



**HAL**  
open science

# Implication physiopathologique et pharmacologique des canaux calciques Cav 3.2 dans la douleur chronique

Elodie Picard

► **To cite this version:**

Elodie Picard. Implication physiopathologique et pharmacologique des canaux calciques Cav 3.2 dans la douleur chronique. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS008 . tel-02426257

**HAL Id: tel-02426257**

**<https://theses.hal.science/tel-02426257>**

Submitted on 2 Jan 2020

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

**Thèse**

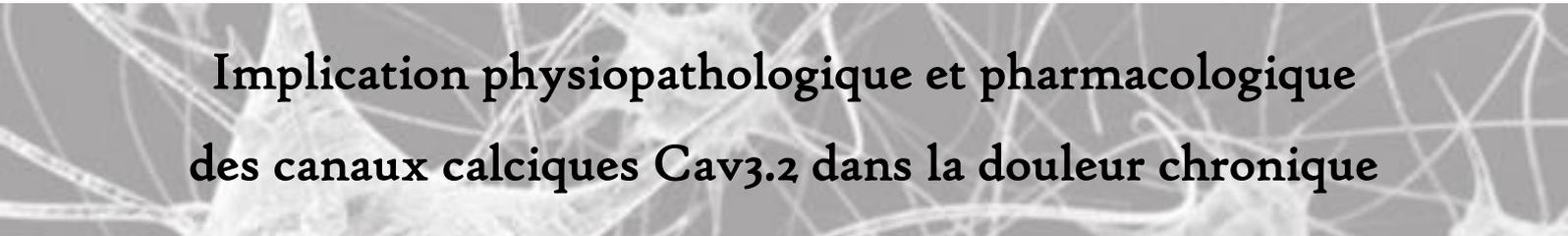
Présentée à l'Université Clermont Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

**Spécialité Neuropharmacologie**

soutenue le 15 décembre 2017

**PICARD Elodie**



**Implication physiopathologique et pharmacologique  
des canaux calciques Cav3.2 dans la douleur chronique**

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :** Mme Annabelle Reaux Le Goazigo, Chargée de Recherche (CR1), INSERM  
M. Eric Lingueglia, Directeur de Recherche (DR2), INSERM

**Examineurs :** Mme Noémie Delage, Praticien Hospitalier, Anesthésie-Douleur  
Mme Laurence Daulhac-Terrail, Professeur des Universités, INSERM  
M. Emmanuel Bourinet, Directeur de Recherche (DR2), INSERM  
M. Christophe Mallet, Maître de conférences, INSERM

**Laboratoire d'accueil :**

*« Chacun peut maîtriser une douleur, excepté celui qui souffre »*

*William Shakespeare, 1600.*

## Résumé.

La douleur chronique occupe une place centrale dans les préoccupations de santé publique. En France, elle touche environ 20% de la population et a un impact négatif sur la qualité de vie des patients. Les traitements actuels sont généralement inefficaces ou associés à d'importants effets indésirables. Par conséquent, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires. Parmi les cibles potentielles, les canaux calciques voltage-dépendants de type T, en particulier l'isoforme Cav3.2, constituent des candidats d'intérêt. Aussi, l'objectif de cette thèse est de caractériser leur implication fonctionnelle dans deux types de douleur chronique : viscérale et somatique. Concernant la douleur viscérale, nous avons développé un modèle murin d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit, deux caractéristiques sémiologiques proches de la symptomatologie rencontrée chez la plupart des patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable (SII) ou de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) durant les périodes de rémission. En ce qui concerne la douleur somatique, nous avons utilisé deux modèles murins de douleur inflammatoire, l'un présentant une inflammation subaiguë et l'autre persistante. Dans ces différents modèles, une inhibition pharmacologique *via* l'administration d'un antagoniste des canaux Cav3.2, le TTA-A2, ou génétique grâce à des souris présentant un Knock out (KO) de Cav3.2 a induit un puissant effet antalgique, démontrant une implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans le développement et le maintien de ces types de douleur. De plus, l'utilisation de souris présentant un KO conditionnel de Cav3.2, spécifiquement dans les fibres C des ganglions de la racine dorsale (DRG), ainsi que l'emploi de l'ABT-639, un agent pharmacologique bloqueur des canaux de type T à action périphérique, nous ont permis de préciser la localisation de cette implication. Ainsi, une action majoritairement spinale présynaptique des canaux Cav3.2 a été mise en évidence pour la douleur viscérale alors qu'une action plus complexe de ces canaux est mise en jeu pour la douleur somatique inflammatoire. En effet, pour cette dernière, le canal Cav3.2 présente une implication à la fois spinale et périphérique. De plus, nous avons montré un rôle des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire, s'effectuant au travers d'une implication de ces derniers dans les cellules immunitaires.

Enfin, dans une démarche de recherche translationnelle, nous avons évalué l'effet de l'éthosuximide (ETX), un bloqueur des canaux de type T, utilisé en clinique dans le traitement de l'épilepsie. Nous avons décrit un effet antalgique de ce dernier dans chacun des modèles étudiés ainsi qu'une action anti-inflammatoire, apportant ainsi une preuve de concept préclinique pour une évaluation d'efficacité clinique de l'ETX dans un contexte de douleurs viscérales ou somatiques inflammatoires.

L'ensemble de ces résultats apporte de nouvelles connaissances concernant l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique et permet de proposer ces canaux comme des cibles d'intérêt pour le développement de stratégies thérapeutiques innovantes visant à soulager les patients.

## **Abstract.**

Chronic pain is a central concern to public health. In France, it affects about 20% of the population and has a negative impact on the patients' quality of life. Current treatments are generally ineffective or associated with strong adverse effects. Therefore, new therapeutic approaches are needed. Among the potential targets, the T-type voltage-dependent calcium channels, in particular the Cav3.2 isoform, constitute candidates of interest. Thus, the objective of this thesis is to characterize their functional implication in two types of chronic pain: visceral and somatic. We have developed a murine model of colonic hypersensitivity associated with low grade inflammation, two symptomatic features close to the symptomatology found in most patients suffering from irritable bowel syndrome (IBS) or with diseases inflammatory bowel disease (IBD) during remission periods. Concerning the somatic pain, we used two murine models of inflammatory pain, one with subacute inflammation and another with persistent inflammation. In these different models, a pharmacological inhibition with the administration of a Cav3.2 channel antagonist, TTA-A2, or a genetic approach using Cav3.2 knockout (KO) mice induced a robust analgesic effect demonstrating a functional implication of Cav3.2 channels in the development and maintenance of these types of pain. Moreover, the use of mice with a Cav3.2 conditional KO, specifically in the C-dorsal root ganglia (DRG) fibers, and the use of ABT-639, a peripherally acting pharmacological blocker of type T channels, allowed us to specify the localization of this implication. Thus, a pre-synaptic spinal action of the Cav3.2 channels has been demonstrated for visceral pain whereas a more complex action of these channels is involved for inflammatory somatic pain. Indeed, for the latter, Cav3.2 channels present a spinal and peripheral implication. In addition, we have shown the role of Cav3.2 channels in the inflammatory process, with an involvement located in the immune cells. Finally, with a translational research approach, we evaluated the effect of ethosuximide (ETX), a T-channel blocker, clinically used in the treatment of epilepsy. We have described an analgesic effect of the latter in both studied models as well as an anti-inflammatory action. These results constitute a pre-clinical proof of concept for a clinical efficacy evaluation of ETX in a context of visceral pain or somatic inflammatory diseases.

Altogether these results provide new insight about the involvement of Cav3.2 channels in chronic pain and allow us to propose these channels as targets of interest for the development of new therapeutic strategies to relieve patients.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord, à exprimer mes sincères remerciements au Professeur Alain Eschalier pour sa grande disponibilité, son aide précieuse ainsi que pour ses conseils avisés et son jugement qui ont su orienter mes travaux de thèses.

Je remercie le Docteur Annabelle Reaux Le Goazigo et le Professeur Eric Lingueglia de m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger à mon jury de thèse et d'assumer le rôle de rapporteur pour le jugement de mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plaisir pour votre présence.

Je remercie le Docteur Noémie Delage qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur, je la prie de bien vouloir trouver ici l'assurance de ma respectueuse considération.

Je suis très heureuse de compter parmi mon jury le Docteur Emmanuel Bourinet. Je te remercie vivement d'une part pour avoir accepté de juger mon travail et d'autre part pour cette collaboration précieuse dans ce projet de thèse. Un grand merci pour ton accueil chaleureux lors de mes différents séjours à l'IGF, pour ta disponibilité et tes conseils judicieux pour l'avancement de ce travail. J'en profite pour remercier également toute l'équipe des Montpelliérains, notamment Christian, Malik et Pierre, pour leur gentillesse.

J'adresse mes remerciements au Professeur Laurence Daulhac Terrail et au Docteur Christophe Mallet. Merci pour vous être lancés avec moi dans l'épreuve du concours de l'Ecole Doctorale, puis dans l'aventure de la thèse, et pour avoir dirigé et encadré mes travaux de recherche.

Evidemment rien de tout ça n'aurait été possible sans le travail et l'investissement du Docteur Frédéric Carvalho. Un grand merci à toi pour ton regard d'expert sur l'aspect viscéral de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Caroline Vachias pour sa gentillesse, sa grande disponibilité, et son aide précieuse aussi bien pour ma formation à l'utilisation du microscope confocal que pour l'analyse de mes images.

Je remercie le Docteur Abdelkrim Alloui pour nos discussions sur l'avancée de mes travaux de thèse, ses conseils scientifiques avisés et son soutien.

Un grand merci à Alexandra, pour son aide précieuse dans la gestion et l'élevage des souris, pour ta gentillesse et ta bonne humeur au quotidien, je te souhaite plein de bonheur pour la suite.

Merci aux animalier, Franck et Didier pour avoir toujours accepté nos protocoles (souvent soumis dans l'urgence), et pour toutes les tâches quotidiennes de gestion de l'animalerie et de nos animaux, qui, il ne faut pas oublier, constituent l'aspect central de nos travaux.

Merci à Emilie pour m'avoir toujours aidée avec efficacité et bienveillance dans les démarches administratives relatives à cette thèse.

Un grand merci à Mireille pour sa bonne humeur et sa gentillesse, le rayon de soleil de ce laboratoire !

Je tiens à remercier Elisabeth Billard pour sa collaboration dans ce projet, qui je l'espère aboutira à la validation de notre hypothèse.

Je remercie le Docteur Nicolas Kerckhove pour m'avoir transmis le flambeau des Cav3.2, pour son aide et ses conseils avisés.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire, tout d'abord Marie, plus qu'une collègue tu as aussi su être une amie. Un grand merci pour ton soutien sans faille, pour ces petites sessions shopping et natation, pour toutes ces discussions très « girly » qui ont exaspéré notre pauvre Pierre Yves... Merci aussi pour tes conseils scientifiques et ton avis d'experte clinique. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite.

Je remercie également le reste de « La team du docteur David Balayssac » : Sakalhé, Lucile, et Stacy. Je garde un très bon souvenir de votre passage au sein du laboratoire et j'ai passé d'excellents moments avec vous au sein de l'open space et en dehors. Je vous souhaite tout le meilleur les filles !!

Lauriane, ma partenaire occasionnelle de running (j'ai du niveau à rattraper avant de pouvoir revenir courir avec toi..) et Manon, ma doggysiter préférée, merci les filles pour tous les bons moments passés au laboratoire et en dehors, pour votre soutien dans les moments de doutes, vos conseils scientifiques, et surtout votre écoute, et oui il paraît que je suis un brin pipelette...

Merci à Elodie, la « team Elo », j'ai beaucoup apprécié les moments que nous avons pu partager durant ces années de thèse et je te souhaite plein de belles choses à venir.

Je remercie Amélie, Pierre-Yves Sylvain, Mélissa, Guillaume, Roberto, Amandine, Ludivine, Laetitia, Mathilde, Jullie, Eric ainsi que tous les autres collègues de l'équipe Neuro-Dol.

J'aimerais remercier tous mes amis en dehors du laboratoire qui ont partagé ces années de thèse avec moi. Tout d'abord Gaëlle, comme quoi ces fameux modules socio-professionnels peuvent nous apporter beaucoup. Ce module à Bruxelles m'a apporté une belle amitié. Je te remercie pour avoir

partagé ces années de thèse, pour avoir été ma partenaire de running, m'avoir poussée à dépasser mes limites, comme pour cette inscription à l'extrême volcanique...! Je te souhaite une belle carrière et beaucoup de bonheur avec Xavier et le petit Alec.

Je pense aussi à mes camarades de longue date, Audrey et Nadine, les récréations au collège durant lesquelles j'étais plongée dans les livres d'histoire, ne laissaient pas forcément présager d'une carrière dans la biologie... Vous avez suivi mon parcours toutes ces années, avez été présentes dans les bons comme dans les mauvais moments, je vous remercie de tout mon cœur pour votre soutien précieux et espère partager avec vous encore de nombreuses années d'amitié.

Je remercie également Marine, Éric, Leslie, Colin, Laura, Amandine et Amélie, merci les amis pour tous les bons moments passés et pour ceux à venir...

Merci à Arnaud pour m'avoir supportée, soutenue, réconfortée et pour avoir pris part à des débats de démarches scientifiques afin de comprendre l'implication de mes fameux canaux Cav3.2...

Un grand merci à mes grands-parents, vous avez suivi mes études avec un grand intérêt, m'avez apporté votre soutien durant toutes ces années. J'espère que la soutenance vous aura apporté des précisions sur mes travaux de thèse qu'il n'est pas toujours évident de vulgariser.

Je tiens également à remercier mon frère, Aurélien. Nous nous sommes suivis dans un parcours d'étude Clermontois, puis tu as bifurqué vers le sud où tu as construit ta vie avec une implication et un investissement personnel remarquables. Plus qu'un grand frère, tu es un exemple et je te souhaite tout le bonheur et la réussite que tu mérites amplement.

Je tiens à remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes études, par leur présence au quotidien, ils ont su me remotiver dans les périodes difficiles, croire en moi et m'apporter tout l'appui nécessaire au cours de cette thèse. Merci Papa pour le temps que tu as consacré à la relecture de ce manuscrit, pour avoir supporté le « squat » de la maison sur la période cruciale de fin de rédaction, (avec la présence non négligeable de Jagger...). Ta petite « Tanguette » va sûrement finir par prendre son envol... Un énorme merci à ma maman, pour ton expertise scientifique, même si la thématique de la douleur était à l'origine loin de ton domaine de prédilection, tu as su m'apporter toute l'aide et le soutien nécessaire pour mener à bien ce projet. Je devais avoir quelques mois quand tu as obtenu le titre de Docteur, tu as su me transmettre ta passion pour la recherche, j'espère avoir également hérité de tes grandes qualités scientifiques et pouvoir devenir un jour un chercheur aussi talentueux que toi.

## Contributions scientifiques



### Articles primaires

- Scanzi J., Accarie A., Muller E., Pereira B., Aissouni Y., Goutte M., Joubert-Zakeyh J., **Picard E.**, Boudieu L., Mallet C., Gelot A., Ardid D., Carvalho F. A., Dapoigny M. Colonic overexpression of the T-type calcium channel Cav 3.2 in a mouse model of visceral hypersensitivity and in irritable bowel syndrome patients. **Neurogastroenterology and Motility**, 2016 Nov, 28(11):1632-1640.
- **Picard E.**, Carvalho F.A., Bourinet E., Eschalier A., Daulhac L., Mallet C. New highlights about T-Type calcium channels implication in irritable bowel syndrome. Soumis à PNAS.
- **Picard E.**, Kerckhove N., Bourinet E, Boudieu L., Billard E., François, A., Aissouni Y., Eschalier A., Daulhac L., Mallet C. Targeting Cav3.2 calcium channels to treat chronic inflammation and related pain. Article en preparation.
- Jouve R., Thery V., Ducki S., Helfeinbein J., Thiery J-C., **Picard E.**, Mallet C., Ripoché I., Bennis K., Optimization of the synthesis of a key intermediate in the synthesis of glucocorticoids. Article en preparation.



### Communications orales

- **Picard E.**, Les canaux calciques Cav3.2 : cibles thérapeutiques d'intérêt dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable. **Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (SVSAE)**. Clermont-Ferrand, 18-19 Juin 2017.
- **Picard E.**, Carvalho F.A., Bourinet E., Bégou M., Daulhac, L., Mallet C. Etude de l'inhibition génétique et pharmacologique des canaux calciques Cav3.2 dans la douleur abdominale associée à une inflammation à bas bruit. 16ème **Congrès National de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD)**. Bordeaux, 24-26 novembre 2016. **Prix du jury SFETD 2016.**
- **Picard E.**, Carvalho F.A., Bégou M., Mallet C., Daulhac L. Les canaux calciques Cav3.2, une opportunité thérapeutique pour le soulagement des douleurs viscérales associées à une inflammation à bas bruit. **Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG)**. Bordeaux, 19-20 juin 2014.



### Communications affichées

- Mallet C., **Picard E.**, Carvalho F. A., Bourinet E., Ardid D., Eschalier A., Daulhac L. Les canaux calciques Cav3.2 : une opportunité thérapeutique pour la douleur abdominale associée à une inflammation à bas bruit. **Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD)** 2018, Paris, 22 au 25 mars.
- **Picard E.**, Carvalho F.A., Bourinet E., Eschalier A., Daulhac L., Mallet C. Cav3.2 calcium channels: targets to relieve colonic hypersensitivity encountered in irritable bowel syndrome. **NeuroGASTRO 2017**, Cork, Irlande, 24-26 Août 2017.
- **Picard E.**, Carvalho, F.A., Bourinet, E., Bégou, M., Daulhac L., Mallet C. Etude de l'inhibition génétique et pharmacologique des canaux calciques Cav3.2 dans la douleur abdominale associée à une inflammation à bas bruit. 16ème **Congrès National de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD)**. Bordeaux, 24-26 novembre 2016.
- **Picard E.**, Carvalho F.A., Bégou M., Mallet C., Daulhac L. T-Type calcium channel involvement in abdominal pain associated to the irritable bowel syndrome. Inserm U 1107, Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, 63000 Clermont Ferrand. **Congrès Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFTD)**. Nancy, 19-21 avril 2016.

## Modules de Formations

### Modules socio-professionnels :

- Communication
- Environnement Territorial en Europe
- Expression corporelle et prise de parole en public
- L'insertion professionnelle

### Modules de Biologie :

- Formation à la technique d'immunohistochimie sur coupe de DRG, Institut de Génétique Fonctionnelle (IGF), Montpellier.
- **DU de Nutrition et Diététique**, Université Clermont Auvergne, 80 h, mention Assez Bien.

# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	6
<b>INTRODUCTION</b> .....	8
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	10
<b>I. LES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T : CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR CHRONIQUE ...</b>	10
<b>A. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR ET TRANSMISSION DE L'INFLUX NERVEUX</b> .....	11
<b>B. CANAUX CAV3.2, ROLE DANS LA DOULEUR</b> .....	15
1. Les canaux ioniques.....	15
1.1. Les canaux ioniques voltage-dépendants .....	15
1.1.1. Les canaux sodiques voltage-dépendants.....	16
1.1.2. Les canaux potassiques voltage-dépendants.....	16
1.1.3. Les canaux cationiques non sélectifs.....	17
1.1.4. Les canaux chlores voltage-dépendants .....	18
1.1.5. Les canaux calciques voltage-dépendants .....	19
2. Caractéristiques des canaux calciques voltage-dépendants .....	20
2.1 Les canaux HVA .....	21
2.1.1. Les canaux Cav1 (de type L).....	21
2.1.2. Les canaux Cav2 (de type N, P/Q, R) .....	23
2.2. Les canaux LVA (de type T).....	24
2.2.1. Rôles physiologiques des canaux de type T .....	24
2.2.2. Rôles physiopathologiques des canaux de type T.....	25
2.2.3. Pharmacologie.....	26
2.2.3.1. Les ions inorganiques .....	26
2.2.3.2. Les toxines peptidiques.....	27
2.2.3.3. Les molécules organiques .....	27
2.2.4. Rôle des canaux de type T dans la douleur .....	30
2.2.4.1. Etudes montrant l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception.....	30
2.2.4.2. Processus de l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception .....	37
<b>II. PATHOLOGIES CIBLEES IMPLIQUANT UNE DOULEUR CHRONIQUE</b> .....	38
<b>A. LES TROUBLES INTESTINAUX</b> .....	39
1. Le syndrome de l'intestin irritable .....	39
1.1. Epidémiologie.....	39
1.2. Manifestations cliniques .....	39

1.3. Diagnostic .....	39
1.4. Physiopathologie .....	41
1.4.1. Troubles de la mobilité gastro-intestinale .....	41
1.4.1.1. Anatomie du tractus digestif .....	41
1.4.1.2. Mobilité gastro-intestinale .....	43
1.4.2. Inflammation .....	45
1.4.3. Hypersensibilité colique .....	46
1.5. Etiologies .....	47
1.5.1. Facteurs génétiques .....	47
1.5.2. Facteurs environnementaux .....	47
1.5.2.1. Dysbiose intestinale .....	47
1.5.2.2. Infections .....	48
1.5.3. Facteurs psychologiques .....	49
1.6. Prise en charge du patient SII .....	49
1.6.1. Prise en charge médicamenteuse .....	49
1.6.1.1. Troubles du transit .....	49
1.6.1.2. Douleurs abdominales .....	50
1.6.2. Prise en charge non médicamenteuse .....	53
2. Les Maladies Inflammatoire Chroniques de l'Intestin, MICI .....	55
2.1. Epidémiologie .....	55
2.2. Manifestations cliniques .....	55
2.3. Diagnostic .....	57
2.4. Physiopathologie .....	58
2.4.1. Inflammation .....	58
2.4.2. Troubles de la mobilité intestinale .....	61
2.4.3. Hypersensibilité colique .....	61
2.5. Etiologies .....	61
2.5.1. Facteurs génétiques .....	61
2.5.2. Facteurs environnementaux .....	62
2.5.2.1. Dysbiose intestinale .....	62
2.5.2.2. Infections .....	62
2.5.2.3. Tabagisme .....	62
2.5.2.4. Autres .....	62
2.5.3. Facteurs psychologiques .....	63
2.6. Prise en charge du patient atteint de MICI .....	63

2.6.1. Traitements utilisés lors de l'induction de la rémission.....	63
2.6.2. Traitements de maintien de la rémission.....	65
3. L'hypersensibilité colique dans le SII ou les MICI en phase de rémission.....	65
3.1. Mécanismes périphériques.....	66
3.2. Mécanismes centraux.....	67
<b>B. MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES : CAS DE L'ARTHRITE.....</b>	<b>70</b>
1. Généralités.....	70
2. La polyarthrite rhumatoïde.....	71
2.1. Epidémiologie.....	71
2.2. Manifestations cliniques.....	71
2.3. Diagnostic.....	72
2.4. Etiologies.....	74
2.5. Physiopathologie.....	76
2.5.1. Phase de déclenchement de la maladie.....	76
2.5.2. Phase d'inflammation de la membrane synoviale.....	76
2.5.3. Phase de destruction articulaire.....	77
2.6. Prise en charge du patient arthritique.....	78
2.6.1. Prise en charge médicamenteuse.....	78
2.6.1.1. Les traitements de la crise.....	79
2.6.1.2. Les traitements de fond.....	80
2.6.2. Prise en charge non médicamenteuse.....	85
3. La douleur dans l'arthrite.....	86
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>89</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>91</b>
1. Animaux.....	91
2. Modèles expérimentaux.....	93
2.1. Modèle de douleur viscérale.....	93
2.2. Modèle de douleur inflammatoire somatique.....	93
2.2.1. Induction du modèle d'arthrite.....	93
2.2.2. Induction du modèle d'inflammation subaiguë.....	93
3. Substances pharmacologiques.....	93
4. Evaluation de la douleur.....	94
4.1. Evaluation de la sensibilité colique : test de distension colorectale.....	94
4.2. Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgésie : Test de von Frey.....	95
5. Evaluation de l'inflammation.....	96

5.1. Inflammation systémique.....	96
5.1.1 Paramètres anatomiques .....	96
5.1.2. Paramètres physiologiques .....	96
5.2. Inflammation locale.....	97
5.2.1. Evaluation de la taille de l'œdème .....	97
5.2.2. Dosage par ELISA de l'IL6 au niveau de l'œdème.....	97
5.2.3. Dosage par ELISA de la myéloperoxydase (MPO) et de l'IL-6 colique.....	97
5.3. Inflammation à bas bruit .....	97
6. Evaluation de l'expression de Cav3.2, par immunohistochimie sur DRG .....	98
7. Evaluation de la l'activation gliale : immunohistochimie sur des coupes de moelle épinière.....	99
8. Culture cellulaire .....	99
8.1. Culture de BMDM.....	99
8.2. Culture primaire enrichie en astrocytes ou en microglie.....	100
9. Protocoles expérimentaux .....	100
9.1. Dans le modèle de douleur viscérale .....	100
9.1.1. Mise en place du modèle et effet d'une invalidation génétique des canaux Cav3.2 .....	100
9.1.2. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration aiguë.....	100
9.1.3. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration répétée.....	101
9.2. Modèle de douleur inflammatoire somatique.....	101
9.2.1. Effet d'une invalidation génétique des canaux Cav3.2 .....	101
9.2.2. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration aiguë.....	102
9.2.3. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administrations répétées..	103
10. Analyses Statistiques .....	103
<b>RESULTATS</b> .....	<b>104</b>
<b>I. IMPLICATION DES CANAUX CALCIQUES CAV3.2 DANS LA DOULEUR VISCERALE</b> .....	<b>104</b>
<b>II. IMPLICATION DES CANAUX CALCIQUES CAV3.2 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE SOMATIQUE</b> .....	<b>146</b>
<b>ANALYSE DE L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE D'UNE NOUVELLE MOLECULE</b> .....	<b>177</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>178</b>
1. Une démarche scientifique originale .....	179
2. Avancée des connaissances sur l'implication des Cav3.2 dans la douleur chronique .....	180
2.1. Implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur viscérale.....	181
2.1.1. Mise en place d'un nouveau modèle d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit.....	181
2.1.2. Implication et localisation fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans le modèle DSS à 0,5% .....	182
2.1.3. La glie, une cible des canaux Cav3.2 ?.....	183

