883.
23. Deuis JR, Yin K, Cooper MA, Schroder K, & Vetter I (2016) Role of the NLRP3 inflammasome in a model of acute burn-induced pain. *Burns*.
24. Motin L, Durek T, & Adams DJ (2016) Modulation of human Nav1.7 channel gating by synthetic alpha-scorpion toxin OD1 and its analogs. *Channels (Austin)* 10(2):139-147.
25. Descoeur J, *et al.* (2011) Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 3:1-13.
26. Chagot B, *et al.* (2004) Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider Phrixotrichus auratus. *Protein Sci* 13(5):1197-1208.
27. Bourinet E, *et al.* (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2(5):407-415.
28. Bourinet E, *et al.* (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J* 81(1):79-88.
29. Ahuja S, *et al.* (2015) Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist. *Science* 350(6267):aac5464.

30. Wu J, *et al.* (2016) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*.
31. Ahern CA, Payandeh J, Bosmans F, & Chanda B (2016) The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J Gen Physiol* 147(1):1-24.
32. Schmalhofer WA, *et al.* (2008) ProTx-II, a selective inhibitor of Nav1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol* 74(5):1476-1484.
33. Minett MS, *et al.* (2015) Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. *Nature communications* 6:8967.
34. Emery EC, Luiz AP, & Wood JN (2016) Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. *Expert Opin Ther Targets* 20(8):975-983.
35. Isensee J, *et al.* (2017) Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Nav1.7 knockout mice. *Sci Signal* 10(461).
36. Cox JJ, *et al.* (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444(7121):894-898.
37. Altier C, *et al.* (2002) Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* 277(37):33598-33603.
38. Francois A, *et al.* (2015) The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep* 10(3):370-382.
39. Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109-110.

Figure Legends:

Figure 1: Purification of native Psp3Tx1.

A. RP-HPLC elution profile of the entire venom with the active fraction pool shown in the boxed gray area. The gradient is as follow: 0% solvent B (acetonitrile + 0,1% TFA) during 5min, 0 to 60% solvent B in 60min, 60 to 90% solvent B in 10min (flow 2mL/min). **B.** CE-HPLC analysis of the active pool. The boxed area highlights the active fraction containing the pure Psp3Tx1 peptide. The gradient is as follow: from 20mM to 1M Ammonium acetate in water in 50min with a flow of 0.5mL/min. **C.** Sequence alignment of peptides with similarity to Psp3Tx1. The full sequence was obtained using Edman sequencing confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. Identity values were obtained using the protein BLAST tool from the NCBI website with the blastp algorithm. Identity values and reported activities are shown next to the amino acid sequence of the peptides. Standard one-letter amino acid abbreviations are used. The % of identity is shown relative to Psp3Tx1. **D.** Homology tree of the peptides similar to Psp3Tx1. The tree was made using BioEdit Sequence Alignment Editor software. Distances between branches are not to scale.

Figure 2: Synthetic Psp3Tx1 production.

A. RP-HPLC elution profile of the linear form of the synthetic peptide. The gradient is as follow: 20% solvent B (acetonitrile + 0,1% TFA) to 50% solvent B in 30min. **B.** RP-HPLC elution profile of the folded form of the synthetic peptide. The gradient is as follow: 15% solvent B (acetonitrile + 0.1% TFA) to 50% solvent B in 35min. **C.** Comparison of native and synthetic Psp3Tx1 block of recombinant Cav3.2 in tsa201 cells. Concentration response curves were obtained with a holding potential of -90mV and a test pulse to -40mV for 100ms applied at 0.1 Hz. Synthetic Psp3Tx1 and the natural polypeptide were nearly equally active.

Figure 3: Psp3Tx1 inhibition of Nav1.x channels

A. Manual patch-clamp sodium currents recordings from tsa201 cells transiently expressing Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.7 subunits and Nav β_1 -Nav β_2 -GFP, F11 cells expressing Nav1.8 or DRG cells expressing Nav1.9. The current traces in the absence or presence of 100nM Psp3Tx1 (or 1 μ M for Nav1.8 and Nav1.9) are in black and red respectively. Step depolarizations of various durations to 0mV from holding potentials of -90mV were applied at 0.1Hz. **B.** Q-patch sodium currents recordings from HEK cells lines stably expressing Nav1.1, Nav1.2, Nav1.7 subunits and from a CHO cell line stably expressing Nav1.6 subunit. The current traces in the absence or presence of 100nM Psp3Tx1 are in black and red respectively. 5ms step depolarizations to 0mV from holding potentials of -90mV were applied at 0.1Hz. **C.** Dose-response inhibition curves of Nav1.3 (n=9), Nav1.4 (n=15), Nav1.5 (n=8), Nav1.7 (n=25), Nav1.8 (n=6) and Nav1.9 (n=5) currents by Psp3Tx1 in manual patch-clamp experiments. For Nav1.8 and Nav1.9 only one dose (1 μ M) was tested. Data are presented as mean \pm SEM of each dose. **D.** Dose-response inhibition curves of Nav1.1 (n=12), Nav1.2 (n=9), Nav1.6 (n=13), Nav1.7 (n=33) currents by Psp3Tx1 in Q-patch experiments. Data are presented as mean \pm SEM of each dose.

Figure 4: Psp3Tx1 inhibition of Kv4.2, Kv4.3, Cav3.X and Cav2.2 channels.

A. Left panel: Manual patch-clamp potassium currents recordings from tsa201 cells transiently expressing Kv4.2 and Kv4.3. The current traces in the absence or presence of 100nM Psp3Tx1 are in black and red respectively. Right panel: Dose-response curves of Kv4.2 (n=10) and Kv4.3 (n=7) currents by Psp3Tx1 in manual patch-clamp experiments. 700ms step depolarizations to +20mV from holding potentials of -90mV were applied at 0.1Hz. Data in the dose response curve are presented as mean \pm SEM of each dose. **B.** Upper panel: Manual patch-clamp sodium

currents recordings from tsa201 cells transiently expressing Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3 and Cav2.2. The current traces in the absence or presence of 1 μ M Psp3Tx1 are in black and red respectively. Bottom panel: Dose-response curves of Cav3.1 (n=5), Cav3.2 (n=10) and Cav3.3 (n=11) currents by Psp3Tx1 in manual patch-clamp experiments. For Cav2.2 only one dose was tested (n=6). Step depolarizations of various durations to -40mV (Cav3.x) or 0mV (Cav2.2) from holding potentials of -90mV were applied at 0.1Hz. Data in the dose response curve are presented as mean \pm SEM of each dose.

Figure 5: Psp3Tx1 block of Nav1.7 channels

A. Typical traces for Psp3Tx1 block of Nav1.7 current at negative and positive test voltages exemplifying the more potent effect of the toxin for weaker depolarizations. The current traces in the absence or presence of 100nM Psp3Tx1 are in black and red respectively. Step depolarizations of 10ms to -10 or +55mV from a holding potential of -90mV were applied at 0.1Hz. **B.** Current-voltage relationships of Nav1.7 current in the absence or presence of 100nM Psp3Tx1 (filled and open circles respectively). The IV curves were fitted with a modified Boltzmann equation giving voltage of half activation of -17.2mV and -10.12mV in control and Psp3Tx1 conditions respectively. Data points in the IV curves are presented as mean \pm SEM, n=9. **C.** Typical time course of development and washout from Nav1.7 block by 100nM Psp3Tx1. Currents were elicited from a holding potential of -90mV to a test potential of -10mV at 0.2Hz. Block is stable over 6min of application and is poorly reversible upon washout. **D.** Typical time course of development and washout from Kv4.3 block by doses from 1nM to 1 μ M. Currents were elicited from a holding potential of -90mV to a test potential of +20mV at 0.1Hz. In contrary to Nav1.7, block of 1 μ M is fully reversible upon washout within 2min.

Figure 6: Psp3Tx1-mediated analgesia.

A. Comparative potency of Psp3Tx1 on ion channels assessed either by whole-cell patch clamp experiments (black bars) or Qpatch (gray bars). Psp3Tx1 showed a better potency against Nav1.7 than any other ion channel isoform, with a 10-fold selectivity against Nav1.1 and Kv4.3 and at least 100-fold selectivity against the other ion channels. $pIC_{50} = -\text{Log}_{10} IC_{50}$. **B.** Na1.7 specific pain test using the OD1 scorpion toxin. Injection of OD1 (40 μ l at 300nM in PBS+0,1% BSA) \pm Psp3Tx1 (12, 40, 120 pmol) in the paw resulted in spontaneous pain behaviors (licking, flinching, shaking and biting) and were counted in periods of five minutes following the start of the procedure. The bar graph shows the cumulative number of behaviors during the first 10min of the test. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 6 per group). **C.** Psp3Tx1 administration decreased paw lifts during hindpaw stimulation with a 0,07g, 0,6g or 1,4g von Frey filament in wild type (WT) mice after establishment of a CCI neuropathy. Antinociceptive effect is observed directly after either intraplantar injection of morphine (10 μ g) or Psp3Tx1 administration (10nmol) and lasts for 50min. Area under the curves of the experiments are presented in the bar graph. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 7-8 per group). ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ compared to vehicle group, ANOVA test. **D.** Psp3Tx1 administration decreased paw lifts during hindpaw stimulation with a 1,4g von Frey filament in wild type (WT) mice. Antinociceptive effect is observed directly after either morphine (10 μ g) or Psp3Tx1 administration (1nmol) by intrathecal injection and lasts for 50min. Area under the curves of experiments presented in the bar graph. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 8-10 per group). *** $p < 0,001$ compared to vehicle group, ANOVA test.

Figure S1:

A. Typical traces of current-voltage relationships of Cav3.2 expressed in *Xenopus* oocytes in the absence or presence of 1 μ M Psp3Tx1.

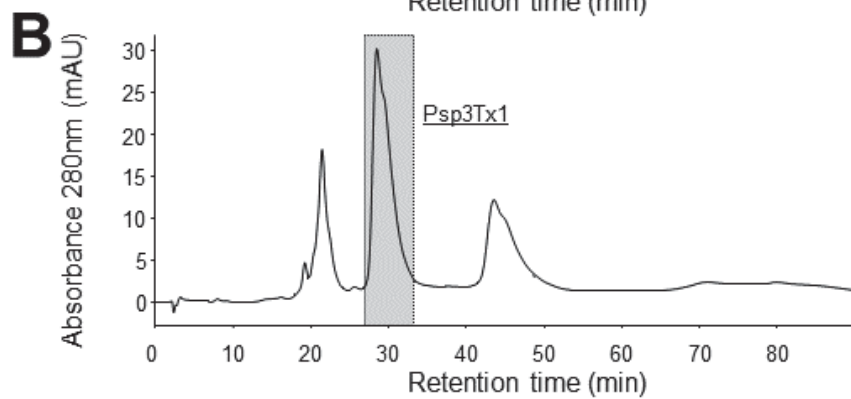
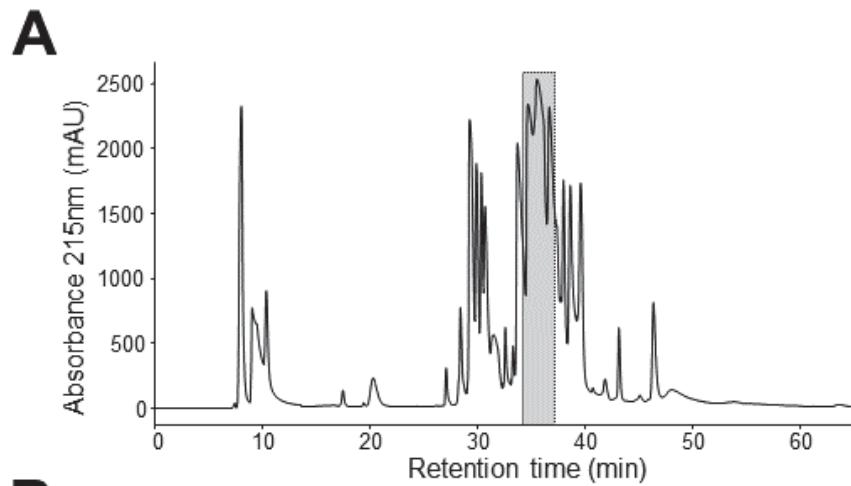
B. Typical time course of development and washout from Cav3.2 block by 1 μ M Psp3Tx1 . Currents were elicited from a holding potential of -90mV to a test potential of -40mV at 0.1Hz. In contrary to Nav1.7, block of 1 μ M is fully reversible upon washout within 4-5min.

C. The IV curves for the typical cell presented in C were fitted with a modified Boltzmann equation giving voltage of half activation of -38mV and -15mV mV in control and Psp3Tx1 conditions respectively.

Table 1:

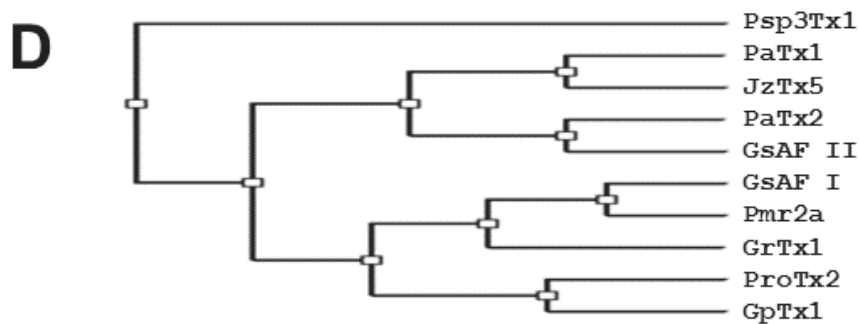
Channel	IC50 (nM) Manual Patch	IC50 (nM) Q-Patch	Selectivity *
hNav1.7	17.46 \pm 0.03 (n=25)	5.8 \pm 0.7 (n=33)	-
hNav1.1		55,6 \pm 0.2 (n=12)	9,5
hNav1.2		582,2 \pm 7.4 (n=9)	100
hNav1.3	44740 \pm 0.67 (n=9)		2562
hNav1.4	2004 \pm 0.22 (n=15)		115
hNav1.5	3455 \pm 0.26 (n=8)		198
hNav1.6		451 \pm 0.2 (n=13)	78
rNav1.8	>10000 (n=6)		>1000
mNav1.9	>10000 (n=5)		>1000
hCav3.1	4600 \pm 0. 3 (n=5)		>300
hCav3.2	3807 \pm 0.11 (n=10)		218
hCav3.3	7388 \pm 0.15 (n=11)		423
hCav2.2	>10000 (n=6)		>1000
hKv4.2	14460 \pm 0.5 (n=10)		828
hKv4.3	114 \pm 0.05 (n=7)		7

(* Fold selectivity over Nav1.7)

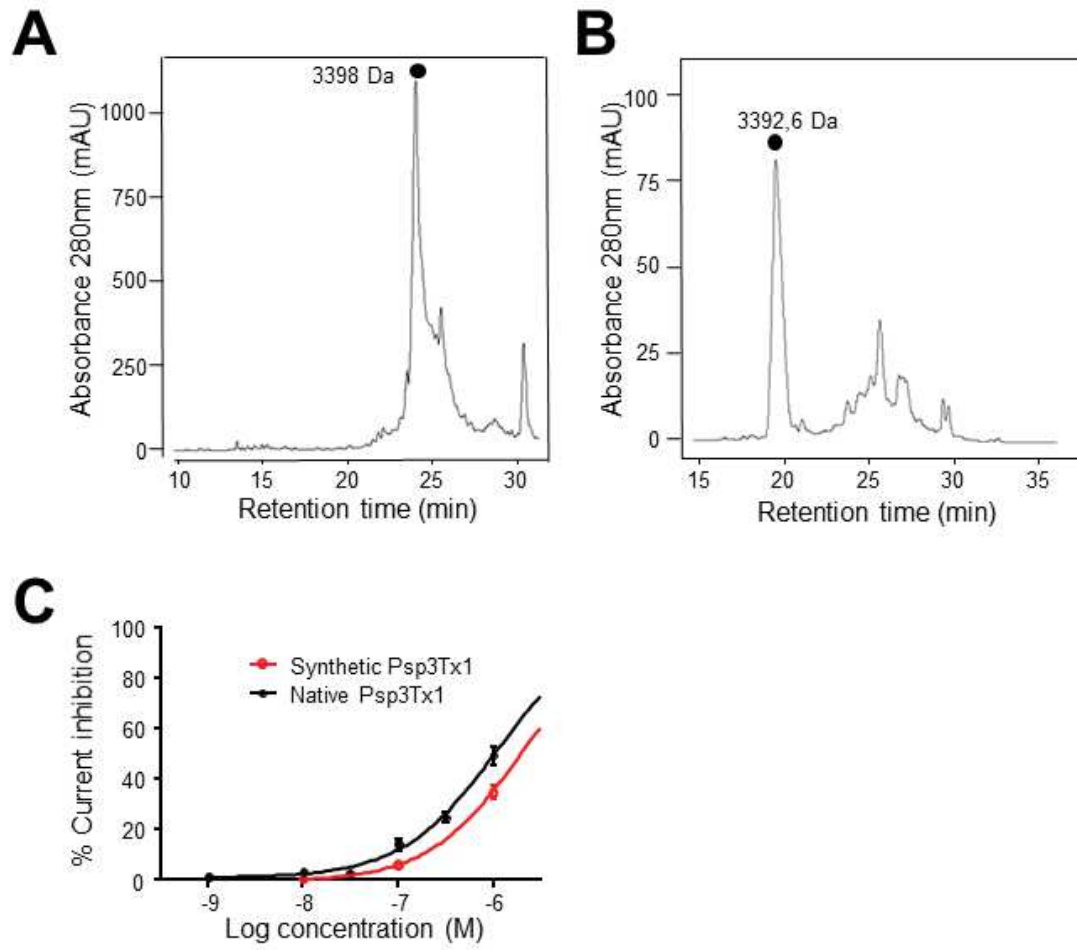


C

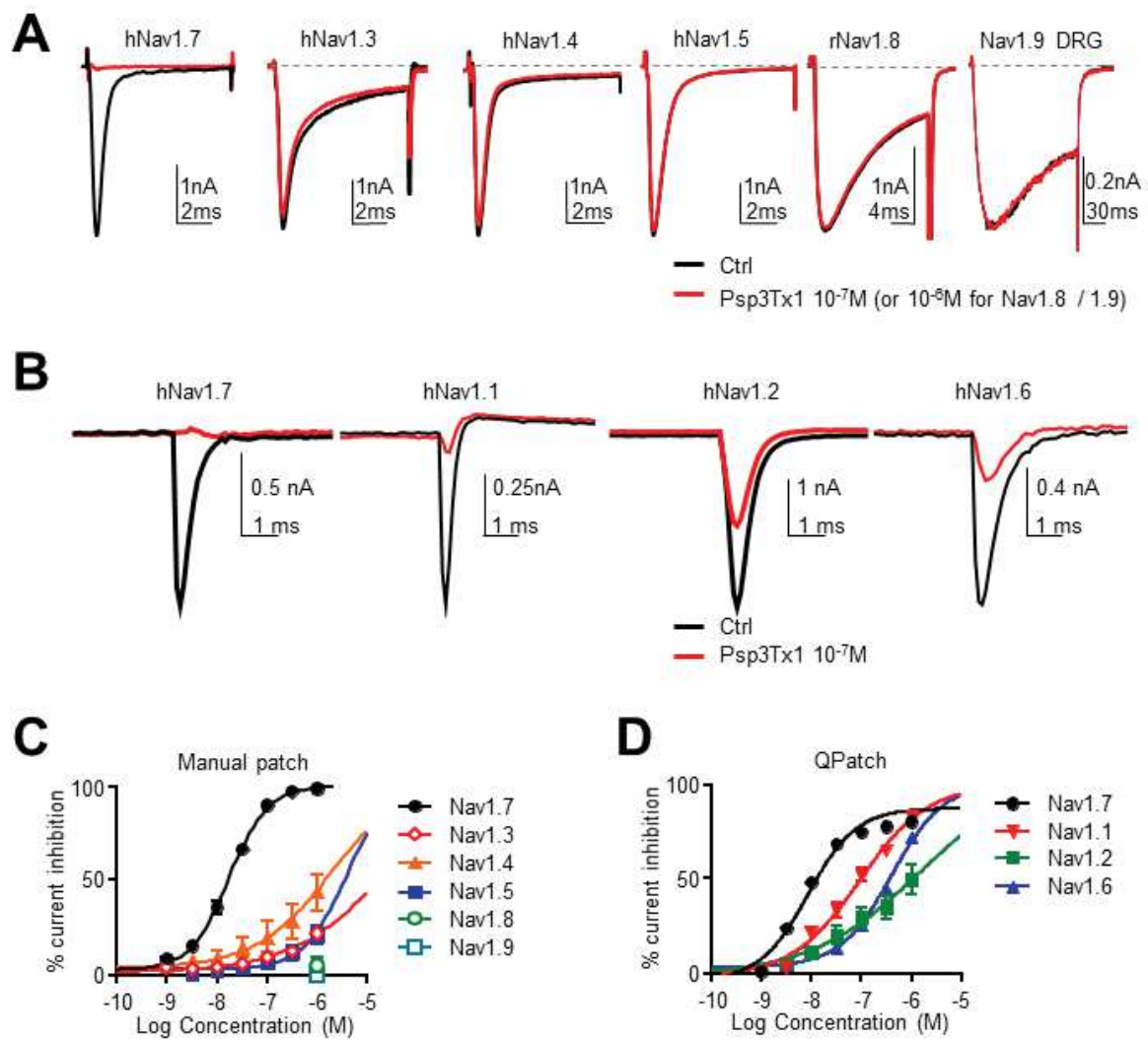
Psp3Tx1	YCQKFLWTCDSER-PCCEG-LVCR---LWCKIN		
		(%Identity)	Activity
PaTx1	YCQKWMWTCDSAR-KCCEG-LVCR---LWCKKII	85	Kv, Cav, Nav
PaTx2	YCQKWMWTCDEER-KCCEG-LVCR---LWCKKIINM	80	Kv
ProTx2	YCQKWMWTCDSER-KCCEG-MVCR---LWCKKKLW	85	Nav, Cav
GsAFI	YCQKWLWTCDSER-KCCED-MVCR---LWCKKRL	85	Nav, Cav
GsAFII	YCQKWMWTCDEER-KCCEG-LVCR---LWCKKKIEW	85	Nav, Cav
JzTx5	YCQKWMWTCDSKR-ACCEG-LRCK---LWCRKIIG	75	Nav, Kv
Pmr2a	YCQEFLWTCDEER-KCCGD-MVCR---LWCKKRL	77	Nav
GrTx1	YCQKWMWTCDSKR-KCCED-MVCQ---LWCKKRL	73	Nav
GpTx1	DCLGFMRKCIIPDNDKCCRPNLVCSRTHKWCKYVF	43	Nav