2.2. Implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire somatique .....	184
2.3. Des mécanismes physiologiques possibles de l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique. ....	185
3. L'utilisation d'antagonistes périphériques des canaux Cav3.2 dans le traitement de la douleur, une stratégie encore envisageable ? .....	188
4. Preuve de concept préclinique de l'utilisation de l'éthosuximide dans la douleur chronique de différentes origines .....	189
<b>CONCLUSION</b> .....	191
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	192
<b>ANNEXE 1</b> .....	217
<b>ANNEXE 2</b> .....	237

---

## Liste des abréviations

---

<b>AAN</b> : Anticorps AntiNucléaires	<b>ELISA</b> : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ACPA</b> : Anti Citrullinated Protein Antibody	<b>EOPS</b> : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
<b>ACR</b> : American College of Rheumatology	<b>EULAR</b> : European League Against Rheumatism
<b>AINS</b> : anti-inflammatoires non stéroïdiens	<b>ERK</b> : Extracellular-signal Regulated Kinase
<b>AMM</b> : Autorisation de mise sur le marché	<b>ETX</b> : EThosuXimide
<b>AMPc</b> : Adénosine MonoPhosphate cyclique	<b>FBS</b> : Fetal Bovine Serum
<b>ANOVA</b> : ANalysis Of VAriance	<b>FODMAPs</b> : Fermentables Oligosaccharides Disaccharides Monosaccharides And Polyolys
<b>ASCA</b> : Anti-Saccharomyces Cerivisiæ Anticorps	<b>GFAP</b> : Glial FibrillaryAcidicProtein
<b>BDNF</b> : Brain-Derived Neurotrophic Factor	<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein
<b>BHE</b> : Barrière hémato-encéphalique	<b>GRE</b> : Glucocorticoïdes Responsive Elements
<b>BMDM</b> : Bone Marrow Derivated Macrophage	<b>HCN</b> : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide
<b>BSA</b> : Bovine Serum Albumine	<b>HLA</b> : Human Leukocyte Antigen
<b>Cav</b> : Canaux calciques voltage-dépendants	<b>HSC</b> : HyperSensibilité Colique
<b>CCI</b> : Chronic Construction Injury	<b>HVA</b> : High Voltage Activated
<b>CCP</b> : Peptides Cycliques Citrullinés	<b>IASP</b> : International Association for the Study of Pain
<b>CD</b> : Clusters de Différenciation	<b>Iba-1</b> : Ionized-calcium binding adaptor 1 molecule
<b>CFA</b> : Complete Freund Adjuvant	<b>IFN-γ</b> : InterFéroN-gamma
<b>CGRP</b> : Calcitonin Gene-Related Peptide	<b>Ig</b> : Immunoglobuline
<b>CNG</b> : Cyclic Nucleotide-Gate	<b>I-KB</b> : Inhibitor of NF-KB
<b>Cox</b> : Cyclo-oxygénase	<b>IL</b> : InterLeukine
<b>CPA</b> : Cellules Présentatrices d'Antigène	<b>i.p.</b> : Intrapéritonéale
<b>CRP</b> : Protéine C Réactive	<b>i. pl.</b> : Intra-plantaire
<b>DAS</b> : Disease Activity Score	<b>IP3</b> : Inositol- <i>tri</i> Phosphate
<b>DHPs</b> : DiHydroPyridines	<b>IRM</b> : Imagerie par Résonance Magnétique
<b>DMARD</b> : Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs	<b>i.t.</b> : Intrathécale
<b>DMEM</b> : Milieu de Eagle Modifié par Dulbecco	<b>KI</b> : Knock In
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	
<b>DRG</b> : Dorsal Root Ganglion	
<b>DSS</b> : Dextran Sodium Sulfate	
<b>EBV</b> : Epstein Barr Virus	

**KD** : Knock Down

**KO** : Knock Out

**LB** : Lymphocytes B

**Lcn-2** : Lipocaline 2

**LPS** : LipoPolySaccharide

**LT** : Lymphocytes T

**LTh** : Lymphocytes T helper

**LTMR** : Low Threshold MecanoReceptor

**LTP** : Long Term Potentiation

**LVA** : Low Voltage Activated

**MC** : Maladie de Crohn

**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

**MPO** : MyeloPérOxydase

**NK** : Natural Killer

**NOD** : Nucleotide Oligomerization Domain

**NSF** : Numérotation de Formule Sanguine

**NTS** : Noyau du Tractus Solitaire

**PA** : Potentiel d'Action

**PAG** : substance Grise PériAqueducale

**pANCA** : Anti-Neutrophiles Cytoplasmiques Anticorps, avec fluorescence périnucléaire

**PG** : Prostaglandine

**PK** : Protéine Kinase

**PBN** : Noyau Para-Brachial

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PFA** : ParaFormAldéhyde

**PR** : Polyarthrite Rhumatoïde

**RANKL** : Receptor Activator of NFκB Ligand

**RCH** : RectoColite Hémorragique

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute

**s.c.** : Sous cutanée

**SII** : Syndrome de l'Intestin Irritable

**SII-C** : SII à Constipation prédominante

**SII-D** : SII à Diarrhée prédominante

**SII-M** : SII Mixte

**SII-PI** : SII Post-infectieux

**SNARE** : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

**SNI** : Spinal Nerve Injury

**SNL** : Spinal Nerve Ligation

**SNC** : Système Nerveux Central

**SNE** : Système Nerveux Entérique

**SNS-KO** : Small-diameter Neurons Specific KO

**SP** : Substance P

**SVF** : Sérum de Veau Fœtal

**Ta** : Température ambiante

**TENS** : Neurostimulation électrique transcutanée

**TEP** : Tomographie par Emission de Positron

**TGF-β** : Transforming Growth Factor-bêta

**TLR** : Toll-like receptor

**TNF** : Tumor Necros Factor

**TRP** : Transient Receptor Potential ion channels

**TSH** : ThyreoStimuline Hormon

**VEH** : Véhicule

**VS** : Vitesse de Sédimentation globulaire

**VMR** : VisceroMotor Response

**WT** : Wild Type

**β-NGF** : β nerve growth factor

---

## Introduction

---

La **douleur chronique** représente un enjeu important en termes de santé publique. De récentes études épidémiologiques estiment à 1,5 milliards le nombre de personnes atteintes par ce type de douleur à travers le monde. En Europe, 19% de la population adulte souffre de douleur chronique (Breivik *et al.* 2006). Ce chiffre est de 18% pour la population française, avec environ 12 millions de personnes (Bouhassira *et al.* 2008). La douleur chronique a des répercussions importantes sur la qualité de vie ainsi qu'un impact conséquent en terme économique. En effet, 60% des personnes souffrant de douleur chronique rapportent avoir des difficultés à exercer leur activité professionnelle et 20% estiment avoir perdu leur emploi de ce fait (Breivik *et al.* 2006). De plus, l'arsenal thérapeutique actuel se limite souvent à des médicaments ne présentant qu'une efficacité limitée et/ou des effets indésirables importants. Il existe donc un réel besoin d'innovation pour le traitement des douleurs chroniques. Pour cela il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur les mécanismes mis en jeu lors de la signalisation douloureuse et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous nous intéressons ici à une population particulière de canaux calciques activés par dépolarisation membranaire, **les canaux Cav3.2** qui contrôlent l'entrée de calcium dans les neurones (et ainsi leur excitabilité) pour de faibles seuils d'activation. L'intérêt de ces canaux comme stratégie thérapeutique a été démontré dans différents types de douleur chronique (Bourinet *et al.* 2005; Okubo *et al.* 2011; Messinger *et al.* 2009; Marger *et al.* 2011). Leur implication dans les douleurs chroniques d'origine viscérale non inflammatoire telles que le **Syndrome de l'intestin irritable (SII)** (ou les **maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)** en phase de rémission) et dans la douleur inflammatoire chronique rencontrée par exemple dans la **polyarthrite rhumatoïde (PR)**, demeure jusqu'alors peu étudiée. Il reste également à préciser leur rôle dans la signalisation douloureuse.

**Ainsi, l'objectif de ma thèse est de comprendre comment les canaux Cav3.2 interviennent dans le développement et le maintien d'une douleur chronique, afin de proposer ces canaux comme cible potentielle pour le traitement de douleurs chroniques de différentes origines.** Pour cela, nous nous sommes intéressés à différentes pathologies : le SII (et les MICI en rémission) et la PR. Plusieurs modèles murins ont été utilisés : un modèle de douleur viscérale non-inflammatoire et deux modèles de douleur inflammatoire somatique. Nous avons appliqué une double stratégie combinant des approches **génétiques et pharmacologiques afin d'étudier l'impact d'un blocage des canaux Cav3.2 dans ces différents modèles.**

Ce manuscrit est composé d'une étude bibliographique faisant le point sur les canaux calciques voltage-dépendants et l'état des connaissances sur leur implication dans la douleur chronique. Une description physiopathologique du SII et des MICI en ce qui concerne la douleur chronique viscérale, et de la PR pour la douleur inflammatoire somatique, ainsi que l'état actuel de l'arsenal thérapeutique disponible pour chacune d'entre elles sont rapportés.

Après une description des protocoles expérimentaux utilisés, les résultats sont présentés en deux parties distinctes, portant sur l'implication des canaux Cav3.2 dans (I) la douleur viscérale et (II) la douleur inflammatoire somatique. Enfin, une discussion générale et une conclusion résument les principaux acquis de ce travail de thèse ainsi que ses perspectives.

---

## Etude bibliographique

---

### I. Les canaux calciques de type T : cible thérapeutique dans le traitement de la douleur chronique

---

---

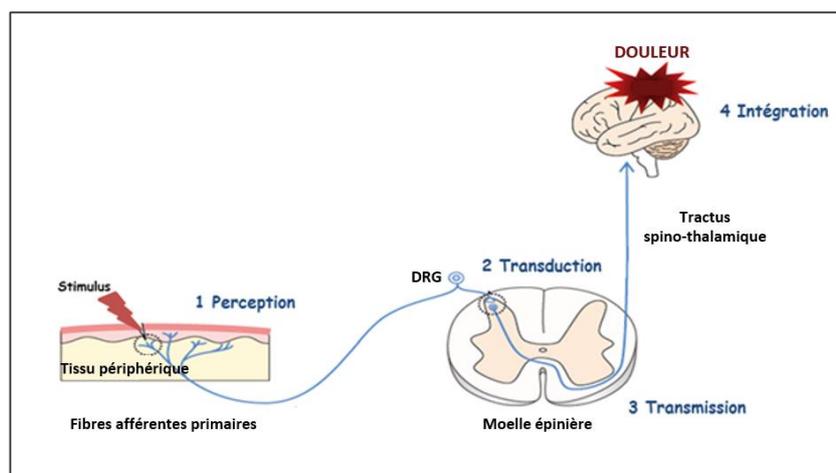
## A. Physiopathologie de la douleur et transmission de l'influx nerveux

---

Deux tiers des consultations médicales auraient pour cause la douleur qui est définie par l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle, ou potentielle, ou décrite en ces termes ». De nombreuses études, aussi bien fondamentales que cliniques, sont menées sur cette thématique afin de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués et de permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soulager les patients.

Dans le cas de la douleur aiguë, avec pour exemple une main posée par inadvertance sur une plaque brûlante, la chaleur va entraîner une activation des terminaisons nerveuses localisées au niveau de la peau appelées nocicepteurs. L'information va alors se propager le long des nerfs jusqu'à la moelle épinière, puis jusqu'au niveau du cerveau où le signal sera intégré et identifié comme une douleur (**Figure 1**). Les mécanismes mis en jeu dans la transmission du message douloureux sont en fait plus complexes. Le signal nociceptif a pour origine un stimulus qui va activer les neurones sensoriels primaires appelés nocicepteurs ou neurones de premier ordre, c'est le phénomène de perception du signal. Les nocicepteurs sont composés de terminaisons libres de fibres nerveuses localisées au niveau de la peau, des muscles ou des viscères ; d'un corps cellulaire et d'axones peu myélinisés (fibre A $\delta$ ) ou amyéliniques (fibres C) (Basbaum *et al.* 2009). On distingue les mécanorécepteurs répondant à des *stimuli* intenses d'origine mécanique (coups, incision, piqûres...) et les nocicepteurs polymodaux répondant à des *stimuli* d'origine mécanique, thermique (brûlures, engelures...) ou chimique (injections de produits, sécrétion d'acide dans le tractus digestif...). Bien que le mécanisme de cette activation ne soit que faiblement établi, il semblerait que le déclenchement du signal nociceptif se fasse soit directement par l'agent nociceptif, soit indirectement *via* les substances algogènes. Ces substances sont libérées par le tissu lésé ou par les cellules qui participent à un éventuel processus inflammatoire et qui agissent sur les protéines membranaires présentes au niveau des nocicepteurs. Ces substances algogènes comprennent notamment l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les tachykinines telles que la substance P (SP) ou la neurokinine A, les prostanoïdes telles que les prostaglandines ou les leucotriènes, les interleukines, les endothélines, l'ATP, les protons H<sup>+</sup> ou encore certains radicaux libres comme le monoxyde d'azote (Julius and Basbaum 2001). Le signal nociceptif ainsi généré est conduit par les fibres afférentes de type A $\delta$  pour les mécanorécepteurs et les fibres afférentes de type C pour les récepteurs polymodaux. Une fois le stimulus détecté, l'activation des nocicepteurs va induire la formation d'un message électrique (message nerveux nociceptif) avec l'intervention notamment de canaux ioniques, c'est la transduction du signal. L'activation des canaux

ioniques permet en effet des flux d'ions qui vont aller modifier le potentiel membranaire de repos du neurone qui sera alors changé en potentiel transducteur. Si le courant généré est suffisamment important, il va permettre une activation des canaux sodiques voltage-dépendants entraînant ainsi une dépolarisation du neurone qui conduit à la formation d'un potentiel d'action. Cette dépolarisation membranaire va immédiatement activer les canaux potassiques voltage-dépendants, qui à leur tour vont générer un courant hyperpolarisant afin de restaurer le potentiel membranaire de repos du neurone. Cette alternance de courant dépolarisant et repolarisant conduit à la formation de potentiels d'action (PA) isolés ou en bouffées, dont la fréquence va permettre le codage du message nerveux. Les corps cellulaires des neurones de premier ordre sont situés dans les ganglions spinaux de la racine dorsale de la moelle épinière. Ils forment des synapses au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière avec les neurones de second ordre, le signal électrique est alors transformé en signal chimique. L'information nociceptive est ensuite transmise vers les centres supérieurs par les voies ascendantes du tractus spinothalamique, atteignant alors le thalamus, puis le cortex sensoriel et le système limbique, ces derniers étant responsables de l'aspect émotionnel et cognitif de la douleur (Weiss and De Waard 2006) ce sont les phases de transmission et d'intégration.



**Figure 1 : Transmission du message douloureux** (D'après Sekiguchi and Kawabata 2013).

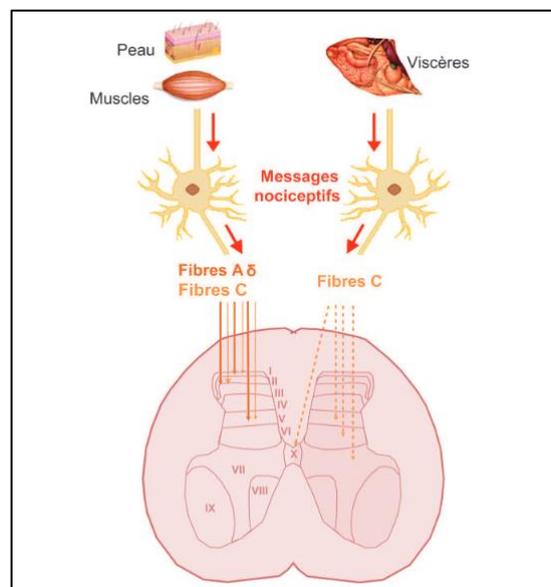
**Perception** : stimulation des nocicepteurs, terminaisons nerveuses libres situées au niveau de la peau, des articulations, des os, des muscles, des tendons, etc.

**Transduction** : codage du message sensoriel pour l'acheminement de l'information nociceptive vers la corne dorsale de la moelle épinière.

**Transmission** : le potentiel d'action nociceptif chemine du nocicepteur jusqu'à la corne dorsale de la moelle où il sera transmis à un neurone de second ordre spinothalamique (de la moelle vers le thalamus).

**Intégration** : effective lorsque l'information nociceptive atteint le cerveau par les voies spinothalamiques. Le neurone tertiaire ou thalamocortical conduit ensuite les informations nociceptives vers différentes régions du cortex somatosensoriel et certaines régions limbiques.

La moelle épinière est composée de dix couches de neurones qui peuvent être activés par des messages nociceptifs ou non nociceptifs (**Figure 2**). Parmi les neurones pouvant recevoir des messages nociceptifs (potentiellement douloureux), sont distingués les neurones spinaux spécifiquement nociceptifs, localisés majoritairement dans les couches I et II de la moelle épinière et en quantité plus restreinte au niveau dans les couches V, VI, VII et X. Une autre catégorie de neurones spinaux, dits convergents, sont eux localisés majoritairement dans la couche V et en quantité plus restreinte au niveau dans les couches I et II, ils peuvent transmettre des messages nociceptifs ou non nociceptifs. Les messages nociceptifs provenant de la peau et des muscles sont transmis par les fibres A $\delta$  et C des nocicepteurs au niveau des couches I, II et V de la moelle épinière alors que les messages nociceptifs provenant des viscères sont transmis par les fibres A $\delta$  et C des nocicepteurs au niveau de la couche V et également au niveau des couches VI, VII et X par les fibres C (Guirimand and Le Bars 1996; Basbaum *et al.* 2009).



**Figure 2 : Transmission des messages nociceptifs par les fibres A $\delta$  et C aux neurones de la moelle épinière (Paulmier *et al.*, 2015)**

La douleur aiguë exerce ainsi un rôle d'alarme, nécessaire au maintien de l'intégrité physique de l'individu, en lui permettant de réagir et de se protéger face à un stimulus potentiellement dangereux. Néanmoins, il arrive que ce mécanisme d'alarme dysfonctionne et on parle alors de douleur chronique ; la douleur devient dans ce cas une maladie à part entière.

La douleur chronique est définie par la Haute Autorité de Santé comme répondant aux critères suivants :

«- persistance ou récurrence, qui dure au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale présumée, notamment si la douleur évolue depuis plus de 3 mois ; réponse insuffisante au traitement,  
- détérioration significative et progressive du fait de la douleur, des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière, au domicile comme à l'école ou au travail »

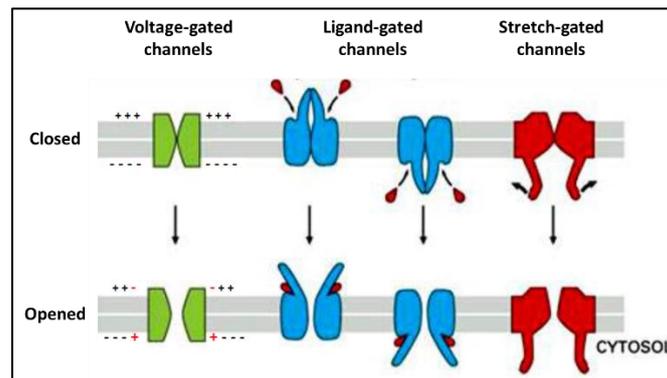
Deux grands types de douleurs chroniques sont distingués en fonction des paramètres mis en jeu (Treede *et al.* 2015). Une première catégorie, les douleurs par excès de nociception, sont dues à une activation des nocicepteurs par des *stimuli* d'origine mécanique, thermique ou chimique. Parmi ces douleurs, on distingue les douleurs somatiques lorsque les nocicepteurs impliqués sont localisés au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires ou osseux et les douleurs viscérales lorsque les nocicepteurs impliqués sont localisés au niveau des zones thoraciques, abdominales ou pelviennes. Les douleurs somatiques peuvent être occasionnées par des lésions tissulaires, survenant lors d'interventions chirurgicales ou de traumatismes accidentels ou peuvent également être provoquées par des agents infectieux par exemple en cas de pathologies impliquant un processus inflammatoire. Les douleurs viscérales quant à elles peuvent avoir pour origine des tensions, dilatations, distensions des organes creux. Elles peuvent également être déclenchées par une inflammation au niveau du tractus digestif, génital ou de la sphère thoracique (Le Bars et Willer, 2004). Les douleurs neuropathiques représentent une seconde catégorie de douleurs. Elles sont associées à une atteinte du système nerveux central et périphérique et peuvent être la conséquence de lésions lors de chirurgie ou de maladie neurologique affectant le système somato-sensoriel (Loeser and Treede 2008). Ces douleurs peuvent être spontanées (continues ou paroxystiques) ou évoquées (induites par des stimulations nociceptives ou non nociceptives). Parmi les douleurs évoquées, on distingue l'hyperalgésie qui est une sensation de douleur amplifiée suite à l'application d'un stimulus douloureux, et l'allodynie qui est une sensation de douleur induite par un stimulus habituellement non douloureux (Le Bars et Willer, 2004). Enfin, il existe des douleurs mixtes qui associent deux composantes, inflammatoire et neuropathique, qui sont souvent rencontrées dans le cadre de cancers ou après une chirurgie. Dans certains cas, comme pour la fibromyalgie ou les troubles fonctionnels intestinaux (tel que le syndrome de l'intestin irritable), aucune de ces deux composantes n'est présente. Ces douleurs peuvent être classées dans la catégorie de douleurs dysfonctionnelles car elles pourraient être liées à des dysfonctions des systèmes de modulation de la douleur.

## B. Canaux Cav3.2, rôle dans la douleur

### 1. Les canaux ioniques

Comme décrit précédemment les canaux ioniques sont des acteurs essentiels pour la perception et la modulation de la douleur.

Ils sont présents dans les membranes cytoplasmiques de tous les organismes uni- ou pluricellulaires. Les courants ioniques traversent les membranes biologiques au travers de pores aqueux nommés canaux. Ces derniers sont capables de changer de conformation et de s'ouvrir ou de se fermer, en réponse à des *stimuli* extérieurs comme l'étirement ou à des *stimuli* physiologiques spécifiques tels qu'une variation de potentiel de membrane, la fixation d'un ligand chimique ou d'un messenger intracellulaire sur un récepteur (**Figure 3**). Ils permettent alors le passage d'ions (sodium, potassium, chlore, calcium, etc.), par flux passifs vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule (Hille 1992). Les canaux ioniques sont caractérisés par leur mode d'activation qui est dépendant de leur propriété de cinétique (potentiel de membrane, temps).

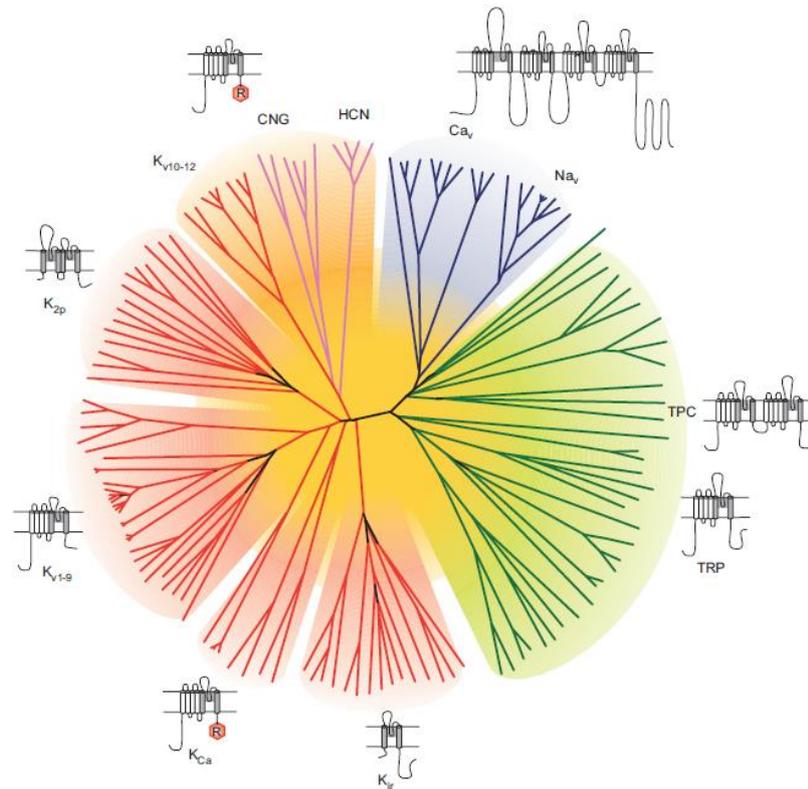


**Figure 3 : Les différents types de canaux ioniques.** Différents types de canaux ioniques sont distingués selon leur mécanisme d'ouverture/ fermeture, régulé par des variations de potentiel de membrane (les canaux voltages-dépendants), la fixation d'un ligand chimique ou d'un messenger intracellulaire sur un récepteur, ou par des *stimuli* extérieurs comme l'étirement.