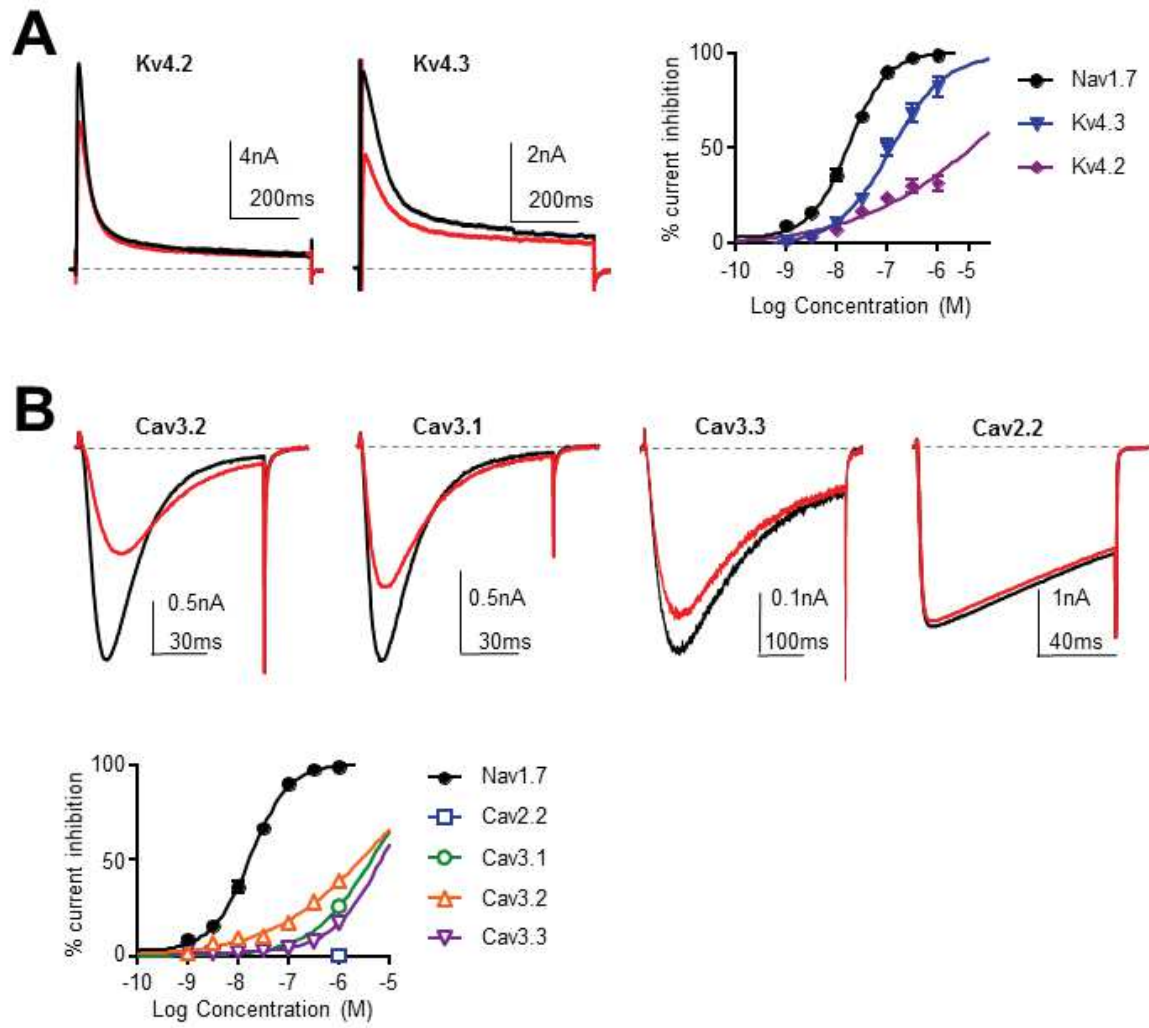
Lesport et al, Figure 1



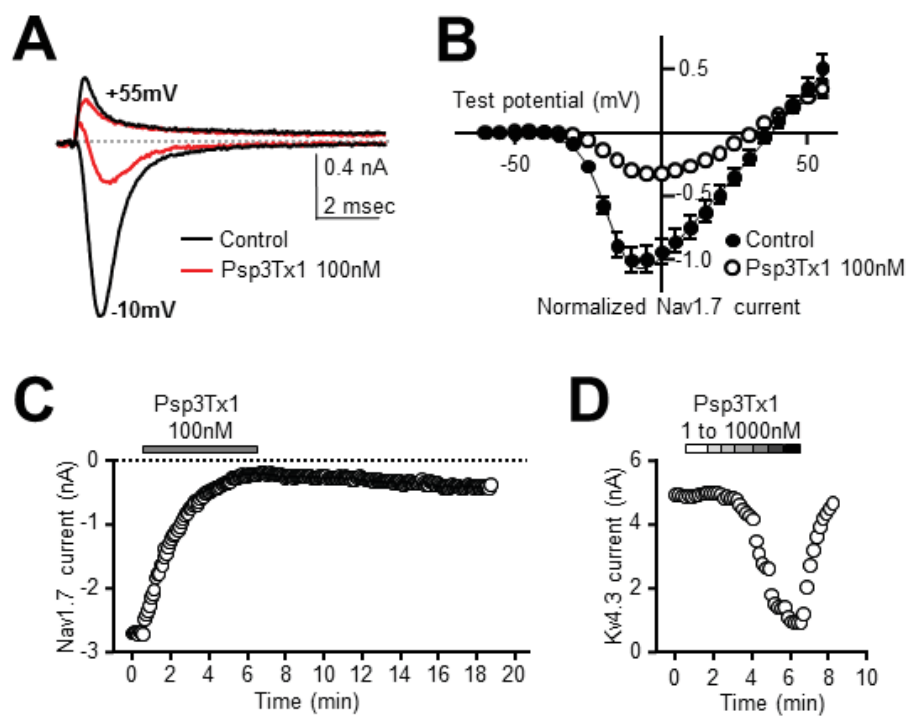
Lesport et al, Figure 2



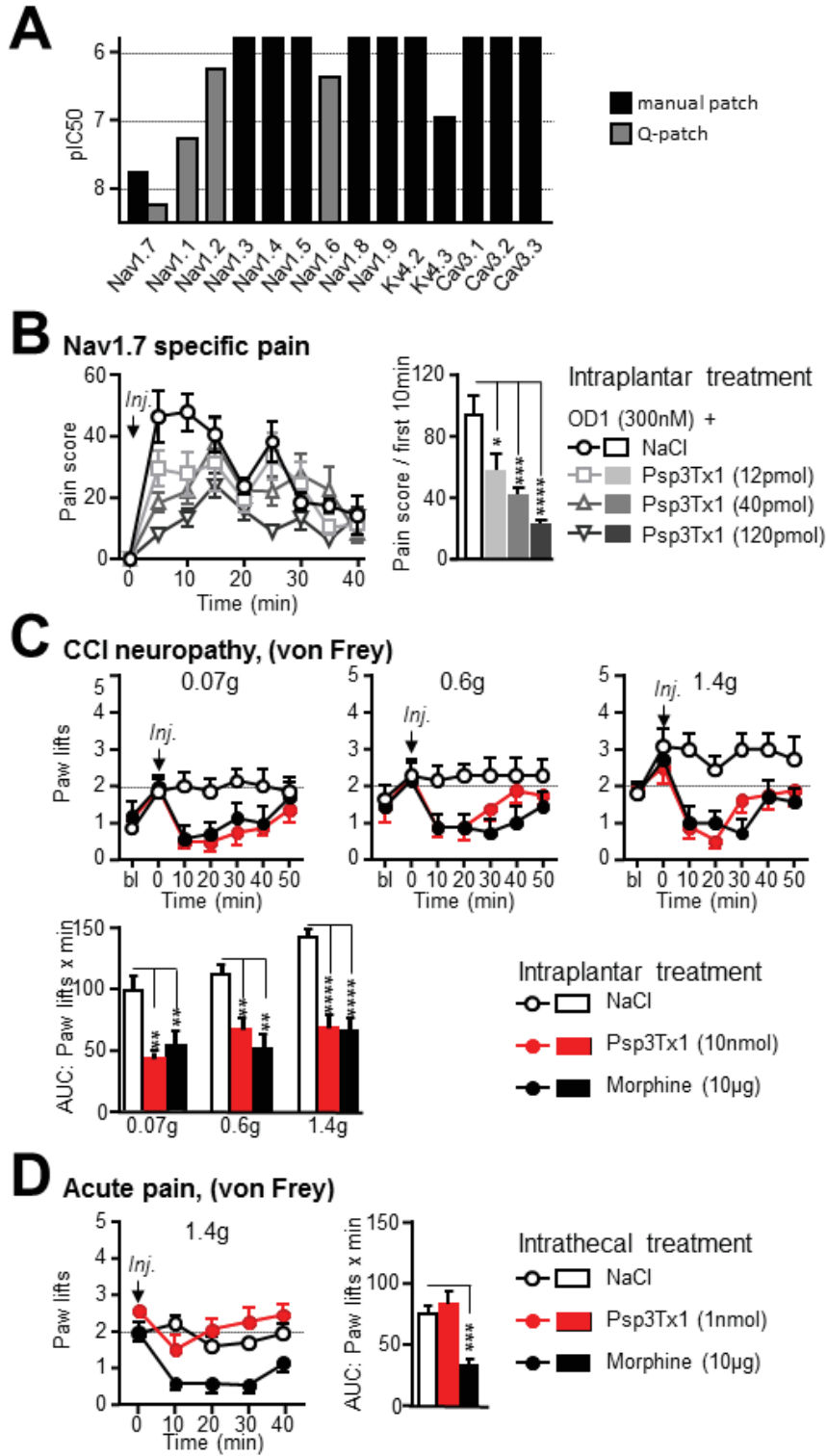
Lesport et al, Figure 3



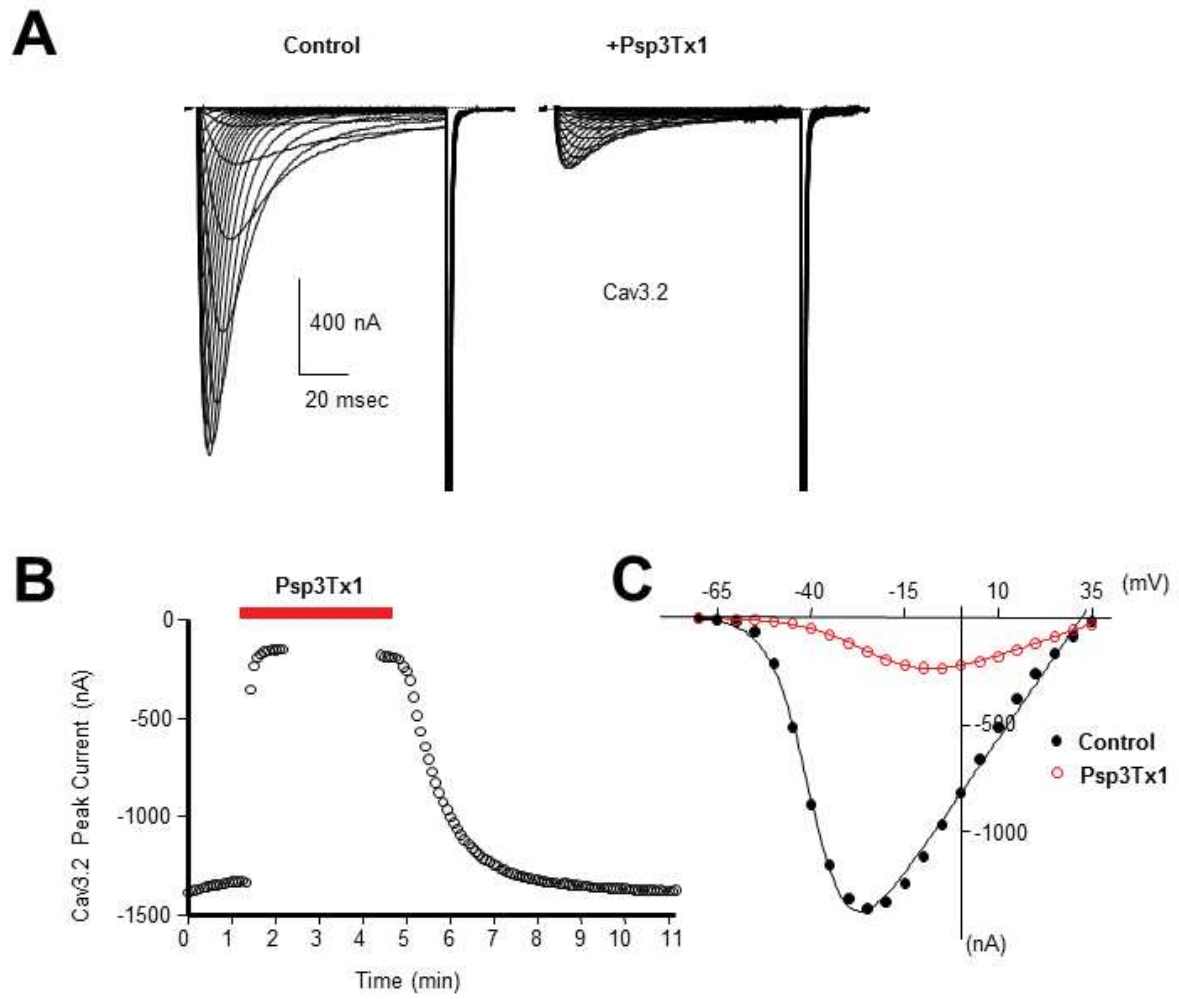
Lesport et al, Figure 4



Lesport et al, Figure 5



Lesport et al, Figure 6



Lesport et al, Figure S1

IX. Discussion / Perspectives

Le but de cette thèse était d'explorer le potentiel analgésique de la toxine Psp3Tx1 criblée précédemment sur une bibliothèque de venins d'araignées. Pour cela, nous avons effectué un test de sélectivité de la toxine sur les différentes isoformes de canaux ioniques que nous pensions pertinentes après les avoir exprimées dans des cellules HEK-293T afin d'écarter des potentiels effets indésirables chez l'animal et l'Homme. Ces tests de sélectivité ont été possibles après que le procédé de synthèse chimique a été trouvé par nos collaborateurs. Celui-ci nous a permis de synthétiser suffisamment de toxine pour pouvoir faire le test de sélectivité ainsi que les expériences suivantes sur le potentiel analgésique *in vivo*. Nous avons utilisé des animaux ayant subi une chirurgie causant une neuropathie puis avons injecté la toxine et testé leurs seuils de douleur mécanique. Nous avons également testé un protocole de co-injection de Psp3Tx1 avec un agoniste des canaux sodiques Nav1.7 causant des douleurs spontanées chez l'animal.

L'étude de sélectivité réalisée nous a permis de montrer que nous disposions d'une toxine avec un fort pouvoir inhibiteur sur l'isoforme Nav1.7 à des doses qui n'affectent pas les autres isoformes de canaux sodiques. Jusqu'alors, une seule autre toxine (ISTX-I) avait présenté une activité similaire sur les canaux sodiques mais à une concentration bien supérieure (IC₅₀ de l'ordre du μM) à celle que nous avons mis en lumière dans notre étude (IC₅₀ de l'ordre du nM) (Rong et al. 2016). La plupart des toxines à motif ICK connues ont une activité sur des familles de canaux ioniques différentes. En nous basant sur la littérature et sur les similitudes de séquence entre Psp3Tx1 et les autres toxines à motif ICK, nous avons pu déterminer quelques cibles potentielles dans d'autres familles de canaux ioniques. Nous avons alors également testé Psp3Tx1 sur des isoformes de canaux potassiques (Kv4.2, Kv4.3) et calciques de type T (Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3), Cav3.2 étant la cible initiale du criblage effectué. Psp3Tx1 s'est révélée plus efficace contre Nav1.7 que contre toutes les autres isoformes testées.

En prenant toujours en compte les similarités entre séquence des toxines à motif ICK, nous avons voulu définir exactement quelle partie de la séquence était responsable de l'interaction forte avec Nav1.7 afin de déterminer si une séquence plus affine était possible. Pour cela nous avons procédé à la synthèse de mutants de la toxine. L'acide aminé en position 17 (juste après le doublet de Cystéines) sur notre séquence est un Glutamate que nous ne retrouvons ni dans la séquence de la PaTx1 ni dans celle de la ProTxII, deux toxines à motif ICK très proches de Psp3Tx1. Le mutant E17K n'a pas montré une meilleure affinité pour Nav1.7 dans le modèle d'expression HEK utilisé pour l'étude de sélectivité de la toxine sauvage synthétique indiquant une importance de ce Glutamate dans la séquence pour l'activité de Psp3Tx1. Sur l'autre mutant que nous avons synthétisé, nous avons remplacé la partie terminale de la séquence (après la 6^e cystéine) par la « queue » protéique d'une autre toxine, celle de la GpTx1. L'activité de ces deux mutants sur Nav1.7 est moins forte que celle de la toxine sauvage. Les capacités de synthèse du laboratoire de nos collaborateurs sont limitées et nous n'avons pas pu synthétiser plus de mutants de notre toxine. Néanmoins il serait très intéressant de pouvoir tester un grand nombre de mutants comme par exemple une bibliothèque de mutants issus d'un Alanine Scanning (méthode consistant à remplacer un à un les acides aminés qui ne sont pas cruciaux pour la structure comme les cystéines dans notre cas) pour analyser l'importance de chaque acide aminé de la séquence dans l'activité). Pour pouvoir tester autant de composés de manière rapide et efficace, nous pouvons utiliser un appareil QPatch comme cela a été fait par nos collaborateurs australiens pour certaines isoformes de canaux sodiques. Il faudra bien évidemment procéder ensuite à une vérification de la structure des mutants ainsi qu'à une vérification de l'effet de ces mutants *in vivo*.

Pour vérifier cet effet nous avons plusieurs possibilités, nous avons déjà testé l'effet analgésique de la toxine dans deux modèles. Le premier est le modèle CCI (Chronic Constriction Injury) où l'animal subit une chirurgie induisant des douleurs neuropathiques dans la patte ciblée. Les

seuils de détection de douleur mécanique de l'animal sont alors modifiés. Il réagit à des stimulations plus faibles comme des stimulations qui ne sont normalement pas douloureuses (allodynie) et réagit plus à des stimulations douloureuses (hyperalgésie). L'injection intraplantaire de 10nmoles de Psp3Tx1 juste avant les tests de douleurs mécaniques (par application de filaments de VonFrey) a permis de démontrer un effet analgésique aussi important que celui de 10 μ g de morphine chez les animaux testés. Ces résultats montrent que Psp3Tx1 a un effet analgésique local dans un cadre de douleur chronique neuropathique. Une injection intraveineuse de la toxine a également été faite et les paramètres vitaux des animaux ont été analysés. Aucune modification de la locomotion et aucune modification dans l'activité cardiaque n'ont été trouvées chez les animaux. Le 2^e modèle de douleur *in vivo* utilisé est le modèle d'induction de douleurs spontanées par injection intraplantaire de la toxine OD1 (agoniste des canaux Nav1.7). Il permet de mimer les pathologies induites par les mutations gain-de-fonction des canaux Nav1.7. Dans ce modèle, l'injection concomitante des deux toxines (OD1 et Psp3Tx1) chez les animaux induit un comportement douloureux moindre et cet effet analgésique est dose-dépendant. Les quantités et concentrations de toxines utilisées dans les modèles animaux de douleur ne correspondent néanmoins pas aux concentrations utilisées dans les tests électrophysiologiques manuels et QPatch. On peut mettre en avant la différence de système de distribution dans les différentes expériences. On a une application locale d'une concentration déterminée sur une seule cellule dans un cas et une application dans la patte entière d'un animal dans l'autre cas, avec tout ce que ça implique en termes de biodisponibilité réduite du composé et de sa présence à proximité des cellules d'intérêt. Le protocole OD1 est néanmoins très utile pour cribler rapidement des composés pharmacologiques avec des effets analgésiques supposés. Dans notre cas, nous avons fait ces expériences en utilisant un système de caméra relié à un logiciel permettant d'enregistrer plusieurs vidéos en simultané puis les vidéos ont été analysées par la suite. Nous avons également pu constater que l'effet analgésique

est visible lors les 10 premières minutes du test ce qui indique qu'il pourrait y avoir une compétition entre les deux toxines au niveau d'un site de liaison ou que les deux toxines ont des sites de liaison différents sur le canal. Pour confirmer ceci nous pourrions effectuer un test électrophysiologique sur des cellules exprimant Nav1.7 en regardant l'effet de l'application des deux toxines séquentiellement, tout d'abord OD1 puis Psp3Tx1 puis l'inverse. Dans un cas, si l'effet inhibiteur du courant de Psp3Tx1 n'est pas retrouvé et si dans l'autre cas l'effet agoniste d'OD1 n'est pas retrouvé nous pourrions dire qu'ils partagent une partie de leur site de liaison et que l'effet analgésique passe par une compétition avec OD1 pour l'accès à ce site. Dans le cas contraire, si aucun des deux effets n'est modifié, nous pourrions conclure que les sites de liaison sont bels et biens différents et que les deux effets sont indépendants l'un de l'autre.

Il serait également intéressant de tester des modèles de douleur inflammatoire comme celui par exemple de douleur induite par la formaline, par la carraghénine ou par l'adjuvant complet de Freund pour apporter une information supplémentaire sur les possibilités analgésiques de la toxine Psp3Tx1.

Tous les modèles utilisés lors de nos expériences apportent une information sur l'action au niveau périphérique de la toxine. Il serait néanmoins très intéressant de proposer des informations sur son effet au niveau central. L'information nociceptive étant conduite au travers de neurones de second ordre dans la moelle épinière puis intégrée dans le cerveau, on peut former l'hypothèse que Psp3Tx1 agirait également sur des isoformes de canaux ioniques situés dans ces structures qui contribueraient à la propagation du signal nerveux. Cela permettrait également d'avoir des informations quant aux effets secondaires que l'on pourrait attendre de cette toxine dans un cadre thérapeutique. Pour répondre à ces questions, nous pouvons essayer la toxine Psp3Tx1 sur des cellules de la corne dorsale de la moelle épinière qui reçoit les afférences des neurones sensitifs périphériques. Nous pourrions par les enregistrements en mode current-clamp déterminer s'il y a un changement dans l'excitabilité des neurones ou dans la

forme du potentiel d'action. De manière similaire, nous pouvons regarder les potentiels d'action dans les neurones des DRGs. Des résultats préliminaires pour cette expérience ont déjà été récoltés lors de cette thèse mais au vu de la diversité des sous-populations des neurones DRGs il est très difficile de dire qu'une cellule patchée exprime effectivement Nav1.7. Nous pourrions utiliser une souris Knock-In possédant un tag extracellulaire sur le canal et procéder à un marquage par immunocytochimie permettant de détecter le canal juste avant l'expérience de patch. Cela nous permettrait d'analyser de façon sûre la transmission du message nerveux dans les neurones exprimant Nav1.7. Les résultats préliminaires montrent que la toxine aurait un effet sur la forme du potentiel d'action ainsi que sur la fréquence d'émission des potentiels d'action.

D'autre part, on a pu voir que la séquence en acide aminés des toxines ICK était très importante pour leur sélectivité et leur affinité. Plusieurs laboratoires travaillent déjà à élaborer une séquence optimale pour les peptides issus de venins comme cela se fait pour les petites molécules. Une optique de travail complémentaire serait de comprendre exactement comment la toxine se fixe au canal afin d'élaborer la séquence complémentaire la plus spécifique possible. Des structures de toxine ICK proches de Psp3Tx1 ont déjà été résolues par le passé et on sait que les toxines ICK adoptent une structure tertiaire particulière. Avec ces informations et des informations structurales sur les canaux ioniques nous pouvons espérer déchiffrer le mode d'action exact des toxines ICK et leur site de liaison. Néanmoins cette optique est largement freinée par l'absence de données structurales sur les canaux ioniques. Pour aller plus loin sur cette idée, nous pourrions tenter d'obtenir un cristal de notre toxine pour analyser sa structure et éventuellement commencer des études comparatives avec la structure des autres toxines ICK connues. De plus, déterminer le site de fixation de la toxine et les interactions spatiales entre les segments transmembranaires des canaux mises en jeu serait un atout non négligeable pour l'amélioration du design d'une toxine à visée thérapeutique. Avoir une grande

quantité d'information à computer sur ce sujet permettrait d'établir un outil informatique pour l'élaboration des séquences les plus intéressantes pour chaque canal ionique d'intérêt. Cet outil permettrait éventuellement d'obtenir des outils pharmacologiques à visée thérapeutique ou pour l'étude des canaux ioniques et des pathologies dans lesquelles ils peuvent être impliqués.

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé une partie des tests requis pour avancer vers une formulation utilisable pour des tests à visée clinique. Parmi ces tests, nous avons apporté la preuve de concept de l'utilité en temps qu'analgésique de notre toxine Psp3Tx1, nous avons déterminé une dose effective dans deux modèles de douleur chez l'animal ainsi que le mode d'application de la toxine, avons réalisé une étude sur la potentielle toxicité de la toxine. Les réponses restantes à apporter pour la validation d'un projet de valorisation sont dépendantes d'une étude de la pharmacocinétique *in vivo*. En effet, les tests que nous avons réalisés sur les animaux ne nous permettent pas de déterminer le devenir du produit injecté dans l'animal. Avec l'injection locale de toxine, nous pouvons nous attendre à une diffusion limitée au reste de l'organisme. Néanmoins, dans le cadre d'une injection intraveineuse de la toxine, nous pouvons nous attendre à des complications du fait du passage au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Cela peut nuire à l'effet potentiel de la toxine en tant qu'analgésique mais cela peut au contraire lui faire bénéficier d'une action au niveau central qui pourrait améliorer son effet. Pour illustrer les effets au niveau central, on peut prendre en exemple le ziconotide qui est utilisé par injection intrathécale pour le traitement des douleurs importantes liées au cancer et résistantes aux analgésiques morphiniques. Cet effet est puissant mais en contrepartie, l'utilisation du ziconotide est compliquée à cause d'une fenêtre thérapeutique très limitée du fait de son manque de sélectivité.

Pour continuer sur une potentielle utilisation thérapeutique de notre toxine, il nous faut aussi penser à une formulation qui soit compatible avec une utilisation pour les tests cliniques et également adaptée aux types de douleurs ciblées. Nous avons pu montrer que Psp3Tx1 était

efficace sur des douleurs neuropathiques et sur des douleurs spontanées et il reste à valider son effet sur une douleur inflammatoire. Etant donné la cible sur laquelle notre toxine est la plus efficace, nous pouvons réfléchir à une formulation pour une application locale au niveau des zones douloureuses. En effet, le profil d'expression de Nav1.7 est restreint au système périphérique dans les neurones des ganglions dorsaux rachidiens. Une formulation pour une prise par voie orale réduirait grandement la disponibilité de Psp3Tx1 au niveau de la zone à traiter si on prend en compte la dégradation enzymatique que le produit subirait durant son trajet vers la zone cible ou par des complications au niveau de l'absorption du produit. Une injection intrathécale de Psp3Tx1 à une dose efficace sur Nav1.7, comme dans le cas du Prialt, serait également très peu efficace sauf dans le cas où la toxine agirait sur une autre cible au niveau central (comme Cav3.2 par exemple que l'on trouve dans la moelle épinière dans les neurones recevant l'innervation des fibres afférentes). Il faudrait alors revoir les quantités de toxine à la hausse et la fenêtre thérapeutique s'en retrouverait diminuée. Les méthodes les plus logiques d'utilisation seraient l'application topique, par exemple à l'aide d'un gel, au niveau des zones douloureuses ou éventuellement par injection intraveineuse si l'absence d'effets secondaires se confirme chez l'Homme. Il existe déjà plusieurs solutions commerciales pour les applications topiques qui seraient compatibles avec la délivrance de Psp3Tx1 aux zones douloureuses. Nous n'avons pas besoin de réfléchir à des solutions pour une délivrance dans des zones spécifiques à l'intérieur de la cellule ciblée car l'action de la toxine se fait depuis la face extracellulaire de la membrane. Néanmoins, faciliter le passage de la toxine à travers les membranes pourrait également améliorer son accès aux fibres nerveuses exprimant Nav1.7 à leur surface. On peut imaginer une fusion de notre toxine avec un CPP (Cell Penetrating Peptide) qui permettrait cet accès. Il faudrait alors re-vérifier le comportement de la protéine fusion après injection, ainsi que l'efficacité contre Nav1.7 et la sélectivité. Ce n'est néanmoins pas la seule façon de valoriser Psp3Tx1.

Une autre possibilité intéressante concernant Psp3Tx1 serait de la modifier afin d'en faire un outil pour l'étude des canaux ioniques. Pour ce faire, nous pourrions réfléchir à la façon d'ajouter un fluorophore à la toxine qui ne modifiera pas les caractéristiques d'action de la toxine. La disponibilité sur le marché d'anticorps spécifiques des isoformes des canaux sodiques est limitée à Nav1.5 (proposé par plusieurs revendeurs) et un anticorps monoclonal de souris a été proposé comme spécifique de Nav1.7 (Lee et al. 2014) mais n'est pas disponible sur le marché pour le moment. Cet anticorps a été sélectionné pour son potentiel de fixation au segment senseur de voltage du domaine 2 en prenant comme base la structure du canal bactérien sodique NavAb. La publication de Lee met en avant une spécificité clairement en faveur de Nav1.7 de cet anticorps monoclonal mais aussi une action dépendante de l'état fermé du canal. Cet anticorps est présenté comme ayant une bonne capacité en tant qu'analgésique sur les douleurs inflammatoires et neuropathiques chez la souris ce qui est très similaire à ce que nous obtenons avec Psp3Tx1, autant en termes de dose efficace qu'en termes de spécificité. De fait, en utilisant Psp3Tx1 fusionnée avec un marqueur fluorescent, nous pourrions utiliser sa spécificité forte pour proposer une solution pour l'étude des canaux Nav1.7 chez la souris. L'étude précédente utilisant l'anticorps a également montré une implication de Nav1.7 dans les phénomènes de prurit. Nous n'avons pas testé Psp3Tx1 dans les modèles de démangeaisons aiguës dépendants (en utilisant le Composé 48/80) ou indépendants de l'histamine (en utilisant la chloroquine). Nous pouvons proposer un protocole similaire à celui utilisé avec la toxine OD1 pour les modèles de douleur et regarder le comportement des animaux après une injection concomitante d'un des deux composés et de Psp3Tx1. Pour étudier son effet sur les démangeaisons chroniques, nous pouvons utiliser le modèle de peau sèche induit par l'application d'acétone et de diéthyéther pendant 5 jours proposé dans (Liu et al. 2012). Après l'établissement du comportement de démangeaison spontanée chez l'animal, nous pouvons injecter notre toxine dans la zone de peau sèche et vérifier l'établissement d'une diminution ou

non des comportements de démangeaison. Cela pourrait donner un effet complémentaire de l'effet analgésique lors d'une application topique de la toxine en limitant les désagréments potentiels.

Une étude récente de l'équipe de John Wood met en avant également le fait que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs opioïdes, le naloxone, sur des souris ne possédant pas le canal Nav1.7 et qui présentent de fait la même insensibilité à la douleur que les patients atteints de CIP reverse cette même insensibilité. Le système opioïdurgique joue également un rôle dans l'analgésie et il est suggéré que l'utilisation de doses faibles de traitements morphiniques couplés à des doses faibles d'inhibiteurs des canaux sodiques pourrait avoir un effet similaire à de fortes doses de chaque composé séparément (Kolesnikov, Chereshnev, and Pasternak 2000). Dans le cas de Psp3Tx1, nous pouvons également penser que cet effet synergétique est possible. Pour tester cette hypothèse, nous pouvons répéter les tests *in vivo* en utilisant le modèle de douleur OD1 en utilisant des doses réduites de toxine couplée à des faibles doses d'analgésiques morphiniques. Ces doses réduites des deux composés doivent être insuffisantes pour être analgésiques seules dans ce test. Cette optique de traitement permettrait à l'usage de réduire grandement les doses utilisées chez les patients douloureux chroniques et leur permettre de retarder l'apparition d'une résistance au traitement ainsi que de diminuer également les potentiels effets secondaires des traitements chroniques.

Les résultats de ces travaux de thèse mènent le projet vers une valorisation possible et très intéressante ainsi que vers l'établissement d'un nouveau brevet plus adapté aux dernières découvertes. Celle-ci est de fait très intéressante pour comprendre les mécanismes d'interaction entre les modulateurs de l'activité des canaux ioniques et les canaux eux-mêmes. En explorant la séquence de cette toxine via des mutations et en la jumelant à des études de structure des canaux ioniques, il sera possible de mieux comprendre la structure tertiaire nécessaire à l'activité contre Nav1.7 mais peut être également contre d'autres cibles d'intérêt comme

Cav3.2. Des données sur les doses moyennes actives d'autres toxines agissant contre Cav3.2 sont déjà disponibles dans la littérature. Nous pourrions ainsi trouver finalement un bloqueur spécifique des canaux calciques de type T comme cela était espéré au début de ce projet. Nous avons également exploré le potentiel analgésique de cette toxine et montré que son utilisation dans deux modèles de douleurs chez l'animal avait des effets analgésiques importants, comparable, à certaines doses, à celui de la morphine. Ces résultats sont très importants toujours dans cette optique de valorisation du brevet déposé sur Psp3Tx1.

X. Annexes

En plus de mon travail de thèse consacré à la toxine Psp3Tx1 j'ai pu participer à une étude en collaboration me permettant de mettre en avant une technique d'électrophysiologie utilisant la mécanostimulation. Dans cette étude, nous mettons en avant la chronicisation irréversible de douleurs aiguës. Cette chronicisation a pour cause l'absence d'une protéine exprimée uniquement dans les mécanorécepteurs à bas seuil d'activation. Toutes les références au nom de cette protéine ont été modifiées en accord avec le Dr. Aziz Moqrich pour des raisons de confidentialité.