D'après [http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010\\_Exam\\_Reviews/Exam\\_3\\_Review/CH\\_11\\_Ion\\_Channels.htm](http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010_Exam_Reviews/Exam_3_Review/CH_11_Ion_Channels.htm)

#### 1.1. Les canaux ioniques voltage-dépendants

Il existe une multitude de canaux ioniques dont le fonctionnement dépend du potentiel transmembranaire (**Figure 4**). L'activation de ces différents canaux transducteurs va générer un flux d'ions (sodique, potassique ou calcique) qui sera soit dépolarisant (canaux sodiques et calciques), soit hyperpolarisant (canaux potassiques) en fonction de leur perméabilité ionique.



**Figure 4 : Représentation de l'homologie des séquences en acides aminés du pore des canaux de la superfamille des canaux ioniques voltage-dépendants.** Cav: "voltage dependent calcium channels"; CNG: "cyclic nucleotide-gated channels"; HCN: "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated"; K2P: "two-pore potassium channels"; Kv: "voltage dependent potassium channels"; KCa: "calcium-activated potassium channels"; Kir: "inwardly rectifying potassium channels"; Nav: "voltage dependent sodium channels"; TPC: "two-pore channels"; TRP: "transient receptor potential" (Yu and Catterall 2004).

### 1.1.1. Les canaux sodiques voltage-dépendants

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de la phase de dépolarisation du potentiel d'action des cellules excitables. Ils sont constitués d'une sous-unité-principale  $\alpha$  (260-280 KDa) associée des sous-unités  $\beta$  auxiliaires. La sous-unité  $\alpha$  est composée de 24 hélices transmembranaires regroupées en 4 domaines homologues. Chaque domaine est lui-même composé de 6 hélices transmembranaires (1 à 6) reliées les unes aux autres par des boucles intracellulaires. Le pore ionique est formé par la boucle située entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. Les autres segments (S1 à S4) sont impliqués dans la sensibilité au voltage (pour revue, Yu and Catterall 2004).

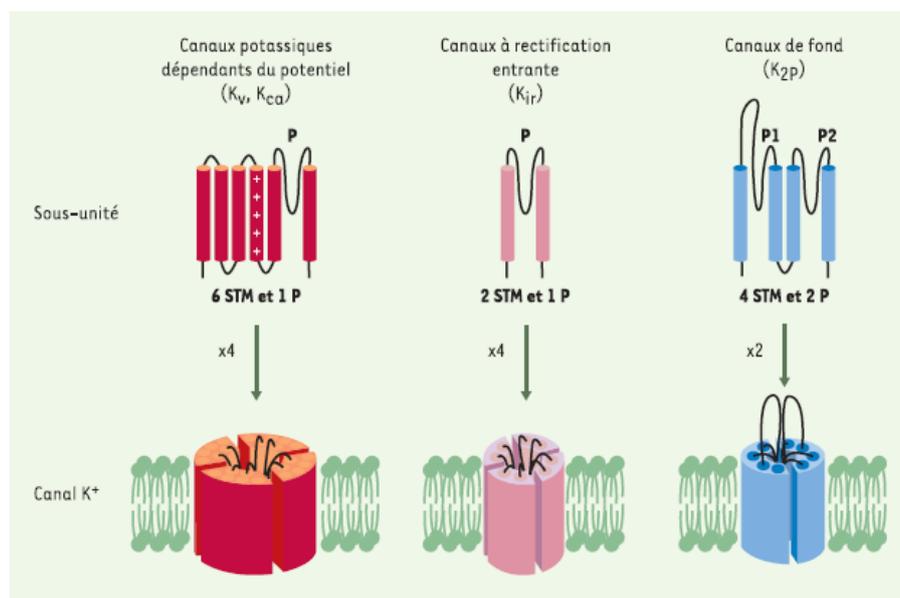
### 1.1.2. Les canaux potassiques voltage-dépendants

Il existe une grande diversité de canaux sélectifs pour l'ion  $K^+$ , avec plus de 75 gènes identifiés chez les mammifères à ce jour. Ces canaux présentent des structures et mécanismes de régulation plus complexes que les canaux sodiques (**Figure 5**). Certains interviennent dans la phase de repolarisation du potentiel d'action. D'un point de vue structural, ces différents canaux ont en commun une structure

nommée domaine P qui a un rôle fondamental dans la formation du filtre de sélectivité envers l'ion  $K^+$ . Les canaux potassique voltages-dépendants possèdent une configuration commune concernant la sous-unité  $\alpha$ , avec la présence de 6 hélices transmembranaires (Yu and Catterall 2004).

Il existe d'autres types de canaux potassiques:

- Les canaux potassiques  $K_{Ca}$  sont activés par le voltage ainsi que par l'augmentation du calcium cytosolique. Leur sous-unité  $\alpha$  est composée de 6 (voire 7) hélices transmembranaires.
- Les canaux potassiques  $K_{ir}$  sont des canaux de rectification entrante (« *inward rectifiers* »). Les sous unités- $\alpha$  de ces canaux comportent 2 hélices transmembranaires.
- Les canaux potassiques à deux domaines P, les  $K_{2P}$ , possèdent une sous unité  $\alpha$  à 4 hélices transmembranaires, avec une topologie similaire à une fusion en tandem de deux canaux  $K_{ir}$ . Les canaux  $K_{2P}$  sont ouverts indépendamment du potentiel de membrane, à la fois au potentiel de repos ou lors de dépolarisation, et génèrent des courants à rectification sortante (excepté les canaux TWIK) (Girard and Lesage, 2017).



**Figure 5 : Structure des différentes classes de canaux potassiques.** Les canaux  $K^+$  sont répartis en 3 grandes classes selon leur homologies structurale et leur propriétés biophysiques : les canaux potassiques voltage-dépendant (les  $K_v$  et les  $K_{Ca}$ ) ; les canaux à rectification entrante ( $kir$ ) ; les canaux à deux domaine P ( $K_{2P}$ ). STM : segments transmembranaires (D'après Girard et Lesage, 2017).

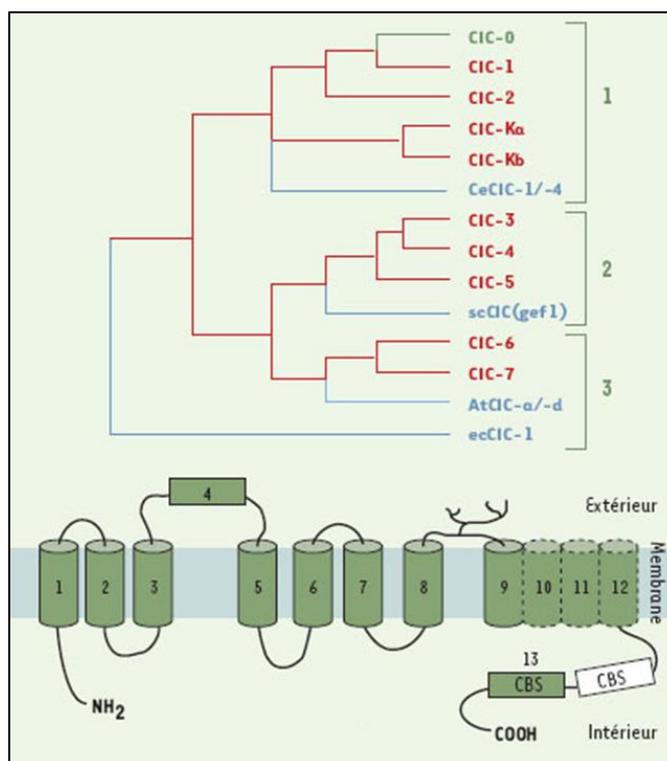
### 1.1.3. Les canaux cationiques non sélectifs

Cette famille de canaux présente une conformation commune à 6 hélices transmembranaires. La perméabilité cationique est non sélective, permettant le passage d'ions aussi bien sodiques, potassiques que calciques. L'ouverture des canaux **HCN** (« hyperpolarization-activated cyclic

nucleotide-gate cation channels ») et des canaux **CNG** (« cyclic nucleotide-gate cation channels ») est potentialisée par la liaison de nucléotides cycliques (AMP ou GMP cycliques) sur l'extrémité C-terminale. Les canaux **TRP** (« transient receptor potential ion channels »), sont régulés quant à eux par les ions calciques intracellulaires, l'inositol-triphosphate (IP3), le diacylglycérol et des acides gras polyinsaturés (Yu and Catterall 2004)

#### 1.1.4. Les canaux chlores voltage-dépendants

Les canaux chlores voltage-dépendants (CIC) constituent une famille présente au sein d'organismes variés tels que les levures, les archéobactéries, les bactéries, les plantes et les animaux (Jentsch *et al.*, 2002). Ils ont été identifiés suite au clonage du canal Cl<sup>-</sup> de la raie torpille (CIC-0) par Thomas J. Jentsch *et al.*, (1999). À ce jour, neuf membres ont été identifiés chez les mammifères avec 3 sous-familles principales. Bien que leur structure ne soit pas pleinement élucidée, il est établi que la protéine canalaire fonctionne sous forme dimérique et se caractérise par l'existence de deux pores formés chacun par un monomère constitué de 10 à 12 segments transmembranaires avec un seul site de glycosylation, localisé entre S8 à S9 (Jentsch *et al.*, 2002) (**Figure 6**).



**Figure 6 : Arbre phylogénétique des canaux CIC.** Les CIC décrits chez l'homme (en rouge), chez le ver *Caenorhabditis elegans* (ce), la plante *Arabidopsis thaliana* (At), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) et la bactérie *Escherichia coli* (ec) (D'après Teulon and Vandewalle, 2002).

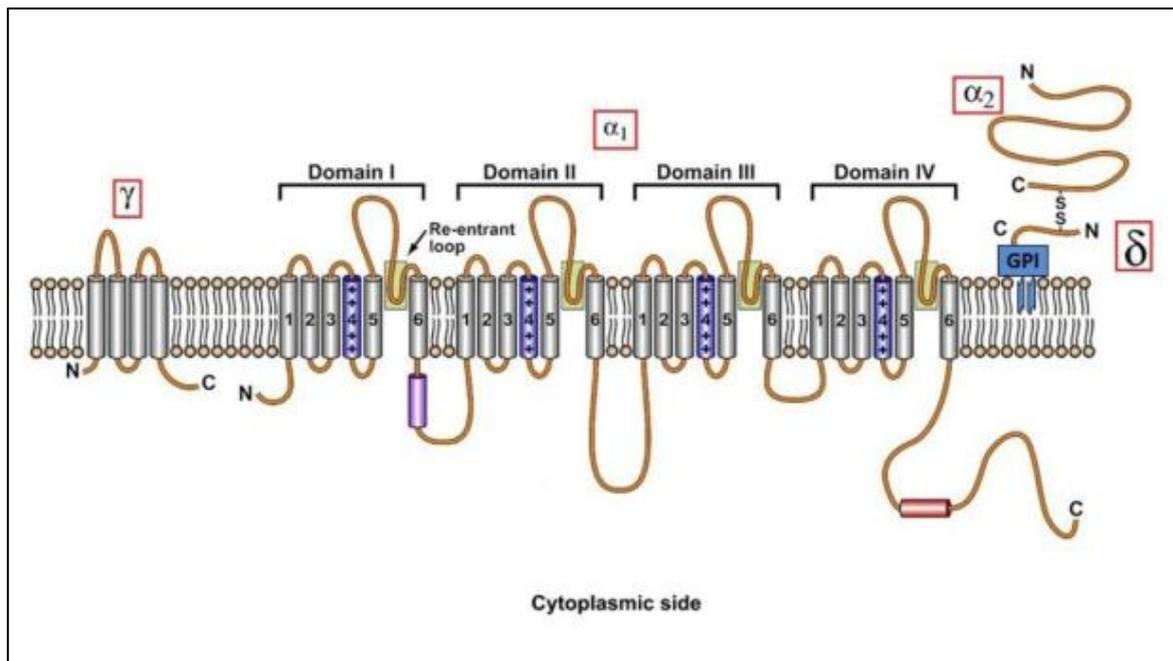
La localisation de ces canaux peut être tissu spécifiques comme CIC-1 qui est présent dans le muscle squelettique ou CIC-K dans le rein. Une présence apicale tout au long de l'arbre bronchique, dans l'intestin grêle et le colon est également observée (Teulon and Vandewalle, 2002).

L'identification des fonctions physiologiques des canaux CIC repose sur l'étude de maladies génétiques humaines. En effet CIC-1, qui est largement exprimé dans le muscle squelettique, se trouve muté dans des myotonies héréditaires comme la myotonie congénitale de Thomsen et Becker. Cette association a permis d'identifier ce canal comme ayant un rôle important dans la régulation et la restauration du potentiel de repos dans le muscle squelettique (Koch *et al.*, 1992). L'identification de mutations de *CIC-Kb* comme cause du syndrome de Bartter, une néphropathie, a également permis de démontrer l'implication de ce canal dans les mécanismes de concentration urinaire dans le rein (Simon *et al.*, 1997). Le développement d'un diabète insipide néphrogénique chez les souris KO pour *CIC-Ka* confirme l'implication de ces canaux dans la régulation des concentrations urinaires (Matsumura *et al.*, 1999).

Les fonctions physiologiques de ces canaux identifiées à ce jour sont la stabilisation du potentiel de membrane dans le muscle squelettique (CIC-1), l'absorption de chlorure dans le tubule rénal (CIC-Ka ou CIC-Kb) et l'accompagnement des flux de protons dans diverses structures (CIC-5) (Mindell and Maduke, 2001).

#### 1.1.5. Les canaux calciques voltage-dépendants

D'un point de vue structural, les canaux calciques voltage-dépendants possèdent une configuration de leur sous-unité  $\alpha$  similaire à celle des canaux sodiques voltage-dépendants : 4 domaines transmembranaires (I à IV) chacun composé de 6 hélices transmembranaires (1 à 6) reliées les unes aux autres par des boucles intracellulaires. Ils sont composés d'une sous-unité principale  $\alpha_1$  (190-250 kDa) qui forme le pore ionique et possède les sites récepteurs aux antagonistes calciques (**Figure 7**). Cette sous-unité centrale est suffisante pour induire l'influx ionique, mais son activité se trouve amplifiée par son association à des sous-unités auxiliaires : sous-unité  $\beta$  cytosolique ; sous-unité  $\alpha\delta$  (composée d'une sous-unité  $\delta$  transmembranaire associée par un pont disulfure à une sous-unité  $\alpha_2$  extracellulaire) et sous-unité  $\gamma$  transmembranaire. Le pore ionique est formé par la boucle située entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. Les autres segments (S1 à S4) sont impliqués dans la sensibilité au voltage. La sélectivité au calcium est portée par la séquence d'acides aminés codant pour 4 résidus glutamates (EEEE) (Yu and Catterall 2004).

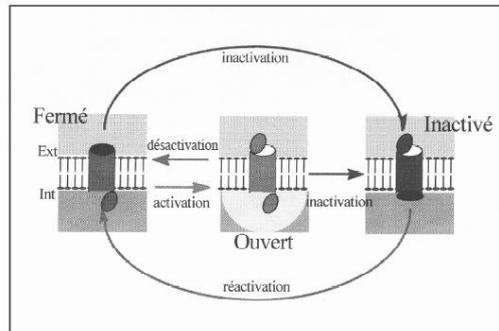


**Figure 7 : Représentation schématique de la structure des canaux calciques voltage-dépendants.**  
D'après Quintavalle, 2012.

Parmi les différents canaux ioniques voltage-dépendants que nous venons d'évoquer, la suite de l'étude bibliographique ciblera les canaux calciques voltage dépendants. En effet, ces canaux jouent un rôle primordial dans la nociception, de par leurs caractéristiques électrophysiologiques et leur implication dans l'excitabilité cellulaire et la transmission synaptique. Ces différents aspects sont détaillés dans le paragraphe suivant.

## 2. Caractéristiques des canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants (Cav) sont fermés au potentiel de repos de la membrane et s'ouvrent sous l'effet de la dépolarisation membranaire. Ils sont caractérisés par différents états fonctionnels : un état fermé, non conducteur, présent au potentiel membranaire de repos ; un état ouvert, conducteur de façon transitoire, activé par une dépolarisation membranaire et un troisième état, inactivé non conducteur avec une activation induite par une dépolarisation plus soutenue (**Figure 8**). Le passage d'un état du canal à un autre état se caractérise par une terminologie propre. Ainsi, le passage de l'état fermé à ouvert correspond à l'activation du canal ; le passage de l'état ouvert à fermé correspond à la désactivation ; la transition de l'état ouvert à inactivé se traduit par l'inactivation ; la transition de l'état inactivé à fermé correspond à la réactivation. Le canal ne peut pas passer directement de l'état inactivé à l'état ouvert. Pour passer à l'état ouvert, le canal doit obligatoirement transiter par un état fermé (Richard et Nargeot, 1998).



**Figure 8 : Présentation schématique des différents états fonctionnels des canaux calciques voltage-dépendants (Richard et Nargeot, 1998)**

Chez les mammifères, 10 sous-unités  $\alpha 1$  ont été identifiées, codées par 10 gènes distincts. L'ouverture des Cav est conditionnée par les variations de potentiel de membrane ainsi que par la nature des sous-unités  $\alpha 1$  et auxiliaires associées (Catterall 2010).

La nomenclature des Cav repose ainsi sur les conditions d'activation mais également sur la diversité de localisation et sur les réponses à divers inhibiteurs ou bloqueurs. On distingue 3 grandes sous familles : Cav1, Cav2 et Cav3 avec une homologie de séquence de 80% au sein de chaque famille. Le groupe Cav1 est composé de 4 sous-types (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 et Cav1.4). Ces canaux sont également appelés canaux de type L en référence à leur large conductance ainsi qu'à leur temps d'inactivation long « Large conductance and Long lasting ». Le groupe Cav2, est composé de Cav2.1 autrement appelé P/Q de par sa localisation dans les cellules de Purkinje du cervelet ; Cav2.2, aussi appelés canaux de type N car ne correspondant ni au groupe T ni au groupe L « Neither T or L » et un troisième groupe Cav2.3, également nommés R pour « Resistant » de par leur résistance à toutes les toxines et agents connus au moment de la genèse de cette nomenclature. Enfin, le groupe Cav3 composé des sous-types Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3, est nommé type T en raison de la faible conductance et du temps d'inactivation rapide « Tiny and Transient conductance ». Du fait de leurs propriétés électrophysiologiques, les canaux Cav1 et Cav2 sont nommés canaux à haut seuil d'activation (HVA : « High Voltage Activated »), activés par de fortes dépolarisations membranaires. Les canaux Cav3 eux sont dits à bas seuil d'activation (LVA, « Low Voltage Activated »), activés pour de plus faibles dépolarisations membranaires (Hans *et al.* 1999; Bourinet *et al.* 1999).

## 2.1 Les canaux HVA

### 2.1.1. Les canaux Cav1 (de type L)

Les canaux Cav1 sont caractérisés par un seuil d'activation d'environ -20 mV et ils s'inactivent lentement. Les 4 isoformes de cette famille présentent des distributions tissulaires et des propriétés biophysiques distinctes.

**Les canaux Cav1.1**, codés par le gène *CACNA1S* (Catterall *et al.* 2005) sont principalement exprimés dans le muscle squelettique à la jonction membranaire avec les tubules T et jouent un rôle primordial dans la contraction musculaire. En effet, ils interagissent physiquement avec les récepteurs à la ryanodine (canaux calciques dont l'ouverture est dépendante du calcium intracellulaire) dans le réticulum sarcoplasmique en déclenchant une libération rapide de calcium générant ainsi une contraction de la fibre musculaire (Tanabe *et al.* 1987).

**Les canaux Cav1.2 et Cav1.3**, codés respectivement par les gènes *CACNA1C* et *CACNA1D* (Catterall *et al.* 2005), sont exprimés dans le cœur (Mangoni *et al.* 2003), le cerveau (Olson *et al.* 2005; Chan *et al.* 2007) et les cellules endocrines (Marcantoni *et al.* 2010). Localisés majoritairement au niveau du soma en postsynaptique ainsi qu'au niveau des épines dendritiques des neurones, ces canaux sont impliqués dans la décharge neuronale et le contrôle de l'expression des gènes, au travers de mécanismes dépendants du calcium (excitation/transcription). Pour exemple, un couplage de Cav1.2 avec la calcineurine permettrait une déphosphorylation des facteurs de transcription induisant une translocation nucléaire (Jenkins *et al.* 2010; Zamponi *et al.* 2015). Ces canaux jouent un rôle important dans la plasticité neuronale en ce qui concerne les fonctions d'apprentissage, de mémoire, d'addictions et de développement neuronal (Zamponi *et al.* 2015; Moosmang *et al.* 2005; White *et al.* 2008; McKinney and Murphy 2006). Ils auraient également une influence sur l'anxiété et la dépression. En effet, des symptômes présents dans la dépression et l'anxiété sont retrouvés chez des souris présentant un déficit en Cav1.2 et/ou Cav1.3 (Lee *et al.* 2012; Dao *et al.* 2010).

Ces deux canaux ont une implication dans le système cardiovasculaire, les Cav1.2 sont majoritairement exprimés dans les cardiomyocytes où ils interviennent dans les contractions du myocarde. Ils interagissent avec des molécules de signalisation telles que l'AMPc et la protéine kinase A (PKA). Un déficit en Cav1.2 ou une augmentation de son activité, est à l'origine de dysfonctionnement cardiaque. De plus, les souris Knock out (KO) *Cav1.2* ne sont pas viables (mort *in utero*). Quant aux canaux Cav1.3, il prédomine dans les nœuds sino-auriculaires atrio-ventriculaires. Des souris KO *Cav1.3* présentent une diminution de la fréquence cardiaque au repos ainsi qu'un ralentissement ou une irrégularité de la fréquence pacemaker spontanée dans le nœud sino-auriculaire (Zhang *et al.* 2002; Mangoni *et al.* 2003). Chez l'humain, une mutation du gène codant Cav1.3 donne lieu à une brady-arythmie, d'où une implication de ces canaux dans la fonction normale de pacemaker (Baig *et al.* 2011). Ces canaux sont exprimés dans les cellules endocrines : cellules des îlots pancréatiques, cellules chromaffines des glandes surrénales et cellules sécrétrices d'aldostérone, où ils participent à la libération de catécholamines. Les canaux Cav1.2 contrôlent la phase rapide de sécrétion d'insuline et les isoformes Cav1.3 ont un rôle central dans la sécrétion d'aldostérone. Enfin, la sécrétion de glucagon dépend à la fois des canaux Cav1.2 et des Cav1.3 (Barg *et al.* 2001; Sinnegger-Brauns *et al.* 2004; Vignali *et al.* 2006).

**Les canaux Cav1.4**, codés par le gène *CACNA1F* (Bech-Hansen *et al.* 1998), sont présents dans les corps cellulaires des photorécepteurs, où ils interviennent dans l'exocytose de neurotransmetteurs en agissant sur l'entrée de calcium. Ils sont impliqués dans la fonction de vision au niveau de la rétine où ils agissent sur la différenciation neuronale, la croissance et la plasticité synaptique (Zamponi *et al.* 2015).

### 2.1.2. Les canaux Cav2 (de type N, P/Q, R)

Les trois isoformes de cette famille sont exprimées au niveau présynaptique et possèdent un rôle primordial dans la transmission synaptique en agissant notamment sur l'exocytose des neurotransmetteurs et la plasticité synaptique. Ces canaux interagissent avec les protéines SNARE (« Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor ») qui régissent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique des terminaisons nerveuses, conduisant au relargage de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (mécanisme dépendant du calcium) (Takahashi and Momiyama 1993).

**Les Cav2.1 (de type P/Q)**, codés par le gène *CACNA1A*, sont impliqués dans le contrôle de la transmission synaptique neuromusculaire. Un déficit en Cav2.1 a mis en évidence une implication de ces canaux dans diverses pathologies ayant pour origine une hyperactivité neuronale, telles que les absences épileptiques, l'ataxie de type 2, ou encore les migraines hémiplégiques familiales (Zamponi *et al.* 2015). Ces canaux ne représentent pas des cibles primordiales pour la pharmacopée actuelle du fait que le KO *Cav2.1* induit une mort à la naissance chez les souris (Jun *et al.* 1999) et qu'un faible nombre de molécules visant ces canaux sont actuellement disponibles.

**Les canaux Cav2.2 (de type N)**, codés par le gène *CACNA1B*, sont importants pour la libération de neurotransmetteurs des afférences primaires terminales dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces canaux sont les canaux Cav2 les plus impliqués dans la nociception. Les souris KO *Cav2.2* sont viables mais présentent des perturbations du contrôle de la pression artérielle ainsi qu'une hyperactivité (Mori *et al.* 2002; Beuckmann *et al.* 2003). De façon intéressante ces souris présentent une diminution de l'hypersensibilité à la douleur dans des modèles de douleurs inflammatoires, thermiques et neuropathiques (Hatakeyama *et al.* 2001; Kim *et al.* 2001; Saegusa *et al.* 2001). Une réduction de l'anxiété ainsi qu'une diminution de la consommation volontaire d'alcool ont également été retrouvées chez ces animaux (Saegusa *et al.* 2001; Newton *et al.* 2004).

**Les canaux Cav2.3 (de type R)**, codés par le gène *CACNA1E*, interviennent dans l'excitabilité et la communication thalamo-corticale (Weiergraber *et al.* 2007). Les souris KO *Cav2.3* sont viables mais présentent un déficit de la libération d'insuline lors de la seconde phase ainsi qu'un défaut d'architecture de l'hippocampe (Jing *et al.* 2005). Tout comme les KO *Cav2.2*, ces souris présentent également une diminution de la sensibilité à la douleur (Saegusa, Matsuda, and Tanabe 2002).

## 2.2. Les canaux LVA (de type T)

### 2.2.1. Rôles physiologiques des canaux de type T

Cette famille est composée de trois isoformes : les canaux Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3, codés respectivement par les gènes *CACNA1G*, *CACNA1H* et *CACNA1I*. Ils sont caractérisés par un seuil d'activation d'environ -70 mV, une cinétique d'inactivation rapide (Perez-Reyes *et al.* 1998; Cribbs *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999; Perez-Reyes 2006). Leur caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 1**.

L'expression des canaux de type T a été décrite dans le système nerveux central et périphérique chez le rat puis chez la souris et l'homme au travers du projet « Allen Brain Atlas » de McCarthy en 2006 (McCarthy 2006). Les trois isoformes sont retrouvées dans la plupart des structures du système nerveux allant du cortex aux neurones sensoriels, en passant par le thalamus. Les canaux de type T sont également retrouvés en dehors du système nerveux, dans le cœur, les muscles lisses, le rein ou les tissus endocriniens. L'étude a également montré une distribution quasi exclusive des canaux Cav3.2 dans les neurones sensoriels primaires (avec une légère expression de l'isoforme Cav3.3). Dans la moelle épinière, au niveau de la corne dorsale, les isoformes Cav3.1 et Cav3.2 sont présentes avec une distribution identique, alors que les canaux Cav3.3 sont très faiblement présents.

La conception d'une lignée de souris knock in (KI) *Cav3.2*-GFP-flox où *Cav3.2* est remplacé par un canal Cav3.2 fusionné à la protéine eGFP (« ecliptic green protein fluorescent ») et présentant un exon floxé, permet entre autres, d'identifier les neurones exprimant les canaux Cav3.2 par la fluorescence de la GFP dans tout le système nerveux, et d'induire des délétions tissues spécifiques à l'aide de virus exprimant la Cre recombinase (Francois *et al.* 2015). Une présence spécifique des canaux Cav3.2 dans deux classes de mécanorécepteurs à bas-seuil, les A $\delta$ -LTMR (« low threshold mecanoreceptor ») et les C-LTMR, innervant la plupart des follicules pileux les plus abondants de la peau a ainsi pu être déterminée (Francois *et al.* 2015).

Les canaux de type T ont un rôle primordial dans l'excitabilité neuronale. En effet, leur seuil d'activation est proche du potentiel de repos des neurones (Chevalier *et al.* 2006), et ils sont associés physiquement et fonctionnellement, à des canaux potassiques voltage et calcium-dépendants (Anderson *et al.* 2010; Rehak *et al.* 2013). Ainsi, ils facilitent la dépolarisation membranaire ainsi que le « rebound bursting » (McCormick and Huguenard 1992). Ils participent également à la libération des neurotransmetteurs des fibres afférentes primaires présynaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière (Jacus *et al.* 2012; Garcia-Caballero *et al.* 2014). Ils sont impliqués dans les sécrétions hormonales en agissant sur la libération des catécholamines dans les cellules chromaffines (Carabelli *et al.*, 2007). De plus, ces canaux interviennent dans la régulation du système cardiovasculaire avec un rôle dans la régulation du système rénine-angiotensine. Une surexpression des canaux de type T induit une production d'angiotensine qui déclenche une augmentation de la sécrétion d'aldostérone, d'où un intérêt de ces canaux dans la conception de molécules anti-hypertensives (Hansen 2015; Chen *et al.* 1999). L'ajout

d'aldostérone sur des cultures de myocytes cardiaques a également montré, une augmentation de l'expression de canaux de type T, modifiant ainsi la fréquence cardiaque (Lalevee *et al.* 2005). Ces résultats mettent en évidence une implication des canaux de type T comme régulateurs de pacemaker cardiaque (Zamponi *et al.* 2015). Les canaux de type T sont aussi impliqués dans la transcription des gènes en activant des facteurs nucléaires des cellules T dans les tissus du cartilage ou lors de développement d'hypertrophie cardiaque (Lin *et al.* 2014; Hsu, Chang, and Chen 2013; Huang, Chen, and Chen 2013). Les mécanismes mis en jeu dans cette fonction restent jusqu'alors peu connus. Enfin, les canaux Cav3.1 sont impliqués dans les cycles de sommeil / éveil et dans les comportements de prise alimentaire (Uebele *et al.* 2009).

### 2.2.2. Rôles physiopathologiques des canaux de type T

Les souris KO *Cav3.1* sont viables et montrent une résistance au développement de tumeurs chimio-induites ainsi qu'une résistance au gain de poids induit par une alimentation riche en graisses (Park *et al.* 2010; Uebele *et al.* 2009). Néanmoins, ces souris présentent une atrophie cérébelleuse ainsi que des pertes de coordination motrice (Chang *et al.* 2011). De plus, ces animaux présentent une bradycardie, en cohérence avec le rôle de ces canaux dans l'activité de pacemaker cardiaque (Mangoni *et al.* 2006). Au contraire, des souris surexprimant les canaux Cav3.1 manifestent des absences épileptiques (Ernst *et al.* 2009). Les souris KO *Cav3.2* sont également viables et présentent un développement anormal de la trachée, une moindre relaxation des tissus vasculaires en réponse à l'acétylcholine, un phénotype anxieux ainsi que des perturbations de la mémoire (Chen, Lamping, *et al.* 2003; Gangarossa *et al.* 2014). De plus, ces souris présentent une diminution de la sensibilité à certains types de *stimuli* douloureux (Choi *et al.* 2007). Les souris KO *Cav3.3* sont viables avec un phénotype normal (Lee *et al.* 2014).

Chez l'humain, plusieurs mutations affectant les canaux de type T ont été décrites. Parmi elles, les mutations concernant les canaux Cav3.1 et Cav3.3 ne sont pas associées à des pathologies humaines. Au contraire, les mutations touchant les canaux Cav3.2 sont corrélées à différentes pathologies telles que l'autisme, l'épilepsie, l'hypertension ou l'hyperaldostéronisme (Chen, Lu, *et al.* 2003; Heron *et al.* 2007; Khosravani *et al.* 2004; Khosravani *et al.* 2005; Zamponi 2016). Il a été décrit que la plupart des mutations à l'origine de ces pathologies induisent un gain de fonction des canaux Cav3.2 (Zamponi *et al.* 2015; Peloquin *et al.* 2006; Khosravani *et al.* 2004). Enfin, une dérégulation des canaux de type-T est associée au développement et au maintien de la douleur dans des modèles animaux, ce point sera détaillé dans le paragraphe « Rôle des canaux de type T dans la douleur ». Une des difficultés des études évaluant les mutations géniques humaines des canaux de type T est la variation de résultats concernant leurs propriétés biophysiques qui peut être très différente en fonction des conditions expérimentales (Souza *et al.* 2016) . Les rares pertes de fonctions seraient décrites chez des patients

souffrant de sclérose latérale amyotrophique (Rzhepetskyy *et al.* 2016; Steinberg *et al.* 2015) ou de douleur chronique (Souza *et al.* 2016). L'implication des canaux de type T avec la douleur sera détaillée dans le paragraphe « Rôle des canaux de type T dans la douleur ».

**Tableau 1 : Caractéristiques des différents sous-types des canaux calciques voltage-dépendants**

Famille	Sous-type	Gène	Localisation	Fonctions	Pathologies associées
Type L	Cav1.1	CACNA1S	Muscle squelettique	Contraction musculaire	Paralysie périodique hypokaliémique et d'hyperthermie maligne
	Cav1.2	CACNA1C	Cœur Cerveau	Système cardiovasculaire Décharge neuronale, Expression des gènes	Syndrome de Timothy Arythmie cardiaque Autisme
	Cav1.3	CACNA1D	Cellules endocrines Neurones	Secretion insuline/aldostérone/glucagon Plasticité et développement neuronale Apprentissage, mémoire, addiction Anxiété & depression	-
	Cav1.4	CACNA1F	Photorécepteurs	Vision Différenciation neuronale Croissance & plasticité synaptique	Cécité nocturne congénitale stationnaire
Type P/Q	Cav2.1	CACNA1A	Neurone, cellules pancréatiques	Transmission synaptique neuromusculaire	Absence épileptique Ataxie Migraines hémiplégiques familiales
Type N	Cav2.2	CACNA1B	Neurone, cellules pancréatiques	Nociception Anxiété	Migraine Hémiplégique familiale Ataxie
Type R	Cav2.3	CACNA1E	Neurone, cellules endocrines	Nociception	-
Type T	Cav3.1	CACNA1G	Cortex / Thalamus Neurones sensoriels	Excitabilité neuronale Libération neurotransmetteurs	-
	Cav3.2	CACNA1H	Moelle épinière Cœur Rein	Nociception Transcription des gènes	Austisme Epilepsie Hypertension
	Cav3.3	CACNA1I	Tissus endocriniens Spermatozoïdes	Régulation du système cardiovasculaire Sécrétions hormonale	-

### 2.2.3. Pharmacologie

Pour cette partie, un récapitulatif des composés inhibiteurs des canaux calciques de type T et des principaux médicaments actuels ou en phase clinique ciblant les canaux calciques voltages dépendant sont présentée dans le **tableau 2** et le **tableau 3**.

#### 2.2.3.1. Les ions inorganiques

Les canaux de type T sont sensibles aux ions métalliques divalents tels que le nickel (Fox, Nowycky, and Tsien 1987; Lee *et al.* 1999), le zinc (Traboulsie *et al.* 2007) ou le cuivre (Todorovic, Jevtovic-Todorovic, Mennerick, *et al.* 2001); chacun présentant une plus forte affinité pour les canaux Cav3.2 comparativement aux deux autres isoformes Cav3.1 ou Cav3.3. Les ions magnésium permettent aussi de moduler l'activité des canaux Cav3 (Serrano *et al.* 2000). Les ions métalliques trivalents sont également des bloqueurs potentiels des canaux de type T. L'yttrium, permet le blocage des canaux Cav3.1 humains clonés (Beedle, Hamid, and Zamponi 2002). Ces ions métalliques constituent des inhibiteurs de l'activité des canaux de type T avec une certaine sélectivité ; néanmoins leur utilisation est restreinte à une application de recherche fondamentale et non à des applications thérapeutiques.

### 2.2.3.2. Les toxines peptidiques

Des peptides dérivant de toxines animales ont été identifiés comme bloqueurs des canaux de type T. Cependant, tout comme les ions inorganiques, ils sont peu utilisés pour des applications thérapeutiques. La Kurtoxine, un peptide isolé du venin de scorpion de l'espèce *Parabuthus transvaalicus* a été le premier à montrer une potentialité d'inhibition des canaux de type T avec une forte affinité pour l'isoforme Cav3.1 (Chuang *et al.* 1998). Il constitue également un bloqueur des canaux de type P/Q, N et L et présente aussi une action sur les canaux sodiques. D'autres toxines issues de venin de scorpion *Parabuthus transvaalicus*, KLI et KLII permettent l'inhibition des canaux de type T (avec une action restreinte sur les canaux Cav3.3) et des canaux sodiques (Olamendi-Portugal *et al.* 2002).

Des peptides issus du venin de tarentule *Trixopelma pruriens*, la protoxine I et II, ont été décrits à l'origine comme des inhibiteurs des canaux sodiques mais se sont révélés avoir une action de blocage sur les canaux de type T avec une activité prédominante de la protoxine I sur les Cav3.1 et de la protoxine II sur les Cav3.2 (Bladen *et al.* 2014). D'autres toxines, isolées à partir du venin de tarentule *Theraphosidae* ou *Paraphysa*, respectivement la PsPTx3 (Brevet FR2940973) et la Psp3 présentent une inhibition des canaux de type T, la première visant également les canaux sodiques et la seconde étant plus spécifiques des canaux Cav3.2.

### 2.2.3.3. Les molécules organiques

Différentes classes de molécules organiques, inhibitrices des canaux de type T ont été identifiées. La première est la classe des diurétiques de la classe de l'amiloride, ayant une plus forte affinité pour les canaux Cav3.2 comparativement aux deux autres isoformes, mais ciblant également les canaux sodiques (Lopez-Charcas, Rivera, and Gomora 2012). Les succinimides, une famille thérapeutique comprenant l'éthosuximide (Zarontin®), ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1988 pour le traitement de l'épilepsie, est également un inhibiteurs de canaux de type T, ciblant chacune des 3 isoformes (Huguenard 2002; Gomora *et al.* 2001).

Le mibéfradil est un bloqueur des canaux de type T (Mishra and Hermsmeyer 1994; Ertel and Clozel 1997) qui avait obtenu une AMM en 1997 dans le traitement de l'hypertension artérielle et l'angor en France. Il a été retiré du marché un an plus tard du fait d'interactions médicamenteuses ayant conduit au décès de deux patients par tachycardie ventriculaire aux États-Unis. Néanmoins, ce médicament n'était pas spécifique des canaux de type T et ciblait également d'autres types de canaux calciques, potassiques, sodiques et chlorures ; les effets hypertenseurs seraient attribués à l'action du mibéfradil sur les canaux de type L. Des dérivés du mibefradil ont été synthétisés, tel que le NNC-55-0396 [(1S,2S)-2-[2-[[3-(1H-Benzimidazol-2-yl)propyl]methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-(1-methylethyl)-2-naphthalenyl]cyclopropanecarboxylate dihydrochloride] (Bui *et al.* 2008). Les canaux de

type T interagissent également avec les endocannabinoïdes et les ligands synthétiques des récepteurs cannabinoïdes. Parmi eux, on peut citer l'anandamide et ses dérivés (arachidonyleglycine) comme inhibiteur des canaux Cav3 (Chemin *et al.* 2001). Le NMP-7 [(9-Pentyl-9H-carbazol-3-yl)(1-pipéridinyl)méthanone] agit comme agoniste des récepteurs cannabinoïdes, mais également comme bloqueur des canaux de type T (You *et al.* 2011; Gadotti *et al.* 2013).

Des neuroleptiques utilisés dans le traitement de la schizophrénie, tels que la diphénylbutylpiperidine, sont connus pour leur rôle d'antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2. Certains composés comme le pimozide, la flunarizine ou le penfluridol sont également des inhibiteurs des canaux de type T, avec une action qui repose sur la présence de pharmacophore à base de pipéridine (Enyeart *et al.* 1990; Santi *et al.* 2002). Divers composés dérivant de ces inhibiteurs ont par la suite été synthétisés, tel que du composé Z944 [N-[[1-[2-(tert-butylamino)-2-oxoethyl]piperidin-4-yl]methyl]-3-chloro-5-fluorobenzamide](Tringham *et al.* 2012). Une autre série de composés dérivant de Z944, comprend le TTA-A2 [(R)-2-(4-cyclopropylphenyl)-N-(1-(5-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl)ethyl)acetamide] et le TTA-P2 [3,5-dichloro-N-[1-(2,2-dimethyl-tetrahydro-pyran-4-ylmethyl)-4-fluoro-piperidin-4-ylmethyl]-benzamide], tous deux bloqueurs des canaux de type T avec une forte sélectivité et une action préférentielle sur les canaux Cav3.2. La différence la plus significative entre ces deux molécules repose sur le fait que le TTA-A2 agit sur les canaux de type T à l'état inactivé (elle maintient l'état d'inactivation) alors que le TTA-P2 agit indépendamment de l'état d'activation des canaux (Choe *et al.* 2011; Francois *et al.* 2013; Uebele *et al.* 2009).

Les canaux de type T interagissent également avec certains types de dihydropyridines (DHPs), tels que la nimodipine, la nicardipine ou la nifédipine qui sont initialement des bloqueurs des canaux de type T utilisés respectivement dans la prise en charge des vasospasmes dus à une hémorragie méningée, dans l'hypertension artérielle ou dans l'angor, l'hypertensions artérielles et les syndromes de Raynaud (Stengel, Jainz, and Andreas 1998). Une autre molécule visant sélectivement les canaux de type T, et préférentiellement l'isoforme Cav3.2, a été développée par les laboratoires Abbott. Il s'agit de l'ABT-639, (4-chloro-2-fluoro-N-(2-fluorophenyl)-5-[(8aR)-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-2(1H)-ylcarbonyl]benzenesulfonamide) (Ziegler *et al.* 2015). L'intérêt de cette molécule est son action périphérique car elle ne passe pas la barrière hématoencéphalique (BHE).

**Tableau 2 : Molécules inhibitrices des canaux de type T.**

ASIC : Acid-sensing ion channel; CB1/CB2 : récepteur cannabinoïde de type 1 et 2; D2 : récepteurs dopaminergiques de type 2 ; GIRK : canaux potassiques à courant rectifiant activé par les protéines G ; HVA : canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil d'activation ; IC50 : Concentration de l'inhibiteur induisant 50% d'inhibition ; Kca : Canaux potassiques calcium-dépendants, Kv : canaux potassiques voltage-dépendants ; Nav : canaux sodiques voltage-dépendants.

Molécules inhibitrices	Inhibition des canaux de Type T			Autres cibles	Références
	Cav3.1	Cav3.2	Cav3.3		
<b>ABT-639</b>					
Amlorides	840 µM	2 µM	1091 µM	P/Q (IC50 : Cav1.2 - Cav2.2 (IC50 : > 30 µM)) ASIC1, canal sodium épithélial (ENaC)	Jarvis <i>et al.</i> , 2014 ; Ziegler <i>et al.</i> , 2015 Lopez-Charcas <i>et al.</i> , 2012
Anandamide	4 µM	300 nM	1 µM	CB1/CB2; Kv;	Chemlin <i>et al.</i> , 2001
Cuivre	22 µM	0,9 µM	25 µM		Todorovic & Jevtovic-Todorovic, 2011
Dihydropyridine		0,9 - 21,3 µM		HVA	Stengel <i>et al.</i> , 1998
Ethosuximide		0,3 à 1 mM		Pompes Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase ; Kca ; GIRK	Goren & Onat, 2007
KLI	+		+	N, Nav	Olamendi-portugal <i>et al.</i> , 2002
KLII					Chuang <i>et al.</i> , 1998
Kurtoxine	15 nM	61 nM		HVA (IC50 : 10 nM)	
Milbefradil	0,12 - 1,20 µM	1,0 - 1,4 µM	1,5 µM	P/Q (IC50 : 0,3 µM) ; R (IC50 : 0,4 µM) ; L (IC50 : 25 µM)	Mirshra & Hermismeyer, 1994 ; Fritel & Clozel, 1997
Nickel	250 - 470 µM	5,4-15 µM	180-220 µM	L (IC50 > 200 µM) ; N (50 µM)	Fox <i>et al.</i> , 1987 ; Lee <i>et al.</i> , 1999
NMP-7	2,47 µM	1,84 µM	5,59 µM	CB1/CB2	You <i>et al.</i> , 2011 ; Gadotti <i>et al.</i> , 2013
NMC-55-0396	6,8 µM				Bui <i>et al.</i> , 2008
Pimozine	35 nM	54 nM	30 nM	D2 (IC50 : 29 nM)	Enyeart <i>et al.</i> , 1990 ; Santi <i>et al.</i> , 2002
Prototoxine I	0,64 µM	94,6 µM	5,4 µM	N	Bladen <i>et al.</i> , 2014
<b>TTA-A2</b>		100 nM		HVA (IC50 : µM) ; TCC (IC50 : 8,99 nM)	Choe <i>et al.</i> , 2011 ; François <i>et al.</i> , 2013 ; Ubel <i>et al.</i> , 2009,
TTA-B2		100 nM		HVA (IC50 : 165 µM) ; Cav2.3 (IC50 : 35 µM)	Kraus <i>et al.</i> , 2010
Yttrium	28 nM			P/Q (IC50 : 769 nM) ; R (IC50 : 276 nM)	Beedle <i>et al.</i> , 2002
Zinc	135 µM	23 µM	470 µM		Taboulis <i>et al.</i> , 2007
Z944		100 nM		Nav1.5 (IC50 : 100 nM)	Tringham <i>et al.</i> , 2012

**Tableau 3 : Médicaments actuels ou en phase clinique ciblant les canaux calciques voltage-dépendants (Modifié d’après Weiss et De Waard, 2006).**

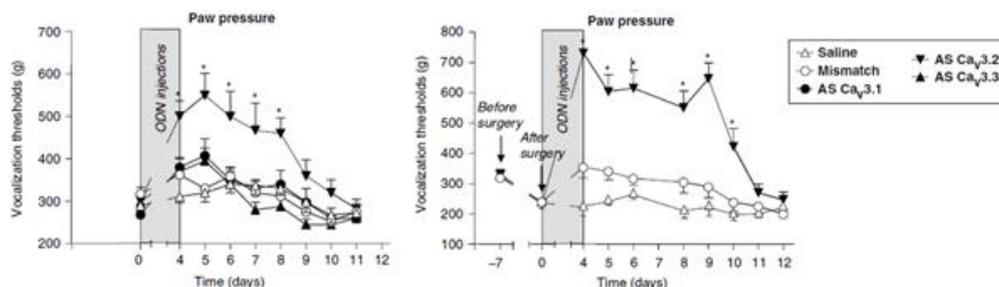
Molécule/ Nom commercial	Cibles moléculaires	Type de douleur	État clinique
Morphine	Bloqueur de canaux N via les récepteurs $\mu$ -opioïdes	Douleurs chroniques, neuropathiques et inflammatoires	Clinique
Ziconotide ( $\omega$ -conotoxine MVIIA) /Prialt®	Bloqueur de canaux N	Douleurs neuropathiques, cancéreuses et liées au SIDA	Clinique
Gabapentine/ Neurontin®	Sous-unités $\alpha_2\delta_1$ et $\alpha_2\delta_2$	Douleurs neuropathiques, cancéreuses, diabétiques et migraine. Neuralgies trigéminales et post-herpétiques	Clinique
Ethosuximide/ Zartantin®	Bloqueur de canaux T	Migraine	Clinique
$\omega$ -conotoxine CVID (AM-336)	Bloqueur de canaux N	Douleur neuropathique	Phase III
ABT-639	Bloqueur de canaux T	Douleur neuropathique	Phase II

## 2.2.4. Rôle des canaux de type T dans la douleur

### 2.2.4.1. Etudes montrant l’implication des canaux Cav3.2 dans la nociception

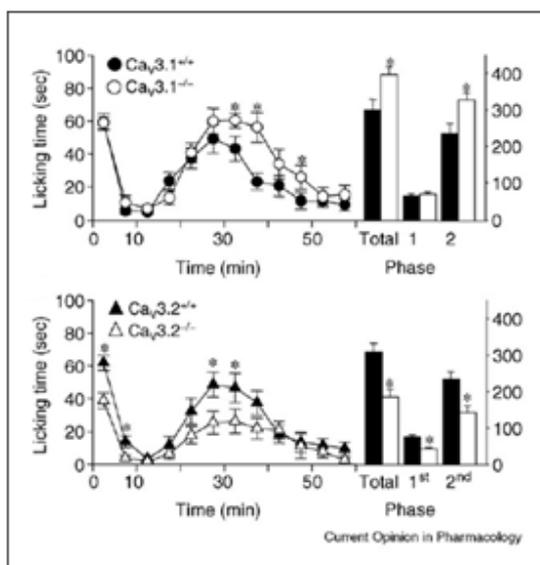
Pour cette partie, une synthèse récapitulant les études précliniques menées sur l’implication des canaux calciques de type T, notamment l’isoforme Cav3.2, dans la douleur est présentée dans le **tableau 4**.

Une inhibition directe des canaux Cav3.2 par un knock down (KD) *in vivo* via l’utilisation d’oligonucléotides antisens, a permis de mettre en évidence l’implication de ces canaux dans les neurones sensoriels et de montrer leur rôle dans la nociception (Bourinet *et al.* 2005) (**Figure 9**).

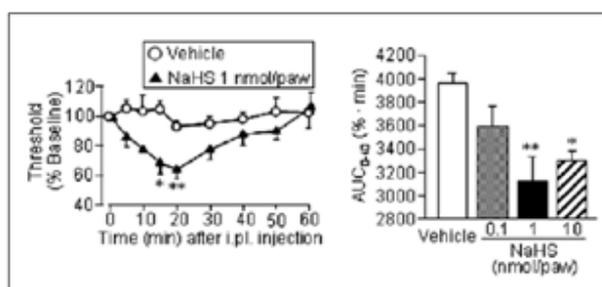


**Figure 9 : L’inhibition de l’expression de Cav3.2 au niveau du DRG réduit fortement la douleur neuropathique.** Effet d’une administration intrathécale d’oligonucléotides antisens visant spécifiquement chacune des 3 isoformes des canaux de type T chez des rats neuropathiques (modèle de « chronic constriction injury », CCI) ou contrôle (solution saline), mesuré par un test d’évaluation de la douleur en réponse à un stimulus mécanique : le test de pression de la patte (Bourinet *et al.*, 2005).

Une autre approche avec des souris KO a démontré une implication des canaux Cav3.1 et Cav3.2 dans les processus de nociception (**Figure 10**) (Shin *et al.* 2008). Par la suite, des études menées chez le rat avec l'utilisation de bloqueurs des canaux de type T, ou par une inhibition d'origine génétique des canaux Cav3.2, ont montré une suppression de l'hyperalgésie induite par administrations intrathécale (i.t.) ou intraplantaire (i.pl.) de NaHS, donneur de H<sub>2</sub>S, qui est un agoniste endogène des canaux Cav3.2 (**Figure 11**). D'autre part, l'utilisation de bloqueurs de la cystathionase (CSE), enzyme impliquée dans la formation de H<sub>2</sub>S à partir de cystéine, préviendrait le développement d'une hyperalgésie induite par une administration i.pl. de lipopolysaccharide (substance pro-inflammatoire) chez le rat (Kawabata *et al.* 2007).