Loss of PROTEINX facilitates the transition from acute to chronic pain through a selective alteration of spinal ionotropic GABAergic neurotransmission

Ana Reynders¹, Stéphane Gaillard², Pierre Lesport³, Annabelle Mantilleri¹, Charline Kambrun^{4,5}, Marc Bartoli⁶, Emmanuel Bourinet³, Andrew J. Saurin¹, Yves Le Feuvre^{4,5}, Corinne Beurrier¹ and Aziz Moqrich^{1*}

¹ Aix-Marseille-Université, CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille, UMR 7288, case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

²Phenotype Expertise, SARL, 5 boulevard Marechal Koenig, 13009, Marseille, France

³ Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR 5203, CNRS, U661, INSERM, Universités Montpellier I&II, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05

⁴ Univ. Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

⁵ CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Aix Marseille Université, GMGF; INSERM, UMR_S 910, 13385 Marseille Cedex 05, France.

*Corresponding author aziz.moqrich@univ-amu.fr

Summary

The transition from acute to chronic pain represents a major clinical problem. The factors and mechanisms underlying pain chronicity are still largely unknown. Here we found that **PROTEINX** is exclusively expressed in adult LTMRs, and loss of this unconventional protein converted a short lasting and reversible inflammatory, neuropathic and postoperative mechanical pain into a long lasting and irreversible chronic pain. Using behavioral pharmacology, electrophysiology and RNA deep sequencing, we found that loss of **PROTEINX** resulted in a selective impairment of spinal ionotropic GABAergic signaling and an intriguing selective upregulation of the $\alpha 2$ subunit of the GABA_A-R in DRG and spinal cord. Together, our results identified *ProteinX* gene as a predictive genetic factor to develop chronic pain, and revealed a unique preclinical animal model to study the mechanisms responsible for chronic pain development and to uncover appropriate pharmacological tools to prevent the transition from acute to chronic pain.

Introduction,

Pain is commonly classified into acute and chronic. Acute pain is short lasting and is essential for the maintenance of our physical integrity, whereas chronic pain persists beyond the normal time of healing and adversely impacts on our well-being. Chronic inflammatory or neuropathic pain gives rise to highly debilitating and long lasting sensory abnormalities such as hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain (Munro, Ahring, and Mirza 2009). These symptoms occur as a consequence of aberrantly prolonged sensitization of pain pathways both in the peripheral and central nervous systems, causing either increased facilitation or loss of inhibition in pain-transmitting circuits (Sandkuhler 2009; Zeilhofer, Wildner, and Yevenes 2012). Diminished spinal inhibition occurs in the setting of inflammation and nerve injury through various mechanisms. These include prostaglandin E₂-mediated inhibition of the inhibitory glycine receptor (Muller, Heinke, and Sandkuhler 2003; Harvey et al. 2004; Ahmadi et al. 2002; Zeilhofer, Wildner, and Yevenes 2012) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-mediated downregulation of the potassium chloride exporter KCC2 that perturbs chloride homeostasis thus altering GABAergic and glycinergic inhibitory functions (Coull et al. 2003; Coull et al. 2005; Zeilhofer, Wildner, and Yevenes 2012). More recently, an avalanche of excellent studies deciphered several micro-circuits involving distinct subsets of spinal cord (SC) excitatory and inhibitory interneurons involved in the control of acute and injury-induced persistent pain (Bourane, Duan, et al. 2015; Bourane, Grossmann, et al. 2015; Foster et al. 2015; Peirs et al. 2015; Petitjean et al. 2015; Duan et al. 2014). Together, these data demonstrate that we know a great deal about the molecular and cellular mechanisms that underlie both peripheral and central sensitization that control the onset of injury-induced acute pain. However, our knowledge on the molecular and cellular events that trigger the transition from acute to chronic pain is still limited. For example, it is well-established that acute post-operative pain is followed by persistent pain in about 10 to 50% of individuals after common surgical procedures such as

breast and thoracic surgery, leg amputation and coronary arteries bypass (Gillon, Jensen, and Dickenson 2013; Kehlet, Jensen, and Woolf 2006). How and why only a fraction of these patients develop chronic postsurgical pain (CPSP) is unknown. In the clinic, several risk factors predicting the development of CPSP have been suggested. These include age, sex, and the type of surgery, the preoperative and postoperative assessment of the response of patients to evoked painful stimuli as well as their genetic susceptibility to develop CPSP (Kehlet, Jensen, and Woolf 2006). Efforts toward a combination of the above mentioned scoring systems and aggressive pharmacological treatments to prevent the onset of the physiological changes that trigger chronic pain are warranted.

In this study, we showed that in *ProteinX* KO mice, a short lasting and reversible inflammatory, neuropathic and postoperative pain is converted into an irreversible chronic pain, suggesting that loss of PROTEINX predisposes the mice to develop chronic pain regardless the etiology of the incurred lesion. Using behavioral pharmacology, we found that *ProteinX* KO mice were selectively insensitive to the analgesic effects of the GABA_A-R agonist muscimol in the setting of inflammation and nerve injury, demonstrating that loss of PROTEINX impaired the ionotropic GABAergic signaling. Accordingly, electrophysiological recordings on SC slices demonstrated that under inflammatory conditions, muscimol-evoked increase in excitatory glutamatergic activity of lamina II interneurons was completely abolished in *ProteinX* KO mice. Using an unbiased RNA deep sequencing screen, we uncovered a selective upregulation of the $\alpha 2$ subunit of the GABA_A-R (GABRA2) both in DRG and SC neurons. Together, our data identify *ProteinX* gene as a predictive genetic factor for the development of injury-induced chronic pain through a selective alteration of ionotropic GABAergic signaling.

Results:

Injury-induced acute mechanical pain is converted into chronic pain in *ProteinX* KO mice.

In a recent study, we identified *ProteinX* to be highly enriched in adult C-LTMRs (Reynders et al. 2015). Co-expression analysis showed that *ProteinX* was indeed expressed in GINIP⁺/IB4⁺ C-LTMRs (Figure 1A), but its expression also occurred in A δ LTMRs marked by TrkB and in a subset of A β Ret⁺ LTMRs (Figures 1B and 1C), and totally excluded from peptidergic TrkA⁺ and proprioceptive TrkC⁺ neurons (Figures S1A and S1B). *ProteinX* level of expression in SC is much lower than in DRGs as confirmed by *in situ* hybridization and q-RT-PCR (Figures 1D and 1E). At the developmental level, *ProteinX* is expressed in a subset of large DRG neurons at E15 (Figure S1C) and its expression extends to the majority of DRG neurons at birth (Figure S1D). Similar to adults, we couldn't detect *ProteinX* transcripts in SC of E15 or new born mice (Figures S1C and S1D).

To gain insights into the role of PROTEINX in sensory physiology, we sought to analyze *ProteinX* KO mice previously generated and characterized by Tyska and colleagues (Tyska et al. 2005). These mice are viable, fertile and most of the perturbations described were related to the intestine biology where this atypical protein is highly expressed (Kravtsov et al. 2012; Mazzolini et al. 2012). However nothing was known about the role of PROTEINX in the somatosensory system.

To test whether loss of PROTEINX altered DRG neurons development, we performed a series of quantitative and qualitative analyses. We found no difference in the total number of lumbar DRG neurons or in the number of TrkA⁺, TrkB⁺, TrkC⁺, Ret⁺ and TH⁺ neurons between WT and *ProteinX* KO mice (Figures S2A and S2B). At the anatomical level, double and triple staining experiments on SC sections showed that peptidergic CGRP⁺ and the subset of nonpeptidergic GINIP⁺ afferents displayed normal central projections to their respective laminae in the dorsal horn of the SC (Figures S2C-E). Peripherally, PGP9.5 and S100 staining

revealed normal peripheral target innervation of all DRG neurons and hair follicles-innervating LTMRs (Figures S2F and 2G). Finally, to test whether loss of PROTEINX affected neuronal excitability of DRG neurons, we performed patch-clamp recordings on cultured C-LTMRs and D-hair A δ mechanoreceptors. The C-LTMRs were visualized by crossing *ProteinX* KO mice with *Tafa4*^{Venus} mice and the D-hair neurons were identified by their rosette-like shape. In both types of neurons, there were no differences between the two genotypes in passive and intrinsic electrical properties (Figures S3A-H). Together these data demonstrate that PROTEINX is dispensable for the survival, the molecular maturation, the anatomical organization and the electrophysiological properties of DRG neurons.

To gain insights into the role of PROTEINX in somatosensation, we subjected *ProteinX* KO mice to a large battery of somatosensory tests under acute and injury conditions. *ProteinX* KO mice had normal behavior in the open field and rotarod tests (Figures S4A-C), they exhibited no difference in their ability to sense noxious heat stimuli in the hot plate test and displayed normal response to the acetone test (Figures S4D and S4E). We then tested the mechanical sensitivity of our mice under acute and 3 different pathological conditions: Carrageenan-induced inflammation, the chronic constriction injury model (CCI) (Bennett and Xie 1988), and the Brennan test (Brennan 1999). Mechanical sensitivity was tested using the up-down method at basal conditions and at several time points after injury (Figures 1F-H). In all three paradigms mechanical thresholds at baseline levels were similar between the two genotypes (Figures 1F-H). Intraplantar injection of carrageenan induced a massive drop in mechanical thresholds in both genotypes starting at one hour post-inflammation (Figure 1F). Impressively, three days post-inflammation, WT mice returned to baseline levels, whereas mechanical hypersensitivity was prolonged as long as 60 days post-inflammation in *ProteinX* KO mice, demonstrating that an acute and reversible inflammation-induced mechanical pain is converted into a long lasting and irreversible chronic pain. The same behavioral responses were observed in the nerve injury

and in the postoperative models. Significant reversal of CCI-induced mechanical hypersensitivity started at day 30 and returned to baseline levels around day 40 in the WT mice, whereas, as in the Carrageenan-induced inflammation, mechanical hypersensitivity in the *ProteinX* KO mice persisted for as long as 60 days post-CCI (Figure 1G). Finally, in the Brenan test, incision-induced mechanical hypersensitivity was irreversible in the *ProteinX* KO mice, whereas it lasted for less than 10 days in the WT mice (Figure 1H). Thermal hypersensitivity was assessed in the Carrageenan and in the Brenan paradigms using the Hargreaves test. In the Carrageenan model, thermal hypersensitivity was prolonged in *ProteinX* KO mice but returned to baseline levels at day 60 post-inflammation (Figure S4F). However, in the Brenan model there was no difference between WT and *ProteinX* KO mice in the postsurgical-induced thermal hypersensitivity (Figure S4G). Finally, *ProteinX* KO mice exhibited a significant enhancement of formalin-evoked nocifensive behavior during both phases (Figure S4H). Together, these data demonstrate that *ProteinX* KO mice are predisposed to develop injury-induced chronic mechanical pain and suggest that these mice can be used as an excellent model system to decipher the mechanisms that trigger the transition from acute to chronic pain.

Loss of PROTEINX specifically alters the ionotropic GABAergic signaling

It is well established that injury-induced chronic pain is caused by an imbalance between the excitatory and inhibitory neurotransmission in the SC, and that the concurrent exaggerated pain can be transiently reversed by a variety of compounds such as opioid, GABA and glycine receptors agonists, calcium channels antagonists and our recently identified TFAFA4. To unravel which of these signaling pathways are dysfunctional in *ProteinX* KO mice, we tested the analgesic effect of these compounds using the spared nerved injury (SNI) neuropathic pain model (Decosterd and Woolf 2000). The SNI model was chosen because it's highly reproducible and also induces a long lasting and irreversible mechanical pain. Using this paradigm, we showed that intrathecal (IT) administration of delta and mu opioid receptors

agonists SNC80 and DAMGO (Figure 2A), GABA_B receptor agonist baclofen and TAF_A4 (Figure 2B), α 2 δ voltage gated calcium channel inhibitor pregabalin and the glycine receptor agonist taurine (Figure 3C) significantly reversed SNI-induced mechanical hypersensitivity in both genotypes. However, in contrast to WT mice, IT administration of the GABA_A agonist muscimol completely failed to reverse SNI-induced mechanical pain in *ProteinX* KO mice (Figure 2D). *ProteinX* KO mice resistance to the analgesic effect of muscimol was also confirmed in the zymosan A-induced inflammatory pain model (Witschi et al. 2011). We first showed that zymosan-induced inflammation also resulted in a prolonged and irreversible mechanical hypersensitivity in *ProteinX* KO mice (Figure 2E). IT administration of muscimol or the GABA_A-Rs positive allosteric modulator diazepam (DZP) strongly reversed zymozan-induced mechanical hypersensitivity in WT mice but had no effect on *ProteinX* KO mice (Figures 2F and 2G). Importantly, injection of SNC80 strongly reversed the mechanical pain in both genotypes (Figure 2H). Together, these data demonstrate that *ProteinX* KO mice predisposition to develop injury-induced chronic mechanical pain is due to a selective impairment of the ionotropic GABAergic inhibitory neurotransmission.

Loss of MOY1A alters gene expression both in DRG and SC neurons

It is well established that loss of GABAergic inhibition may be altered by several means both in peripheral and central nervous systems. These include altered subunit composition of GABA_A-Rs, altered levels of GABA, GABA release probability and the speed of its removal from the synaptic cleft, and change in chloride gradient that switches GABA-mediated inhibition into excitation (Sandkuhler 2009). In order to unravel which of these mechanisms are affected in *ProteinX* KO mice we used an unbiased RNA deep sequencing screen. Biological replicates of polyA mRNA prepared from DRG and SC neurons from WT and *ProteinX*KO mice were subjected to high-throughput sequencing to very high sequencing depth (an average of 112x10⁶ exome-mapped reads per replicate), representing an average 250x

whole-exome coverage (Table S1). Highly significant differentially expressed (DE) genes upon loss of *ProteinX* expression were called ($< 5\%$ FDR; $< p 0.00025$), resulting in the identification of 98 DE genes in DRG neurons (Figure 3A and Table S2), and 32 DE genes (Figure 3A and Table S3) in SC neurons. While not surprising that the majority of DE genes were unique to DRG neurons where *ProteinX* is normally expressed (Figure 1 and Figure Sx), a small number (14) of DE genes were deregulated in both DRG and SC neurons and 18 DE genes were unique to SC neurons (Figure Sx B,C). To confirm the RNA seq data we focused on genes that were differentially expressed in both tissues using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). In both tissues, *Nnt*, *Gabra2* and *Wdfy1* displayed a 1.5 to 5 fold increase in *ProteinX*KO mice (Figure 3B). However, we were unable to confirm the differential expression of the downregulated genes (data not shown).

ProteinX KO mice selective alteration of the ionotropic GABAergic neurotransmission revealed by our behavioral experiments prompted us to focus on *Gabra2* gene. *Gabra2* was the only GABA receptor subunit that displayed altered expression in *ProteinX* KO mice (Figure SX and table SY). To complement the qRT-PCR results, we used *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Consistent with the wide distribution of *ProteinX* in DRG neurons at birth (Figure S1D), we found that *Gabra2* upregulation occurred in a much wider population of neurons than in *ProteinX*-expressing LTMRs in adult DRG (Figure 3C). In the SC, *Gabra2* upregulation is much less evident to apprehend by *in situ* hybridization likely because of its low and wide spread expression in the dorsal horn (Figure 3D), and in a subset of medial and ventral motor neurons (Figure SX). Using immunohistochemistry, we confirmed that *Gabra2* upregulation was accompanied by a significant increase in GABRA2 protein in the dorsal horn of SC where primary afferent endings and local interneurons are intermingled (Figure 3E). Importantly, in line with the selective upregulation of GABRA2 (Table S3), we found no difference in the immunoreactivity of GABRA1 ($\alpha 1$ subunit) between the two genotypes

(Figure 3F). Finally, to test whether GABRA2 upregulation impacted GABA_A-Rs function, we performed whole-cell patch clamp recordings on cultured WT and *ProteinX* KO Venus-expressing C-LTMRs. We found that bath application of increasing concentrations of muscimol triggered similar current amplitudes in both genotypes (Figure 4A), demonstrating that GABRA2 upregulation did not alter GABA_A-Rs response to its selective agonist muscimol.

Muscimol-evoked increase in excitatory glutamatergic activity of lamina II interneurons is severely impaired in inflamed *ProteinX* KO mice.

In an attempt to provide a rational explanation to the insensitivity of *ProteinX* KO mice to the analgesic effect of muscimol, we used whole cell patch-clamp recordings on SC slices. First, a thorough characterization of a large panel of electrophysiological properties of inner lamina II neurons under acute conditions and after inflammation revealed no difference between WT and *ProteinX* KO mice (Figure S6). We then investigated the incidence of bath application of muscimol on spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSC) in laminae II neurons in WT and *ProteinX* KO mice, under acute conditions and after zymosan inflammation. Under these conditions the overall average amplitude of sEPSC was similar between the two genotypes (data not shown). In naïve WT mice, bath application of 5 μ M muscimol induced a 117% increase in sEPSC frequency (Figures 4A1 and 4E1, n=6), as indicated by the shift of the sEPSC interval cumulative distribution curve towards the left (Figure 4A2). This effect was almost doubled (212%, n=9) in slices from WT mice inflamed with zymosan (Figures 4B1 and 4B2 and 4E2, n=9). Interestingly, in naïve slices from *ProteinX* KO mice, muscimol induced a drastic 544% increase in sEPSC frequency (Figures 4C1 and 4C2 and 4E3, n=9). However, this effect was completely lost in slices obtained from zymosan inflamed KO mice as bath application of muscimol had no effect on sEPSC frequency (Figures 4D1 and 4D2 and 4E4, n=9), further supporting our observed insensitivity of *ProteinX* KO mice to the analgesic effect of muscimol after injury (Figures 2D and 2F).

Discussion

In this study, we showed that loss of PROTEINX converted an injury-induced acute and reversible pain into a long lasting and irreversible pain. This pain chronicity was selective to mechanical sensitivity in two inflammatory, one neuropathic and one post-operative pain models, suggesting that loss of PROTEINX predisposes an individual to develop injury-induced chronic pain and that these mice represent an ideal animal model to uncover the cellular and molecular mechanisms that trigger the transition from acute to chronic pain. Indeed, we found that loss of PROTEINX selectively impaired the ionotropic GABAergic signaling as injury-induced mechanical hypersensitivity in *ProteinX* KO mice could be transiently reversed by opioids, baclofen, pregabalin, TFAFA4 and taurine but not by muscimol and diazepam. We also found that loss of ProteinX resulted in a constitutive upregulation of the $\alpha 2$ subunit of GABA_A-Rs, suggesting a possible participation of the altered expression of this subunit in the process of injury-induced pain chronicity.

Chronic pain is a serious and highly heterogeneous medical problem with a prevalence varying from 20 to 30% of the world population (Breivik et al. 2006; Bouhassira et al. 2008). Given that only a fraction of individuals develop chronic pain, the contribution of genetic factors has been postulated (Devor 2004; Macrae 2008; Voscopoulos and Lema 2010; Belfer et al. 2015; Tegeder et al. 2006). Here, using four different pain paradigms, we showed that *ProteinX* KO mice developed irreversible chronic pain after injury, demonstrating a causal link between loss of PROTEINX and the development of chronic pain. In humans, *ProteinX* gene has been postulated to be involved in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA48 (Donaudy et al. 2003). However, these findings were recently disqualified by Eisenberger and colleagues (Eisenberger et al. 2014). Importantly, a recent study identified a haplotype on chromosome 12 containing sequence variants in the genes DCTN2, DNAH10, LRIG3, and PROTEINX has been linked to an inherited neuropathy in humans (Braathen et al. 2015). In

line with this finding, exploration of ExAC public database (<http://exac.broadinstitute.org/> November 2015) indicates that *ProteinX* gene is highly polymorphic as more variants than expected were observed (Synonymous: 153.1 expected, 158 observed, $z = -0.25$. Missense: 363.9 expected, 405 observed, $z = -1.05$), further supporting the need to genetically decipher whether variations in *ProteinX* gene predispose human patients to develop chronic pain. Very importantly, we found that loss of one copy of *ProteinX* gene in mice also induced a long lasting and irreversible mechanical pain in the setting of inflammation, further supporting a potential contribution of *ProteinX* as a predisposition gene to develop injury-induced chronic pain (Figure S7).

Using behavioral pharmacology, we showed that injury-induced mechanical hypersensitivity could not be reversed in *ProteinX* KO mice by muscimol. This impaired ionotropic GABAergic signaling was further demonstrated by our electrophysiological recordings in which we showed that under acute conditions, muscimol evoked a drastic increase in the excitatory glutamatergic activity of lamina II interneurons, whereas after inflammation, this effect was completely abolished. We also showed that the selective antagonist of GABA_A-Rs bicuculline was able to evoke mechanical hypersensitivity in naïve *ProteinX* KO mice (Figure S8 B), demonstrating that GABA_A-Rs are functional under acute conditions. Together, these data indicate that injury causes a shift of spinal GABA_A-Rs from active to inactive state, further silencing the ionotropic GABAergic inhibitory neurotransmission in *ProteinX* KO mice. One plausible explanation to this phenomenon is that injury induces a massive internalization of GABA_A-Rs in *ProteinX* KO mice. Indeed, decreases in synaptic GABA_A-Rs, resulting from enhanced endocytosis, have been observed in animals in which the life-threatening refractory convulsive status epilepticus (SE) has been experimentally induced (Naylor, Liu, and Wasterlain 2005; Terunuma et al. 2008). Interestingly, this decrease in surface receptors mainly targets GABA_A-Rs containing benzodiazepine-sensitive subunits, which explains both the pharmaco-resistance of SE patients

to benzodiazepines and the non-terminating nature of the seizures. Remarkably, we demonstrated that under injury conditions, *ProteinX* KO mice were totally insensitive to muscimol and DZP, and under these same conditions, once the injury-induced mechanical hypersensitivity is established; it becomes irreversible in these mice.

Another possible explanation to our phenotype came from our RNA deep sequencing data. We found that loss of PROTEINX was accompanied by a massive and selective upregulation of *Gabra2* both in DRG and SC neurons at steady state, indicating that this altered expression likely participate to the observed injury-induced pain chronicity. Although we confirmed that *gabra2* upregulation resulted in a significant increase in GABRA2 protein, this increase has no effect on the amplitude of muscimol-evoked currents in *ProteinX* KO CLTMRs. Given that GABRA2 was the only GABA_A-Rs subunit to be differentially expressed in DRG and SC neurons, our data suggest that GABRA2 upregulation likely contribute to shifting the balance towards more GABA_A-Rs containing $\alpha 2$ subunit. In this case, the $\alpha 2/\alpha 1$ ratio will be mainly impacted large size primary afferent neurons (See Figure 3D) as $\alpha 2$ and $\alpha 1$ are the main subunits expressed in DRG (See table S4). In line with this hypothesis, a recent study demonstrated that patients with refractory convulsive status epilepticus and refractory epilepsy had significantly more $\alpha 2$ -containing GABA_A-Rs at the expense of $\alpha 1$ -containing receptors (Loddenkemper et al. 2014). Whether $\alpha 2$ -containing GABA_A-Rs are prone to excessive internalization than GABA_A-Rs containing other alpha subunits is unknown.

In conclusion, although we're far from deciphering the mechanisms that impair GABA_A-Rs function in our mutant mice, our study describes the first mouse model in which a loss-of-function mutation leads to an irreversible pain state after injury. It also provides strong arguments that *ProteinX* gene should be seriously considered as a predictive genetic factor for the development of injury-induced chronic pain and points out the ionotropic GABAergic system as the main mechanism that contributes to the transition from acute to chronic pain. Our

study also provides a powerful preclinical animal model that can be used (i) to deepen our understanding of the molecular and cellular mechanisms that trigger the transition from acute to chronic pain and (ii) to the design "à la carte" pharmacological therapies to prevent the establishment of chronic pain.

Experimental Procedures

A full description of methods is found in the Supplemental Experimental Procedures.

Supplemental information

Supplemental information includes experimental procedures, 8 figures and 4 tables

Authors Contributions

A.M and A.R conceived the project and designed the experiments. A.R, S.G and A.Ma performed and analyzed the behavioral and histological experiments. P.L and E.B performed electrophysiological experiments on D-hairs neurons. M.B explored the human databases. C.K and Y.L performed electrophysiological experiments on SC neurons. A.S analysed the RNA seq data. C.B performed electrophysiological experiments on C-LTRMs. A.M wrote the manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Eduardo Gascon and the members of the Moqrich laboratory for fruitful scientific discussions. Work in E.B, Y.L and A.M laboratories have been supported the C-LTRMs ANR grant. This work has been funded by ERC-Starting grant paineurons 260435 to A.M.

Competing Financial Interests

The authors declare that ProteinX gene possible involvement as a predisposition gene to develop chronic pain is under patenting.

Figure Legends

Figure 1: *ProteinX* is expressed in DRG LTMRs and *ProteinX* KO mice exhibit long-lasting injury-induced mechanical pain

(A-C) Characterization of *ProteinX*-expressing neurons in adult DRG. ISH using *ProteinX* antisense probe (red) followed by double immunolabeling with anti-GINIP (blue) antibody and IB4 (green) (A) or anti-Ret antibody (blue) (C). (B) Double-ISH using *ProteinX* (red) and *TrkB* antisense probes (green). Scale bars: 100 μ m.

(D) ISH using *ProteinX* probe (in white, left panel) or no probe (right panel) on adult SC tissue. Dashed area delimitates laminae I and II of SC.

(E) Quantification of *ProteinX* transcripts in adult DRG and SC (relative to β -actin). Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

(F-G) Mechanical responses of WT and KO mice following carrageenan-induced inflammation (n=11 for WT and n=13 for KO) (F), CCI surgery (n=9 for WT and n=10 for KO) (G) and paw incision surgery (n= 10 for WT and n=10 for KO) (H). Data are presented as mean \pm SEM for each group (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Figure 2: Muscimol- and Diazepam-mediated analgesia is impaired in *ProteinX* KO mice

(A-D) Mechanical responses of WT and KO mice following SNI surgery and i.t administration at indicated time-points of 10 nmol of SNC80, 0.2 nmol of DAMGO (A), 0.1 μ g of baclofen, 2 μ g of TAFA4 (n=6 mice per genotype) (B), 40 μ g of taurine, i.p administration of 3mg/kg of pregabalin (n=8 mice per genotype) (C) and i.t administration of 0.15 μ g of muscimol (n=8 mice per genotype) (D).

(E-G) Mechanical responses of WT and KO mice following zymosan-induced inflammation (n=9 mice per genotype) (E) and i.t administration at indicated time-points of 0.15 μ g of muscimol, 10 nmol of SNC80 (n=9 mice per genotype) (F) and 0.09 mg/kg of DZP (G) (n=7

mice per genotype). Data are presented as mean \pm SEM for each group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant).

Figure 3: Transcriptional analysis of DRG and SC tissue from WT and *ProteinX* KO mice reveals an increased *Gabra2* expression

(A) Venn diagram showing the number of KO vs WT DEG in DRG (red), SC (blue) and in both tissues (yellow)

(B) Heatmap representing the list of KO vs WT DEG in both DRG and SC.

(C) Quantification of *Wdfy1*, *Gabra2* and *Nnt* transcripts in DRG and SC tissues from WT and KO mice. Data represent the mean fold-change of KO vs WT \pm SEM (n=3 independent experiments).

(D) *Gabra2* transcripts expression assessed by ISH (red) in DRG (upper panels) and in SC (lower panels) from WT (left) and KO (right) mice. Scale bars: 100 μ m.

(E) Immunostaining showing GABRA2 protein expression (green) in the dorsal horn of SC from WT (left) and KO (right) mice. Scale bars: 50 μ m.

(F) Quantification of GABRA2 immunofluorescence intensity in the laminae I-III of SC from WT and KO mice. Data represent the mean fold change of KO vs WT \pm SEM (n=3 independent experiments).

(G) Immunostaining showing GABRA1 protein expression (red) in SC dorsal horn of WT (left) and KO (right) mice. Scale bars: 50 μ m.

Figure 4: Muscimol-induced increase in EPSC frequency is lost in *ProteinX* KO mice after zymosan inflammation.

(A) Representative traces of whole-cell recordings of muscimol-induced currents in dissociated C-LTMRs.

(B) Current amplitude (mean \pm SEM) after bath application of indicated doses of muscimol, recorded in C-LTMRs from ProteinX^{+/+}::Tafa4^{+Venus} and ProteinX^{-/-}::Tafa4^{+Venus} mice. The number of recorded cells is indicated on the histograms.

(C - F) Whole cell recordings of spontaneous EPSC in laminae II interneurons after muscimol application in naïve (C-D) and in zymosan-inflamed WT and KO mice (E-F).

Left panels: representative traces of EPSC obtained under ACSF (black traces), following superfusion of 5 μ M muscimol (blue traces) and during wash (brown traces).

Middle panels: Cumulative distribution of EPSC intervals (in seconds) for the experiments shown in the left panels. Note the shift of the muscimol/blue curves towards the left (C, D, E *middle panels*), indicating a reversible increase in EPSC frequency.

Right panels: Normalized EPSC frequency (mean \pm SEM) under ACSF, following superfusion of 5 μ M muscimol and during wash. Note the absence of effect of muscimol in slices from zymosan inflamed mice. The number of recorded cells is indicated in the right panels (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: non-significant).

Supplemental Figures Legends

Figure S1 (Related to Figure 1): DRG neurons survival, specification, central and peripheral innervation are not impaired in absence of ProteinX

(A-B) Cell counts of total PGP9.5* (A) and of indicated subsets (B) realized on lumbar L4 DG sections from WT and KO mice. Data represent the mean absolute values (A) or the mean % of PGP9.5 neurons (B) \pm SEM of three independent experiments. No statistically significant differences were observed between genotypes.

(C-E) Sensory neurons innervation of the SC is preserved in *ProteinX* KO mice. Immunostainings of SC transversal sections from WT (upper panels) and KO (lower panels)

mice with anti-CGRP (red, C) and GINIP (blue, C-E), IB4 (green, D) and anti-PKC γ (red, E). Scale bars: 100 μ m.

(F-G) Sensory neurons innervation of the hairy skin is preserved in *ProteinX* mice. Immunostainings of hairy skin sections from WT (upper panels) and KO (lower panels) mice with anti-PGP9.5 (red, F) and anti-S100 (red, G). Scale bars: PGP9.5 and S100 showing hairy skin innervation: 50 μ m. PGP9.5 showing epidermis innervation: 15 μ m. (Related to Figure 1)

Figure S2 (Related to Figure 1) C-LTMRs and A δ -LTMRs electrophysiological properties are preserved in absence of ProteinX

(A-D) Electrophysiological properties of C-LTMRs.

(A-B) The graphs show the capacitance and the resting membrane potential of WT and KO C-LTMRs.

(C) Representative traces illustrating the response of WT and KO C-LTMRs to depolarizing current pulse (50pA, 1000ms).

(D) The graph represents the number of Action Potentials (AP) evoked by depolarizing current steps of increasing amplitude (Δ 10pA, 1000ms) of WT (black) and KO C-LTMRs (red)

(E-I) Electrophysiological properties of A δ -LTMRs.

The cell capacitance (upper panel) and resting membrane potential (lower panel) of WT and KO A δ -LTMRs are shown in E.

Aps were evoked by depolarizing (F-G upper panels) or hyperpolarizing (F-G lower panels) current injection (1000ms, Δ 0.1nA or Δ -0.1nA, respectively). (F) The figure shows representative traces obtained for WT (black) and KO (red) A δ -LTMRs. (G) The curves represent the probability of AP firing as function of the injected current during depolarizing (upper panels) or following hyperpolarizing (lower panels) current injection, respectively. The

AP rebound observed at the termination of the hyperpolarizing pulse is a characteristic of A δ -LTMRs.

(H) Representative mechano-activated (MA) currents in WT (black) and KO (red) A δ -LTMRs elicited by incremented mechanical stimulations of the same at a holding potential of -60mV.

(I) Peak amplitude (I-peak) was normalized to obtain the current/probe displacement curve. The curves show the normalized peak current (I-peak) as function of the probe displacement.

Mean normalized amplitudes do not differ between WT and KO A δ -LTMRs.

No statistically significant differences were observed between genotypes in C-LTMRs and A δ -LTMRs. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure S3 (Related to Figure S1): Behavioral characterization of naïve *ProteinX* KO mice and thermal and mechanical hypersensitivity post-injury.

Behavior of WT and KO in the open field (A) and rotarod (B: time and C: speed) tests.

Thermal sensitivity to paw cooling (D: acetone test) and noxious heat (E: hotplate test) show no difference between genotypes.

(F) The graph illustrates WT and KO mice pain behavior in formalin test. The histograms represent the response duration during the 1st and 2nd phase. Note that KO mice exhibit increased response duration in this test (**p<0.001).

(G-H) Thermal hypersensitivity of WT and KO mice following carrageenan-induced inflammation (G) and paw incision surgery (H) was determined in Hargreaves test (**p<0.001, ns: non significant).

(I) Mechanical responses of WT, *ProteinX*^{+/-} and KO mice following carrageenan-induced inflammation (**p<0.001, *ProteinX*^{+/-} versus WT).

(J) Mechanical responses of WT and KO mice after i.t injection of bicuculline (0.01 μ g in 10 μ l) (ns: non significant).

Data are presented as mean \pm SEM for each group.

Figure S4 (Related to Figure 4): Electrophysiological characterization of SC lamina II neurons passive, active and synaptic properties in ProteinX KO naïve or inflamed mice.

(A-F) The graphs represent the average membrane potential (A), the membrane resistance (B), the capacitance (C), the Sag ratio in response to -25pA hyperpolarizing pulse (D), the number of rebound AP in response to -25pA current pulses ϵ and the number of AP in response of +25pA current pulses (F) of SC lamina II interneurons from WT and KO mice under naïve and Carrageenan- (Carra.) and Zymosan- (Zymo) induced inflammation. The numbers of recorded cells are: Naïve 16 WT and 26 KO, Carra: 29 WT and 23 KO and Zymo: 10 WT and 12 KO.

(G) The graph illustrates the paired pulse ratio recorded in SC lamina II interneurons of WT and KO mice under Naïve and in Carra- and Zymo- induced inflammation. The numbers of recorded cells are: Naïve 19 WT and 33 KO, Carra: 9 WT and 13 KO and Zymo: 9 WT and 9 KO.

Data are presented as mean \pm SEM for each group. No significant differences were observed between genotypes.

References

- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W.L., and Zeilhofer, H.U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5, 34-40.
- Belfer, I., Dai, F., Kehlet, H., Finelli, P., Qin, L., Bittner, R., and Aasvang, E.K. (2015). Association of functional variations in COMT and GCH1 genes with postherniotomy pain and related impairment. *Pain* 156, 273-279.
- Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., and Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136, 380-387.
- Bourane, S., Duan, B., Koch, S.C., Dalet, A., Britz, O., Garcia-Campmany, L., Kim, E., Cheng, L., Ghosh, A., Ma, Q., and Goulding, M. (2015a). Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. *Science* 350, 550-554.
- Bourane, S., Grossmann, K.S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M.G., Stam, F.J., Garcia-Campmany, L., Koch, S., and Goulding, M. (2015b). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160, 503-515.
- Braathen, G.J., Hoyer, H., Busk, O.L., Tveten, K., Skjelbred, C.F., and Russell, M.B. (2015). Variants in the genes DCTN2, DNAH10, LRIG3, and PROTEINX are associated with intermediate Charcot-Marie-Tooth disease in a Norwegian family. *Acta neurologica Scandinavica*.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.
- Brennan, T.J. (1999). Postoperative Models of Nociception. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 40, 129-136.

Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021.

Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-942.

Decosterd, I., and Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.

Devor, M. (2004). Evidence for heritability of pain in patients with traumatic neuropathy. *Pain* 108, 200-201; author reply 202.

Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R.E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K.B., and Gasparini, P. (2003). Multiple mutations of *PROTEINX*, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 72, 1571-1577.

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., *et al.* (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159, 1417-1432.

Eisenberger, T., Di Donato, N., Baig, S.M., Neuhaus, C., Beyer, A., Decker, E., Murbe, D., Decker, C., Bergmann, C., and Bolz, H.J. (2014). Targeted and genomewide NGS data disqualify mutations in *PROTEINX*, the "DFNA48 gene", as a cause of deafness. *Hum Mutat* 35, 565-570.

Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W.T., Jegen, M., Johannssen, H., Hosli, L., Haenraets, K., Ghanem, A., *et al.* (2015). Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 85, 1289-1304.

Gilron, I., Jensen, T.S., and Dickenson, A.H. (2013). Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *The Lancet Neurology* 12, 1084-1095.

Harvey, R.J., Depner, U.B., Wasse, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O.M., *et al.* (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.

Kehlet, H., Jensen, T.S., and Woolf, C.J. (2006). Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 367, 1618-1625.

Kravtsov, D.V., Caputo, C., Collaco, A., Hoekstra, N., Egan, M.E., Mooseker, M.S., and Ameen, N.A. (2012). Myosin Ia is required for CFTR brush border membrane trafficking and ion transport in the mouse small intestine. *Traffic* 13, 1072-1082.

Loddenkemper, T., Talos, D.M., Cleary, R.T., Joseph, A., Sanchez Fernandez, I., Alexopoulos, A., Kotagal, P., Najm, I., and Jensen, F.E. (2014). Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. *Epilepsy research* 108, 605-615.

Macrae, W.A. (2008). Chronic post-surgical pain: 10 years on. *Br J Anaesth* 101, 77-86.

Mazzolini, R., Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., Chang, W., Rodrigues, P., Bazzocco, S., Alazzouzi, H., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., Andretta, E., *et al.* (2012). Brush border myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1530-1535.

Muller, F., Heinke, B., and Sandkuhler, J. (2003). Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience* 122, 799-805.

Munro, G., Ahring, P.K., and Mirza, N.R. (2009). Developing analgesics by enhancing spinal inhibition after injury: GABAA receptor subtypes as novel targets. *Trends Pharmacol Sci* 30, 453-459.

Naylor, D.E., Liu, H., and Wasterlain, C.G. (2005). Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci* 25, 7724-7733.

Peirs, C., Williams, S.P., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., and Seal, R.P. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87, 797-812.

Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., *et al.* (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell reports* 13, 1246-1257.

Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrich, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell reports*.

Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89, 707-758.

Tegeder, I., Costigan, M., Griffin, R.S., Abele, A., Belfer, I., Schmidt, H., Ehnert, C., Nejjim, J., Marian, C., Scholz, J., *et al.* (2006). GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat Med* 12, 1269-1277.

Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P.G., Coulter, D.A., and Moss, S.J. (2008). Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J Neurosci* 28, 376-384.

Tyska, M.J., Mackey, A.T., Huang, J.D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Mooseker, M.S. (2005). Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition. *Mol Biol Cell* 16, 2443-2457.

Voscopoulos, C., and Lema, M. (2010). When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth* 105 Suppl 1, i69-85.

Witschi, R., Punnakkal, P., Paul, J., Walczak, J.S., Cervero, F., Fritschy, J.M., Kuner, R., Keist, R., Rudolph, U., and Zeilhofer, H.U. (2011). Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *J Neurosci* 31, 8134-8142.

Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yevenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92, 193-235.

Figure 1

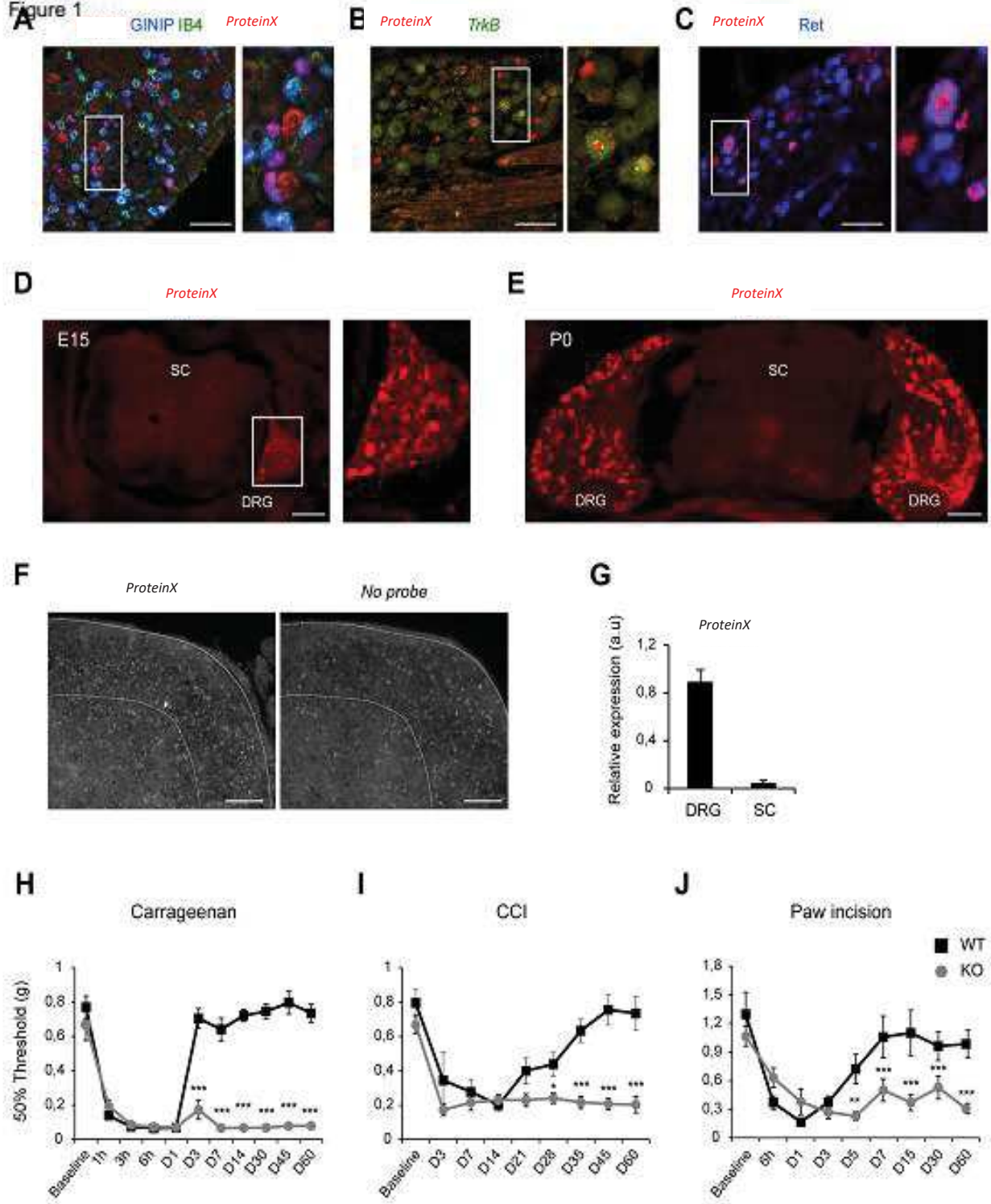


Figure 2

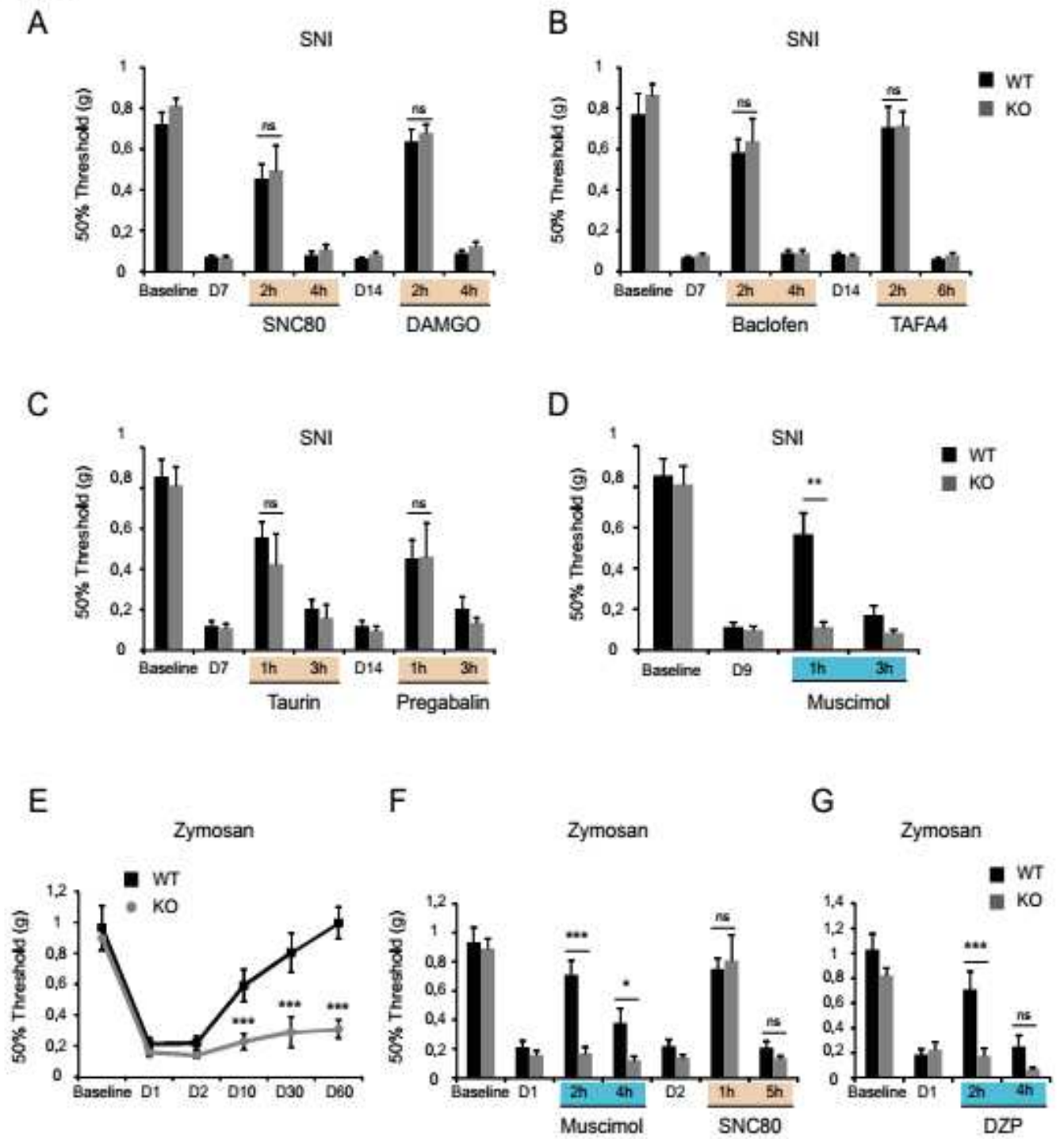


Figure 3

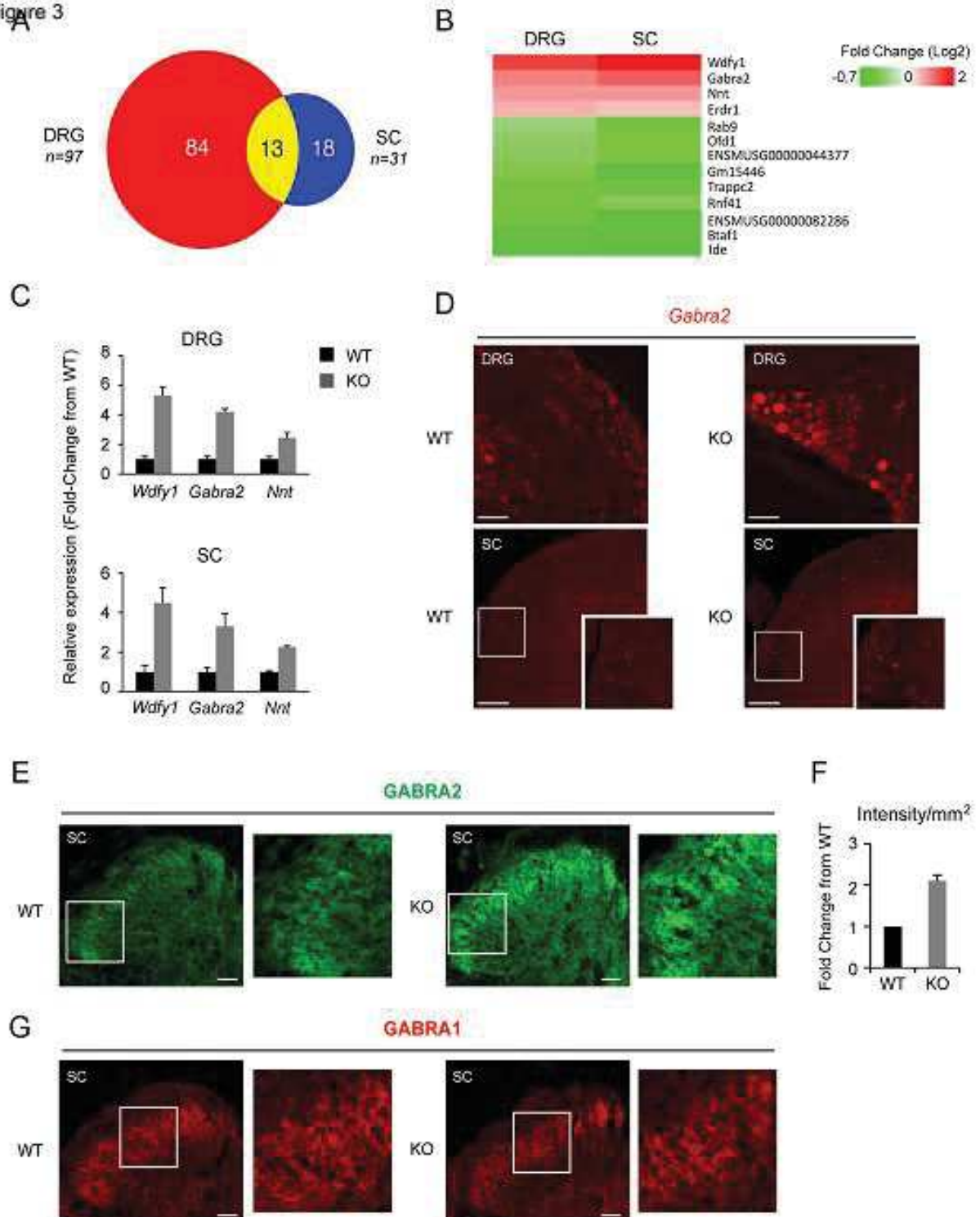


Figure 4

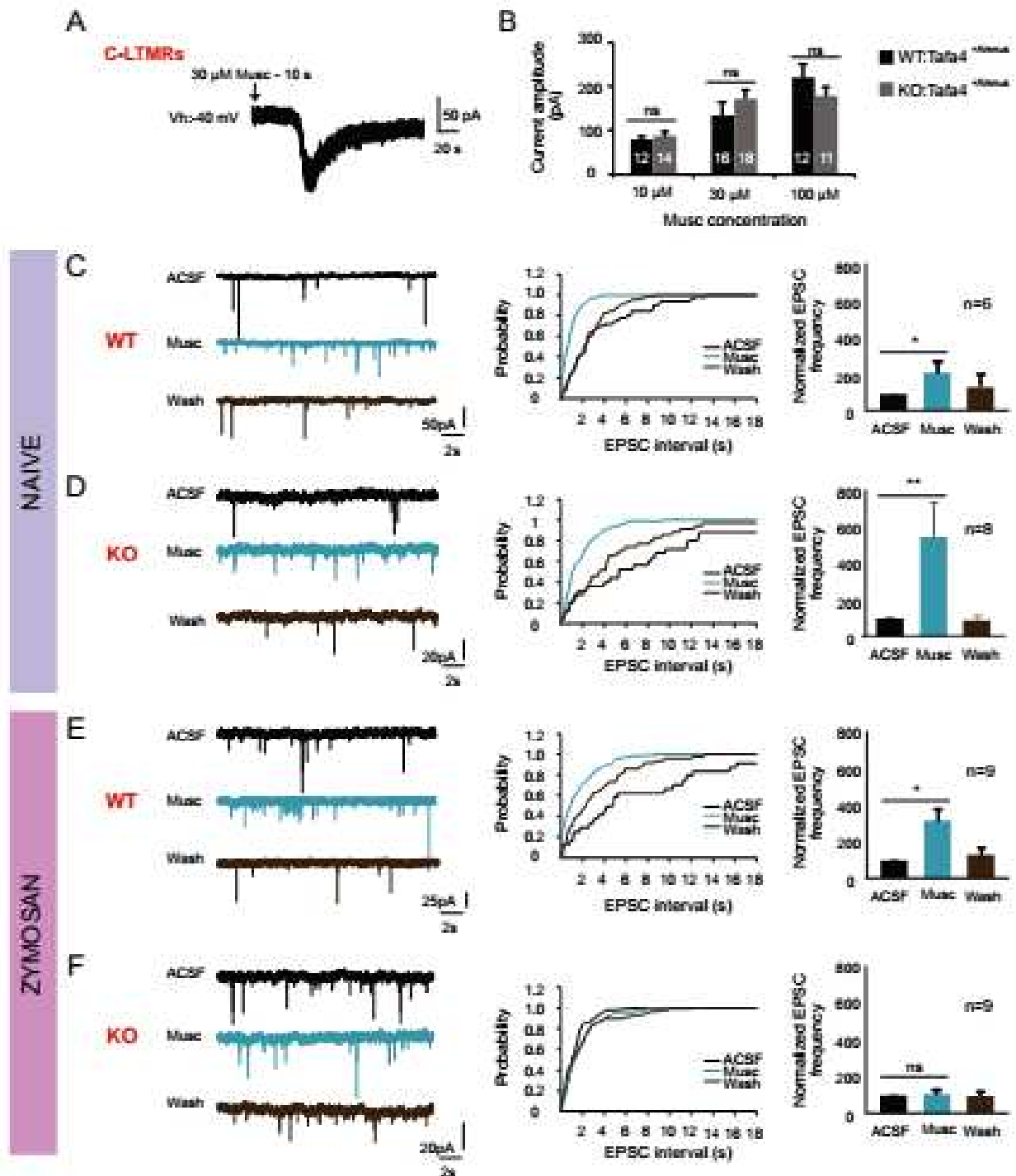


Figure S1 (related to Figure 1)

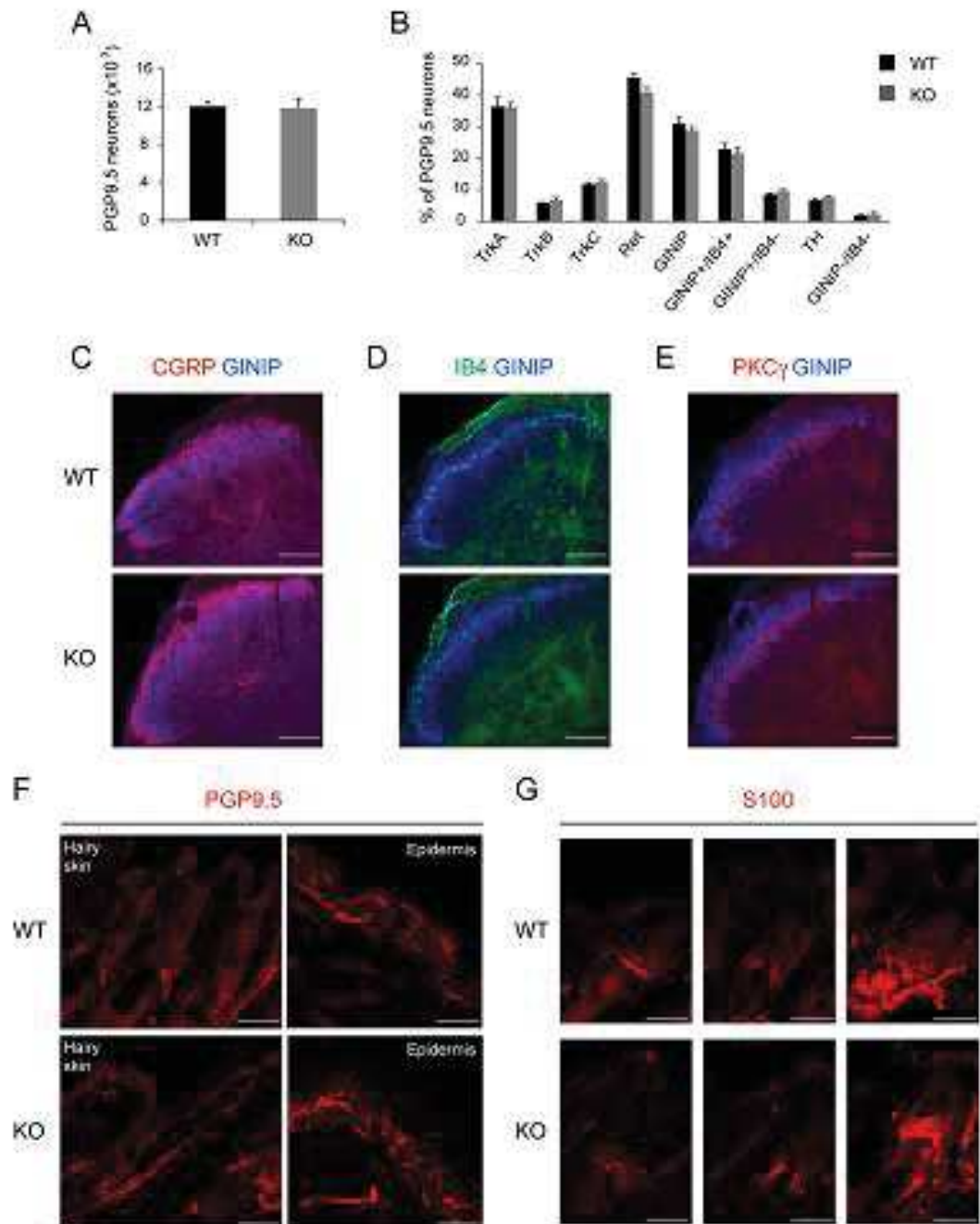


Figure S2 (Related to Figure 1)