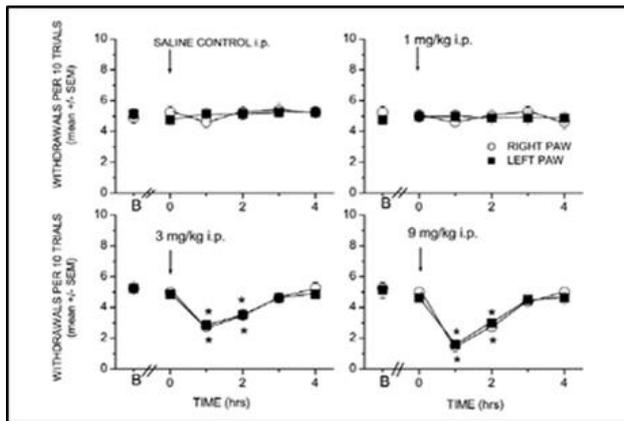


**Figure 10 : Implication des canaux de type T dans le processus de nociception.** Evaluation du temps passé par l'animal à se lécher/mordre la patte suite à une injection intraplantaire de formol chez des souris KO Cav3.2 et littermates contrôles (Shin *et al.*, 2008).

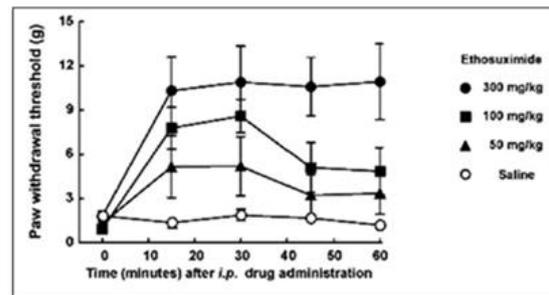


**Figure 11 : Effet pro-nociceptif du NaHS, donneur de H<sub>2</sub>S chez le rat.** Evaluation de la douleur par le test de pression de la patte en réponse à une administration intraplantaire de différentes concentration de NaHS (0,1 ; 1 ou 10 nmol) (Kawabata *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont porté sur l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur neuropathique. Des injections systémiques de mibéfradil ont permis de mettre en évidence l'implication des canaux de type T dans ce type de douleur chez le rat (Todorovic, Meyenburg, and Jevtovic-Todorovic 2002) (**Figure 12**). De la même façon, une administration d'éthosuximide dans différents modèles de douleurs neuropathiques a montré un effet antalgique sur l'hyperalgésie thermique ou mécanique (Dogrul *et al.* 2003; Matthews and Dickenson 2001a; Flatters and Bennett 2004) (**Figure 13**).



**Figure 12 : Le Mibéfradil induit un effet anti-nociceptif dépendant de la dose.** Test de von Frey évaluant les seuils nociceptifs chez le rat, suite à une administration intrapéritonéale de Mibéfradil à la dose de 1, 3 ou 9 mg/kg (ou saline contrôle) (Todorovic *et al.*, 2002).



**Figure 13 : L'éthosuximide réduit l'hypersensibilité tactile chez le rat neuropathique.** Effet d'une administration intrapéritonéale de doses croissantes d'éthosuximide (50, 100 et 300 mg/kg) évalué par le test de von Frey dans un modèle de douleur neuropathique (« spinal nerve ligation », SNL) (Drogul *et al.*, 2003).

L'implication des canaux de type T dans les neuropathies chimio-induites a également été démontrée par l'utilisation de l'éthosuximide dans un modèle de neuropathie induite par le paclitaxel ou la vincristine chez le rat. Les résultats indiquent une diminution de l'allodynie mécanique et au froid (Flatters and Bennett 2004) (**Figure 14**). L'utilisation de bloqueurs plus spécifiques des canaux Cav3.2 dans le même modèle a montré une suppression de l'hyperalgésie (Okubo *et al.* 2011) (**Figure 14**). De plus, les canaux de type T ont été identifiés comme étant impliqués dans les neuropathies diabétiques. En effet, une inhibition des canaux Cav3.2 dans les ganglions de la racine dorsale (DRG pour « dorsal root ganglion ») de rats diabétiques supprime l'hyperalgésie thermique et mécanique induites (Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2011).

De façon intéressante, une augmentation de la densité des courants des canaux de type T (**Figure 15**), ou bien une augmentation de l'expression des canaux Cav3.2 (**Figure 16**), est retrouvée dans les DRG de rat en contexte de douleurs neuropathiques qu'elles soient d'origine traumatique (Jagodic *et al.* 2008; Wen *et al.* 2010; Yue *et al.* 2013), diabétique (Cao *et al.* 2011; Jagodic *et al.* 2007; Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2011) ou chimio-induite (Kawabata 2013; Okubo *et al.* 2011). L'hyperalgésie ou l'allodynie présente chez ces animaux, est supprimée par une inhibition génétique ou pharmacologique des canaux Cav3.2 (Bourinet *et al.* 2005; Streng *et al.* 2008; Takahashi *et al.* 2010). Néanmoins, les résultats sont controversés puisque certains auteurs n'ont pas observé de modifications de l'expression des canaux Cav3.2 dans les mêmes types de modèles de douleur (Jagodic *et al.* 2007; Okubo *et al.* 2011; Lin *et al.* 2016) (**Figure 16**).

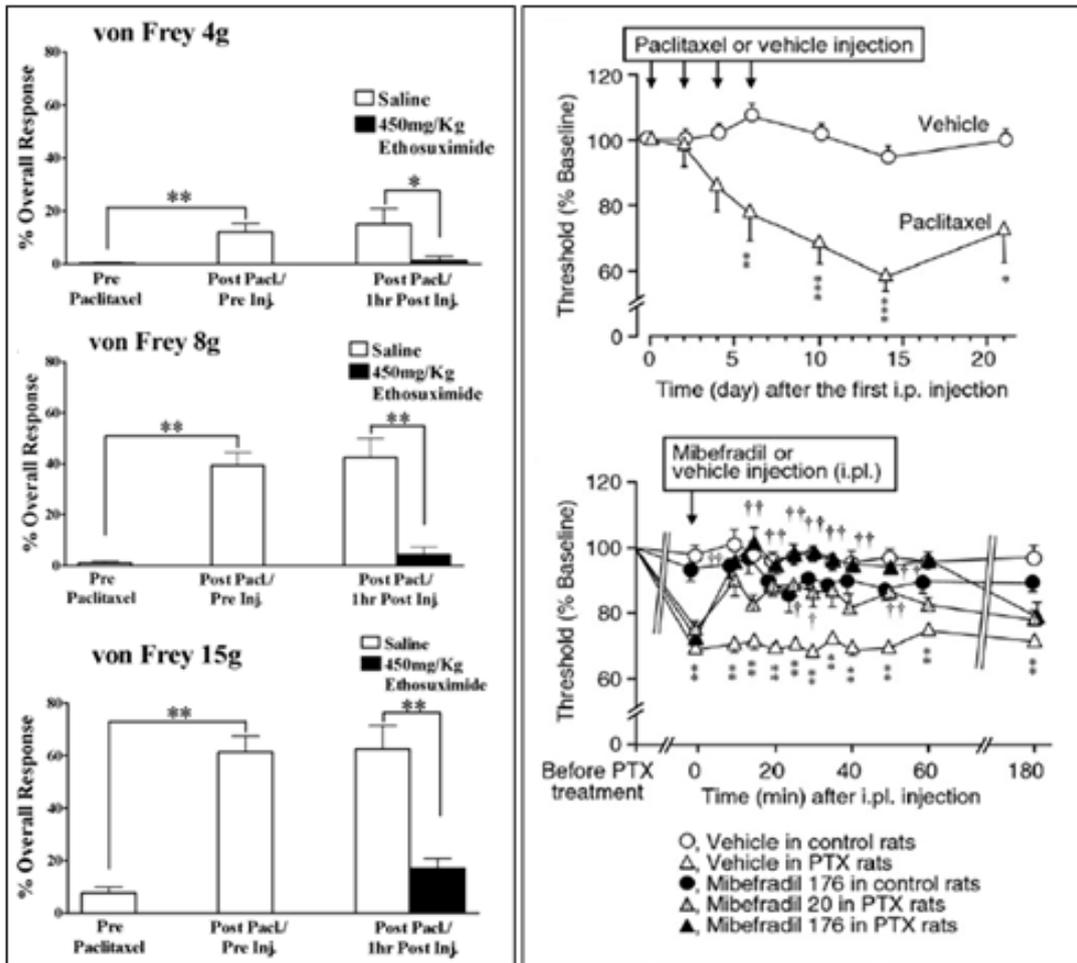


Figure 14 : Implication des canaux de type T dans la douleur neuropathique chimio-induite au Paclitaxel chez le rat. Evaluation de l'effet de l'éthosuximide par des tests de von Frey (à gauche, Flatters *et al.*, 2004) ; évaluation de l'effet du Mibéfradil par des tests de pression de la patte (à droite, Okubo *et al.*, 2011).

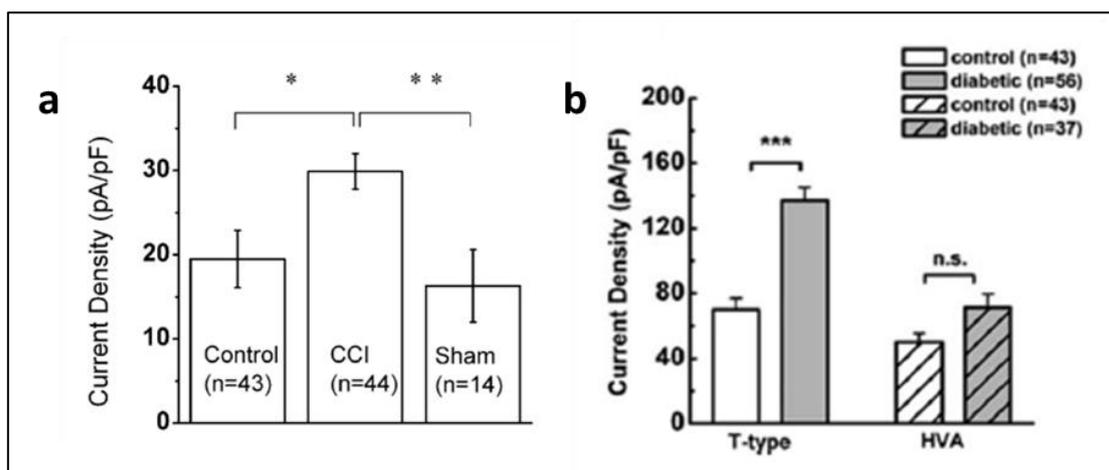
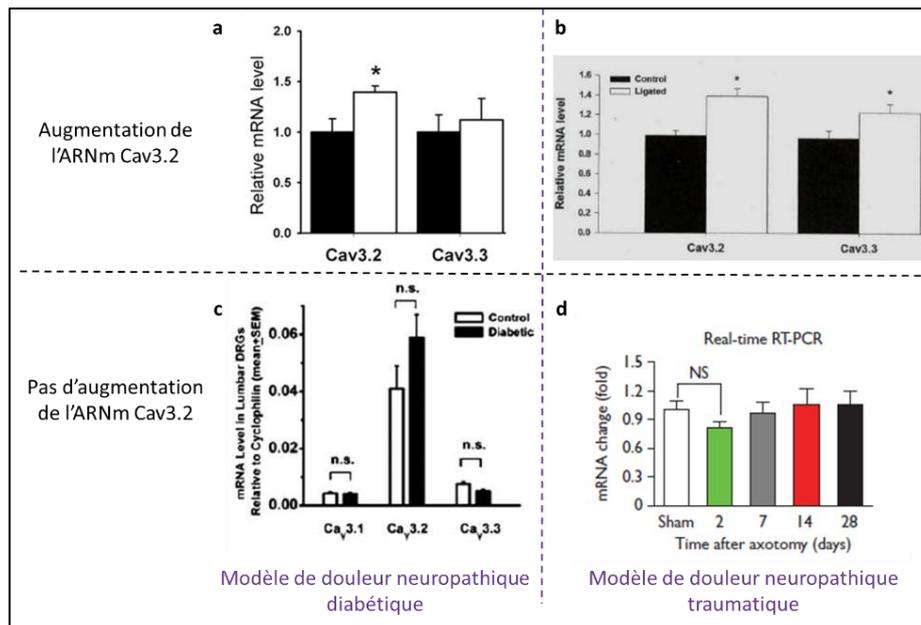


Figure 15 : L'activité des canaux calciques de type-T est augmentée en condition pathologique (modèles de douleur neuropathique). Evaluation par technique d'électrophysiologie de la densité de courant des canaux de type T dans des modèles de douleur neuropathique traumatique (a, Jagodic *et al.*, 2008) ou diabétique (b, Jagodic *et al.*, 2007).



**Figure 16 : Evaluation de l'expression des canaux Cav3.2 dans les DRG, en condition de douleur neuropathique, par technique de qPCR.** Dans un modèle de douleur neuropathique diabétique ( induit par la streptozotocine), une augmentation de l'ARNm de Cav3.2 a été observé par Cao *et al.*, (2011) (a) mais n'a pas été retrouvée par Jagodic *et al.*, (2007) (c). Dans un modèle de douleur neuropathique traumatique, une augmentation de l'ARNm de Cav3.2 a été observée par Yue *et al.*, (2013) (b) mais n'a pas été retrouvée par Lin *et al.*, (2016) (d).

Les canaux de type T semblent aussi être impliqués dans les processus de douleur viscérale. Des administrations intracoliques de NaHS chez la souris, induisent une hyperalgésie qui est supprimée par l'utilisation d'inhibiteurs des canaux Cav3.2 (Matsunami *et al.* 2011) mais aussi par une inhibition génétique de Cav3.2 (Tsubota-Matsunami *et al.* 2012). Une autre étude menée chez le rat avec l'utilisation de knock-down *in vivo* ainsi que des bloqueurs des canaux de type T dans un modèle de butyrate, a montré une diminution de l'hypersensibilité colique ainsi qu'une augmentation de l'expression des canaux Cav3.2 dans les nocicepteurs coliques en contexte pathologique (Marger *et al.* 2011). Par la suite, d'autres études ont montré l'implication des canaux de type T dans des modèles de cystite (Murakami-Nakayama *et al.* 2015) ou de pancréatite (Terada *et al.* 2015).

L'utilisation de souris présentant un KO conditionnel de Cav3.2 spécifiquement dans les fibres C-LTMR, (souris nommées SNS-KO pour « small-diameter neurons specifically ») a permis de mettre en évidence une implication des canaux Cav3.2 dans les sensations de douleur suite à une application de stimulus nociceptif d'ordre mécanique, chimique et thermique (au froid) ; aucune modification nociceptive de la perception du chaud n'a été identifiée. De plus, dans un contexte de douleur neuropathique, l'allodynie mécanique se retrouve diminuée chez ces souris et l'allodynie au froid est totalement supprimée (Francois *et al.* 2015).

**Tableau 4 : Principales études précliniques conduites sur l'implication des canaux calciques voltage-dépendants de type T dans la douleur.**





#### 2.2.4.2. Processus de l'implication des canaux Cav3.2 dans la nociception

Il a été tout d'abord considéré que les canaux de type T jouaient un rôle dans la régulation de l'excitabilité cellulaire avec une action localisée au niveau des terminaisons des fibres afférentes primaires des nocicepteurs. De récentes études sur cultures cellulaires ont montré une régulation de l'exocytose par les canaux Cav3.2 de façon indépendante du potentiel d'action (Weiss *et al.* 2012). De plus, la neurotransmission excitatrice synaptique dans la moelle épinière serait régulée par les canaux Cav3.2 présynaptiques (Jacus *et al.* 2012). Ainsi, le rôle des canaux Cav3.2 dans les processus nociceptifs serait localisé à la fois au niveau central et au niveau périphérique des terminaisons des neurones afférents primaires.

Il a également été mis en évidence un rôle pronociceptif des canaux Cav3.2 au niveau supraspinal par des études démontrant une activation de ces canaux dépendante de la protéine ERK (« Extracellular signal-regulated kinase ») dans le noyau antérieur du thalamus paraventriculaire conduisant au développement d'une hyperalgésie chronique (Chen, Liu, and Chang 2010).

La surexpression fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans les neurones sensoriels en contexte pathologique peut être impliquée dans l'hyperexcitabilité cellulaire et la neurotransmission excessive au niveau des terminaisons périphériques et spinales des nocicepteurs. Cette augmentation serait due en partie à une augmentation de la transcription des canaux Cav3.2, impliquant des facteurs de transcription tels que Erg1 (Mamet *et al.* 2014) et pourrait également être induite par une augmentation du trafic du canal à la membrane plasmique impliquant des mécanismes de déubiquitination coordonnés par la déubiquitinase USP5 (Garcia-Caballero *et al.* 2014; Gadotti *et al.* 2015). Une augmentation de l'activité du canal peut impliquer des mécanismes de modulation *via* la Protéine Kinase C (PKC) (Park *et al.* 2006) et/ou des mécanismes de régulation rédox orchestrés par les protéines S-nitrosylées (Lee *et al.* 2013).

Au travers de ce chapitre nous avons mis en évidence le rôle crucial des canaux calciques voltage-dépendants de type T, tout particulièrement les canaux Cav3.2, dans le développement et le maintien de la douleur chronique. Dans le chapitre suivant, nous décrirons des pathologies présentant une douleur chronique, et pour lesquelles l'implication des canaux Cav3.2 a été jusqu'à présent peu étudiée. Dans une première partie nous aborderons le cas des douleurs viscérales non inflammatoires avec le SII, et inflammatoire avec les MICI. Dans une seconde partie, la PR, pathologie d'origine inflammatoire somatique, sera développée.

---

## Etude bibliographique

---

### II. Pathologies ciblées, impliquant une douleur chronique

---

---

## A. Les troubles intestinaux

---

### 1. Le syndrome de l'intestin irritable

#### 1.1. Epidémiologie

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble fonctionnel intestinal caractérisé par une douleur abdominale récurrente associée à des perturbations du transit intestinal. Cette maladie chronique affecte le tractus gastro-intestinal inférieur. Elle survient le plus souvent entre 15 et 65 ans, avec une prévalence supérieure chez la femme (*sex ratio* de 2 :1). Dans les pays développés, on estime entre 7 et 14% l'incidence de la maladie (Lovell and Ford 2012; Dixon *et al.* 2016; Mearin *et al.* 2016).

#### 1.2. Manifestations cliniques

Cette pathologie est caractérisée par une douleur abdominale ainsi qu'un inconfort digestif associé à un fonctionnement anormal de l'intestin se manifestant par des diarrhées et/ou des constipations. Un ballonnement ainsi qu'une distension abdominale sont également fréquemment associés tout comme des symptômes extra-digestifs, tels que la migraine, la fatigue ou l'anxiété (Drossman *et al.* 2002). A l'échelle tissulaire, aucune atteinte viscérale biochimique ou inflammatoire n'est constatée. Seuls des signes d'inflammation à bas bruit, associée à une augmentation du taux de protéine C réactive (CRP) sanguine, apparaissent (Drossman *et al.* 2002).

#### 1.3. Diagnostic

L'utilisation de critères d'inclusion tels que les critères de Rome IV, établis par un groupe de travail dont le but est de standardiser les critères de diagnostic caractéristiques du SII, sont indispensables à la pose du diagnostic.

Les critères de Rome IV (Mearin *et al.* 2016; Drossman 2016) sont les suivants : douleur abdominale ou inconfort digestif (sensation abdominale désagréable non douloureuse) survenant au moins un jour dans les 3 derniers mois associée avec au moins 2 de 3 critères suivants :

- amélioration par la défécation ;
- survenue associée à une modification de la fréquence des selles ;
- survenue associée à une modification de la consistance des selles.

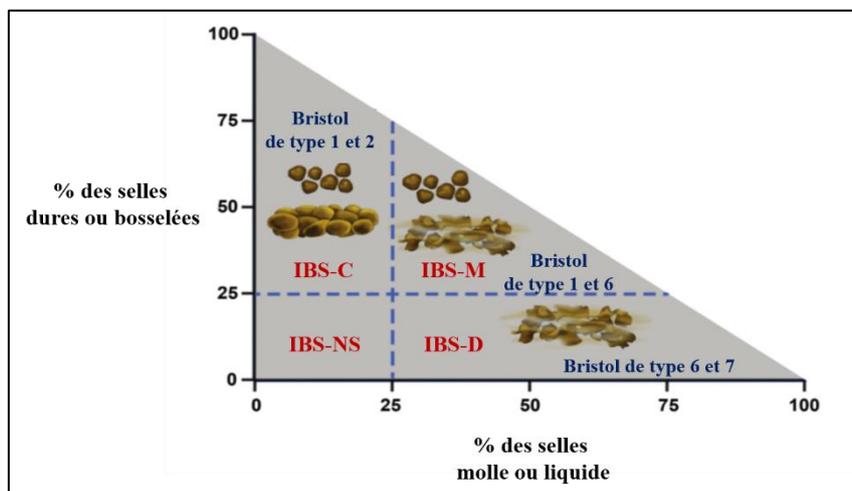
Le début des symptômes doit dater d'au moins 6 mois.

Le type du trouble de transit est défini par la consistance des selles, qui est évaluée grâce à l'échelle de Bristol (Lewis and Heaton 1997) (**Figure 17**) et par la fréquence des selles. Cela permet de distinguer différentes classes de SII (Mearin *et al.* 2016) (**Figure 18**) :

- constipation prédominante (SII-C) ;
- diarrhée prédominante (SII-D) ;
- alternance diarrhée et constipation, catégorie dite « mixte » (SII-M) ;
- et des catégories dites « non spécifiées », avec une absence de suffisamment de critères pour correspondre aux autres classes.



**Figure 17 : Echelle de Bristol, (d'après Heaton *et al.* 1992).**



**Figure 18 : Présentation schématique des différents sous-type de SII en fonction de la fréquence et de la consistance des selles (d'après Lacy *et al.*, 2016).**

Aucun examen biologique ou morphologique ne permet le diagnostic de la maladie, et le recours à des explorations plus ou moins invasives est contesté. Ce type d'analyse peut néanmoins être appliqué en cas de présence de signes cliniques d'alarme, notamment si le patient est âgé de plus de 50 ans, en cas de présence de sang dans les selles, d'anémie ou d'amaigrissement, afin d'exclure les pathologies

organiques ayant une symptomatologie proche de celle du SII (les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), les cancers colorectaux, les troubles thyroïdiens, les maladies parasitaires, les infections gastro-intestinales...).

Ces examens consistent à effectuer des tests sérologiques ou fécaux, en vue de réaliser (American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel *et al.* 2009; Ford, Chey, *et al.* 2009; Ozdil *et al.* 2011; Ford, Talley, *et al.* 2009) :

- une numérotation de formule sanguine (NSF) pour identifier une anémie ;
- un dosage de la CRP pour rechercher la présence d'inflammation ;

En cas de SII-D, doivent être réalisés :

- un dosage sanguin de la thyroïdostimuline (TSH) pour éliminer une hyperthyroïdie ;
- un dosage des anticorps IgA anti-transglutaminases pour éliminer une maladie cœliaque ;
- un examen parasitologique des selles pour exclure une maladie parasitaire ;
- un dosage de calprotectine fécale peut également permettre de distinguer un SII d'un MICI. En effet, les taux sont généralement normaux chez un patient SII, modérément élevés en cas de MICI en phase de rémission et plus élevés en cas de MICI en phase de poussée ;
- un test respiratoire à l'hydrogène pour diagnostiquer une intolérance au lactose ;
- des biopsies coliques afin d'écarter une colite microscopique ;
- des biopsies duodénales afin d'identifier une maladie cœliaque ou parasitaire.

#### **1.4. Physiopathologie**

Initialement considéré comme un trouble purement moteur, il est maintenant admis que le SII est une pathologie multifactorielle. La présence de troubles de la sensibilité viscérale ainsi qu'un dysfonctionnement des relations bidirectionnelles de l'axe cerveau-intestin peuvent être incriminés. Le rôle du microbiote intestinal dans la pathologie émerge également depuis plusieurs années. Néanmoins, il existe une grande variabilité entre les patients, ce qui rend la caractérisation de la physiopathologie du SII particulièrement difficile.

##### **1.4.1. Troubles de la mobilité gastro-intestinale**

###### **1.4.1.1. Anatomie du tractus digestif**

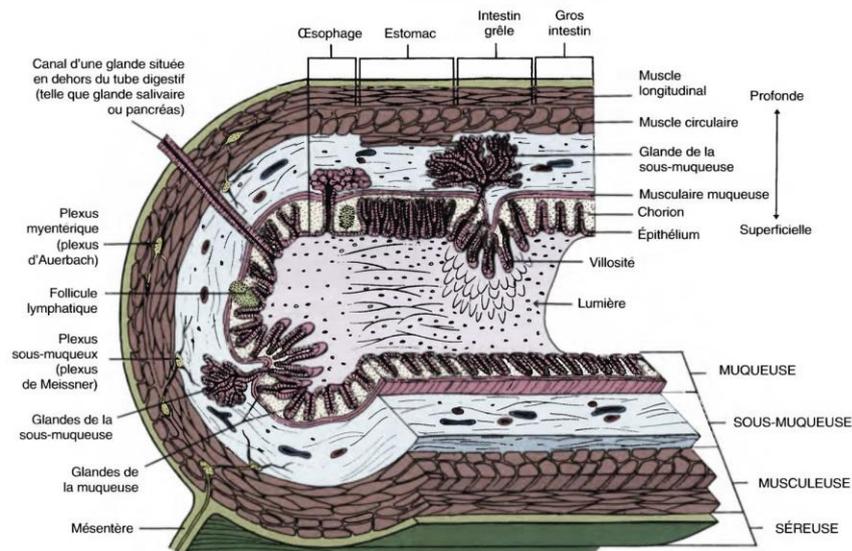
Le tractus digestif comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléum), le gros intestin (*caecum*, côlon et rectum) et l'anus. La paroi du tube digestif possède une structure histologique caractéristique avec 4 tuniques concentriques, structurées de façon variable en fonction des différentes portions du tube digestif (**Figure 19**).