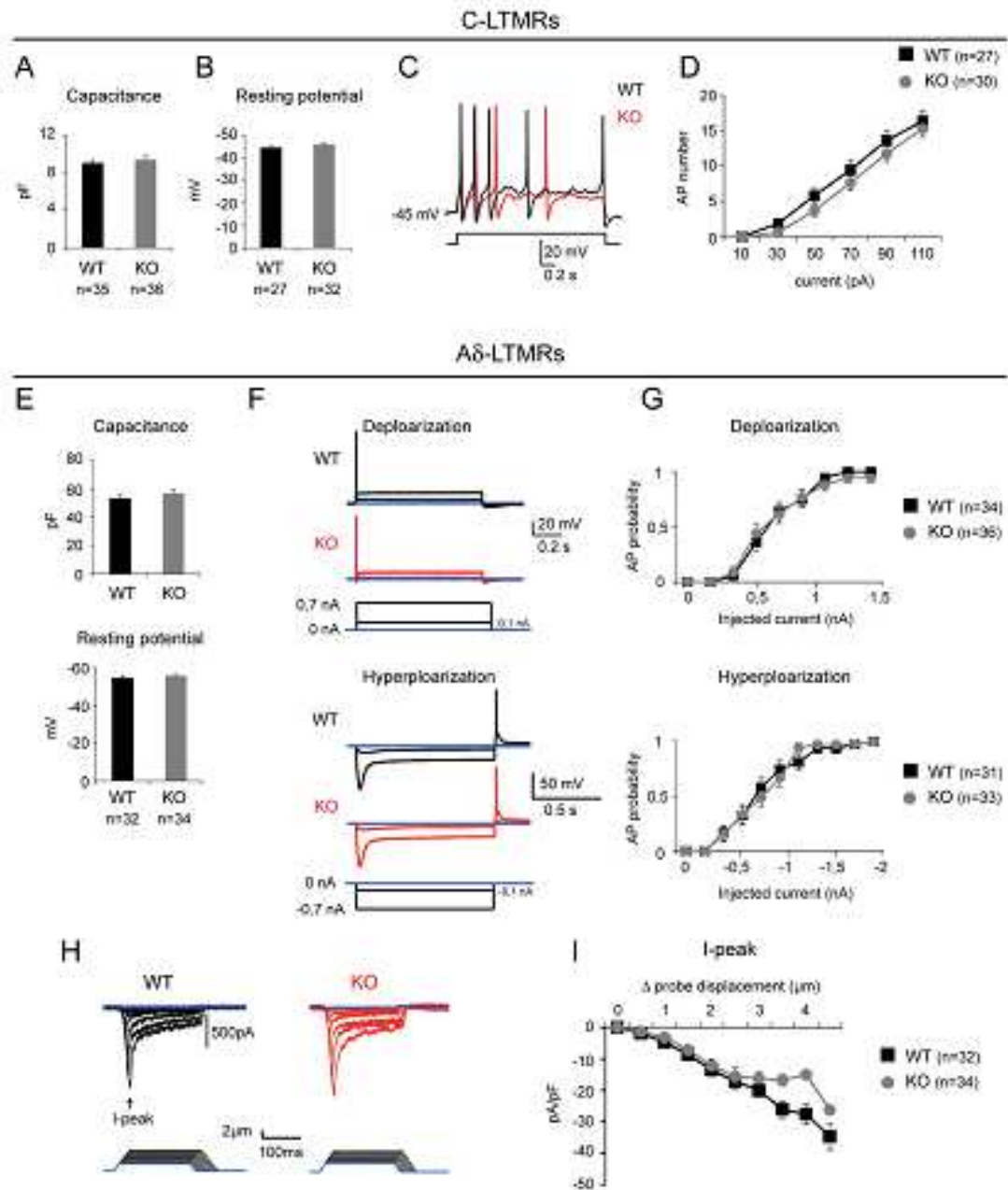


Figure S3 (Related to Figure 1)

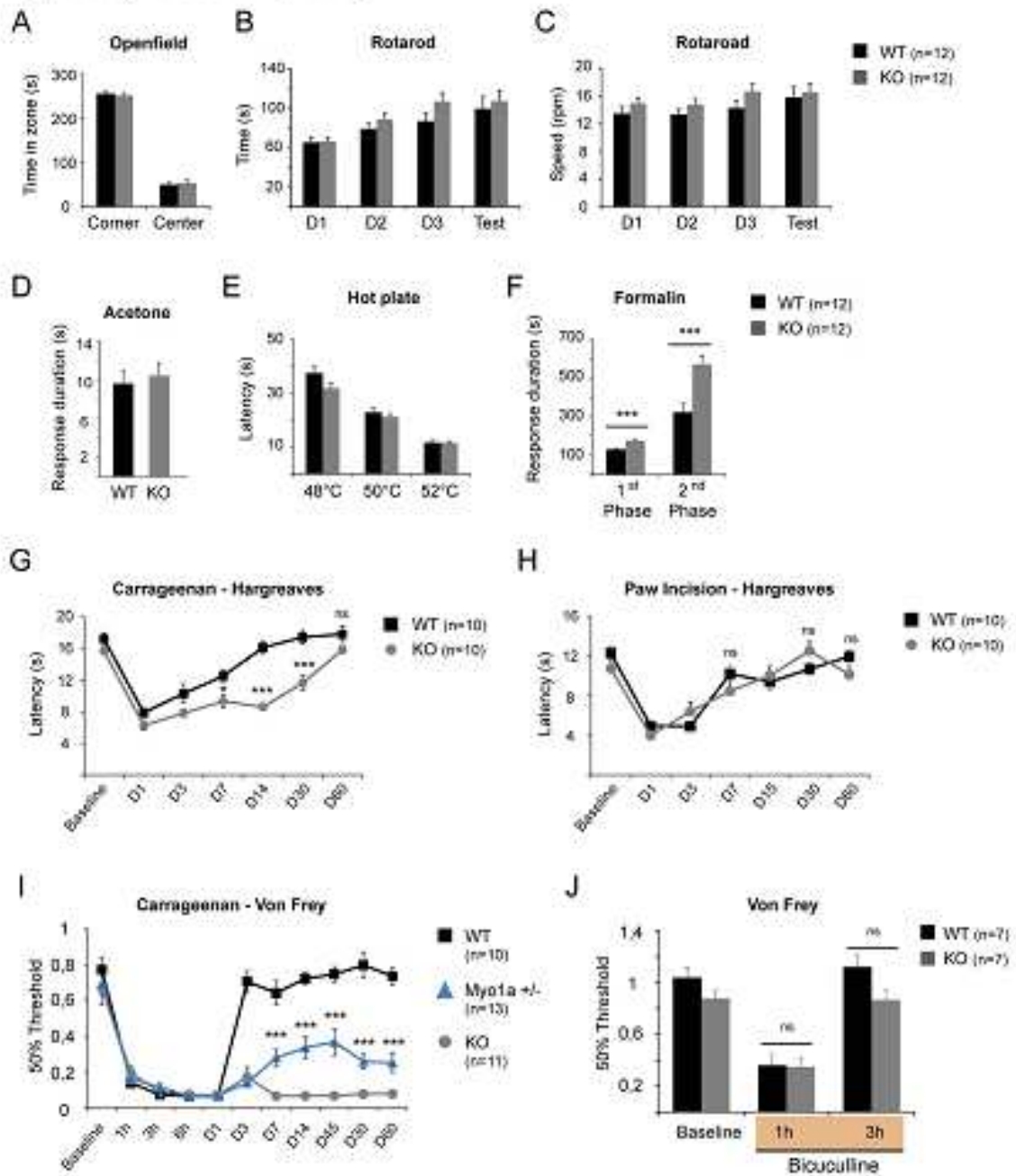
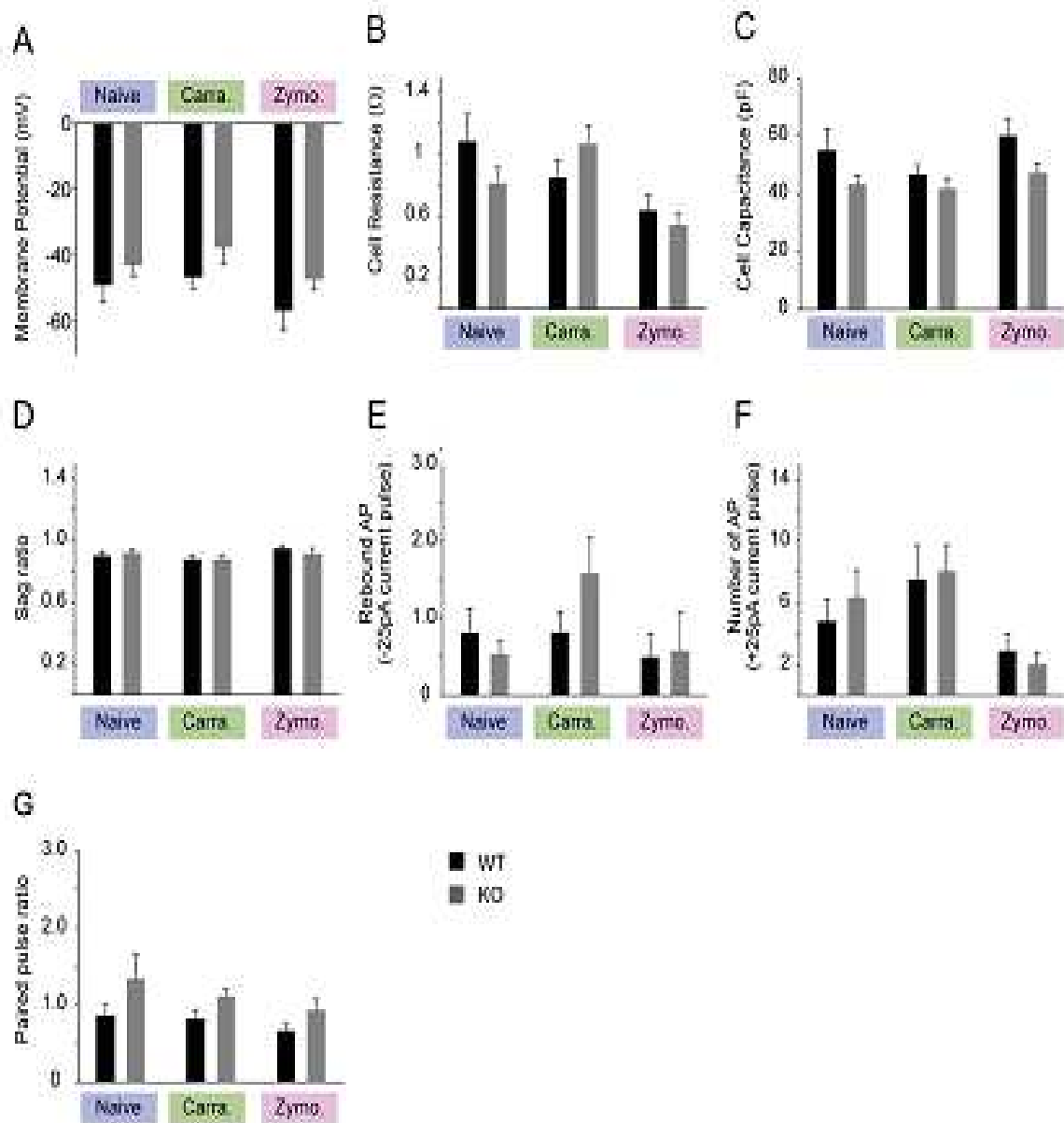


Figure S4 (Related to Figure 4)



XI. Références Bibliographiques

- Abrahamsen, B., J. Zhao, C. O. Asante, C. M. Cendan, S. Marsh, J. P. Martinez-Barbera, M. A. Nassar, A. H. Dickenson, and J. N. Wood. 2008. 'The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain', *Science*, 321: 702-5.
- Abramowitz, J., and L. Birnbaumer. 2009. 'Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels', *FASEB J*, 23: 297-328.
- Adams, P. J., E. Garcia, L. S. David, K. J. Mulatz, S. D. Spacey, and T. P. Snutch. 2009. 'Ca(V)₂L P/Q-type calcium channel alternative splicing affects the functional impact of familial hemiplegic migraine mutations: implications for calcium channelopathies', *Channels (Austin)*, 3: 110-21.
- Adams, P. J., and T. P. Snutch. 2007. 'Calcium channelopathies: voltage-gated calcium channels', *Subcell Biochem*, 45: 215-51.
- Ahern, C. A., J. Payandeh, F. Bosmans, and B. Chanda. 2016. 'The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy', *J Gen Physiol*, 147: 1-24.
- Ahmadi, S., S. Lippross, W. L. Neuhuber, and H. U. Zeilhofer. 2002. 'PGE₂ selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons', *Nat Neurosci*, 5: 34-40.
- Ahn, H. S., S. D. Dib-Hajj, J. J. Cox, L. Tyrrell, F. V. Elmslie, A. A. Clarke, J. P. Drenth, C. G. Woods, and S. G. Waxman. 2010. 'A new Nav1.7 sodium channel mutation I234T in a child with severe pain', *Eur J Pain*, 14: 944-50.
- Ahuja, S., S. Mukund, L. Deng, K. Khakh, E. Chang, H. Ho, S. Shriver, C. Young, S. Lin, J. P. Johnson, Jr., P. Wu, J. Li, M. Coons, C. Tam, B. Brillantes, H. Sampang, K. Mortara, K. K. Bowman, K. R. Clark, A. Estevez, Z. Xie, H. Verschoof, M. Grimwood, C. Dehnhardt, J. C. Andrez, T. Focken, D. P. Sutherland, B. S. Safina, M. A. Starovashnik, D. F. Ortwine, Y. Franke, C. J. Cohen, D. H. Hackos, C. M. Koth, and J. Payandeh. 2015. 'Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist', *Science*, 350: aac5464.
- Akins, P. T., and E. W. McCleskey. 1993. 'Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP', *Neuroscience*, 56: 759-69.
- Akopian, A. N., C. C. Chen, Y. Ding, P. Cesare, and J. N. Wood. 2000. 'A new member of the acid-sensing ion channel family', *Neuroreport*, 11: 2217-22.
- Akopian, A. N., V. Souslova, S. England, K. Okuse, N. Ogata, J. Ure, A. Smith, B. J. Kerr, S. B. McMahon, S. Boyce, R. Hill, L. C. Stanfa, A. H. Dickenson, and J. N. Wood. 1999. 'The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways', *Nat Neurosci*, 2: 541-8.
- Albillos, A., E. Neher, and T. Moser. 2000. 'R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells', *J Neurosci*, 20: 8323-30.
- Altier, C., S.J. Dubel, C. Barrère, S. E. Jarvis, S. C. Stotz, R. L. Spaetgens, J. D. Scott, V. Cornet, M. De Waard, G. W. Zamponi, J. Nargeot, and E. Bourinet. 2002. 'Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79.', *J. Biol. Chem.*, 277: 33598-603.
- Altomare, C., B. Terragni, C. Brioschi, R. Milanese, C. Pagliuca, C. Viscomi, A. Moroni, M. Baruscotti, and D. DiFrancesco. 2003. 'Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node', *J Physiol*, 549: 347-59.
- Alvarez-Perez, B., J. Homs, M. Bosch-Mola, T. Puig, F. Reina, E. Verdu, and P. Boadas-Vaello. 2016. 'Epigallocatechin-3-gallate treatment reduces thermal hyperalgesia after spinal cord injury by down-regulating RhoA expression in mice', *Eur J Pain*, 20: 341-52.
- Amaya, F., H. Wang, M. Costigan, A. J. Allchorne, J. P. Hatcher, J. Egerton, T. Stean, V. Morisset, D. Grose, M. J. Gunthorpe, I. P. Chessell, S. Tate, P. J. Green, and C. J. Woolf. 2006. 'The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity', *J Neurosci*, 26: 12852-60.
- Andreasen, D., U. G. Friis, T. R. Uhrenholt, B. L. Jensen, O. Skott, and P. B. Hansen. 2006. 'Coexpression of voltage-dependent calcium channels Cav1.2, 2.1a, and 2.1b in vascular myocytes', *Hypertension*, 47: 735-41.

- Antzelevitch, C., G. D. Pollevick, J. M. Cordeiro, O. Casis, M. C. Sanguinetti, Y. Aizawa, A. Guerschicoff, R. Pfeiffer, A. Oliva, B. Wollnik, P. Gelber, E. P. Bonaros, Jr., E. Burashnikov, Y. Wu, J. D. Sargent, S. Schickel, R. Oberheiden, A. Bhatia, L. F. Hsu, M. Haissaguerre, R. Schimpf, M. Borggrefe, and C. Wolpert. 2007. 'Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death', *Circulation*, 115: 442-9.
- Bader, P. L., M. Faizi, L. H. Kim, S. F. Owen, M. R. Tadross, R. W. Alfa, G. C. Bett, R. W. Tsien, R. L. Rasmusson, and M. Shamloo. 2011. 'Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 15432-7.
- Baeriswyl, V., and C. Heinis. 2013. 'Polycyclic peptide therapeutics', *ChemMedChem*, 8: 377-84.
- Baker, M. D., S. Y. Chandra, Y. Ding, S. G. Waxman, and J. N. Wood. 2003. 'GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones', *J Physiol*, 548: 373-82.
- Ball, S. L., P. A. Powers, H. S. Shin, C. W. Morgans, N. S. Peachey, and R. G. Gregg. 2002. 'Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1595-603.
- Bane, V., M. Lehane, M. Dikshit, A. O'Riordan, and A. Furey. 2014. 'Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection', *Toxins (Basel)*, 6: 693-755.
- Barbara, G., A. Alloui, J. Nargeot, P. Lory, A. Eschalier, E. Bourinet, and J. Chemin. 2009. 'T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipopeptides', *J Neurosci*, 29: 13106-14.
- Barbosa, C., Z. Y. Tan, R. Wang, W. Xie, J. A. Strong, R. R. Patel, M. R. Vasko, J. M. Zhang, and T. R. Cummins. 2015. 'Navbeta4 regulates fast resurgent sodium currents and excitability in sensory neurons', *Mol Pain*, 11: 60.
- Barg, S., X. Ma, L. Eliasson, J. Galvanovskis, S. O. Gopel, S. Obermuller, J. Platzer, E. Renstrom, M. Trus, D. Atlas, J. Striessnig, and P. Rorsman. 2001. 'Fast exocytosis with few Ca(2+) channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells', *Biophys J*, 81: 3308-23.
- Bech-Hansen, N. T., M. J. Naylor, T. A. Maybaum, W. G. Pearce, B. Koop, G. A. Fishman, M. Mets, M. A. Musarella, and K. M. Boycott. 1998. 'Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness', *Nat Genet*, 19: 264-7.
- Beckh, S., M. Noda, H. Lubbert, and S. Numa. 1989. 'Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development', *EMBO J*, 8: 3611-6.
- Belfer, I., F. Dai, H. Kehlet, P. Finelli, L. Qin, R. Bittner, and E. K. Aasvang. 2015. 'Association of functional variations in COMT and GCH1 genes with postherniotomy pain and related impairment', *Pain*, 156: 273-9.
- Belfer, Inna, and Luda Diatchenko. 2014. *Pain genetics : basic to translational science* (Wiley Blackwell: Ames Iowa).
- Bennett, G. J. 2012. 'What is spontaneous pain and who has it?', *J Pain*, 13: 921-9.
- Bennett, G. J., and Y. K. Xie. 1988. 'A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man', *Pain*, 33: 87-107.
- Berger, N. D., V. M. Gadotti, R. R. Petrov, K. Chapman, P. Diaz, and G. W. Zamponi. 2014. 'NMP-7 inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain via block of Cav3.2 T-type calcium channels and activation of CB2 receptors', *Mol Pain*, 10: 77.
- Beyder, A., A. Mazzone, P. R. Strege, D. J. Tester, Y. A. Saito, C. E. Bernard, F. T. Enders, W. E. Ek, P. T. Schmidt, A. Dlugosz, G. Lindberg, P. Karling, B. Ohlsson, M. Gazouli, G. Nardone, R. Cuomo, P. Usai-Satta, F. Galeazzi, M. Neri, P. Portincasa, M. Bellini, G. Barbara, M. Camilleri, G. R. Locke, 3rd, N. J. Talley, M. D'Amato, M. J. Ackerman, and G. Farrugia. 2014. 'Loss-of-function of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 (channelopathies) in patients with irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 146: 1659-68.
- Bezprozvanny, I., and R. W. Tsien. 1995. 'Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967)', *Mol Pharmacol*, 48: 540-9.
- Binshtok, A. M., P. Gerner, S. B. Oh, M. Puopolo, S. Suzuki, D. P. Roberson, T. Herbert, C. F. Wang, D. Kim, G. Chung, A. A. Mitani, G. K. Wang, B. P. Bean, and C. J. Woolf. 2009.

- 'Coapplication of lidocaine and the permanently charged sodium channel blocker QX-314 produces a long-lasting nociceptive blockade in rodents', *Anesthesiology*, 111: 127-37.
- Black, J. A., N. Frezel, S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman. 2012. 'Expression of Nav1.7 in DRG neurons extends from peripheral terminals in the skin to central preterminal branches and terminals in the dorsal horn', *Mol Pain*, 8: 82.
- Black, J. A., and S. G. Waxman. 2013. 'Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels', *Neuron*, 80: 280-91.
- Bladen, C., J. Hamid, I. A. Souza, and G. W. Zamponi. 2014. 'Block of T-type calcium channels by protoxins I and II', *Mol Brain*, 7: 36.
- Bleakman, D., D. Bowman, C. P. Bath, P. F. Brust, E. C. Johnson, C. R. Deal, R. J. Miller, S. B. Ellis, M. M. Harpold, M. Hans, and et al. 1995. 'Characteristics of a human N-type calcium channel expressed in HEK293 cells', *Neuropharmacology*, 34: 753-65.
- Blin, S., F. C. Chatelain, S. Feliciangeli, D. Kang, F. Lesage, and D. Bichet. 2014. 'Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels', *J Biol Chem*, 289: 28202-12.
- Block, B. A., T. Imagawa, K. P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong. 1988. 'Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle', *J Cell Biol*, 107: 2587-600.
- Blomster, L. V., D. Strobaek, C. Hougaard, J. Klein, L. H. Pinborg, J. D. Mikkelsen, and P. Christophersen. 2016. 'Quantification of the functional expression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa 3.1 on microglia from adult human neocortical tissue', *Glia*.
- Bocksteins, E., A. L. Raes, G. Van de Vijver, T. Bruyns, P. P. Van Bogaert, and D. J. Snyders. 2009. 'Kv2.1 and silent Kv subunits underlie the delayed rectifier K⁺ current in cultured small mouse DRG neurons', *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C1271-8.
- Bocksteins, E., and D. J. Snyders. 2012. 'Electrically silent Kv subunits: their molecular and functional characteristics', *Physiology (Bethesda)*, 27: 73-84.
- Bocksteins, E., G. Van de Vijver, P. P. Van Bogaert, and D. J. Snyders. 2012. 'Kv3 channels contribute to the delayed rectifier current in small cultured mouse dorsal root ganglion neurons', *Am J Physiol Cell Physiol*, 303: C406-15.
- Bosmans, F., L. Rash, S. Zhu, S. Diochot, M. Lazdunski, P. Escoubas, and J. Tytgat. 2006. 'Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes', *Mol Pharmacol*, 69: 419-29.
- Bouhassira, D., M. Lanteri-Minet, N. Attal, B. Laurent, and C. Touboul. 2008. 'Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population', *Pain*, 136: 380-7.
- Bourane, S., B. Duan, S. C. Koch, A. Dalet, O. Britz, L. Garcia-Campmany, E. Kim, L. Cheng, A. Ghosh, Q. Ma, and M. Goulding. 2015. 'Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons', *Science*, 350: 550-4.
- Bourane, S., K. S. Grossmann, O. Britz, A. Dalet, M. G. Del Barrio, F. J. Stam, L. Garcia-Campmany, S. Koch, and M. Goulding. 2015. 'Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control', *Cell*, 160: 503-15.
- Bourinet, E., A. Alloui, A. Monteil, C. Barrere, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T. P. Snutch, A. Eschalier, and J. Nargeot. 2005. 'Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception', *EMBO J*, 24: 315-24.
- Bourinet, E., A. Francois, and S. Laffray. 2016. 'T-type calcium channels in neuropathic pain', *Pain*, 157 Suppl 1: S15-22.
- Bourinet, E., T. W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G. W. Zamponi, J. Nargeot, and T. P. Snutch. 1999. 'Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels', *Nat Neurosci*, 2: 407-15.
- Bourinet, E., S. C. Stotz, R. L. Spaetgens, G. Dayanithi, J. Lemos, J. Nargeot, and G. W. Zamponi. 2001. 'Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels', *Biophys J*, 81: 79-88.
- Braathen, G. J., H. Hoyer, O. L. Busk, K. Tveten, C. F. Skjelbred, and M. B. Russell. 2015. 'Variants in the genes DCTN2, DNAH10, LRIG3, and MYO1A are associated with intermediate Charcot-Marie-Tooth disease in a Norwegian family', *Acta Neurol Scand*.

- Brackenbury, W. J., and L. L. Isom. 2011. 'Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family', *Front Pharmacol*, 2: 53.
- Brandt, A., J. Striessnig, and T. Moser. 2003. 'CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells', *J Neurosci*, 23: 10832-40.
- Bregman, H., L. Berry, J. L. Buchanan, A. Chen, B. Du, E. Feric, M. Hierl, L. Huang, D. Immke, B. Janosky, D. Johnson, X. Li, J. Ligutti, D. Liu, A. Malmberg, D. Matson, J. McDermott, P. Miu, H. N. Nguyen, V. F. Patel, D. Waldon, B. Wilenkin, X. M. Zheng, A. Zou, S. I. McDonough, and E. F. DiMauro. 2011. 'Identification of a potent, state-dependent inhibitor of Nav1.7 with oral efficacy in the formalin model of persistent pain', *J Med Chem*, 54: 4427-45.
- Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen, and D. Gallacher. 2006. 'Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment', *Eur J Pain*, 10: 287-333.
- Brennan, S. C., B. A. Finney, M. Lazarou, A. E. Rosser, C. Scherf, D. Adriaensen, P. J. Kemp, and D. Riccardi. 2013. 'Fetal calcium regulates branching morphogenesis in the developing human and mouse lung: involvement of voltage-gated calcium channels', *PLoS One*, 8: e80294.
- Brennan, T. J. 1999. 'Postoperative Models of Nociception', *ILAR J*, 40: 129-36.
- Brenneis, C., K. Kistner, M. Puopolo, S. Jo, D. Roberson, M. Sisignano, D. Segal, E. J. Cobos, B. J. Wainger, S. Labocha, N. Ferreiros, C. von Hehn, J. Tran, G. Geisslinger, P. W. Reeh, B. P. Bean, and C. J. Woolf. 2014. 'Bupivacaine-induced cellular entry of QX-314 and its contribution to differential nerve block', *Br J Pharmacol*, 171: 438-51.
- Broad, L. M., A. J. Mogg, E. Eberle, M. Tolley, D. L. Li, and K. L. Knopp. 2016. 'TRPV3 in Drug Development', *Pharmaceuticals (Basel)*, 9.
- Brown, D. A., and P. R. Adams. 1980. 'Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone', *Nature*, 283: 673-6.
- Burashnikov, E., R. Pfeiffer, H. Barajas-Martinez, E. Delpon, D. Hu, M. Desai, M. Borggrefe, M. Haissaguerre, R. Kanter, G. D. Pollevick, A. Guerchicoff, R. Laino, M. Marieb, K. Nademane, G. B. Nam, R. Robles, R. Schimpf, D. D. Stapleton, S. Viskin, S. Winters, C. Wolpert, S. Zimmern, C. Veltmann, and C. Antzelevitch. 2010. 'Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death', *Heart Rhythm*, 7: 1872-82.
- Caciotti, A., A. Morrone, R. Domenici, M. A. Donati, and E. Zammarchi. 2003. 'Severe prognosis in a large family with hypokalemic periodic paralysis', *Muscle Nerve*, 27: 165-9.
- Callaway, E. 2015. 'The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology', *Nature*, 525: 172-4.
- Cannon, S. C. 2002. 'An expanding view for the molecular basis of familial periodic paralysis', *Neuromuscul Disord*, 12: 533-43.
- Cardoso, F. C., Z. Dekan, K. J. Rosengren, A. Erickson, I. Vetter, J. R. Deuis, V. Herzig, P. F. Alewood, G. F. King, and R. J. Lewis. 2015. 'Identification and Characterization of ProTx-III [μ -TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelma pruriens*', *Mol Pharmacol*, 88: 291-303.
- Casillas-Espinosa, P. M., A. Hicks, A. Jeffreys, T. P. Snutch, T. J. O'Brien, and K. L. Powell. 2015. 'Z944, a Novel Selective T-Type Calcium Channel Antagonist Delays the Progression of Seizures in the Amygdala Kindling Model', *PLoS One*, 10: e0130012.
- Catacuzzeno, L., B. Fioretti, D. Pietrobon, and F. Franciolini. 2008. 'The differential expression of low-threshold K⁺ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones', *J Physiol*, 586: 5101-18.
- Catterall, W. A. 2010. 'Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology', *Neuron*, 67: 915-28.
- . 2011. 'Voltage-gated calcium channels', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3: a003947.
- . 2012. 'Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology', *J Physiol*, 590: 2577-89.
- Chagot, B., P. Escoubas, E. Villegas, C. Bernard, G. Ferrat, G. Corzo, M. Lazdunski, and H. Darbon. 2004. 'Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*', *Protein Sci*, 13: 1197-208.