De l'intérieur à l'extérieur, sont retrouvés :

- **la muqueuse** composée de 3 couches successives avec un épithélium monostratifié en contact avec la lumière intestinale, la *lamina propria* aussi appelée chorion, composée d'un tissu conjonctif riche en lymphocytes et polynucléaires éosinophiles, et la *muscularis mucosae* (musculaire muqueuse) formée par deux couches musculaires (une longitudinale et l'autre circulaire) ;
- **la sous-muqueuse** composée d'un tissu conjonctif lâche avec des fibres de collagène et des fibres élastiques, permettant le glissement de la couche muqueuse par rapport à la musculuse. Elle contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les plexus sous-muqueux, appelés plexus de Meissner qui sont constitués d'un réseau de fibres musculaires appartenant au système nerveux entérique ;
- **la musculuse** constituée de deux couches de fibres musculaires lisses, une couche longitudinale externe et une couche circulaire interne, entre lesquelles s'insèrent les plexus nerveux myentériques, appelés plexus d'Auerbach qui forment un second réseau issu du système nerveux entérique et qui contrôlent les contractions de ces fibres ;
- **la séreuse** composée de cellules mésothéliales, adhérant à la couche musculuse.

L'intestin grêle est subdivisé en 3 parties avec le duodénum, le jéjunum et l'iléum. La paroi de l'intestin grêle a une structure particulière avec la présence d'une amplification de la surface de la muqueuse avec une surface totale atteignant 200 m<sup>2</sup>. Cette augmentation de la surface est obtenue par la présence de hauts pics circulaires au niveau de la muqueuse, appelés valvules conniventes. Sur ces pics, se trouvent des expansions d'environ 1 mm de hauteur, appelées villosités, ainsi que des invaginations plus courtes nommées cryptes de Lieberkühn. De plus, les cellules de la muqueuse possèdent à leur surface un grand nombre de petits appendices de cytoplasme, appelées microvillosités, formant une bordure dite en brosse, participant à l'augmentation de la surface de l'épithélium.

Le gros intestin comprend le *caecum* et le côlon qui lui-même est divisé en 4 parties : côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant et côlon sigmoïde. Tout comme l'intestin grêle, il présente des caractéristiques particulières au niveau de la paroi. On ne trouve plus de villosités mais exclusivement des invaginations particulièrement profondes : les cryptes du gros intestin.



**Figure 19 : Structure histologique des tissus de la paroi du tube digestif**

<http://www.casimages.com/i/13011806324914676010773313.jpg.html>

De la partie la plus basse de l'œsophage jusqu'au gros intestin, une structure histologique de la paroi du tube digestif est caractéristique et commune avec 4 tuniques : la muqueuse, la sous muqueuse, le musculature et la séreuse.

#### 1.4.1.2. Mobilité gastro-intestinale

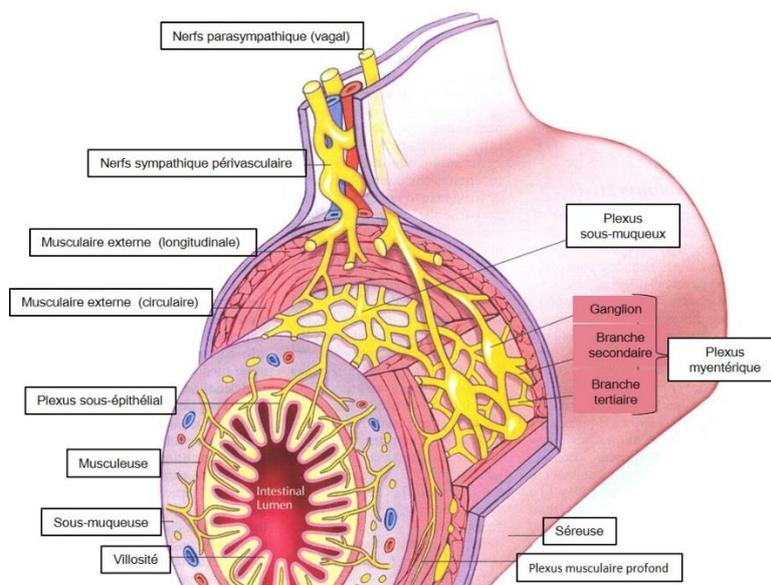
La mobilité gastro-intestinale est régie par deux réseaux nerveux : un réseau intrinsèque, le système nerveux entérique (SNE) localisé dans les *plexi* de Meissner (sous-muqueux) et d'Auerbach (myentérique) (**Figure 20**), et un réseau extrinsèque apporté par les fibres nerveuses et connectant la paroi intestinale au système nerveux central (SNC) (Goyal and Hirano 1996). Le SNE, aussi appelé système nerveux digestif autonome, contrôle l'alimentation sanguine et les mouvements du tractus gastro-intestinal ainsi que la tonicité des sphincters et la sécrétion des sucs digestifs. Les *plexi* de Meissner sont impliqués dans les sécrétions gastro-intestinales et le contrôle du débit sanguin local. Les plexi d'Auerbach contiennent des neurones sensoriels qui innervent les muscles lisses circulaires, les ganglions myentériques et sous-muqueux ainsi que les cellules épithéliales. Ils régulent la mobilité intestinale en modulant la genèse, la fréquence et la propagation des contractions. Un réseau d'interneurones permet une communication entre ces deux *plexi*, assurant une coordination des réflexes viscéraux et une adaptation des réponses intestinales aux *stimuli* provenant de la lumière intestinale (Goyal and Hirano 1996).

Le système nerveux extrinsèque module la régulation spinale et supra-spinale de la fonction digestive ainsi que de la transmission de l'information sensitive provenant du tractus gastro-intestinal. Ceci fait intervenir deux types d'afférences (Holzer 2001) :

- les afférences vagues, qui possèdent leurs corps cellulaires dans les ganglions nodaux et qui innervent la partie supérieure du tube digestif et une partie de l'intestin grêle et projettent directement au

niveau du tronc cérébral. Ces afférences sont impliquées dans la détection de stimulations non nociceptives ;

- les afférences spinales, splanchniques et pelviennes, qui possèdent leurs corps cellulaires dans les DRG, qui innervent le tube digestif supérieur ainsi que l'intestin grêle, le côlon et les organes urogénitaux, et qui projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière puis les centres supra-spinaux. Ces afférences sont constituées majoritairement de fibres à haut seuil d'activation et participent à la transmission d'informations douloureuses.



**Figure 20 : Système nerveux entérique, d'après Gershon *et al.*, 1999**

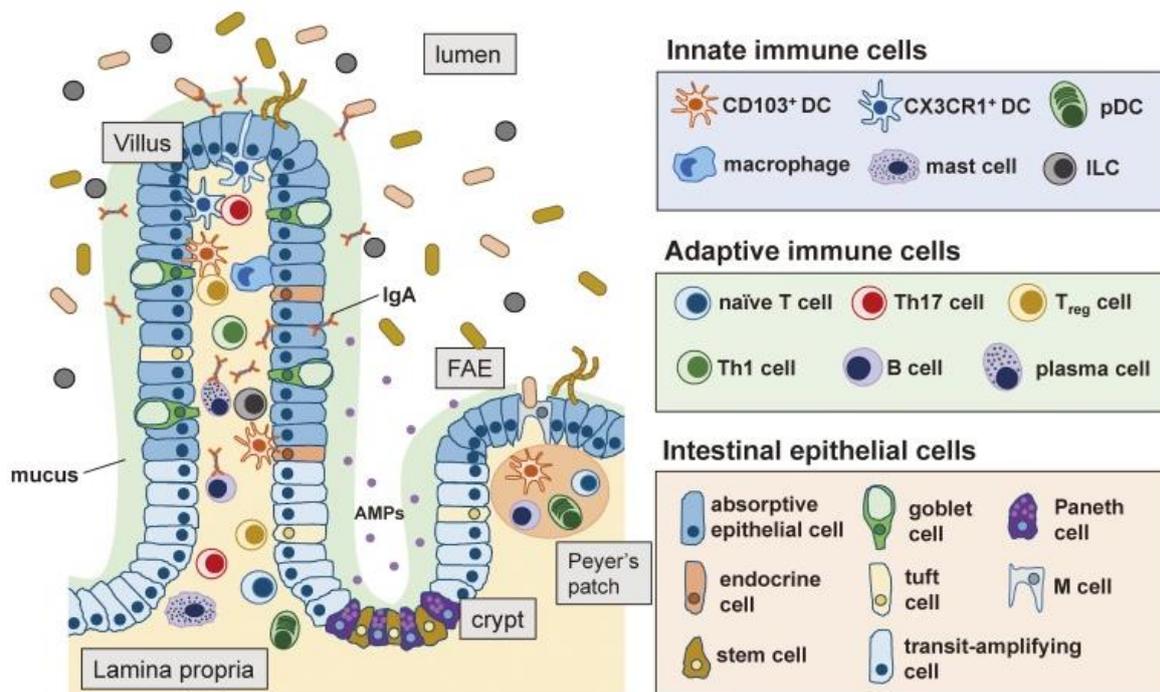
Des troubles de la motricité sont rencontrés dans le SII au niveau de l'intestin grêle des patients, particulièrement de ceux présentant un SII-D. Ces anomalies motrices sont à l'origine de crampes abdominales. Elles apparaissent aussi bien en période post-prandiale qu'entre deux repas et se caractérisent par une hyperactivité motrice disparaissant pendant le sommeil nocturne, des contractions iléales de grande amplitude se propageant jusqu'au *caecum* et des contractions jéjunales. Des perturbations motrices coliques sont également présentes, bien que moins prononcées. Ces troubles apparaissent principalement après la prise d'un repas avec une réponse motrice recto-sigmoïdienne accrue et/ou prolongée pour les patients souffrant de SII-D. Au contraire, une réponse anormalement faible peut être rencontrée dans le SII-C (Ropert and Bouguen 2009). Les perturbations de la mobilité gastro-intestinale ont également des répercussions sur la capacité d'évacuation des gaz digestifs induisant une rétention intestinale des gaz, à l'origine de sensation de distension abdominale et de ballonnement chez les patients (Azpiroz and Malagelada 2005).

### 1.4.2. Inflammation

La muqueuse intestinale est constituée d'une très large surface d'échange avec l'extérieur, nécessaire notamment à l'absorption des nutriments. Le système immunitaire intestinal permet de surveiller les nombreux micro-organismes qui sont au contact de la muqueuse intestinale, en discriminant les allergènes bénéfiques de ceux qui sont pathogènes. Le système immunitaire constitue ainsi le système de défense de l'organisme envers une large variété d'agents étrangers, notamment infectieux et potentiellement nocifs. On distingue deux types de réponses de défense : la réponse innée et la réponse adaptative. La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense, c'est une réponse constitutive, d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène et non adaptative. Elle fait intervenir de nombreux types de cellules telles que les cellules épithéliales, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules NK (« Natural Killer »). Cette réponse est déclenchée par la reconnaissance de motifs moléculaires bactériens grâce à des récepteurs comme les récepteurs transmembranaires « Toll-like » (TLR) présents à la surface des cellules, ou les récepteurs intracytoplasmiques NOD (« Nucleotide Oligomerization Domain »). Ils vont permettre l'activation de voies de transduction et la transcription de gènes, aboutissant à la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'agents antimicrobiens. Cela conduit à la phagocytose des cellules infectées et des micro-organismes, la présentation de la bactérie aux lymphocytes T (LT) et le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse immunitaire adaptative (ou acquise), est quant à elle hautement spécifique de l'antigène et confère une immunité de longue durée (mémoire). Des cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentent la bactérie au LT par l'intermédiaire de son récepteur spécifique, le TCR. Ceci induit une activation et une différenciation des LT en fonction du type de signal transmis par la CPA (en fonction du type d'antigène). Il s'en suit une production d'effecteurs de type cytokines et anticorps (Okumura and Takeda 2016).

Au niveau de la muqueuse intestinale, les sites effecteurs sont composés de lymphocytes disséminés tout le long de l'épithélium et de la *lamina propria*. Les organes lymphoïdes responsables de l'induction de la réponse immunitaire (sites inducteurs) sont essentiellement les plaques de Peyer, les nodules mésentériques et les follicules lymphoïdes isolés (**Figure 21**).

Une inflammation discrète mais chronique de la muqueuse est présente dans le SII. Même en l'absence d'inflammation, la muqueuse des patients contient une présence accrue de mastocytes et de lymphocytes T et B (Collins *et al.* 2009). Cette inflammation de faible degré pourrait avoir un rôle d'initiateur, ouvrant la voie à l'installation de mécanismes physiopathologiques.



**Figure 21 : Les cellules du système immunitaire intestinal :** Les cellules immunitaires innées comprennent les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les cellules lymphoïdes innées (ILC) ; les cellules immunitaires adaptatives sont constituées des cellules T, cellules B et cellules plasmatisques ; les cellules épithéliales intestinales sont divisées en différents sous-types, les cellules épithéliales absorbantes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules endocrines, les cellules M et les cellules souches (D'après Okumura and Takeda 2016).

### 1.4.3. Hypersensibilité colique

L'hypersensibilité viscérale est une perception exacerbée de la douleur dans un organe interne. Elle est retrouvée chez les patients souffrant de SII, principalement les patients présentant un SII-D. En effet, l'application d'un stimulus nociceptif par gonflement d'un ballonnet au niveau du rectum est ressentie de façon plus intense chez les patients SII comparativement aux sujets contrôles. Cette hypersensibilité viscérale a tout d'abord été mise en évidence dans une étude de Mertz et collaborateurs en 1995, avec une perception rectale altérée chez 94% des patients souffrant de SII (Mertz *et al.* 1995). Une étude de l'équipe du docteur Azpiroz en 2007 a évalué l'effet de distensions colorectales par l'utilisation d'un barostat électronique chez des patients atteints de SII et des individus sains contrôles (Azpiroz *et al.* 2007). Les résultats indiquent des seuils douloureux plus faibles chez 90% des patients SII avec des seuils de 28 mmHg comparativement à des seuils de 40 mmHg chez les patients sains.

Dans cette étude, l'hypersensibilité colique se manifeste par 3 critères (Azpiroz *et al.* 2007) :

- une diminution des seuils de perception de la douleur chez 90% des patients SII ;
- une sensibilisation suite à une répétition des distensions : seuils de perception de la douleur de 40 et 41 *versus* 33 et 26 mmHg chez les patients contrôles et les patients SII, respectivement pour le premier et le second set de distensions ;
- une douleur référée à des sites autres que rectaux chez 83% des patients SII comparativement à 10% chez les patients sains.

Ces observations mettent en évidence une dysrégulation du système sensoriel chez les patients SII.

Cette partie ainsi que les mécanismes mis en jeu seront détaillés dans le paragraphe 3 de ce chapitre.

## 1.5. Etiologies

Comme évoqué, les étiologies du SII sont multifactorielles. Une mobilité gastro-intestinale anormale, une inflammation à bas bruit ainsi qu'une hypersensibilité viscérale, peuvent être à l'origine des symptômes. Des facteurs génétiques, environnementaux ou psychologiques peuvent être responsables de ces différents dysfonctionnements (Camilleri 2012).

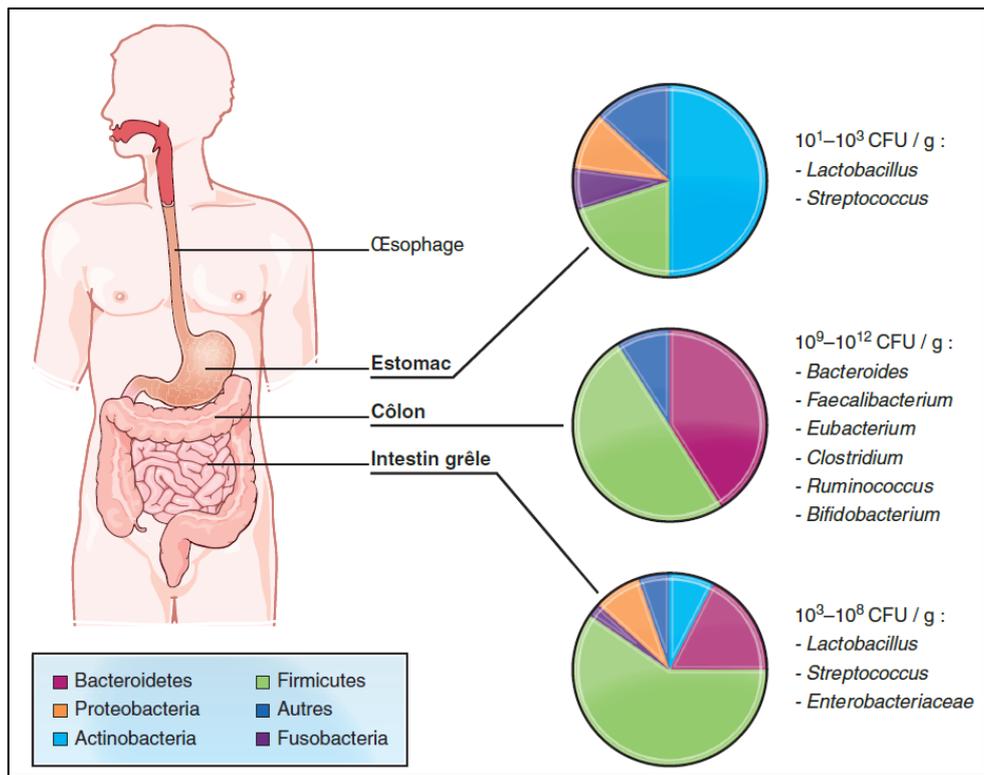
### 1.5.1. Facteurs génétiques

Des études sur des jumeaux ont montré une prévalence familiale de la maladie. En effet, le risque de développer un SII est 2 fois plus élevé chez les jumeaux monozygotes comparativement aux jumeaux dizygotes (Levy *et al.* 2001). De plus, le risque est augmenté d'un facteur 3 pour un individu si un parent est lui-même atteint (Saito and Talley 2008). Concernant les polymorphismes génétiques, une quinzaine de gènes ont pu être mis en évidence dans cette pathologie. La plupart sont impliqués dans la régulation du système sérotoninergique, d'autres dans la signalisation adrénergique ou dans l'inflammation (Makker, Chilimuri, and Bella 2015) .

### 1.5.2. Facteurs environnementaux

#### 1.5.2.1. Dysbiose intestinale

La flore, ou microbiote intestinal, correspond à l'ensemble des micro-organismes qui colonisent le tube digestif humain. Ce dernier est composé d'un écosystème complexe de  $10^{14}$  bactéries, soit 10 fois plus que le nombre de cellules présentes dans le corps humain. Des études de séquençage estiment entre 3,3 et 4,9 millions le nombre de gènes constituant le génome du microbiote, soit 150 fois celui du génome humain (23 000 gènes). A ce jour plus de 400 espèces différentes ont été identifiées, avec 4 grands *phyla* bactériens majoritaires: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (Thursby and Juge 2017) (**Figure 22**).



**Figure 22 : Composition et densité du microbiote intestinal.** D’après « Les fondamentaux de la pathologie digestive », chapitre 13, Editions Elsevier-Masson (2014).

Le rôle de ce microbiote intestinal est varié, il exerce une fonction :

- de métabolisme et de nutrition, en participant à la digestion des sucres, des lipides et des protéines et en produisant des vitamines ainsi que de l’énergie pour le tube digestif, et par son action sur les produits de sécrétion endogène ;
- de défense anti-infectieuse au niveau du tube digestif par un effet barrière et par une implication dans la maturation du système immunitaire intestinal (Thursby and Juge 2017).

Une dysbiose, c’est-à-dire un déséquilibre de la flore microbienne colique pourrait être à l’origine de l’inflammation chronique rencontrée dans le SII. Ces modifications, observées à partir de l’examen de prélèvements fécaux de patients atteints de SII, consistent généralement en une augmentation des bactéries de type *Enterobacter* et une diminution de la population de *Bifidobacterium* spp (Collins et al. 2009). Ce changement qualitatif dans la composition du microbiote peut induire un déséquilibre de la balance microbienne, pouvant être à l’origine de l’activation d’une réponse immunitaire intestinale.

**1.5.2.2. Infections**

Une infection par des organismes pathogènes conduisant à des gastro-entérites, peut être à l’origine du développement d’un SII. En effet, entre 3 et 36% des personnes souffrant de SII ont développé la

maladie suite à une gastro-entérite aiguë (Thabane and Marshall 2009). Ce type de SII est défini comme SII-post infectieux (SII-PI). Les bactéries incriminées sont principalement *Helicobacter pylori*, les bactéries du genre *Campylobacteria*, *Salmonella* ou *Shigella*. Des virus tels que les Rotavirus, les Adénovirus ou Calicivirus ainsi que des parasites tels que *Giardia lamblia* ou *Blastocystis hominis*, peuvent également être responsables de ces gastro-entérites (Spiller and Garsed 2009). L'invasion de ces pathogènes au niveau de la muqueuse intestinale peut induire une perturbation du microbiote de l'hôte et une augmentation de la perméabilité intestinale.

### 1.5.3. Facteurs psychologiques

Concernant les facteurs psychologiques, une présence de comorbidités avec des maladies psychiatriques, telles que la dépression ou des troubles anxieux, est fréquemment rencontrée chez les patients SII (Levy *et al.* 2006). De plus, des stress post-traumatiques ou chroniques, notamment intervenant lors de l'enfance, en cas d'abus physiques ou sexuels, mais également d'abandons, sont fortement liés à l'apparition des troubles fonctionnels à l'âge adulte (Whitehead *et al.* 1992). Néanmoins, le rôle d'un stress intense comme facteur initiateur ou aggravant de la maladie est discuté.

## 1.6. Prise en charge du patient SII

Les traitements visent à diminuer l'intensité des symptômes et/ou la fréquence de leur survenue, et à améliorer la qualité de vie du patient.

### 1.6.1. Prise en charge médicamenteuse

Le **tableau 5** décrit les principaux traitements pharmacologiques utilisés pour le SII et leurs principaux effets indésirables.

#### 1.6.1.1. Troubles du transit

Afin de soulager les troubles du transit, les traitements visant à améliorer la **constipation**, en cas de SII-C, reposent sur l'utilisation de laxatifs, d'antagonistes sérotoninergiques et de dérivés de la prostaglandine E2.

Les laxatifs osmotiques ramollissent les selles par un appel d'eau dans l'intestin permettant ainsi une amélioration de la consistance et de la fréquence des selles. Ces substances ont un mode d'action purement physique : elles ne sont pas absorbées par l'organisme et sont excrétées sous forme inchangées. Les éventuels effets-indésirables sont des ballonnements et des flatulences.

Les laxatifs stimulants peuvent également être prescrits. Ils augmentent la motricité de l'intestin. Ce type de traitement doit toujours être de courte durée (pas plus de 8 à 10 jours), une prolongation pouvant entraîner une dépendance et des troubles intestinaux graves (Camilleri and Boeckstaens 2017 ; Holzer 2001 ; Jackson *et al.* 2000).

Parmi les stratégies thérapeutiques impliquant la sérotonine, le tégasérod, un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, indiqué dans le traitement du SII-C (Ford and Vandvik 2010), commercialisé aux USA en 2002, il a été retiré du marché en 2007 en raison de troubles cardiovasculaires graves : angor, accident vasculaire cérébral. L'alosétron, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, a montré lors d'essais cliniques une réduction de la mobilité gastro-intestinale et des douleurs abdominales (Spiller and Garsed 2009), mais il n'a jamais été mis sur le marché en raison d'effets indésirables tels que constipation et risque d'ischémie colique. Le prucalopride, un agoniste sélectif à forte affinité des récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, n'a montré aucun effet indésirable cardiaque (Camilleri *et al.* 2008). Il stimule la mobilité colique et améliore considérablement la fréquence des selles. Ce médicament est indiqué dans le traitement symptomatique de la constipation chronique de l'adulte. Enfin, le lubiprostone, un dérivé de la prostaglandine E1 et activateur de canal chlore et commercialisé aux Etats-Unis, induit un effet sécrétoire dans la lumière intestinale (entrée d'eau, de sodium et de chlore) permettant une amélioration de la consistance et fréquence des selles, des douleurs abdominales et des ballonnements. Il est également indiqué dans le traitement symptomatique de la constipation chronique de l'adulte (Drossman *et al.* 2009).

Toujours en vue de soulager les troubles du transit, cette fois-ci de la **diarrhée**, en cas de SII-D, les traitements reposent sur l'utilisation d'anti-diarrhéiques tels que le lopéramide qui agit en ralentissant le transit intestinal et en diminuant les sécrétions intestinales. Ce médicament permet ainsi d'augmenter la consistance des selles et d'en réduire la fréquence (Ford and Vandvik 2010).

Des antibiotiques à large spectre comme la rifaximine, efficace contre la plupart des bactéries aérobies et anaérobies à Gram positif et négatif, et indiqués dans le traitement de la diarrhée des voyageurs ou des encéphalopathies hépatiques, ont montré une amélioration des symptômes chez des patients SII-D et SII-M (Tack 2011).

#### **1.6.1.2. Douleurs abdominales**

La prise en charge thérapeutique de la douleur abdominale comprend l'utilisation d'**antispasmodiques** qui relâchent les muscles du tube digestif et des voies biliaires. Ce type de médicament soulage les spasmes douloureux d'origine digestive en induisant un relâchement des muscles lisses (Ford and Vandvik 2010). On distingue les anticholinergiques qui agissent en bloquant l'activité du système nerveux parasympathique et les musculotropes avec une action directe sur la musculature lisse.