- Chang, B., J. R. Heckenlively, P. R. Bayley, N. C. Brecha, M. T. Davissou, N. L. Hawes, A. A. Hirano, R. E. Hurd, A. Ikeda, B. A. Johnson, M. A. McCall, C. W. Morgans, S. Nusinowitz, N. S. Peachey, D. S. Rice, K. A. Vessey, and R. G. Gregg. 2006. 'The nob2 mouse, a null mutation in Cacna1f: anatomical and functional abnormalities in the outer retina and their consequences on ganglion cell visual responses', *Vis Neurosci*, 23: 11-24.
- Charnet, P., E. Bourinet, S. J. Dubel, T. P. Snutch, and J. Nargeot. 1994. 'Calcium currents recorded from a neuronal alpha 1C L-type calcium channel in *Xenopus* oocytes', *FEBS Lett*, 344: 87-90.
- Chemin, J., A. Monteil, E. Perez-Reyes, E. Bourinet, J. Nargeot, and P. Lory. 2002. 'Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability', *J Physiol*, 540: 3-14.
- Chen, J., S. M. Guan, W. Sun, and H. Fu. 2016. 'Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom', *Neurosci Bull*, 32: 265-72.
- Chen, W. C., H. Z. Xue, Y. L. Hsu, Q. Liu, S. Patel, and R. L. Davis. 2011. 'Complex distribution patterns of voltage-gated calcium channel alpha-subunits in the spiral ganglion', *Hear Res*, 278: 52-68.
- Cheng, J. K., C. S. Lin, C. C. Chen, J. R. Yang, and L. C. Chiou. 2007. 'Effects of intrathecal injection of T-type calcium channel blockers in the rat formalin test', *Behav Pharmacol*, 18: 1-8.
- Cheng, X., S. D. Dib-Hajj, L. Tyrrell, R. H. Te Morsche, J. P. Drenth, and S. G. Waxman. 2011. 'Deletion mutation of sodium channel Na(V)1.7 in inherited erythromelalgia: enhanced slow inactivation modulates dorsal root ganglion neuron hyperexcitability', *Brain*, 134: 1972-86.
- Chevrier, P., K. Vijayaragavan, and M. Chahine. 2004. 'Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine', *Br J Pharmacol*, 142: 576-84.
- Chiu, I. M., L. B. Barrett, E. K. Williams, D. E. Strohlic, S. Lee, A. D. Weyer, S. Lou, G. S. Bryman, D. P. Roberson, N. Ghasemlou, C. Piccoli, E. Ahat, V. Wang, E. J. Cobos, C. L. Stucky, Q. Ma, S. D. Liberles, and C. J. Woolf. 2014. 'Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity', *Elife*, 3.
- Choe, W., R. B. Messinger, E. Leach, V. S. Eckle, A. Obradovic, R. Salajegheh, V. Jevtovic-Todorovic, and S. M. Todorovic. 2011. 'TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent', *Mol Pharmacol*, 80: 900-10.
- Choi, J. S., S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman. 2006. 'Inherited erythromelalgia: limb pain from an S4 charge-neutral Na channelopathy', *Neurology*, 67: 1563-7.
- Choi, S., H. S. Na, J. Kim, J. Lee, S. Lee, D. Kim, J. Park, C. C. Chen, K. P. Campbell, and H. S. Shin. 2007. 'Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels', *Genes Brain Behav*, 6: 425-31.
- Christensen, A. H., F. C. Chatelain, I. G. Huttner, M. S. Olesen, M. Soka, S. Feliciangeli, C. Horvat, C. F. Santiago, J. I. Vandenberg, N. Schmitt, S. P. Olesen, F. Lesage, and D. Fatkin. 2016. 'The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size', *J Mol Cell Cardiol*, 97: 24-35.
- Chuang, R. S., H. Jaffe, L. Cribbs, E. Perez-Reyes, and K. J. Swartz. 1998. 'Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin', *Nat Neurosci*, 1: 668-74.
- Clement, H., G. Odell, F. Z. Zamudio, E. Redaelli, E. Wanke, A. Alagon, and L. D. Possani. 2007. 'Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels', *Toxicon*, 50: 65-74.
- Cohen-Armon, M., and M. Sokolovsky. 1993. 'Evidence for involvement of the voltage-dependent Na⁺ channel gating in depolarization-induced activation of G-proteins', *J Biol Chem*, 268: 9824-38.
- Cohen, S. A. 1996. 'Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks', *Circulation*, 94: 3083-6.
- Coull, J. A., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter, and Y. De Koninck. 2005. 'BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain', *Nature*, 438: 1017-21.

- Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck, and Y. De Koninck. 2003. 'Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain', *Nature*, 424: 938-42.
- Coulter, D. A., J. R. Huguenard, and D. A. Prince. 1989. 'Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons', *Ann Neurol*, 25: 582-93.
- Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble, and C. G. Woods. 2006. 'An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain', *Nature*, 444: 894-8.
- Cribbs, L. L., J. H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees, and E. Perez-Reyes. 1998. 'Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family', *Circ Res*, 83: 103-9.
- Cummins, T. R., S. D. Dib-Hajj, J. A. Black, A. N. Akopian, J. N. Wood, and S. G. Waxman. 1999. 'A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons', *J Neurosci*, 19: RC43.
- Cummins, T. R., S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman. 2004. 'Electrophysiological properties of mutant Nav1.7 sodium channels in a painful inherited neuropathy', *J Neurosci*, 24: 8232-6.
- Cummins, T. R., and S. G. Waxman. 1997. 'Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury', *J Neurosci*, 17: 3503-14.
- Curcio-Morelli, C., P. Zhang, B. Venugopal, F. A. Charles, M. F. Browning, H. F. Cantiello, and S. A. Slaugenhaupt. 2010. 'Functional multimerization of mucolipin channel proteins', *J Cell Physiol*, 222: 328-35.
- Dadi, P. K., B. Luo, N. C. Vierra, and D. A. Jacobson. 2015. 'TASK-1 Potassium Channels Limit Pancreatic alpha-Cell Calcium Influx and Glucagon Secretion', *Mol Endocrinol*, 29: 777-87.
- Daly, N. L., and D. J. Craik. 2011. 'Bioactive cystine knot proteins', *Curr Opin Chem Biol*, 15: 362-8.
- Daniil, G., F. L. Fernandes-Rosa, J. Chemin, I. Blesneac, J. Beltrand, M. Polak, X. Jeunemaitre, S. Boulkroun, L. Amar, T. M. Strom, P. Lory, and M. C. Zennaro. 2016. 'CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism', *EBioMedicine*.
- Danziger, N., and J. C. Willer. 2009. '[Congenital insensitivity to pain]', *Rev Neurol (Paris)*, 165: 129-36.
- Davis, K. D., R. A. Meyer, and J. N. Campbell. 1993. 'Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey', *J Neurophysiol*, 69: 1071-81.
- de Vries, B., A. H. Stam, F. Beker, A. M. van den Maagdenberg, K. R. Vanmolkot, L. Laan, I. B. Ginjaar, R. R. Frants, H. Lauffer, J. Haan, J. P. Haas, G. M. Terwindt, and M. D. Ferrari. 2008. 'CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood', *Cephalalgia*, 28: 887-91.
- Decosterd, I., and C. J. Woolf. 2000. 'Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain', *Pain*, 87: 149-58.
- Descoeur, J., V. Pereira, A. Pizzoccaro, A. Francois, B. Ling, V. Maffre, B. Couette, J. Busserolles, C. Courteix, J. Noel, M. Lazdunski, A. Eschalier, N. Authier, and E. Bourinet. 2011a. 'Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors', *EMBO Mol Med*, 3: 266-78.
- . 2011b. 'Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors', *EMBO Mol Med*, 3: 1-13.
- Deuis, J. R., Z. Dekan, J. S. Wingerd, J. J. Smith, N. R. Munasinghe, R. F. Bhola, W. L. Imlach, V. Herzig, D. A. Armstrong, K. J. Rosengren, F. Bosmans, S. G. Waxman, S. D. Dib-Hajj, P. Escoubas, M. S. Minett, M. J. Christie, G. F. King, P. F. Alewood, R. J. Lewis, J. N. Wood, and I. Vetter. 2017. 'Pharmacological characterisation of the highly Nav1.7 selective spider venom peptide Pn3a', *Sci Rep*, 7: 40883.
- Deuis, J. R., J. S. Wingerd, Z. Winter, T. Durek, Z. Dekan, S. R. Sousa, K. Zimmermann, T. Hoffmann, C. Weidner, M. A. Nassar, P. F. Alewood, R. J. Lewis, and I. Vetter. 2016. 'Analgesic Effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a Mouse Model of Nav1.7-Mediated Pain', *Toxins (Basel)*, 8.

- Deuis, J. R., K. Yin, M. A. Cooper, K. Schroder, and I. Vetter. 2016. 'Role of the NLRP3 inflammasome in a model of acute burn-induced pain', *Burns*.
- Deval, E., X. Gasull, J. Noel, M. Salinas, A. Baron, S. Diochot, and E. Lingueglia. 2010. 'Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain', *Pharmacol Ther*, 128: 549-58.
- Devor, M. 1999. 'Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion', *Pain*, Suppl 6: S27-35.
- . 2004. 'Evidence for heritability of pain in patients with traumatic neuropathy', *Pain*, 108: 200-1; author reply 02.
- Dib-Hajj, S. D., T. R. Cummins, J. A. Black, and S. G. Waxman. 2010. 'Sodium channels in normal and pathological pain', *Annu Rev Neurosci*, 33: 325-47.
- Dib-Hajj, S. D., L. Tyrrell, T. R. Cummins, J. A. Black, P. M. Wood, and S. G. Waxman. 1999. 'Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons', *FEBS Lett*, 462: 117-20.
- DiFrancesco, D. 1993. 'Pacemaker mechanisms in cardiac tissue', *Annu Rev Physiol*, 55: 455-72.
- Diochot, S., M. D. Drici, D. Moinier, M. Fink, and M. Lazdunski. 1999. 'Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis', *Br J Pharmacol*, 126: 251-63.
- Djoughri, L., and S. N. Lawson. 2004. 'Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals', *Brain Res Brain Res Rev*, 46: 131-45.
- Dolphin, A. C. 2016. 'Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology', *J Physiol*.
- Donaudy, F., A. Ferrara, L. Esposito, R. Hertzano, O. Ben-David, R. E. Bell, S. Melchionda, L. Zelante, K. B. Avraham, and P. Gasparini. 2003. 'Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss', *Am J Hum Genet*, 72: 1571-7.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. 'The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity', *Science*, 280: 69-77.
- Dragicevic, E., C. Poetschke, J. Duda, F. Schlaudraff, S. Lammel, J. Schiemann, M. Fauler, A. Hetzel, M. Watanabe, R. Lujan, R. C. Malenka, J. Striessnig, and B. Liss. 2014. 'Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons', *Brain*, 137: 2287-302.
- Du, Y., D. P. Garden, L. Wang, B. S. Zhorov, and K. Dong. 2011. 'Identification of new batrachotoxin-sensing residues in segment IIIS6 of the sodium channel', *J Biol Chem*, 286: 13151-60.
- Duan, B., L. Cheng, S. Bourane, O. Britz, C. Padilla, L. Garcia-Campmany, M. Krashes, W. Knowlton, T. Velasquez, X. Ren, S. E. Ross, B. B. Lowell, Y. Wang, M. Goulding, and Q. Ma. 2014. 'Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain', *Cell*, 159: 1417-32.
- Dubel, S. J., T. V. Starr, J. Hell, M. K. Ahlijanian, J. J. Enyeart, W. A. Catterall, and T. P. Snutch. 1992. 'Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 5058-62.
- Dutertre, S., A. H. Jin, I. Vetter, B. Hamilton, K. Sunagar, V. Lavergne, V. Dutertre, B. G. Fry, A. Antunes, D. J. Venter, P. F. Alewood, and R. J. Lewis. 2014. 'Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails', *Nat Commun*, 5: 3521.
- Dutzler, R., E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2002. 'X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity', *Nature*, 415: 287-94.
- Edgerton, G. B., K. M. Blumenthal, and D. A. Hanck. 2008. 'Evidence for multiple effects of ProTxII on activation gating in Na(V)1.5', *Toxicon*, 52: 489-500.
- . 2010. 'Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel Ca(V)3.1 by ProTxII', *Toxicon*, 56: 624-36.
- Ednie, A. R., J. M. Harper, and E. S. Bennett. 2015. 'Sialic acids attached to N- and O-glycans within the Nav1.4 D1S5-S6 linker contribute to channel gating', *Biochim Biophys Acta*, 1850: 307-17.

- Egan, T. J., M. A. Acuna, M. Zenobi-Wong, H. U. Zeilhofer, and D. Urech. 2016. 'Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity', *Biosci Rep*.
- Eisenberger, T., N. Di Donato, S. M. Baig, C. Neuhaus, A. Beyer, E. Decker, D. Murbe, C. Decker, C. Bergmann, and H. J. Bolz. 2014. 'Targeted and genomewide NGS data disqualify mutations in MYO1A, the "DFNA48 gene", as a cause of deafness', *Hum Mutat*, 35: 565-70.
- Ellis, S. B., M. E. Williams, N. R. Ways, R. Brenner, A. H. Sharp, A. T. Leung, K. P. Campbell, E. McKenna, W. J. Koch, A. Hui, and et al. 1988. 'Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel', *Science*, 241: 1661-4.
- Emery, E. C., A. P. Luiz, and J. N. Wood. 2016. 'Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief', *Expert Opin Ther Targets*, 20: 975-83.
- Enyedi, P., and G. Czirjak. 2010. 'Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels', *Physiol Rev*, 90: 559-605.
- Escoubas, P., and L. Rash. 2004. 'Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists', *Toxicol*, 43: 555-74.
- Eubanks, J., J. Srinivasan, M. B. Dinulos, C. M. Disteché, and W. A. Catterall. 1997. 'Structure and chromosomal localization of the beta2 subunit of the human brain sodium channel', *Neuroreport*, 8: 2775-9.
- Faber, C. G., J. G. Hoeijmakers, H. S. Ahn, X. Cheng, C. Han, J. S. Choi, M. Estacion, G. Lauria, E. K. Vanhoutte, M. M. Gerrits, S. Dib-Hajj, J. P. Drenth, S. G. Waxman, and I. S. Merkies. 2012. 'Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy', *Ann Neurol*, 71: 26-39.
- Faber, C. G., G. Lauria, I. S. Merkies, X. Cheng, C. Han, H. S. Ahn, A. K. Persson, J. G. Hoeijmakers, M. M. Gerrits, T. Pierro, R. Lombardi, D. Kapetis, S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman. 2012. 'Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 19444-9.
- Faber, E. S., and P. Sah. 2007. 'Functions of SK channels in central neurons', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34: 1077-83.
- Fang, X., L. Djouhri, J. A. Black, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman, and S. N. Lawson. 2002. 'The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons', *J Neurosci*, 22: 7425-33.
- Faramarzi, G., M. Zendejdel, and A. Haghparast. 2016. 'D1- and D2-like dopamine receptors within the nucleus accumbens contribute to stress-induced analgesia in formalin-related pain behaviours in rats', *Eur J Pain*.
- Farmer, C., J. J. Cox, E. V. Fletcher, C. G. Woods, J. N. Wood, and S. Schorge. 2012. 'Splice variants of Na(V)1.7 sodium channels have distinct beta subunit-dependent biophysical properties', *PLoS One*, 7: e41750.
- Farrag, K. J., A. Bhattacharjee, and R. J. Docherty. 2008. 'A comparison of the effects of veratridine on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in isolated rat dorsal root ganglion neurons', *Pflugers Arch*, 455: 929-38.
- Fecher-Trost, C., P. Weissgerber, and U. Wissenbach. 2014. 'TRPV6 channels', *Handb Exp Pharmacol*, 222: 359-84.
- Felts, P. A., S. Yokoyama, S. Dib-Hajj, J. A. Black, and S. G. Waxman. 1997. 'Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system', *Brain Res Mol Brain Res*, 45: 71-82.
- Flinspach, M., Q. Xu, A. D. Piekarz, R. Fellows, R. Hagan, A. Gibbs, Y. Liu, R. A. Neff, J. Freedman, W. A. Eckert, M. Zhou, R. Bonesteel, M. W. Pennington, K. A. Eddinger, T. L. Yaksh, M. Hunter, R. V. Swanson, and A. D. Wickenden. 2017. 'Insensitivity to pain induced by a potent selective closed-state Nav1.7 inhibitor', *Sci Rep*, 7: 39662.
- Foell, J. D., R. C. Balijepalli, B. P. Delisle, A. M. Yunker, S. L. Robia, J. W. Walker, M. W. McEnery, C. T. January, and T. J. Kamp. 2004. 'Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization', *Physiol Genomics*, 17: 183-200.
- Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hosli, K. Haenraets, A. Ghanem, K. K. Conzelmann, M. Bosl, and H. U. Zeilhofer. 2015. 'Targeted

- ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch', *Neuron*, 85: 1289-304.
- Fox, A. P., M. C. Nowycky, and R. W. Tsien. 1987. 'Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones', *J Physiol*, 394: 173-200.
- Francois, A., N. Kerckhove, M. Meleine, A. Alloui, C. Barrere, A. Gelot, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. Eschalier, D. Ardid, and E. Bourinet. 2013. 'State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects', *Pain*, 154: 283-93.
- Francois, A., S. Laffray, A. Pizzoccaro, A. Eschalier, and E. Bourinet. 2014. 'T-type calcium channels in chronic pain: mouse models and specific blockers', *Pflugers Arch*, 466: 707-17.
- Francois, A., N. Schuetter, S. Laffray, J. Sanguesa, A. Pizzoccaro, S. Dubel, A. Mantilleri, J. Nargeot, J. Noel, J. N. Wood, A. Moqrich, O. Pongs, and E. Bourinet. 2015a. 'The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function', *Cell Rep*.
- . 2015b. 'The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function', *Cell Rep*, 10: 370-82.
- Freise, D., B. Held, U. Wissenbach, A. Pfeifer, C. Trost, N. Himmerkus, U. Schweig, M. Freichel, M. Biel, F. Hofmann, M. Hoth, and V. Flockerzi. 2000. 'Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties', *J Biol Chem*, 275: 14476-81.
- Fukuoka, T., K. Kobayashi, H. Yamanaka, K. Obata, Y. Dai, and K. Noguchi. 2008. 'Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons', *J Comp Neurol*, 510: 188-206.
- Gaifullina, A. S., A. V. Yakovlev, A. N. Mustafina, T. M. Weiger, A. Hermann, and G. F. Sitdikova. 2016. 'Homocysteine augments BK channel activity and decreases exocytosis of secretory granules in rat GH3 cells', *FEBS Lett*.
- Gajski, G., and V. Garaj-Vrhovac. 2013. 'Melittin: a lytic peptide with anticancer properties', *Environ Toxicol Pharmacol*, 36: 697-705.
- Garcia-Caballero, A., V. M. Gadotti, P. Stemkowski, N. Weiss, I. A. Souza, V. Hodgkinson, C. Bladen, L. Chen, J. Hamid, A. Pizzoccaro, M. Deage, A. Francois, E. Bourinet, and G. W. Zamponi. 2014. 'The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity', *Neuron*, 83: 1144-58.
- Gasser, HS. 1941. 'The classification of nerve fibers', *Ohio Journal of Science*, 41: 145-59.
- Ge, J., W. Li, Q. Zhao, N. Li, M. Chen, P. Zhi, R. Li, N. Gao, B. Xiao, and M. Yang. 2015. 'Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel', *Nature*, 527: 64-9.
- George, A. L., Jr., J. Komisarof, R. G. Kallen, and R. L. Barchi. 1992. 'Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel', *Ann Neurol*, 31: 131-7.
- Gilron, I., T. S. Jensen, and A. H. Dickenson. 2013. 'Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside', *Lancet Neurol*, 12: 1084-95.
- Girard, C., F. Duprat, C. Terrenoire, N. Tinel, M. Fosset, G. Romey, M. Lazdunski, and F. Lesage. 2001. 'Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels', *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 249-56.
- Goldin, A. L., R. L. Barchi, J. H. Caldwell, F. Hofmann, J. R. Howe, J. C. Hunter, R. G. Kallen, G. Mandel, M. H. Meisler, Y. B. Netter, M. Noda, M. M. Tamkun, S. G. Waxman, J. N. Wood, and W. A. Catterall. 2000. 'Nomenclature of voltage-gated sodium channels', *Neuron*, 28: 365-8.
- Gonzales, E. B., T. Kawate, and E. Gouaux. 2009. 'Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors', *Nature*, 460: 599-604.
- Gottschalk, A., and D. S. Smith. 2001. 'New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia', *Am Fam Physician*, 63: 1979-84.
- Grimm, C., S. Jors, Z. Guo, A. G. Obukhov, and S. Heller. 2012. 'Constitutive activity of TRPML2 and TRPML3 channels versus activation by low extracellular sodium and small molecules', *J Biol Chem*, 287: 22701-8.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, J. P. Adelman, J. Aiyar, D. A. Bayliss, D. E. Clapham, M. Covarriubias, G. V. Desir, K. Furuichi, B. Ganetzky, M. L. Garcia, S. Grissmer, L. Y. Jan, A. Karschin, D. Kim, S. Kuperschmidt, Y. Kurachi, M. Lazdunski, F. Lesage, H. A. Lester, D.

- McKinnon, C. G. Nichols, I. O'Kelly, J. Robbins, G. A. Robertson, B. Rudy, M. Sanguinetti, S. Seino, W. Stuehmer, M. M. Tamkun, C. A. Vandenberg, A. Wei, H. Wulff, R. S. Wymore, and Pharmacology International Union of. 2003. 'International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels', *Pharmacol Rev*, 55: 583-6.
- Haase, H., A. Kresse, A. Hohaus, H. D. Schulte, M. Maier, K. J. Osterziel, P. E. Lange, and I. Morano. 1996. 'Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium', *J Mol Med (Berl)*, 74: 99-104.
- Hagen, N. A., B. Lapointe, M. Ong-Lam, B. Dubuc, D. Walde, B. Gagnon, R. Love, R. Goel, P. Hawley, A. H. Ngoc, and P. du Souich. 2011. 'A multicentre open-label safety and efficacy study of tetrodotoxin for cancer pain', *Curr Oncol*, 18: e109-16.
- Hains, B. C., J. P. Klein, C. Y. Saab, M. J. Craner, J. A. Black, and S. G. Waxman. 2003. 'Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury', *J Neurosci*, 23: 8881-92.
- Hall, M. K., D. A. Weidner, M. A. Edwards, and R. A. Schwalbe. 2015. 'Complex N-Glycans Influence the Spatial Arrangement of Voltage Gated Potassium Channels in Membranes of Neuronal-Derived Cells', *PLoS One*, 10: e0137138.
- Han, H. J., S. W. Lee, G. T. Kim, E. J. Kim, B. Kwon, D. Kang, H. J. Kim, and K. S. Seo. 2016. 'Enhanced Expression of TREK-1 Is Related with Chronic Constriction Injury of Neuropathic Pain Mouse Model in Dorsal Root Ganglion', *Biomol Ther (Seoul)*, 24: 252-9.
- Hans, M., A. Urrutia, C. Deal, P. F. Brust, K. Stauderman, S. B. Ellis, M. M. Harpold, E. C. Johnson, and M. E. Williams. 1999. 'Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels', *Biophys J*, 76: 1384-400.
- Hansen, P. B., B. L. Jensen, D. Andreasen, U. G. Friis, and O. Skott. 2000. 'Vascular smooth muscle cells express the alpha(1A) subunit of a P-/Q-type voltage-dependent Ca(2+)Channel, and It is functionally important in renal afferent arterioles', *Circ Res*, 87: 896-902.
- Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassele, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer, and U. Muller. 2004. 'GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization', *Science*, 304: 884-7.
- Hawrylycz, M. J., E. S. Lein, A. L. Guillozet-Bongaarts, E. H. Shen, L. Ng, J. A. Miller, L. N. van de Lagemat, K. A. Smith, A. Ebbert, Z. L. Riley, C. Abajian, C. F. Beckmann, A. Bernard, D. Bertagnolli, A. F. Boe, P. M. Cartagena, M. M. Chakravarty, M. Chapin, J. Chong, R. A. Dalley, B. D. Daly, C. Dang, S. Datta, N. Dee, T. A. Dolbeare, V. Faber, D. Feng, D. R. Fowler, J. Goldy, B. W. Gregor, Z. Haradon, D. R. Haynor, J. G. Hohmann, S. Horvath, R. E. Howard, A. Jeromin, J. M. Jochim, M. Kinnunen, C. Lau, E. T. Lazarz, C. Lee, T. A. Lemon, L. Li, Y. Li, J. A. Morris, C. C. Overly, P. D. Parker, S. E. Parry, M. Reding, J. J. Royall, J. Schulkin, P. A. Sequeira, C. R. Slaughterbeck, S. C. Smith, A. J. Sodt, S. M. Sunkin, B. E. Swanson, M. P. Vawter, D. Williams, P. Wohnoutka, H. R. Zielke, D. H. Geschwind, P. R. Hof, S. M. Smith, C. Koch, S. G. Grant, and A. R. Jones. 2012. 'An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome', *Nature*, 489: 391-9.
- Hedley, P. L., P. Jorgensen, S. Schlamowitz, J. Moolman-Smook, J. K. Kanters, V. A. Corfield, and M. Christiansen. 2009. 'The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update', *Hum Mutat*, 30: 1256-66.
- Helton, T. D., W. Xu, and D. Lipscombe. 2005. 'Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly', *J Neurosci*, 25: 10247-51.
- Henriques, S. T., E. Deplazes, N. Lawrence, O. Cheneval, S. Chaousis, M. Inserra, P. Thongyoo, G. F. King, A. E. Mark, I. Vetter, D. J. Craik, and C. I. Schroeder. 2016. 'Interaction of Tarantula Venom Peptide ProTx-II with Lipid Membranes Is a Prerequisite for Its Inhibition of Human Voltage-gated Sodium Channel NaV1.7', *J Biol Chem*, 291: 17049-65.
- Herzig, V., D. L. Wood, F. Newell, P. A. Chaumeil, Q. Kaas, G. J. Binford, G. M. Nicholson, D. Gorse, and G. F. King. 2011. 'ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures', *Nucleic Acids Res*, 39: D653-7.

- Hibino, H., A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay, and Y. Kurachi. 2010. 'Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles', *Physiol Rev*, 90: 291-366.
- Hille, Bertil. 2001. *Ion channels of excitable membranes* (Sinauer: Sunderland, Mass.).
- Honore, E., J. R. Martins, D. Penton, A. Patel, and S. Demolombe. 2015. 'The Piezo Mechanosensitive Ion Channels: May the Force Be with You!', *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 169: 25-41.
- Hu, T., N. Liu, M. Lv, L. Ma, H. Peng, S. Peng, and T. Liu. 2016. 'Lidocaine Inhibits HCN Currents in Rat Spinal Substantia Gelatinosa Neurons', *Anesth Analg*, 122: 1048-59.
- Huang, H., B. Z. Tan, Y. Shen, J. Tao, F. Jiang, Y. Y. Sung, C. K. Ng, M. Raida, G. Kohr, M. Higuchi, H. Fatemi-Shariatpanahi, B. Harden, D. T. Yue, and T. W. Soong. 2012. 'RNA editing of the IQ domain in Ca(v)1.3 channels modulates their Ca(2)(+)-dependent inactivation', *Neuron*, 73: 304-16.
- Hulme, J. T., M. Ahn, S. D. Hauschka, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 2002. 'A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function', *J Biol Chem*, 277: 4079-87.
- Hwang, H. Y., E. Zhang, S. Park, W. Chung, S. Lee, D. W. Kim, Y. Ko, and W. Lee. 2015. 'TWIK-Related Spinal Cord K(+) Channel Expression Is Increased in the Spinal Dorsal Horn after Spinal Nerve Ligation', *Yonsei Med J*, 56: 1307-15.
- Irie, S., and T. Furukawa. 2014. 'Trpm1', *Handb Exp Pharmacol*, 222: 387-402.
- Isensee, J., L. Krahe, K. Moeller, V. Pereira, J. E. Sexton, X. Sun, E. Emery, J. N. Wood, and T. Hucho. 2017. 'Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Nav1.7 knockout mice', *Sci Signal*, 10.
- Isom, L. L. 2001. 'Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary', *Neuroscientist*, 7: 42-54.
- Isom, L. L., K. S. De Jongh, D. E. Patton, B. F. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin, and W. A. Catterall. 1992. 'Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel', *Science*, 256: 839-42.
- Isom, L. L., D. S. Ragsdale, K. S. De Jongh, R. E. Westenbroek, B. F. Reber, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1995. 'Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif', *Cell*, 83: 433-42.
- Jasti, J., H. Furukawa, E. B. Gonzales, and E. Gouaux. 2007. 'Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH', *Nature*, 449: 316-23.
- Jay, S. D., S. B. Ellis, A. F. McCue, M. E. Williams, T. S. Vedvick, M. M. Harpold, and K. P. Campbell. 1990. 'Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle', *Science*, 248: 490-2.
- Jiang, Y. Q., Q. Sun, H. Y. Tu, and Y. Wan. 2008. 'Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain', *Neurochem Res*, 33: 1979-89.
- Jimenez, C., E. Bourinet, V. Leuranguer, S. Richard, T. P. Snutch, and J. Nargeot. 2000. 'Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels', *Neuropharmacology*, 39: 1-10.
- Jonsson, E. H., H. Backlund Wasling, V. Wagnbeck, M. Dimitriadis, J. R. Georgiadis, H. Olausson, and I. Croy. 2015. 'Unmyelinated tactile cutaneous nerves signal erotic sensations', *J Sex Med*, 12: 1338-45.
- Kallen, R. G., Z. H. Sheng, J. Yang, L. Q. Chen, R. B. Rogart, and R. L. Barchi. 1990. 'Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle', *Neuron*, 4: 233-42.
- Kamanina, Y. V., E. A. Klimanova, E. A. Dergousova, I. Y. Petrushanko, and O. D. Lopina. 2016. 'Identification of a Region of the Polypeptide Chain of Na,K-ATPase alpha-Subunit Interacting with 67-kDa Melittin-Like Protein', *Biochemistry (Mosc)*, 81: 249-54.
- Kang, H. W., J. Y. Park, S. W. Jeong, J. A. Kim, H. J. Moon, E. Perez-Reyes, and J. H. Lee. 2006. 'A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels', *J Biol Chem*, 281: 4823-30.
- Kanju, P., Y. Chen, W. Lee, M. Yeo, S. H. Lee, J. Romac, R. Shahid, P. Fan, D. M. Gooden, S. A. Simon, I. Spasojevic, R. A. Mook, R. A. Liddle, F. Guilak, and W. B. Liedtke. 2016. 'Small molecule dual-inhibitors of TRPV4 and TRPA1 for attenuation of inflammation and pain', *Sci Rep*, 6: 26894.

- Kehlet, H., T. S. Jensen, and C. J. Woolf. 2006. 'Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention', *Lancet*, 367: 1618-25.
- Kerckhove, N., C. Mallet, A. Francois, M. Boudes, J. Chemin, T. Voets, E. Bourinet, A. Alloui, and A. Eschalier. 2014. 'Ca(v)3.2 calcium channels: the key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol', *Pain*, 155: 764-72.
- Kerstein, P. C., B. T. Jacques-Fricke, J. Rengifo, B. J. Mogen, J. C. Williams, P. A. Gottlieb, F. Sachs, and T. M. Gomez. 2013. 'Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth', *J Neurosci*, 33: 273-85.
- Kim, C., K. Jun, T. Lee, S. S. Kim, M. W. McEnery, H. Chin, H. L. Kim, J. M. Park, D. K. Kim, S. J. Jung, J. Kim, and H. S. Shin. 2001. 'Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel', *Mol Cell Neurosci*, 18: 235-45.
- Kim, D., D. Park, S. Choi, S. Lee, M. Sun, C. Kim, and H. S. Shin. 2003. 'Thalamic control of visceral nociception mediated by T-type Ca²⁺ channels', *Science*, 302: 117-9.
- Kimm, T., and B. P. Bean. 2014. 'Inhibition of A-type potassium current by the peptide toxin SNX-482', *J Neurosci*, 34: 9182-9.
- King, G. F. 2011. 'Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics', *Expert Opin Biol Ther*, 11: 1469-84.
- Klugbauer, N., E. Marais, and F. Hofmann. 2003. 'Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding', *J Bioenerg Biomembr*, 35: 639-47.
- Knowlton, W. M., and D. D. McKemy. 2011. 'TRPM8: from cold to cancer, peppermint to pain', *Curr Pharm Biotechnol*, 12: 68-77.
- Kohrman, D. C., M. R. Smith, A. L. Goldin, J. Harris, and M. H. Meisler. 1996. 'A missense mutation in the sodium channel Scn8a is responsible for cerebellar ataxia in the mouse mutant jolting', *J Neurosci*, 16: 5993-9.
- Kolesnikov, Y. A., I. Chereshevnev, and G. W. Pasternak. 2000. 'Analgesic synergy between topical lidocaine and topical opioids', *J Pharmacol Exp Ther*, 295: 546-51.
- Kopljar, I., A. Grottesi, T. de Block, J. D. Rainier, J. Tytgat, A. J. Labro, and D. J. Snyders. 2016. 'Voltage-sensor conformation shapes the intra-membrane drug binding site that determines gambierol affinity in Kv channels', *Neuropharmacology*, 107: 160-7.
- Kozlov, S., and E. Grishin. 2005. 'Classification of spider neurotoxins using structural motifs by primary structure features. Single residue distribution analysis and pattern analysis techniques', *Toxicon*, 46: 672-86.
- Kraus, R. L., Y. Li, Y. Gregan, A. L. Gotter, V. N. Uebele, S. V. Fox, S. M. Doran, J. C. Barrow, Z. Q. Yang, T. S. Reger, K. S. Koblan, and J. J. Renger. 2010. 'In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice', *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 409-17.
- Kravtsov, D. V., C. Caputo, A. Collaco, N. Hoekstra, M. E. Egan, M. S. Mooseker, and N. A. Ameen. 2012. 'Myosin Ia is required for CFTR brush border membrane trafficking and ion transport in the mouse small intestine', *Traffic*, 13: 1072-82.
- Kurogi, M., Y. Kawai, K. Nagatomo, M. Tateyama, Y. Kubo, and O. Saitoh. 2015. 'Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons', *Chem Senses*, 40: 27-46.
- Laedermann, C. J., M. Cachemaille, G. Kirschmann, M. Pertin, R. D. Gosselin, I. Chang, M. Albesa, C. Towne, B. L. Schneider, S. Kellenberger, H. Abriel, and I. Decosterd. 2013. 'Dysregulation of voltage-gated sodium channels by ubiquitin ligase NEDD4-2 in neuropathic pain', *J Clin Invest*, 123: 3002-13.
- Laedermann, C. J., N. Syam, M. Pertin, I. Decosterd, and H. Abriel. 2013. 'beta1- and beta3- voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells', *Front Cell Neurosci*, 7: 137.
- Lalevee, N., M. C. Rebsamen, S. Barrere-Lemaire, E. Perrier, J. Nargeot, J. P. Benitah, and M. F. Rossier. 2005. 'Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes', *Cardiovasc Res*, 67: 216-24.
- Lallemend, F., and P. Ernfors. 2012. 'Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons', *Trends Neurosci*, 35: 373-81.

- LeBlanc, B. W., T. R. Lii, J. J. Huang, Y. C. Chao, P. M. Bowary, B. S. Cross, M. S. Lee, L. P. Vera-Portocarrero, and C. Y. Saab. 2016. 'T-type calcium channel blocker Z944 restores cortical synchrony and thalamocortical connectivity in a rat model of neuropathic pain', *Pain*, 157: 255-63.
- Lee, A., S. Wang, B. Williams, J. Hagen, T. E. Scheetz, and F. Haeseleer. 2015. 'Characterization of Cav1.4 complexes (alpha1.4, beta2, and alpha2delta4) in HEK293T cells and in the retina', *J Biol Chem*, 290: 1505-21.
- Lee, J. H., L. L. Cribbs, and E. Perez-Reyes. 1999. 'Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels', *FEBS Lett*, 445: 231-6.
- Lee, J. H., A. N. Daud, L. L. Cribbs, A. E. Lacerda, A. Pereverzev, U. Klockner, T. Schneider, and E. Perez-Reyes. 1999. 'Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family', *J Neurosci*, 19: 1912-21.
- Lee, J. H., C. K. Park, G. Chen, Q. Han, R. G. Xie, T. Liu, R. R. Ji, and S. Y. Lee. 2014. 'A monoclonal antibody that targets a Nav1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief', *Cell*, 157: 1393-404.
- Leipold, E., L. Liebmann, G. C. Korenke, T. Heinrich, S. Giesselmann, J. Baets, M. Ebbinghaus, R. O. Goral, T. Stodberg, J. C. Hennings, M. Bergmann, J. Altmuller, H. Thiele, A. Wetzel, P. Nurnberg, V. Timmerman, P. De Jonghe, R. Blum, H. G. Schaible, J. Weis, S. H. Heinemann, C. A. Hubner, and I. Kurth. 2013. 'A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception', *Nat Genet*, 45: 1399-404.
- Lengyel, M., G. Czirjak, and P. Enyedi. 2016. 'Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits', *J Biol Chem*, 291: 13649-61.
- Levinson, S. R., S. Luo, and M. A. Henry. 2012. 'The role of sodium channels in chronic pain', *Muscle Nerve*, 46: 155-65.
- Li, C. L., K. C. Li, D. Wu, Y. Chen, H. Luo, J. R. Zhao, S. S. Wang, M. M. Sun, Y. J. Lu, Y. Q. Zhong, X. Y. Hu, R. Hou, B. B. Zhou, L. Bao, H. S. Xiao, and X. Zhang. 2016. 'Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity', *Cell Res*, 26: 83-102.
- Li, Q., and X. Zhang. 2015. 'Epigallocatechin-3-gallate attenuates bone cancer pain involving decreasing spinal Tumor Necrosis Factor-alpha expression in a mouse model', *Int Immunopharmacol*, 29: 818-23.
- Li, X. Y., and H. Toyoda. 2015. 'Role of leak potassium channels in pain signaling', *Brain Res Bull*, 119: 73-9.
- Liao, M., E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng. 2013. 'Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy', *Nature*, 504: 107-12.
- Liman, E. R. 2007. 'TRPM5 and taste transduction', *Handb Exp Pharmacol*: 287-98.
- Limpitikul, W. B., I. E. Dick, M. Ben-Johny, and D. T. Yue. 2016. 'An autism-associated mutation in CaV1.3 channels has opposing effects on voltage- and Ca(2+)-dependent regulation', *Sci Rep*, 6: 27235.
- Link, T. M., U. Park, B. M. Vonakis, D. M. Raben, M. J. Soloski, and M. J. Caterina. 2010. 'TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis', *Nat Immunol*, 11: 232-9.
- Liu, H., M. De Waard, V. E. Scott, C. A. Gurnett, V. A. Lennon, and K. P. Campbell. 1996. 'Identification of three subunits of the high affinity omega-conotoxin MVIIC-sensitive Ca2+ channel', *J Biol Chem*, 271: 13804-10.
- Liu, M., and J. N. Wood. 2011. 'The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain', *Pain Med*, 12 Suppl 3: S93-9.
- Liu, T., T. Berta, Z. Z. Xu, C. K. Park, L. Zhang, N. Lu, Q. Liu, Y. Liu, Y. J. Gao, Y. C. Liu, Q. Ma, X. Dong, and R. R. Ji. 2012. 'TLR3 deficiency impairs spinal cord synaptic transmission, central sensitization, and pruritus in mice', *J Clin Invest*, 122: 2195-207.
- Liu, X., P. S. Yang, W. Yang, and D. T. Yue. 2010. 'Enzyme-inhibitor-like tuning of Ca(2+) channel connectivity with calmodulin', *Nature*, 463: 968-72.
- Loddenkemper, T., D. M. Talos, R. T. Cleary, A. Joseph, I. Sanchez Fernandez, A. Alexopoulos, P. Kotagal, I. Najm, and F. E. Jensen. 2014. 'Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus', *Epilepsy Res*, 108: 605-15.

- Lolignier, S., M. Amsalem, F. Maingret, F. Padilla, M. Gabriac, E. Chapuy, A. Eschalier, P. Delmas, and J. Busserolles. 2011. 'Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation', *PLoS One*, 6: e23083.
- Lolignier, S., C. Bonnet, C. Gaudioso, J. Noel, J. Ruel, M. Amsalem, J. Ferrier, L. Rodat-Despoix, V. Bouvier, Y. Aissouni, L. Prival, E. Chapuy, F. Padilla, A. Eschalier, P. Delmas, and J. Busserolles. 2015. 'The Nav1.9 channel is a key determinant of cold pain sensation and cold allodynia', *Cell Rep*, 11: 1067-78.
- Lu, B., Y. Su, S. Das, J. Liu, J. Xia, and D. Ren. 2007. 'The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm', *Cell*, 129: 371-83.
- Luo, J. L., H. Y. Qin, C. K. Wong, S. Y. Tsang, Y. Huang, and Z. X. Bian. 2011. 'Enhanced excitability and down-regulated voltage-gated potassium channels in colonic drg neurons from neonatal maternal separation rats', *J Pain*, 12: 600-9.
- Macpherson, L. J., B. Xiao, K. Y. Kwan, M. J. Petrus, A. E. Dubin, S. Hwang, B. Cravatt, D. P. Corey, and A. Patapoutian. 2007. 'An ion channel essential for sensing chemical damage', *J Neurosci*, 27: 11412-5.
- Macrae, W. A. 2008. 'Chronic post-surgical pain: 10 years on', *Br J Anaesth*, 101: 77-86.
- Maier, S. K., R. E. Westenbroek, K. A. McCormick, R. Curtis, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 2004. 'Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart', *Circulation*, 109: 1421-7.
- Maier, S. K., R. E. Westenbroek, T. T. Yamanushi, H. Dobrzynski, M. R. Boyett, W. A. Catterall, and T. Scheuer. 2003. 'An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3507-12.
- Makielski, J. C., J. Limberis, Z. Fan, and J. W. Kyle. 1999. 'Intrinsic lidocaine affinity for Na channels expressed in *Xenopus* oocytes depends on alpha (hH1 vs. rSkM1) and beta 1 subunits', *Cardiovasc Res*, 42: 503-9.
- Malmberg, A. B., and T. L. Yaksh. 1994. 'Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception', *J Neurosci*, 14: 4882-90.
- Mangoni, M. E., B. Couette, E. Bourinet, J. Platzter, D. Reimer, J. Striessnig, and J. Nargeot. 2003. 'Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 5543-8.
- Marcantoni, A., D. H. Vandael, S. Mahapatra, V. Carabelli, M. J. Sinnegger-Brauns, J. Striessnig, and E. Carbone. 2010. 'Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells', *J Neurosci*, 30: 491-504.
- Marger, F., A. Gelot, A. Alloui, J. Matricon, J. F. Ferrer, C. Barrere, A. Pizzoccaro, E. Muller, J. Nargeot, T. P. Snutch, A. Eschalier, E. Bourinet, and D. Ardid. 2011. 'T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 11268-73.
- Marsh, B., C. Acosta, L. Djouhri, and S. N. Lawson. 2012. 'Leak K(+) channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour', *Mol Cell Neurosci*, 49: 375-86.
- Martin, R. L., J. H. Lee, L. L. Cribbs, E. Perez-Reyes, and D. A. Hanck. 2000. 'Mibefradil block of cloned T-type calcium channels', *J Pharmacol Exp Ther*, 295: 302-8.
- Matthews, E. A., L. A. Bee, G. J. Stephens, and A. H. Dickenson. 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: 3561-9.
- Mazzolini, R., H. Dopeso, S. Mateo-Lozano, W. Chang, P. Rodrigues, S. Bazzocco, H. Alazzouzi, S. Landolfi, J. Hernandez-Losa, E. Andretta, P. Alhopuro, E. Espin, M. Armengol, J. Taberner, S. Ramon y Cajal, M. Kloor, J. Gebert, J. M. Mariadason, S. Schwartz, Jr., L. A. Aaltonen, M. S. Mooseker, and D. Arango. 2012. 'Brush border myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 1530-5.
- McCormack, K., S. Santos, M. L. Chapman, D. S. Krafte, B. E. Marron, C. W. West, M. J. Krambis, B. M. Antonio, S. G. Zellmer, D. Printzenhoff, K. M. Padilla, Z. Lin, P. K. Wagoner, N. A. Swain, P. A. Stupple, M. de Groot, R. P. Butt, and N. A. Castle. 2013. 'Voltage sensor

- interaction site for selective small molecule inhibitors of voltage-gated sodium channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E2724-32.
- McGlone, F., and D. Reilly. 2010. 'The cutaneous sensory system', *Neurosci Biobehav Rev*, 34: 148-59.
- McRory, J. E., J. Hamid, C. J. Doering, E. Garcia, R. Parker, K. Hamming, L. Chen, M. Hildebrand, A. M. Beedle, L. Feldcamp, G. W. Zamponi, and T. P. Snutch. 2004. 'The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution', *J Neurosci*, 24: 1707-18.
- Meadows, L. S., Y. H. Chen, A. J. Powell, J. J. Clare, and D. S. Ragsdale. 2002. 'Functional modulation of human brain Nav1.3 sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary beta 1, beta 2 and beta 3 subunits', *Neuroscience*, 114: 745-53.
- Mermelstein, P. G., R. C. Foehring, T. Tkatch, W. J. Song, G. Baranauskas, and D. J. Surmeier. 1999. 'Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with beta subunit expression', *J Neurosci*, 19: 7268-77.
- Middleton, R. E., V. A. Warren, R. L. Kraus, J. C. Hwang, C. J. Liu, G. Dai, R. M. Brochu, M. G. Kohler, Y. D. Gao, V. M. Garsky, M. J. Bogusky, J. T. Mehl, C. J. Cohen, and M. M. Smith. 2002. 'Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels', *Biochemistry*, 41: 14734-47.
- Minett, M. S., V. Pereira, S. Sikandar, A. Matsuyama, S. Lolignier, A. H. Kanellopoulos, F. Mancini, G. D. Iannetti, Y. D. Bogdanov, S. Santana-Varela, Q. Millet, G. Baskozos, R. MacAllister, J. J. Cox, J. Zhao, and J. N. Wood. 2015. 'Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7', *Nat Commun*, 6: 8967.
- Mitchell, J. W., J. K. Larsen, and P. M. Best. 2002. 'Identification of the calcium channel alpha 1E (Ca(v)2.3) isoform expressed in atrial myocytes', *Biochim Biophys Acta*, 1577: 17-26.
- Monteil, A., J. Chemin, E. Bourinet, G. Mennessier, P. Lory, and J. Nargeot. 2000. 'Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels', *J Biol Chem*, 275: 6090-100.
- Moosmang, S., N. Haider, N. Klugbauer, H. Adelsberger, N. Langwieser, J. Muller, M. Stiess, E. Marais, V. Schulla, L. Lacinova, S. Goebbels, K. A. Nave, D. R. Storm, F. Hofmann, and T. Kleppisch. 2005. 'Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory', *J Neurosci*, 25: 9883-92.
- Moosmang, S., V. Schulla, A. Welling, R. Feil, S. Feil, J. W. Wegener, F. Hofmann, and N. Klugbauer. 2003. 'Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation', *EMBO J*, 22: 6027-34.
- Morgan, K., E. B. Stevens, B. Shah, P. J. Cox, A. K. Dixon, K. Lee, R. D. Pinnock, J. Hughes, P. J. Richardson, K. Mizuguchi, and A. P. Jackson. 2000. 'beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2308-13.
- Mori, Y., T. Friedrich, M. S. Kim, A. Mikami, J. Nakai, P. Ruth, E. Bosse, F. Hofmann, V. Flockerzi, T. Furuichi, and et al. 1991. 'Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel', *Nature*, 350: 398-402.
- Motin, L., T. Durek, and D. J. Adams. 2016. 'Modulation of human Nav1.7 channel gating by synthetic alpha-scorpion toxin OD1 and its analogs', *Channels (Austin)*, 10: 139-47.
- Muller, F., B. Heinke, and J. Sandkuhler. 2003. 'Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation', *Neuroscience*, 122: 799-805.
- Munro, G., P. K. Ahring, and N. R. Mirza. 2009. 'Developing analgesics by enhancing spinal inhibition after injury: GABAA receptor subtypes as novel targets', *Trends Pharmacol Sci*, 30: 453-9.
- Murakami, M., O. Nakagawasai, S. Fujii, K. Kameyama, S. Murakami, S. Hozumi, A. Esashi, R. Taniguchi, T. Yanagisawa, K. Tan-no, T. Tadano, K. Kitamura, and K. Kisara. 2001. 'Antinociceptive action of amlodipine blocking N-type Ca²⁺ channels at the primary afferent neurons in mice', *Eur J Pharmacol*, 419: 175-81.
- Murray, J. K., J. Ligutti, D. Liu, A. Zou, L. Poppe, H. Li, K. L. Andrews, B. D. Moyer, S. I. McDonough, P. Favreau, R. Stocklin, and L. P. Miranda. 2015. 'Engineering potent and

- selective analogues of GpTx-1, a tarantula venom peptide antagonist of the Na(V)1.7 sodium channel', *J Med Chem*, 58: 2299-314.
- Murray, J. K., J. Long, A. Zou, J. Ligutti, K. L. Andrews, L. Poppe, K. Biswas, B. D. Moyer, S. I. McDonough, and L. P. Miranda. 2016. 'Single Residue Substitutions That Confer Voltage-Gated Sodium Ion Channel Subtype Selectivity in the Nav1.7 Inhibitory Peptide GpTx-1', *J Med Chem*, 59: 2704-17.
- Myoga, M. H., and W. G. Regehr. 2011. 'Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses', *J Neurosci*, 31: 5235-43.
- N'Gouemo, P. 2011. 'Targeting BK (big potassium) channels in epilepsy', *Expert Opin Ther Targets*, 15: 1283-95.
- Na, T., and J. B. Peng. 2014. 'TRPV5: a Ca(2+) channel for the fine-tuning of Ca(2+) reabsorption', *Handb Exp Pharmacol*, 222: 321-57.
- Nakagawa, H., and A. Hiura. 2013. 'Comparison of the transport of QX-314 through TRPA1, TRPM8, and TRPV1 channels', *J Pain Res*, 6: 223-30.
- Narahashi, T., J. W. Moore, and W. R. Scott. 1964. 'Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons', *J Gen Physiol*, 47: 965-74.
- Naylor, D. E., H. Liu, and C. G. Wasterlain. 2005. 'Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus', *J Neurosci*, 25: 7724-33.
- Newcomb, R., B. Szoke, A. Palma, G. Wang, Xh Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J. A. Loo, D. J. Dooley, L. Nadasdi, R. W. Tsien, J. Lemos, and G. Miljanich. 1998. 'Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*', *Biochemistry*, 37: 15353-62.
- Nilius, B. 2007. 'TRP channels in disease', *Biochim Biophys Acta*, 1772: 805-12.
- Noda, M., T. Ikeda, H. Suzuki, H. Takeshima, T. Takahashi, M. Kuno, and S. Numa. 1986. 'Expression of functional sodium channels from cloned cDNA', *Nature*, 322: 826-8.
- Norton, R. S., and P. K. Pallaghy. 1998. 'The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides', *Toxicon*, 36: 1573-83.
- Oberwinkler, J., and S. E. Philipp. 2014. 'Trpm3', *Handb Exp Pharmacol*, 222: 427-59.
- Obradovic, ALj, S. M. Hwang, J. Scarpa, S. J. Hong, S. M. Todorovic, and V. Jevtovic-Todorovic. 2014. 'CaV3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons are important for mibefradil-induced reversal of hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy', *PLoS One*, 9: e91467.
- Olamendi-Portugal, T., B. I. Garcia, I. Lopez-Gonzalez, J. Van Der Walt, K. Dyason, C. Ulens, J. Tytgat, R. Felix, A. Darszon, and L. D. Possani. 2002. 'Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels', *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 562-8.
- Omilusik, K., J. J. Priatel, X. Chen, Y. T. Wang, H. Xu, K. B. Choi, R. Gopaul, A. McIntyre-Smith, H. S. Teh, R. Tan, N. T. Bech-Hansen, D. Waterfield, D. Fedida, S. V. Hunt, and W. A. Jefferies. 2011. 'The Ca(v)1.4 calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis', *Immunity*, 35: 349-60.
- Ophoff, R. A., G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, J. E. Lamerdin, H. W. Mohrenweiser, D. E. Bulman, M. Ferrari, J. Haan, D. Lindhout, G. J. van Ommen, M. H. Hofker, M. D. Ferrari, and R. R. Frants. 1996. 'Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4', *Cell*, 87: 543-52.
- Orestes, P., H. P. Osuru, W. E. McIntire, M. O. Jacus, R. Salajegheh, M. M. Jagodic, W. Choe, J. Lee, S. S. Lee, K. E. Rose, N. Pairo, M. R. Digruccio, K. Krishnan, D. F. Covey, J. H. Lee, P. Q. Barrett, V. Jevtovic-Todorovic, and S. M. Todorovic. 2013. 'Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)3.2 T-type calcium channels', *Diabetes*, 62: 3828-38.
- Osorio, N., S. Korogod, and P. Delmas. 2014. 'Specialized functions of Nav1.5 and Nav1.9 channels in electrogenesis of myenteric neurons in intact mouse ganglia', *J Neurosci*, 34: 5233-44.
- Osteen, J. D., V. Herzig, J. Gilchrist, J. J. Emrick, C. Zhang, X. Wang, J. Castro, S. Garcia-Caraballo, L. Grundy, G. Y. Rychkov, A. D. Weyer, Z. Dekan, E. A. Undheim, P. Alewood, C. L.