Le citrate d'alvérine (Météospasmyl®) est un médicament associant 2 principes actifs, le citrate d'alvérine et la siméthicone. Il exerce une action antispasmodique au niveau des cellules musculaires lisses où il réduit les contractions du grêle induites par les stimulations afférentes parasympathiques mais également une action anti-nociceptive viscérale *via* une action antagoniste sur les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> de la sérotonine. Des essais cliniques ont démontré une efficacité du Météospasmyl® similaire à

l'action de médicaments antispasmodiques de référence, chez des patients atteints de SII (Wittmann *et al.* 2010).

La montmorillonite beidellitique (BEDELIX®) est une argile naturelle dont l'efficacité sur la douleur abdominale et l'inconfort digestif a été démontrée chez des patients SII-C (Ducrotte *et al.* 2005).

Une autre catégorie de médicament peut être utilisée dans le SII, il s'agit des **antidépresseurs**. Les antidépresseurs tricycliques inhibent la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine. Ils ont montré une action bénéfique sur les douleurs abdominales et la régulation du transit intestinal et peuvent également être utiles en cas de comorbidités psychiatriques associées (Ford and Vandvik 2010; Ford, Talley, *et al.* 2009; Jackson *et al.* 2000; Lackner *et al.* 2004). Ces traitements sont utilisés à des posologies moindres que celle employées pour le traitement de la dépression. Néanmoins, ils sont à l'origine d'importants effets indésirables tels que somnolence ou insomnie, maux de tête, vertiges, nausées, sécheresse buccale, constipation. Ainsi, leur utilisation est plus indiquée en cas de SII-D. Des antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine peuvent également être utilisés ; ces médicaments améliorent le bien-être général du patient et peuvent avoir un effet favorable sur les nausées, insomnies ou la perte de poids, symptômes pouvant être rencontrés dans le SII. Comme les antidépresseurs tricycliques, cette classe d'antidépresseurs entraîne des effets indésirables de type somnolence ou insomnie, maux de tête, vertiges, nausées, sécheresse buccale auxquels se rajoute la diarrhée, préconisant ce type de traitement chez le patient SII-C.

La sérotonine, neurotransmetteur libéré par les cellules entérochromaffines, a des effets périphériques péristaltiques, sécrétoires, vasculaires et nociceptifs. Les médicaments agissant sur les récepteurs de la sérotonine présentent ainsi un intérêt au niveau digestif, et ont été particulièrement étudiés dans le traitement du SII. Un **antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>**, l'alosétron, bloquant la transmission du message sensitif et ralentissant le transit, particulièrement intéressant dans le SII-D, a été développé. Malgré une efficacité supérieure au placebo chez des femmes atteintes de SII, le développement du médicament a été stoppé à cause de son efficacité incertaine chez les hommes et de la survenue de plusieurs cas de colites ischémiques imputables au médicament (Spiller and Garsed 2009).

Le cilansétron, un autre antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, est en phase 3 d'évaluation clinique pour le traitement du SII-D. Plusieurs études ont montré que l'administration de cilansétron permettait de diminuer de manière significative les douleurs et l'inconfort abdominal, améliorait le transit et la qualité de vie des malades quel que soit leur sexe, sans effet secondaire grave (Stacher 2007).

Une deuxième classe médicamenteuse ciblant les récepteurs de la sérotonine est représentée par les **agonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub>**, avec notamment le tégasérod avec une efficacité dose dépendante sur l'amélioration de la sensibilité viscérale, en stimulant parallèlement le péristaltisme. Comme évoqué précédemment, ce médicament a été retiré du marché en 2007. Le cisapride, autre agoniste des récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, a également été retiré du marché en raison des troubles du rythme ventriculaire de type torsades de pointe dues à un allongement de l'espace QT qu'il induisait. Un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine à forte affinité, le prucalopride (RESELOR®), a été mis sur le marché en 2009 dans le traitement symptomatique de la constipation chronique chez les adultes (Camilleri *et al.* 2008).

Les **antiépileptiques**, par leur action centrale peuvent être utilisés dans le traitement de la douleur chronique. La prégabaline a montré une efficacité supérieure au placebo et une réduction de l'hypersensibilité viscérale à la distension (Houghton *et al.* 2007). Néanmoins, ce médicament présente d'importants problèmes de tolérance.

Des troubles du sommeil sont fréquemment rencontrés dans le SII. Aussi, l'usage de la **mélatonine**, régulateur du sommeil, permettrait également une régulation de la sensibilité du tube digestif ainsi qu'une amélioration de la motricité.

**Tableau 5 : Les principaux médicaments actuellement disponibles dans le traitement du SII.**  
D'après <https://eurekasante.vidal.fr/maladies/estomac-intestins/syndrome-colon-irritable.html?pb=traitements>

Laxatifs osmotiques *		Antispasmodiques musculotropes *	
Lactulose	DUPHALAC	Charbon activé/ Papavérine chlorhydrate	ACTICARBINE
	LAXARON	Mébévérine chlorhydrate	DUSPATALIN
	MELAXOSE		MEBEVERINE ZENTIVA
	TRANSULOSE	Phloroglucinol dihydrate	METEOXANE
Lactitol	IMPORTAL		PHLOROGLUCINOL
Macrogol	CASENLAX	Pinavérium bromure	SPASMOCALM
	FORLAX		DICETEL
	MOVICOL	Triméthylphloroglucinol	PINAVERIUM
	TRANSIPEG		SPASFON
Pentaérythritol	AUXITRANS	Trimébutine maléate	DEBRICALM
Sorbitol	HÉPARGITOL		DEBRIDAT
	SORBITOL RICHARD		TRANSACALM
Laxatifs de lest		Siméticone/ Alvérine citrate	METEOSPASMYL
Ispaghul	SPAGULAX		DOLOSPASMYL
Psyllium	PSYLLIA	Antispasmodiques anticholinergiques	
	PSYLLIUM LANGLEBERT	Clidinium bromure/Chlordiazépoxyde	LIBRAX
Sterculia	NORMACOL	Antidépresseurs Tricycliques *	
Laxatifs stimulants		Duloxétine	CYMBALTA
Aloès	IDÉOLAXYL	Milnacipran	DULOXETINE
	Bisacodyl		CONTALAX
	DULCOLAX	Venlafaxine	MILNACIPRAN
Bourdaïne	DRAGÉES FUCA		EFFEXOR
		DRAGÉES VÉGÉTALES REX	VENLAFAXINE
Docusate de sodium	JAMYLÈNE	Antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine *	
Ispaghul	AGIOLAX	Citalopram	CITALOPRAM
Magnésium hydroxyde	CHLORUMAGÈNE		SEROPRAM
		MAGNESIE SAN PELLEGRINO	Escitalopram
Picosulfate de sodium	FRUCTINES au picosulfate de sodium	SEROPLEX	
Séné	BOLDOFLORINE	Fluoxétine	FLUOXETINE
	GRAINS DE VALS		PROZAC
	HERBESAN	Fluvoxamine	FLOXYFRAL
	MODANE		FLUVOXAMINE
	SANTANE		DEROXAT
Sennosides calciques	YERBALAXA	Paroxétine	DIVARIUS
	PURSENNIDE		PAROXETINE
Antidiarrhéiques : ralentisseurs du transit intestinal *		Sertraline	SERTRALINE
Lopéramide	ARESTAL		ZOLOFT
	DIARÉTYL	Agoniste sélectif des récepteurs de la sérotonine (5-HT4)	
	DIASTROLIB	Prucalopride	RESOLOR
	ERCESTOP	* Existe aussi en médicament générique	
	GASTROWELL LOPÉRAMIDE		
	IMODIUM		
INDIARAL			
LOPÉRAMIDE			
Antibiotique à large spectre			
Rifaximine	TIXTAR		

### 1.6.2. Prise en charge non médicamenteuse

Une présence de dysbiose au niveau du microbiote intestinal dans le SII ayant été rapportée, l'utilisation de **probiotiques** pourrait être bénéfique.

Des souches de bactéries telles que *Bifidobacterium infantis* 35624 ont montré une diminution des douleurs abdominales, des ballonnements et des difficultés d'exonération ainsi qu'une normalisation du transit intestinal chez les patients atteints de SII, tous types confondus (O'Mahony *et al.* 2005) . La prise de probiotiques *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 accélérerait le transit intestinal et augmenterait la fréquence des selles chez le patient SII-C. Certaines souches très spécifiques comme

*Bifidocacteruim lactis* DN-173 010 et le « cocktail » probiotique VSL#3 ont également montré une efficacité clinique sur les ballonnements, la distension abdominale et la flatulence. Toutefois, l'efficacité de ce type de traitement serait très variable en fonction de l'individu et de la souche de bactérie utilisée ('World Gastroenterology Organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics' 2009).

Pratiquer une **activité physique** peut favoriser une diminution de la sévérité des symptômes (Johannesson *et al.* 2011). Des traitements alternatifs comme l'**hypnose** (Webb *et al.* 2007) ont montré une efficacité au cours d'études cliniques. Les patients SII expriment majoritairement une association de leurs symptômes avec leur alimentation (Park and Camilleri 2006), avec notamment une aggravation de leurs symptômes suite à la consommation de certains aliments. C'est pourquoi des pistes thérapeutiques visant à modifier le **régime alimentaire** sont très intéressantes. Ces dernières années, un régime appauvri en FODMAPs, acronyme anglo-saxon signifiant « Fermentables Oligosaccharides Disaccharides Monosacharides And Polyols », a montré une efficacité dans le soulagement des douleurs abdominales, consistance des selles, ballonnements et flatulences chez des patients SII (Gibson 2017), notamment en cas de SII-D. Ce régime consiste en une restriction globale des hydrates de carbone à chaîne courte et des sucres alcool (polyols) présents dans différentes catégories d'aliments (céréales, légumes, légumineuses, produits laitiers, fruits, édulcorants...). Ces composés sont des petites molécules osmotiquement actives, faiblement absorbées dans l'intestin grêle et rapidement fermentées par les bactéries du microbiote et qui peuvent être à l'origine de symptômes fonctionnels tels que des gaz, une distension intestinale ou encore une altération de la mobilité intestinale. Néanmoins, ce type de régime restrictif nécessite une éducation thérapeutique du patient afin d'éviter les carences et reste difficile à suivre à long terme.

Le facteur psychologique joue un rôle important dans le SII. Une prise en charge par **psychothérapie**, mais aussi la pratique d'exercices de relaxation comme le **yoga** ont montré une réelle efficacité pour réduire les symptômes de la maladie (Surdea-Blaga, Baban, and Dumitrascu 2012).

## 2. Les Maladies Inflammatoire Chroniques de l'Intestin, MICI

Les MICI regroupent les pathologies induisant une inflammation chronique du tube digestif et évoluant par phases de poussées inflammatoires entrecoupées de phases de rémissions (Kaistha and Levine 2014). Les deux formes principales sont la Maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH). Dans 10 à 20% des cas de colite, il n'est pas possible de faire la distinction entre une MC et une RCH : on parle alors de colite indéterminée.

### 2.1. Epidémiologie

Environ 1 à 2 millions de personnes sont atteintes de MICI en Europe et aux Etats-Unis avec 70 à 150 cas rapportés sur 100 000 individus (Molodecky *et al.* 2012; Kaistha and Levine 2014). L'apparition d'une MICI survient le plus souvent entre 15 et 30 ans, bien qu'elle puisse survenir à tout âge. Un second pic est observé chez les individus entre 50 et 70 ans. La RCH a une prévalence légèrement plus importante chez l'homme alors que la MC touche plus fréquemment les femmes. Des données épidémiologiques rapportent une atteinte plus marquée des populations des pays développés avec un gradient Nord-Sud (Kaistha and Levine 2014; Sonnenberg, McCarty, and Jacobsen 1991; Shivananda *et al.* 1996).

### 2.2. Manifestations cliniques

Dans la MC, la présence de douleurs abdominales récidivantes, de type crampes, non soulagées par la défécation et accompagnées de diarrhées sanglantes ainsi que de vomissements est caractéristique de la pathologie. A ces symptômes s'ajoutent des ballonnements, un inconfort anal pouvant se manifester par des fistules, des fissures ou des démangeaisons, ainsi qu'une ulcération du tractus digestif et une perte d'appétit (Wilkins, Jarvis, and Patel 2011). La RCH est également caractérisée par la plupart de ces symptômes. Une présence d'hématochésie (correspondant à une émission par l'anus de sang non digéré, pur ou mélangé aux matières fécales) ou un passage de mucus dans les selles, sont des symptômes plus fréquents dans la RCH (Danese and Fiocchi 2011). D'autres symptômes comme les fistules ou les affections péri-anales sont retrouvés exclusivement dans la MC (Wilkins, Jarvis, and Patel 2011).

Des symptômes extra digestifs comme des affections cutané-muqueuses, articulaires, hépatobiliaires, oculaires, urologiques ou des maladies thromboemboliques sont également retrouvées dans les MICI, aussi bien dans la MC ou la RCH (Nikolaus and Schreiber 2007).

D'un point de vue histologique, la MC se caractérise par une affection inflammatoire de la muqueuse transmurale, pouvant toucher tous les segments du tube digestif, avec une atteinte plus fréquente de l'iléon, du côlon et de l'anus. L'inflammation est segmentaire, entrecoupée de zones saines. La RCH

quant à elle, est caractérisée par une inflammation continue de la muqueuse intestinale débutant toujours par le bas du rectum, puis s'étendant progressivement à l'intégralité du côlon, ne touchant cependant ni l'intestin grêle ni l'anus.

La classification de Vienne, modifiée par la suite à Montréal (Satsangi *et al.* 2006) (**Tableau 6**), permet de différencier différentes catégories de MC sur la base de divers critères incluant l'âge du diagnostic, la topographie de l'atteinte inflammatoire et le phénotype de la maladie. De la même façon, une classification prenant en compte l'étendue de l'atteinte inflammatoire ainsi que la sévérité de la maladie a été établie pour la RCH (Satsangi *et al.* 2006).

**Tableau 6. Classifications de Vienne et de Montréal pour la MC et la RCH (D'après Satsangi *et al.* 2006).**

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

### 2.3. Diagnostic

Le diagnostic de la maladie se fait principalement en période de poussée. Cependant, il n'existe pas de présentation clinique classique permettant de caractériser spécifiquement une MICI. En effet, les symptômes varient en fonction de la localisation, de la sévérité, du mode évolutif de la maladie et de la présence ou non, de manifestations extradigestives. Concernant la MC, 45% des patients présentent une localisation de la maladie au niveau de l'iléon et du côlon, 20% uniquement au niveau du côlon, 30% au niveau de l'intestin grêle et 5% au niveau gastroduodéal (Kaistha and Levine 2014). Lorsque l'atteinte est située au niveau de l'intestin grêle, les symptômes sont une malabsorption de type diarrhée non sanglante et intermittente associée à des crampes abdominales, une perte de poids et une anorexie. Lorsqu'uniquement le côlon est touché, une douleur abdominale diffuse avec présence de sang et de mucus dans les selles est retrouvée et est caractéristique d'une atteinte gastroduodénale. Enfin, une atteinte péri-anale sera marquée par une douleur péri-rectale avec un écoulement purulent provenant des fistules (Kaistha and Levine 2014; Nikolaus and Schreiber 2007). Pour la RCH, des diarrhées sanglantes d'intensité variable, des urgences fécales ainsi que des crampes abdominales sont caractéristiques de la maladie. En cas de colites fulminantes avec une extension transmurale des ulcères, le patient peut présenter de la fièvre, une douleur abdominale associée à une diarrhée sévère et des signes de toxémie pouvant aller jusqu'à des péritonites ou des occlusions intestinales (Kaistha and Levine 2014; Nikolaus and Schreiber 2007; Wilkins, Jarvis, and Patel 2011). Aucun test biologique ne permet donc de diagnostiquer avec certitude la MC ou la RCH. Toutefois, des analyses biologiques peuvent permettre de détecter une augmentation des taux de CRP et des polynucléaires neutrophiles sanguins, caractéristique d'un syndrome inflammatoire. Une recherche d'anticorps de type pANCA (anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques avec fluorescence périnucléaire) et ASCA (anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiæ*) peut également permettre d'orienter le diagnostic vers une MICI (Mitsuyama *et al.* 2016). Enfin, la réalisation d'une endoscopie œso-gastro-duodénale et d'une iléo-coloscopie avec biopsies étagées même en territoires apparemment sains, est nécessaire à la confirmation du diagnostic.

Le risque de développer un cancer colorectal est augmenté chez les personnes atteintes de MICI. Il est de 3% et 8%, respectivement 10 ans et 30 ans après le diagnostic de la maladie. Ces chiffres sont très similaires pour la RCH puisqu'ils sont estimés à 2%, 8% et 18%, respectivement à 10, 20 et 30 ans après la découverte de la pathologie puisqu'ils sont estimés à 2%, 8% et 18%, respectivement à 10, 20 et 30 ans après la découverte de la pathologie (Nikolaus and Schreiber 2007).

## 2.4. Physiopathologie

Les MICI se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif. Des troubles de la mobilité ainsi qu'une présence d'hypersensibilité colique responsable de la douleur abdominale sont également rencontrés.

### 2.4.1. Inflammation

Les patients atteints de MICI présentent une activation des réponses immunitaires innées et acquises ainsi qu'une perte de tolérance vis-à-vis des bactéries entériques commensales.

En condition normale (**Figure 23**), la reconnaissance des protéines alimentaires et des bactéries commensales induit la sécrétion de TGF- $\beta$  (« Transforming Growth Factor-bêta ») et de PGE<sub>2</sub> (prostaglandines E<sub>2</sub>) par les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les macrophages. La production de ces cytokines va entraîner une maturation partielle des cellules dendritiques des plaques de Peyer ou de la *lamina propria*. Les cellules dendritiques vont alors migrer vers les ganglions lymphatiques mésentériques où elles vont libérer de l'IL-10, qui est une cytokine anti-inflammatoire, induisant la différenciation des LT naïfs en LT régulateurs qui vont à leur tour libérer de l'IL-10 et de l'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma) afin d'inhiber l'activation des macrophages et des LT effecteurs, autrement appelés helper (LTh), différenciés en LTh1, LTh2 et LTh17 en fonction des cytokines qu'ils produisent. Ceci permet le maintien de l'homéostasie intestinale et une tolérance fonctionnelle aux bactéries commensales de la flore intestinale. Les lymphocytes B (LB) sont également activés et vont sécréter des Immunoglobulines afin d'assurer la protection des muqueuses (Mowat 2003).

Des défauts au niveau de la barrière intestinale peuvent induire une perte des mécanismes de contrôle de la flore intestinale avec par exemple une diminution de la production de mucus ou de peptides antimicrobiens. Une atteinte des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium peut entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire permettant alors le contact direct de bactéries pathogènes avec l'épithélium intestinal, ces bactéries pouvant alors atteindre la *lamina propria*. Cette perte de fonction de la barrière protectrice va engendrer une activation excessive du système immunitaire (**Figure 24**). En effet, les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les macrophages vont produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8). Il s'en suit une maturation complète des cellules dendritiques au contact des antigènes pathogènes puis une migration vers les ganglions lymphatiques mésentériques où elles vont libérer de l'IL-12 pro-inflammatoire induisant alors la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en LT effecteurs (LTh1, LTh2 et LTh17). Ces LT effecteurs vont alors amplifier l'inflammation en libérant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-17 (**Figure 25**). Les LTh1 permettent une activation des LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et des macrophages qui vont éliminer les bactéries pathogènes ; les LTh2 vont induire une réponse humorale avec l'activation des LB qui vont

produire des immunoglobulines ; les LTh17 vont recruter des cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles (Mowat 2003).

Les patients atteints de MC présentent une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-21, IL-22, IL-23 sécrétées par les LTh1 et LTh17 tandis que les patients souffrant de RCH ont une augmentation des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les LTh2 : IL-4, IL-5, IL-13 (Kaistha and Levine 2014).

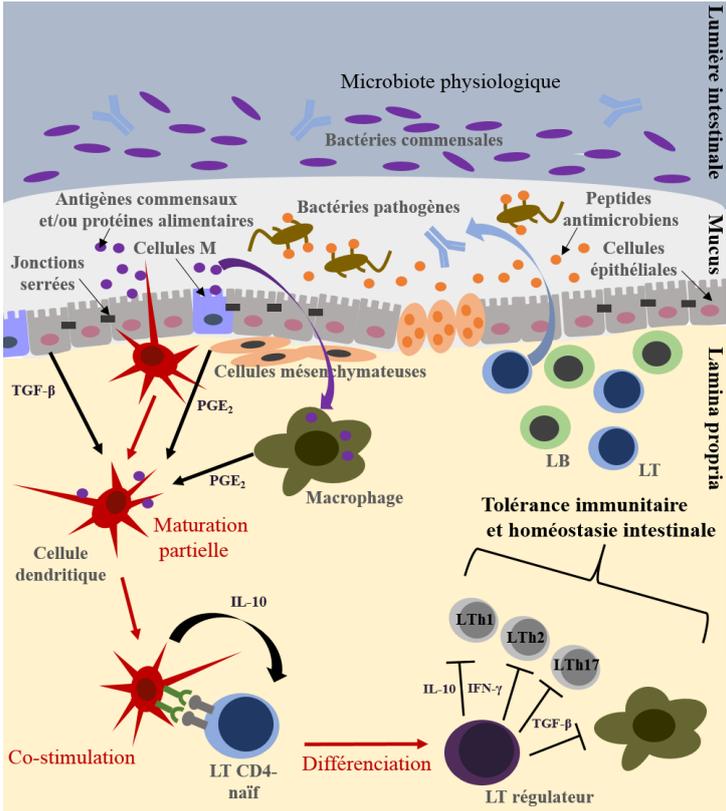


Figure 23 : Paroi intestinale en contexte sain. (D'après Kökten *et al.*, 2016)

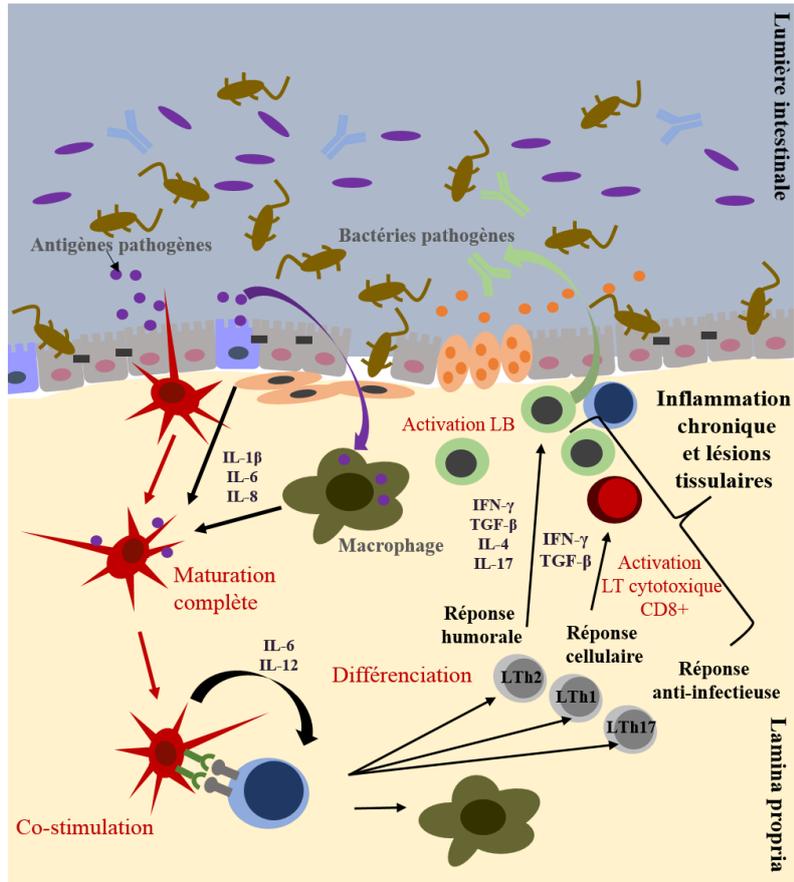


Figure 24 : Paroi intestinale en contexte pathologique (D'après Kökten *et al.*, 2016)

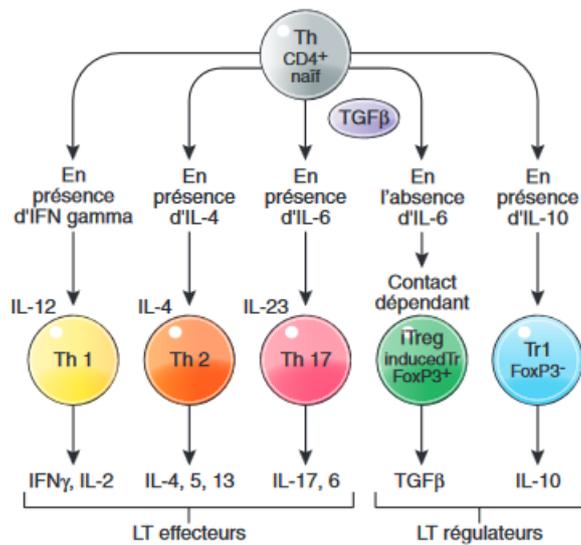


Figure 25 : Lymphocytes T effecteurs et régulateurs

([http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-13\\_fondamentaux-pathologie-digestive\\_octobre-2014.pdf](http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf))

### 2.4.2. Troubles de la mobilité intestinale

Des profils moteurs anormaux sont retrouvés dans les MICI, aussi bien dans la MC que dans la RCH (O'Brien and Phillips 1996).