- Stucky, S. M., Brierley, A. I., Basbaum, F., Bosmans, G. F., King, and D. Julius. 2016. 'Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain', *Nature*, 534: 494-9.
- Overington, J. P., B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins. 2006. 'How many drug targets are there?', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 993-6.
- Owsianik, G., K. Talavera, T. Voets, and B. Nilius. 2006. 'Permeation and selectivity of TRP channels', *Annu Rev Physiol*, 68: 685-717.
- Pan, J. Q., and D. Lipscombe. 2000. 'Alternative splicing in the cytoplasmic II-III loop of the N-type Ca channel alpha 1B subunit: functional differences are beta subunit-specific', *J Neurosci*, 20: 4769-75.
- Pape, H. C. 1996. 'Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons', *Annu Rev Physiol*, 58: 299-327.
- Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore, and D. Talwar. 1997. 'Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel', *J Membr Biol*, 160: 127-40.
- Park, H., E. J. Kim, J. Han, J. Han, and D. Kang. 2016. 'Effects of analgesics and antidepressants on TREK-2 and TRESK currents', *Korean J Physiol Pharmacol*, 20: 379-85.
- Park, J. H., K. P. Carlin, G. Wu, V. I. Ilyin, L. L. Musza, P. R. Blake, and D. J. Kyle. 2014. 'Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels', *J Med Chem*, 57: 6623-31.
- Passmore, G. M., A. A. Selyanko, M. Mistry, M. Al-Qatari, S. J. Marsh, E. A. Matthews, A. H. Dickenson, T. A. Brown, S. A. Burbidge, M. Main, and D. A. Brown. 2003. 'KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy', *J Neurosci*, 23: 7227-36.
- Payandeh, J., T. M. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng, and W. A. Catterall. 2012. 'Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states', *Nature*, 486: 135-9.
- Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng, and W. A. Catterall. 2011. 'The crystal structure of a voltage-gated sodium channel', *Nature*, 475: 353-8.
- Peirs, C., S. P. Williams, X. Zhao, C. E. Walsh, J. Y. Gedeon, N. E. Cagle, A. C. Goldring, H. Hioki, Z. Liu, P. S. Marell, and R. P. Seal. 2015. 'Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain', *Neuron*, 87: 797-812.
- Peng, K., Y. Lin, and S. P. Liang. 2006. 'Nuclear magnetic resonance studies on huwentoxin-XI from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*: 15N labeling and sequence-specific 1H, 15N nuclear magnetic resonance assignments', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 38: 457-66.
- Pereira, V., J. Buserrolles, M. Christin, M. Devilliers, L. Poupon, W. Legha, A. Alloui, Y. Aissouni, E. Bourinet, F. Lesage, A. Eschalier, M. Lazdunski, and J. Noel. 2014. 'Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception', *Pain*, 155: 2534-44.
- Perez-Alvarez, A., A. Hernandez-Vivanco, J. C. Caba-Gonzalez, and A. Albillos. 2011. 'Different roles attributed to Cav1 channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells', *J Neurochem*, 116: 105-21.
- Perez-Reyes, E. 2003. 'Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels', *Physiol Rev*, 83: 117-61.
- . 2006. 'Molecular characterization of T-type calcium channels', *Cell Calcium*, 40: 89-96.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees, and J. H. Lee. 1998. 'Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel', *Nature*, 391: 896-900.
- Perl, E. R. 2007. 'Ideas about pain, a historical view', *Nat Rev Neurosci*, 8: 71-80.
- Petitjean, H., S. A. Pawlowski, S. L. Fraine, B. Sharif, D. Hamad, T. Fatima, J. Berg, C. M. Brown, L. Y. Jan, A. Ribeiro-da-Silva, J. M. Braz, A. I. Basbaum, and R. Sharif-Naeini. 2015. 'Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury', *Cell Rep*, 13: 1246-57.
- Pietrobon, D. 2007. 'Familial hemiplegic migraine', *Neurotherapeutics*, 4: 274-84.
- Pingle, S. C., J. A. Matta, and G. P. Ahern. 2007. 'Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel', *Handb Exp Pharmacol*: 155-71.
- Poetschke, C., E. Dragicevic, J. Duda, J. Benkert, A. Dougalis, R. DeZio, T. P. Snutch, J. Striessnig, and B. Liss. 2015. 'Compensatory T-type Ca²⁺ channel activity alters D2-autoreceptor

- responses of Substantia nigra dopamine neurons from Cav1.3 L-type Ca²⁺ channel KO mice', *Sci Rep*, 5: 13688.
- Pollema-Mays, S. L., M. V. Centeno, C. J. Ashford, A. V. Apkarian, and M. Martina. 2013. 'Expression of background potassium channels in rat DRG is cell-specific and down-regulated in a neuropathic pain model', *Mol Cell Neurosci*, 57: 1-9.
- Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T. P. Snutch, and K. P. Campbell. 1994. 'Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit', *Nature*, 368: 67-70.
- Priest, B. T., K. M. Blumenthal, J. J. Smith, V. A. Warren, and M. M. Smith. 2007. 'ProTx-I and ProTx-II: gating modifiers of voltage-gated sodium channels', *Toxicon*, 49: 194-201.
- Radwani, H., M. J. Lopez-Gonzalez, D. Cattaert, O. Roca-Lapirot, E. Dobremez, R. Bouali-Benazzouz, E. Eiriksdottir, U. Langel, A. Favereaux, M. Errami, M. Landry, and P. Fossat. 2016. 'Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short- and long-term sensitization to pain', *J Physiol*.
- Rajan, S., E. Wischmeyer, C. Karschin, R. Preisig-Muller, K. H. Grzeschik, J. Daut, A. Karschin, and C. Derst. 2001. 'THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels', *J Biol Chem*, 276: 7302-11.
- Ranzato, E., V. Magnelli, S. Martinotti, Z. Waheed, S. M. Cain, T. P. Snutch, C. Marchetti, and B. Burlando. 2014. 'Epigallocatechin-3-gallate elicits Ca²⁺ spike in MCF-7 breast cancer cells: essential role of Cav3.2 channels', *Cell Calcium*, 56: 285-95.
- Renganathan, M., T. R. Cummins, and S. G. Waxman. 2001. 'Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons', *J Neurophysiol*, 86: 629-40.
- Reynders, A., A. Mantilleri, P. Malapert, S. Rialle, S. Nidelet, S. Laffray, C. Beurrier, E. Bourinet, and A. Moqrich. 2015. 'Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs', *Cell Rep*.
- Ringkamp, M., R. J. Schepers, S. G. Shimada, L. M. Johaneck, T. V. Hartke, J. Borzan, B. Shim, R. H. LaMotte, and R. A. Meyer. 2011. 'A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation', *J Neurosci*, 31: 14841-9.
- Rong, M., J. Liu, M. Zhang, G. Wang, G. Zhao, G. Wang, Y. Zhang, K. Hu, and R. Lai. 2016. 'A sodium channel inhibitor ISTX-I with a novel structure provides a new hint at the evolutionary link between two toxin folds', *Sci Rep*, 6: 29691.
- Ruan, Y., N. Liu, and S. G. Priori. 2009. 'Sodium channel mutations and arrhythmias', *Nat Rev Cardiol*, 6: 337-48.
- Rugiero, F., M. Mistry, D. Sage, J. A. Black, S. G. Waxman, M. Crest, N. Clerc, P. Delmas, and M. Gola. 2003. 'Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and Nav1.9 subunit in myenteric sensory neurons', *J Neurosci*, 23: 2715-25.
- Rush, A. M., and S. G. Waxman. 2004. 'PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins', *Brain Res*, 1023: 264-71.
- Ruth, P., A. Rohrkasten, M. Biel, E. Bosse, S. Regulla, H. E. Meyer, V. Flockerzi, and F. Hofmann. 1989. 'Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle', *Science*, 245: 1115-8.
- Salari, A., B. S. Vega, L. S. Milescu, and M. Milescu. 2016. 'Molecular Interactions between Tarantula Toxins and Low-Voltage-Activated Calcium Channels', *Sci Rep*, 6: 23894.
- Sandkuhler, J. 2009. 'Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia', *Physiol Rev*, 89: 707-58.
- Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, C. Kitada, H. Yokoi, K. Nozawa, H. Okada, H. Matsushime, and K. Furuichi. 2003. 'A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord', *J Biol Chem*, 278: 27406-12.
- Scharinger, A., S. Eckrich, D. H. Vandael, K. Schonig, A. Koschak, D. Hecker, G. Kaur, A. Lee, A. Sah, D. Bartsch, B. Benedetti, A. Lieb, B. Schick, N. Singewald, M. J. Sinnegger-Brauns, E. Carbone, J. Engel, and J. Striessnig. 2015. 'Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca(2+)-channels by a C-terminal automodulatory domain', *Front Cell Neurosci*, 9: 309.
- Schmalhofer, W. A., J. Calhoun, R. Burrows, T. Bailey, M. G. Kohler, A. B. Weinglass, G. J. Kaczorowski, M. L. Garcia, M. Koltzenburg, and B. T. Priest. 2008. 'ProTx-II, a selective inhibitor of Nav1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors', *Mol Pharmacol*, 74: 1476-84.

- Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster, M. Ringkamp, E. Torebjork, and H. Handwerker. 1995. 'Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin', *J Neurosci*, 15: 333-41.
- Schultz, D., G. Mikala, A. Yatani, D. B. Engle, D. E. Iles, B. Segers, R. J. Sinke, D. O. Weghuis, U. Klockner, M. Wakamori, and et al. 1993. 'Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 6228-32.
- Shi, X., S. Yasumoto, E. Nakagawa, T. Fukasawa, S. Uchiya, and S. Hirose. 2009. 'Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome', *Brain Dev*, 31: 758-62.
- Shields, S. D., H. S. Ahn, Y. Yang, C. Han, R. P. Seal, J. N. Wood, S. G. Waxman, and S. D. Dib-Hajj. 2012. 'Nav1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system', *Pain*, 153: 2017-30.
- Shu, Q., and S. P. Liang. 1999. 'Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*', *J Pept Res*, 53: 486-91.
- Sidach, S. S., and I. M. Mintz. 2002. 'Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels', *J Neurosci*, 22: 2023-34.
- Singh, A., M. Gebhart, R. Fritsch, M. J. Sinnegger-Brauns, C. Poggiani, J. C. Hoda, J. Engel, C. Romanin, J. Striessnig, and A. Koschak. 2008. 'Modulation of voltage- and Ca²⁺-dependent gating of CaV1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain', *J Biol Chem*, 283: 20733-44.
- Singh, A., D. Hamedinger, J. C. Hoda, M. Gebhart, A. Koschak, C. Romanin, and J. Striessnig. 2006. 'C-terminal modulator controls Ca²⁺-dependent gating of Ca(v)1.4 L-type Ca²⁺ channels', *Nat Neurosci*, 9: 1108-16.
- Smith, R. D., and A. L. Goldin. 1998. 'Functional analysis of the rat I sodium channel in xenopus oocytes', *J Neurosci*, 18: 811-20.
- Soong, T. W., A. Stea, C. D. Hodson, S. J. Dubel, S. R. Vincent, and T. P. Snutch. 1993. 'Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family', *Science*, 260: 1133-6.
- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti, and M. T. Keating. 2004. 'Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism', *Cell*, 119: 19-31.
- Splawski, I., D. S. Yoo, S. C. Stotz, A. Cherry, D. E. Clapham, and M. T. Keating. 2006. 'CACNA1H mutations in autism spectrum disorders', *J Biol Chem*, 281: 22085-91.
- Starr, T. V., W. Prystay, and T. P. Snutch. 1991. 'Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 5621-5.
- Stea, A., S. J. Dubel, and T. P. Snutch. 1999. 'alpha 1B N-type calcium channel isoforms with distinct biophysical properties', *Ann N Y Acad Sci*, 868: 118-30.
- Stea, A., W. J. Tomlinson, T. W. Soong, E. Bourinet, S. J. Dubel, S. R. Vincent, and T. P. Snutch. 1994. 'Localization and functional properties of a rat brain alpha 1A calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-type channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 10576-80.
- Stemkowski, P. L., and P. A. Smith. 2012. 'Sensory neurons, ion channels, inflammation and the onset of neuropathic pain', *Can J Neurol Sci*, 39: 416-35.
- Stirling, L. C., G. Forlani, M. D. Baker, J. N. Wood, E. A. Matthews, A. H. Dickenson, and M. A. Nassar. 2005. 'Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice', *Pain*, 113: 27-36.
- Strachan, L. C., R. J. Lewis, and G. M. Nicholson. 1999. 'Differential actions of pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons', *J Pharmacol Exp Ther*, 288: 379-88.
- Strom, T. M., G. Nyakatura, E. Apfelstedt-Sylla, H. Hellebrand, B. Lorenz, B. H. Weber, K. Wutz, N. Gutwillinger, K. Ruther, B. Drescher, C. Sauer, E. Zrenner, T. Meitinger, A. Rosenthal, and A. Meindl. 1998. 'An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness', *Nat Genet*, 19: 260-3.
- Suter, M. R., Z. A. Bhuiyan, C. J. Laedermann, T. Kuntzer, M. Schaller, M. W. Stauffacher, E. Roulet, H. Abriel, I. Decosterd, and C. Wider. 2015. 'p.L1612P, a novel voltage-gated sodium channel

- Nav1.7 mutation inducing a cold sensitive paroxysmal extreme pain disorder', *Anesthesiology*, 122: 414-23.
- Swift, A. E., and T. R. Swift. 1993. 'Ciguatera', *J Toxicol Clin Toxicol*, 31: 1-29.
- Takahashi, T., and A. Momiyama. 1993. 'Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission', *Nature*, 366: 156-8.
- Takahashi, Y., S. Y. Jeong, K. Ogata, J. Goto, H. Hashida, K. Isahara, Y. Uchiyama, and I. Kanazawa. 2003. 'Human skeletal muscle calcium channel alpha1S is expressed in the basal ganglia: distinctive expression pattern among L-type Ca²⁺ channels', *Neurosci Res*, 45: 129-37.
- Talley, E. M., L. L. Cribbs, J. H. Lee, A. Daud, E. Perez-Reyes, and D. A. Bayliss. 1999. 'Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels', *J Neurosci*, 19: 1895-911.
- Tan, B. Z., F. Jiang, M. Y. Tan, D. Yu, H. Huang, Y. Shen, and T. W. Soong. 2011. 'Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels', *J Biol Chem*, 286: 42725-35.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose, and S. Numa. 1987. 'Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle', *Nature*, 328: 313-8.
- Tang, X., Y. Zhang, W. Hu, D. Xu, H. Tao, X. Yang, Y. Li, L. Jiang, and S. Liang. 2010. 'Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses', *J Proteome Res*, 9: 2550-64.
- Tegeder, I., M. Costigan, R. S. Griffin, A. Abele, I. Belfer, H. Schmidt, C. Ehnert, J. Nejjim, C. Marian, J. Scholz, T. Wu, A. Allchorne, L. Diatchenko, A. M. Binshtok, D. Goldman, J. Adolph, S. Sama, S. J. Atlas, W. A. Carlezon, A. Parsegian, J. Lotsch, R. B. Fillingim, W. Maixner, G. Geisslinger, M. B. Max, and C. J. Woolf. 2006. 'GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence', *Nat Med*, 12: 1269-77.
- Terunuma, M., J. Xu, M. Vithlani, W. Sieghart, J. Kittler, M. Pangalos, P. G. Haydon, D. A. Coulter, and S. J. Moss. 2008. 'Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus', *J Neurosci*, 28: 376-84.
- Thakur, M., M. Crow, N. Richards, G. I. Davey, E. Levine, J. H. Kelleher, C. C. Agle, F. Denk, S. D. Harridge, and S. B. McMahon. 2014. 'Defining the nociceptor transcriptome', *Front Mol Neurosci*, 7: 87.
- Theile, J. W., and T. R. Cummins. 2011. 'Inhibition of Navbeta4 peptide-mediated resurgent sodium currents in Nav1.7 channels by carbamazepine, riluzole, and anandamide', *Mol Pharmacol*, 80: 724-34.
- Timmes, T. R., R. Rothbaum, Kirti, C. Y. Silva, J. Bhawan, D. L. Cummins, and D. Wolpowitz. 2013. 'Gastrin-releasing peptide-expressing nerves comprise subsets of human cutaneous Adelta and C fibers that may sense pruritus', *J Invest Dermatol*, 133: 2645-7.
- Todorovic, S. M., V. Jevtovic-Todorovic, A. Meyenburg, S. Mennerick, E. Perez-Reyes, C. Romano, J. W. Olney, and C. F. Zorumski. 2001. 'Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors', *Neuron*, 31: 75-85.
- Todorovic, S. M., A. Meyenburg, and V. Jevtovic-Todorovic. 2002. 'Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker', *Brain Res*, 951: 336-40.
- Toma, T., M. M. Logan, F. Menard, A. S. Devlin, and J. Du Bois. 2016. 'Inhibition of Sodium Ion Channel Function with Truncated Forms of Batrachotoxin', *ACS Chem Neurosci*.
- Tringham, E., K. L. Powell, S. M. Cain, K. Kuplast, J. Mezeyova, M. Weerapura, C. Eduljee, X. Jiang, P. Smith, J. L. Morrison, N. C. Jones, E. Braine, G. Rind, M. Fee-Maki, D. Parker, H. Pajouhesh, M. Parmar, T. J. O'Brien, and T. P. Snutch. 2012. 'T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures', *Sci Transl Med*, 4: 121ra19.
- Tuluc, P., B. Benedetti, P. Coste de Bagneaux, M. Grabner, and B. E. Flucher. 2016. 'Two distinct voltage-sensing domains control voltage sensitivity and kinetics of current activation in CaV1.1 calcium channels', *J Gen Physiol*, 147: 437-49.

- Tyska, M. J., A. T. Mackey, J. D. Huang, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and M. S. Mooseker. 2005. 'Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition', *Mol Biol Cell*, 16: 2443-57.
- Usoskin, D., A. Furlan, S. Islam, H. Abdo, P. Lonnerberg, D. Lou, J. Hjerling-Leffler, J. Haeggstrom, O. Kharchenko, P. V. Kharchenko, S. Linnarsson, and P. Ernfors. 2015. 'Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing', *Nat Neurosci*, 18: 145-53.
- Vajna, R., M. Schramm, A. Pereverzev, S. Arnhold, H. Grabsch, U. Klockner, E. Perez-Reyes, J. Hescheler, and T. Schneider. 1998. 'New isoform of the neuronal Ca²⁺ channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidney--distribution of voltage-gated Ca²⁺ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues', *Eur J Biochem*, 257: 274-85.
- van den Boogaard, M., S. Smemo, O. Burnicka-Turek, D. E. Arnolds, H. J. van de Werken, P. Klous, D. McKean, J. D. Muehlschlegel, J. Moosmann, O. Toka, X. H. Yang, T. T. Koopmann, M. E. Adriaens, C. R. Bezzina, W. de Laat, C. Seidman, J. G. Seidman, V. M. Christoffels, M. A. Nobrega, P. Barnett, and I. P. Moskowitz. 2014. 'A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression', *J Clin Invest*, 124: 1844-52.
- Veeramah, K. R., J. E. O'Brien, M. H. Meisler, X. Cheng, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman, D. Talwar, S. Girirajan, E. E. Eichler, L. L. Restifo, R. P. Erickson, and M. F. Hammer. 2012. 'De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP', *Am J Hum Genet*, 90: 502-10.
- Vennekens, R., and B. Nilius. 2007. 'Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role', *Handb Exp Pharmacol*: 269-85.
- Vergara, C., R. Latorre, N. V. Marrion, and J. P. Adelman. 1998. 'Calcium-activated potassium channels', *Curr Opin Neurobiol*, 8: 321-9.
- Verkerk, A. O., C. A. Remme, C. A. Schumacher, B. P. Scicluna, R. Wolswinkel, B. de Jonge, C. R. Bezzina, and M. W. Veldkamp. 2012. 'Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology', *Circ Res*, 111: 333-43.
- Vicart, S., D. Sternberg, E. Fournier, F. Ochsner, P. Laforet, T. Kuntzer, B. Eymard, B. Hainque, and B. Fontaine. 2004. 'New mutations of SCN4A cause a potassium-sensitive normokalemic periodic paralysis', *Neurology*, 63: 2120-7.
- Vierra, N. C., P. K. Dadi, I. Jeong, M. Dickerson, D. R. Powell, and D. A. Jacobson. 2015. 'Type 2 Diabetes-Associated K⁺ Channel TALK-1 Modulates beta-Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis', *Diabetes*, 64: 3818-28.
- Vijayaragavan, K., A. J. Powell, I. J. Kinghorn, and M. Chahine. 2004. 'Role of auxiliary beta1-, beta2-, and beta3-subunits and their interaction with Na(v)1.8 voltage-gated sodium channel', *Biochem Biophys Res Commun*, 319: 531-40.
- Vitko, I., Y. Chen, J. M. Arias, Y. Shen, X. R. Wu, and E. Perez-Reyes. 2005. 'Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel', *J Neurosci*, 25: 4844-55.
- Voscopoulos, C., and M. Lema. 2010. 'When does acute pain become chronic?', *Br J Anaesth*, 105 Suppl 1: i69-85.
- Walker, J. R., P. A. Novick, W. H. Parsons, M. McGregor, J. Zablocki, V. S. Pande, and J. Du Bois. 2012. 'Marked difference in saxitoxin and tetrodotoxin affinity for the human nociceptive voltage-gated sodium channel (Nav1.7) [corrected]', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 18102-7.
- Wall, Patrick D., S. B. McMahon, and Martin Koltzenburg. 2006. *Wall and Melzack's textbook of pain* (Elsevier/Churchill Livingstone: Philadelphia).
- Wang, R., and G. R. Lewin. 2011. 'The Cav3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors', *J Physiol*, 589: 2229-43.
- Watanabe, I., J. Zhu, E. Recio-Pinto, and W. B. Thornhill. 2015. 'The degree of N-glycosylation affects the trafficking and cell surface expression levels of Kv1.4 potassium channels', *J Membr Biol*, 248: 187-96.
- Watanabe, M., T. Ueda, Y. Shibata, N. Kumamoto, S. Shimada, and S. Ugawa. 2015. 'Expression and Regulation of Cav3.2 T-Type Calcium Channels during Inflammatory Hyperalgesia in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons', *PLoS One*, 10: e0127572.

- Waxman, S. G., and G. W. Zamponi. 2014. 'Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets', *Nat Neurosci*, 17: 153-63.
- Weiss, N., S. A. Black, C. Bladen, L. Chen, and G. W. Zamponi. 2013. 'Surface expression and function of Cav3.2 T-type calcium channels are controlled by asparagine-linked glycosylation', *Pflugers Arch*, 465: 1159-70.
- Westenbroek, R. E., L. Hoskins, and W. A. Catterall. 1998. 'Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals', *J Neurosci*, 18: 6319-30.
- Whitaker, W. R., J. J. Clare, A. J. Powell, Y. H. Chen, R. L. Faull, and P. C. Emson. 2000. 'Distribution of voltage-gated sodium channel alpha-subunit and beta-subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum', *J Comp Neurol*, 422: 123-39.
- Whitaker, W. R., R. L. Faull, H. J. Waldvogel, C. J. Plumpton, P. C. Emson, and J. J. Clare. 2001. 'Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain', *Brain Res Mol Brain Res*, 88: 37-53.
- Williams, M. E., P. F. Brust, D. H. Feldman, S. Patthi, S. Simerson, A. Maroufi, A. F. McCue, G. Velicelebi, S. B. Ellis, and M. M. Harpold. 1992. 'Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel', *Science*, 257: 389-95.
- Witcher, D. R., M. De Waard, and K. P. Campbell. 1993. 'Characterization of the purified N-type Ca²⁺ channel and the cation sensitivity of omega-conotoxin GVIA binding', *Neuropharmacology*, 32: 1127-39.
- Witschi, R., P. Punnakkal, J. Paul, J. S. Walczak, F. Cervero, J. M. Fritschy, R. Kuner, R. Keist, U. Rudolph, and H. U. Zeilhofer. 2011. 'Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control', *J Neurosci*, 31: 8134-42.
- Wood, J. N. 2013. 'Results in analgesia--Darwin 1, pharma 0', *N Engl J Med*, 369: 2558-60.
- Wood, J. N., J. P. Boorman, K. Okuse, and M. D. Baker. 2004. 'Voltage-gated sodium channels and pain pathways', *J Neurobiol*, 61: 55-71.
- Woolf, C. J. 2010. 'What is this thing called pain?', *J Clin Invest*, 120: 3742-4.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, X. Qian, S. Lu, M. Dong, Q. Zhou, and N. Yan. 2016a. 'Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution', *Nature*.
- . 2016b. 'Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution', *Nature*, 537: 191-96.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong, and N. Yan. 2015. 'Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex', *Science*, 350: aad2395.
- Wu, L. J., T. B. Sweet, and D. E. Clapham. 2010. 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family', *Pharmacol Rev*, 62: 381-404.
- Xiao, Y., K. Blumenthal, J. O. Jackson, 2nd, S. Liang, and T. R. Cummins. 2010. 'The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation', *Mol Pharmacol*, 78: 1124-34.
- Xifro, X., L. Vidal-Sancho, P. Boadas-Vaello, C. Turrado, J. Alberch, T. Puig, and E. Verdu. 2015. 'Novel epigallocatechin-3-gallate (EGCG) derivative as a new therapeutic strategy for reducing neuropathic pain after chronic constriction nerve injury in mice', *PLoS One*, 10: e0123122.
- Xu, Z. Z., Y. H. Kim, S. Bang, Y. Zhang, T. Berta, F. Wang, S. B. Oh, and R. R. Ji. 2015. 'Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade', *Nat Med*, 21: 1326-31.
- Yamamoto, S., N. Takahashi, and Y. Mori. 2010. 'Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels', *Prog Biophys Mol Biol*, 103: 18-27.
- Yang, T., H. L. Zhang, Q. Liang, Y. Shi, Y. A. Mei, P. Q. Barrett, and C. Hu. 2016. 'Small-Conductance Ca²⁺-Activated Potassium Channels Negatively Regulate Aldosterone Secretion in Human Adrenocortical Cells', *Hypertension*, 68: 785-95.
- Yang, Y., J. Huang, M. A. Mis, M. Estacion, L. Macala, P. Shah, B. R. Schulman, D. B. Horton, S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman. 2016. 'Nav1.7-A1632G Mutation from a Family with Inherited Erythromelalgia: Enhanced Firing of Dorsal Root Ganglia Neurons Evoked by Thermal Stimuli', *J Neurosci*, 36: 7511-22.

- Yokoyama, K., T. Kurihara, H. Saegusa, S. Zong, K. Makita, and T. Tanabe. 2004. 'Blocking the R-type (Cav2.3) Ca²⁺ channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance', *Eur J Neurosci*, 20: 3516-9.
- Yu, F. H., and W. A. Catterall. 2004. 'The VGL-CHANOME: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis', *Sci STKE*, 2004: re15.
- Yu, F. H., R. E. Westenbroek, I. Silos-Santiago, K. A. McCormick, D. Lawson, P. Ge, H. Ferriera, J. Lilly, P. S. DiStefano, W. A. Catterall, T. Scheuer, and R. Curtis. 2003. 'Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2', *J Neurosci*, 23: 7577-85.
- Yunker, A. M., A. H. Sharp, S. Sundarraj, V. Ranganathan, T. D. Copeland, and M. W. McEnery. 2003. 'Immunological characterization of T-type voltage-dependent calcium channel CaV3.1 (alpha 1G) and CaV3.3 (alpha 1I) isoforms reveal differences in their localization, expression, and neural development', *Neuroscience*, 117: 321-35.
- Zeilhofer, H. U., H. Wildner, and G. E. Yevenes. 2012. 'Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control', *Physiol Rev*, 92: 193-235.
- Zeng, X., M. Deng, Y. Lin, C. Yuan, J. Pi, and S. Liang. 2007. 'Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*', *Toxicon*, 49: 388-99.
- Zhang, F., X. Xu, T. Li, and Z. Liu. 2013. 'Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels', *Mar Drugs*, 11: 4698-723.
- Zhu, H. L., A. Shibata, T. Inai, M. Nomura, Y. Shibata, J. A. Brock, and N. Teramoto. 2010. 'Characterization of Nav1.6-mediated Na⁺ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens', *J Cell Physiol*, 223: 234-43.
- Zhu, H. L., R. D. Wassall, T. C. Cunnane, and N. Teramoto. 2009. 'Actions of kurtotoxin on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na⁺ currents, Nav1.6, in murine vas deferens myocytes', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379: 453-60.
- Zierler, S., A. Sumoza-Toledo, S. Suzuki, F. O. Duill, L. V. Ryazanova, R. Penner, A. G. Ryazanov, and A. Fleig. 2016. 'TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation', *J Physiol*, 594: 2957-70.
- Zimmer, T., V. Haufe, and S. Blechschmidt. 2014. 'Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart', *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014: 449-63.
- Zimmermann, K., J. R. Deuis, M. C. Inserra, L. S. Collins, B. Namer, P. J. Cabot, P. W. Reeh, R. J. Lewis, and I. Vetter. 2013. 'Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia', *Pain*, 154: 1999-2006.
- Zimmermann, K., A. Hein, U. Hager, J. S. Kaczmarek, B. P. Turnquist, D. E. Clapham, and P. W. Reeh. 2009. 'Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse', *Nat Protoc*, 4: 174-96.
- Zimmermann, K., A. Leffler, A. Babes, C. M. Cendan, R. W. Carr, J. Kobayashi, C. Nau, J. N. Wood, and P. W. Reeh. 2007. 'Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures', *Nature*, 447: 855-8.
- Zimmermann, M. 1983. 'Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals', *Pain*, 16: 109-10.
- Zucker, R. S., and W. G. Regehr. 2002. 'Short-term synaptic plasticity', *Annu Rev Physiol*, 64: 355-405.