Chez ces patients, sont retrouvés un ralentissement de la vidange gastrique et du temps de transit oro-caecal ; un dysfonctionnement du sphincter anal ; une activité contractile réduite du muscle lisse en zones enflammées et/ou une présence accrue de contractions se propageant par bouffées dans l'intestin grêle proximal. Ces dysfonctionnements moteurs sont à l'origine des diarrhées et des crampes abdominales rencontrées dans les MICI (Chryso *et al.* 2001; Annese *et al.* 1997).

### 2.4.3. Hypersensibilité colique

Tout comme chez le patient atteint de SII, l'hypersensibilité viscérale est également une caractéristique commune aux MICI. En effet, le volume maximal toléré pour le gonflement du ballonnet est réduit chez les patients atteints de RCH (Rao *et al.* 1987) ou de MC (Bernstein *et al.* 1996) et une douleur abdominale est présente chez 40 à 90% des personnes atteintes de MICI (Docherty, Jones, and Wallace 2011). Cette hypersensibilité colique persiste chez 20 à 60% des patients en période de rémission (Farrokhyar *et al.* 2006).

Les mécanismes mis en jeu dans l'hypersensibilité colique seront détaillés dans la partie 3 de ce chapitre.

## 2.5. Etiologies

Il est communément admis que les MICI sont, tout comme le SII, des pathologies présentant des étiologies multifactorielles avec une implication de facteurs génétiques, environnementaux et psychologiques. Les MICI auraient pour origine une activation anormale du système immunitaire intestinal, induite ou aggravée par des facteurs environnementaux, chez des individus prédisposés génétiquement.

### 2.5.1. Facteurs génétiques

Des études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence une agrégation familiale dans les MICI avec 2 à 14% des patients présentant une histoire familiale de MC ou de RCH (Orholm *et al.* 1991; Probert *et al.* 1993). Le risque de développer une MC est augmenté de 15 à 42 fois et il est augmenté de 7 à 17 fois pour la RCH pour un individu, si un parent au premier degré est lui-même atteint (Orholm *et al.* 1991; Meucci *et al.* 1992). De plus, un taux de concordance de 20 à 50% a été établi chez les jumeaux monozygotes alors qu'il n'est que de 10% chez les jumeaux dizygotes. En ce qui concerne la RCH, ce taux de concordance est estimé entre 13 et 19% chez les jumeaux monozygotes contre 0 à 5% chez les dizygotes (Orholm *et al.* 2000; Halfvarson *et al.* 2003). Des polymorphismes génétiques ont pu

être mis en évidence dans la MC et la RCH avec à ce jour plus de 160 gènes impliqués principalement dans l'immunité et l'inflammation, l'autophagie et l'homéostasie de la barrière épithéliale.

## **2.5.2. Facteurs environnementaux**

### **2.5.2.1. Dysbiose intestinale**

Tout comme dans le SII, une dysbiose, pourrait être à l'origine de l'inflammation chronique rencontrée dans les MICI (Huttenhower, Kostic, and Xavier 2014). Sont observés une diminution des bactéries du phylum *Bacteroidetes* dans les selles des patients, une diminution des bactéries du phylum *Firmicutes* au niveau de l'iléon de patients souffrant de MC ainsi qu'une augmentation des bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* (Swidsinski *et al.* 2002). Cette dysbiose est également associée à une augmentation du risque de récurrence précoce après recours à une intervention chirurgicale. Des questions se posent quant au rôle de cette dysbiose en tant que cause ou conséquence de l'inflammation présente dans la maladie.

### **2.5.2.2. Infections**

Tout comme dans le SII, une infection par des organismes pathogènes tels que *Campylobacter* ou *Salmonella* conduisant à des gastro-entérites, peut être à l'origine du développement d'une MICI (Porter *et al.* 2008).

### **2.5.2.3. Tabagisme**

Le tabagisme est un facteur fortement associé au développement de MICI. Il influe néanmoins différemment sur la prévalence de la maladie en fonction du type de MICI. En effet, le tabagisme actif augmente de 50% le risque de développer une MC et constitue un facteur aggravant de l'évolution de la pathologie (Calkins 1989; Cosnes *et al.* 2001). Il augmente en effet le risque de récurrence ainsi que le recours à des interventions chirurgicales. Au contraire, le tabagisme actif ou passif, constituerait un facteur « protecteur » contre la survenue d'une RCH. Cet effet protecteur peut s'expliquer par une augmentation de l'épaisseur de la couche du mucus au niveau du côlon, une diminution du flux vasculaire et de la perméabilité membranaire (Calkins 1989; Odes *et al.* 2001).

### **2.5.2.4. Autres**

D'autres facteurs environnementaux, cités ci-dessous, ont été clairement démontrés comme impliqués dans la survenue des MICI :

- une appendicectomie réalisée avant l'âge de 20 ans constitue un rôle protecteur contre la RCH, avec une réduction d'environ 70% de la prévalence (Russel *et al.* 1997). Dans le cas de la MC, cette

intervention chirurgicale pourrait, au contraire, augmenter le risque de survenue de la pathologie (Carbonnel *et al.* 2009).

- l'usage de traitements pharmacologiques tels que les antibiotiques (Hviid, Svanstrom, and Frisch 2011), les contraceptifs oraux, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est associé à un risque accru de survenue de MICI (Carbonnel *et al.* 2009).

- la sédentarité, l'alimentation, la vaccination ainsi que les conditions d'hygiène de vie expliquent aussi l'émergence des MICI dans les pays développés (Koloski, Bret, and Radford-Smith 2008). En effet, l'amélioration des conditions d'hygiène diminuerait l'exposition à des agents microbiens ou parasitaires, ce qui pourrait fragiliser l'immunité en provoquant une défaillance de l'apprentissage du système immunitaire. Ceci induirait une réponse immunitaire excessive lors de l'exposition ultérieure à des antigènes environnementaux.

### 2.5.3. Facteurs psychologiques

Une présence de troubles anxieux ou de dépression, est fréquemment rencontrée chez les patients atteints de MICI avec une conséquence importante sur la sévérité des symptômes (Bernstein 2016). Concernant l'implication du stress, il ne semble pas influencer l'évolution des MICI, mais son rôle en tant qu'initiateur de la maladie reste à préciser.

## 2.6. Prise en charge du patient atteint de MICI

Les MICI sont des maladies chroniques évoluant par poussées imprévisibles. On distingue les traitements utilisés lors de l'induction de la rémission et les traitements de maintien de la rémission.

### 2.6.1. Traitements utilisés lors de l'induction de la rémission

Le **tableau 7** décrit les principaux traitements pharmacologiques actuels utilisés pour le traitement des MICI.

Les **dérivés aminosalicylés** (dérivés 5-ASA) sont utilisés pour leur effet anti-inflammatoire local sur les muqueuses intestinales et coliques. Ces médicaments présentent une efficacité modérée dans le traitement des poussées d'intensité faible à modérée, mais ne sont cependant pas suffisamment efficaces en cas de poussées de fortes intensités. Les dérivés aminosalicylés auraient également un rôle bénéfique dans la prévention des rechutes après intervention chirurgicale. Ils sont généralement bien tolérés avec pour effets indésirables les plus fréquents : maux de tête, nausées, vomissements, et diarrhées (Wilkins, Jarvis and Patel. 2011).

L'utilisation de **corticoïdes** d'action locale, administrés sous la forme de gélules contenant des granules gastro-résistants permettent une libération du principe actif au niveau de l'iléon distal, du côlon ascendant ou du côlon droit. Ces molécules sont très peu absorbées à partir de l'intestin et ont donc

moins d'effets indésirables que les corticoïdes systémiques. Elles sont indiquées dans le traitement d'attaque de la maladie ou dans la prolongation de la rémission. Les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés sont les syndromes de type Cushing, l'hypokaliémie, des troubles du comportement comme nervosité, insomnie ou variations d'humeur et des réactions cutanées.

Le recours aux corticoïdes systémiques a montré une réelle efficacité mais leur utilisation ne se justifie que lorsqu'ils sont vraiment indispensables, en limitant au maximum la durée du traitement. En effet, ce type de traitement est associé à d'importants effets indésirables et au développement d'une corticodépendance (Wilkins, Jarvis and Patel. 2011).

Les anti-métabolites **immunosuppresseurs** comme l'azathioprine (IMUREL®) permettent d'inhiber le système immunitaire. Leur utilisation est restreinte aux formes les plus évolutives ou réfractaires de la maladie (rechutes fréquentes, poussées sévères, dépendances aux corticoïdes, ...) en raison de l'importance des effets indésirables notamment de diminution des leucocytes, plus rarement des plaquettes et des érythrocytes dans le sang ; de pancréatites aiguës ou de toxicité hépatique.

Un traitement par **anticorps anti-TNF- $\alpha$** , « tumor necrosis factor », avec comme exemple l'adalimumab (HUMIRA®), le Golimumab (SIMPONI®) ou l'infliximab (REMICADE®), peut être indiqué dans le traitement de MICI active d'intensité modérée à sévère, chez des patients n'ayant pas répondu à un traitement par corticoïdes et/ou immunosuppresseurs. Ces médicaments sont des anticorps monoclonaux complètement ou partiellement humanisés, ou des protéines chimériques se comportant comme des récepteurs solubles du TNF $\alpha$ . Ils diminuent le TNF $\alpha$  sérique, permettant ainsi de contrôler l'inflammation régionale et donc l'évolution des maladies inflammatoires chroniques. L'inconvénient majeur de ce type de traitement est la production d'auto-anticorps dirigés contre le TNF- $\alpha$  pouvant réduire l'efficacité du traitement à long terme (Wilkins, Jarvis and Patel. 2011).

Le recours à des interventions chirurgicales peut être nécessaire en cas de MICI compliquée suite à un échec du traitement médical ou à des complications telles que des perforations intestinales ou des fistules. La chirurgie consiste en une exérèse des segments lésés de l'intestin grêle ou du côlon. Elle doit être la plus localisée possible car elle ne guérit pas de la maladie, les patients opérés ne sont en effet pas à l'abri d'une récurrence.

**Tableau 7 : Les principaux médicaments actuellement disponibles dans le traitement des MICI.**  
D'après <https://eurekasante.vidal.fr/maladies/estomac-intestins/maladie-crohn.html?pb=medicaments>

Corticoïdes par voie orale*		Dérivés aminosalicylés	
Bétaméthasone	BETNESOL comprimé	Mésalazine	FIVASA
	CÉLESTÈNE oral		PENTASA oral
Dexaméthasone acétate	DECTANCYL		ROWASA
Méthylprednisolone	MÉDROL	Olsalazine sodique	DIPENTUM
Prednisone	CORTANCYL	Sulfasalazine	SALAZOPYRINE
Prednisolone	SOLUPRED		
		Agents anti-TNF	
Corticoïdes d'action locale		Adalimumab	HUMIRA
Budésouide	CORTIMENT	Golimumab	SIMPONI
	ENTOCORT	Infliximab	INFLECTRA
	MIKICORT		REMICADE
	REMSIMA		
Corticoïdes par voie rectale			
Bétaméthasone	BETNESOL solution rectale	Immunosuppresseurs *	
Hydrocortisone acétate	COLOFOAM	Azathioprine	IMUREL
* Existe aussi en médicament générique			

### 2.6.2. Traitements de maintien de la rémission

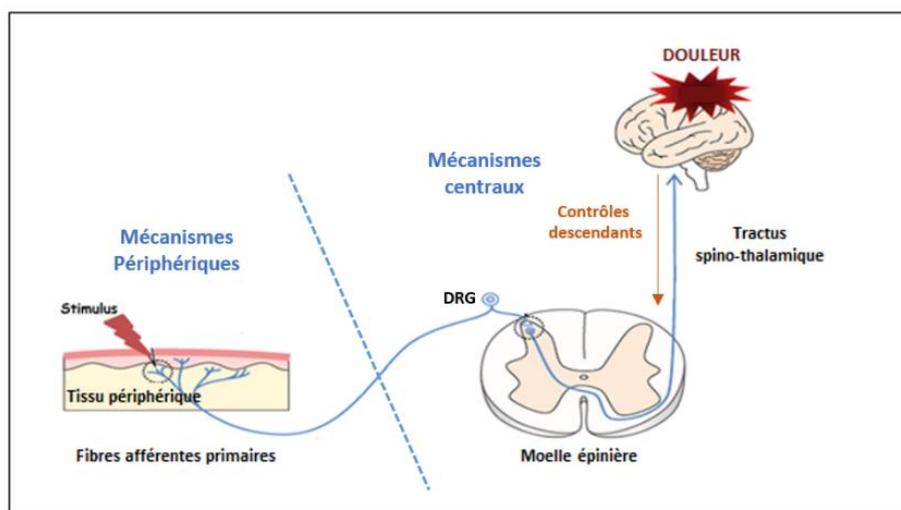
Des traitements antalgiques peuvent être mis en place durant les phases de rémission ou en cas de douleurs importantes lors des phases de poussées. Ces traitements reposent principalement sur l'utilisation d'AINS, d'opioïdes et d'antidépresseurs. L'usage des AINS reste discuté, une corrélation entre la prise AINS et la sévérité de la maladie ayant été établie. L'utilisation des opioïdes est également à l'origine de phénomènes de dépendance et d'effets indésirables tels que des nausées, une dépression respiratoire, une sédation et une constipation. Le recours à une psychothérapie cognitive ou comportementale, bien que n'ayant aucune action sur l'activité de la maladie, permet une diminution de la perception douloureuse et une amélioration de la qualité de vie (Wilkins, Jarvis and Patel. 2011).

## 3. L'hypersensibilité colique dans le SII ou les MICI en phase de rémission

Les *stimuli* viscéraux sont transmis à partir de l'intestin par les afférences des nerfs, traversant ensuite la moelle épinière pour être intégrés au niveau du cerveau, où le caractère douloureux est alors perçu. Différentes études décrivent une présence d'hypersensibilité colique chez les patients atteints de SII. Cette hypersensibilité est également présente chez les patients présentant des MICI en phase de rémission. En effet 20 à 60% des patients conservent une douleur abdominale associée à une hypersensibilité colique, en période de rémission (Schirbel *et al.* 2010; Farrokhhyar *et al.* 2006; Minderhoud *et al.* 2004). Cette hypersensibilité viscérale peut s'étendre à l'ensemble du tube digestif, affectant l'œsophage (Trimble *et al.* 1995), l'estomac (Simren, Abrahamsson, and Bjornsson 2001), le duodénum (Fukudo *et al.* 2002), l'iléon (Kellow *et al.* 1988) ou le côlon sigmoïde (Drewes *et al.* 2001).

Néanmoins l'atteinte est restreinte à la sphère viscérale, en effet, aucune hypersensibilité somatique à la douleur n'est retrouvée chez les patients souffrant d'HSC (Accarino, Azpiroz, and Malagelada 1995; Cook, van Eeden, and Collins 1987).

L'utilisation de techniques d'imagerie telles que la tomographie par émission de positon (TEP) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont permis d'observer les réponses cérébrales à des distensions colorectales. Les résultats indiquent une augmentation du signal cérébral provoqué par la distension chez les patients en contexte pathologique comparativement à des individus sains (Mayer *et al.* 2009). Cette augmentation du signal peut avoir plusieurs origines : une augmentation du signal au niveau périphérique dans l'intestin, une amplification de signal intestinal normal durant sa transmission au niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, ou une amplification centrale au niveau du cerveau. Une dysrégulation des mécanismes de contrôle descendants de la douleur peut également être impliquée. Des mécanismes périphériques et/ou centraux sont donc mis en jeu dans l'hypersensibilité viscérale (**Figure 26**).



**Figure 26 : Les mécanismes de l'hypersensibilité colique.** (D'après Sekiguchi et Kawabata, 2013)

### 3.1. Mécanismes périphériques

Dans la paroi intestinale, les terminaisons sensibles des nerfs vagues et spinaux détectent les *stimuli* nociceptifs. Les axones de ces nerfs sont pour la plupart non-myélinisés (fibres C) ou faiblement myélinisés (A $\delta$ ) et leurs corps cellulaires se trouvent dans les ganglions mésentériques pour le nerf vague et dans les DRG pour les afférences spinales. Les fibres C spinales représentent la quasi-totalité des fibres afférentes nociceptives au niveau viscéral (Matricon *et al.* 2010).

Une stimulation anormale des neurones afférents primaires de la paroi digestive peut induire une sensibilisation neuronale périphérique. Cette hypersensibilité peut être expliquée par une stimulation plus intense ou prolongée, des nocicepteurs *via* une libération excessive de médiateurs de type

cytokines, sérotonine, histamine, kinines, ions H<sup>+</sup> ou ATP au niveau des terminaisons sensibles. Ceci abaisserait le seuil de sensibilité de ces neurones, permettant une genèse de PA pour des seuils de dépolarisation plus bas que ceux habituellement provoqués par un stimulus nociceptif aigu (Azpiroz *et al.* 2007).

La présence d'une inflammation, même à bas bruit, peut être à l'origine d'une sensibilisation périphérique. En effet, l'inflammation peut induire des interactions neuro-immunitaires pouvant modifier le phénotype des neurones entériques et des muscles lisses. Cette étroite communication entre les cellules épithéliales, les cellules immunocompétentes et les neurones entériques de la muqueuse colique peut aboutir à l'amplification de l'inflammation, la perturbation de la mobilité intestinale ainsi qu'à la douleur.

De plus, la sensibilité rectale à des distensions au barostat peut être réduite par une administration rectale d'un anesthésique local, la lidocaïne, suggérant la présence d'un signal exacerbé au niveau périphérique (Verne *et al.* 2003).

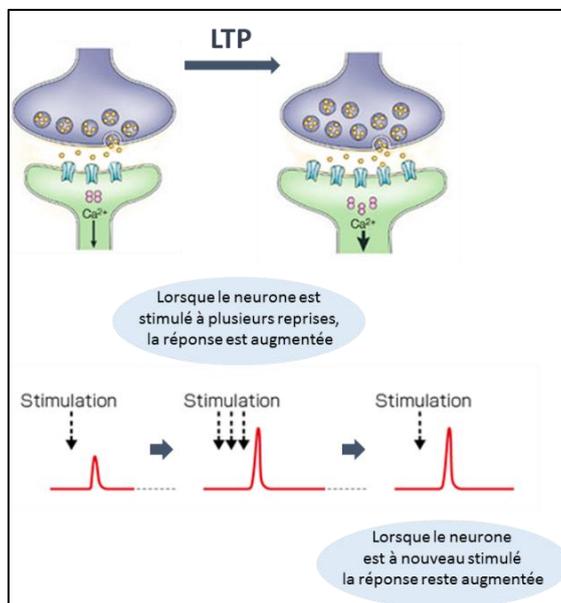
### 3.2. Mécanismes centraux

L'intensité du message douloureux en provenance de la périphérie peut encore être amplifiée à un niveau anatomique supérieur. Les structures spinales et supra-spinales sont en effet capables de moduler la transmission du message douloureux, soit en exacerbant le signal par des mécanismes de sensibilisation centrale, soit en l'inhibant par des systèmes de contrôles descendants (Matricon *et al.* 2010).

Les neurones sensoriels nociceptifs, sensibilisés en périphérie, vont faire synapse avec les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. La répétition des PA générés en périphérie va induire une augmentation à la fois de la fréquence de décharge et de la quantité de neuromédiateurs excitateurs (SP, glutamate, BDNF (« Brain-Derived Neurotrophic Factor ») libérés au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, l'arrivée de PA au niveau présynaptique des terminaisons nerveuses spinales des fibres afférentes primaires entraîne une entrée de calcium *via* l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, qui va induire une exocytose de neuromédiateurs. Le signal va ensuite être transmis au niveau postsynaptique sur les neurones nociceptifs spécifiques. Cette stimulation répétée des neurones spinaux va induire leur sensibilisation. Le message douloureux va ensuite être transmis au cortex par l'intermédiaire des structures supra-spinales, notamment le bulbe rachidien, le tronc cérébral et le thalamus. Les messages sensitifs d'origine viscérale sont alors amplifiés induisant une exacerbation et/ou une chronicisation de la douleur. Des *stimuli* d'intensité normale, non nociceptifs, sont alors perçus comme douloureux (Mayer, Naliboff, and Craig 2006).

L'hyperexcitabilité médullaire peut également induire des changements transcriptionnels, dans le but d'améliorer sur le long terme la transmission synaptique, par exemple en permettant la libération de

neurotransmetteurs excitateurs en réponse à un PA présynaptique inférieur au seuil normalement nécessaire. C'est ce qu'on appelle la potentialisation à long terme (LTP pour « long term potentiation ») (Duman *et al.* 2012). Ainsi, la LTP modifie les caractéristiques des réponses à un stimulus. Cette facilitation centrale persiste si le stimulus se maintient, même à faible niveau (**Figure 27**).



**Figure 27 : Schéma représentatif du phénomène de facilitation centrale, LTP. (D'après Duman *et al.* 2012)**

Au niveau supra-spinal, des structures organisées autour d'un élément central, la substance grise périaqueducule (PAG) localisée dans le mésencéphale, participent au contrôle de la douleur.

La PAG reçoit les efférences nociceptives de la moelle épinière et se trouve connectée à d'autres structures telles que le noyau para-brachial (PBN), le noyau du tractus solitaire (NTS) et les structures cortico-limbiques. Ce réseau est impliqué dans l'intégration des dimensions affectives et cognitives de la douleur. Des contrôles inhibiteurs descendants provenant de ces structures permettent de moduler la douleur (Millan 2002) (Figure 28). En effet, suite à une stimulation nociceptive, une activation des neurones sérotoninergiques de structures supra-spinales telles que la PAG peut s'effectuer. S'en suit un contrôle inhibiteur sur les neurones nociceptifs non spécifiques au niveau médullaire, bloquant la transmission des messages nociceptifs et exerçant ainsi une action analgésique (Bonaz and Sabate 2009). Un dysfonctionnement de ce système de contrôles peut jouer un rôle dans l'hypersensibilité viscérale (Heymen *et al.* 2010; Wilder-Smith *et al.* 2004).

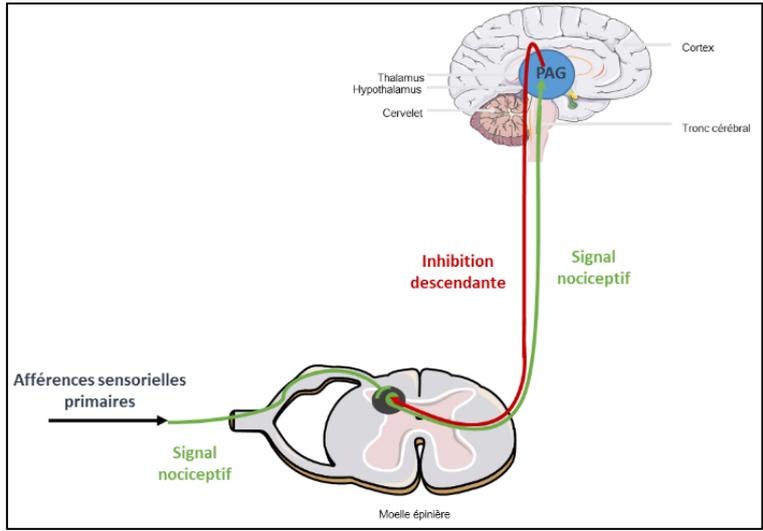


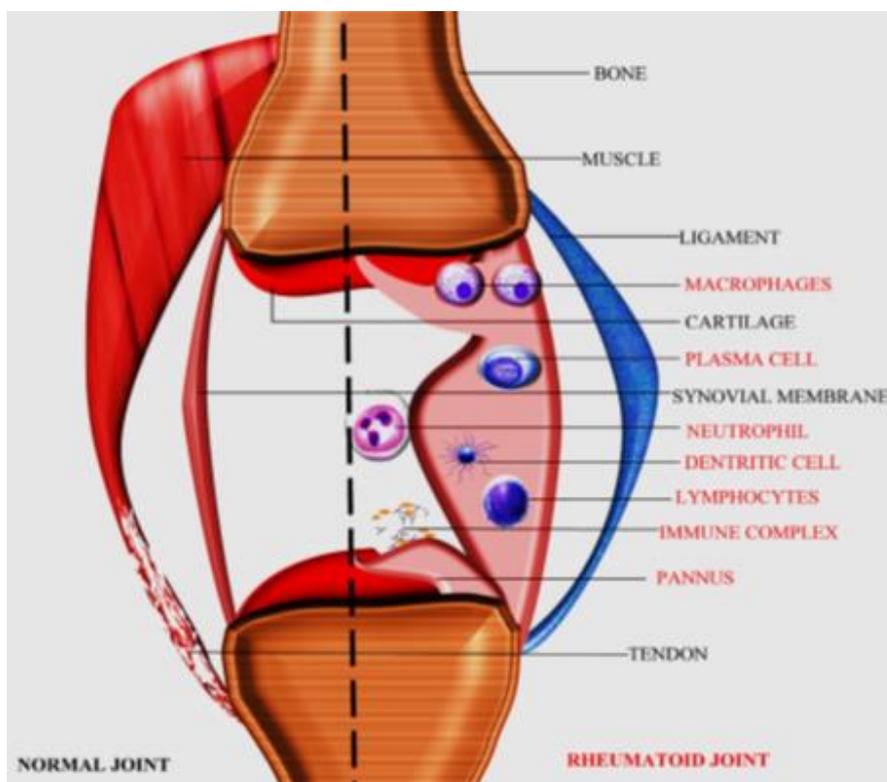
Figure 28 : Les contrôles inhibiteurs descendants de la douleur (D'après Guirimand et Le Bars 1996).

## B. Maladies inflammatoires chroniques : cas de l'arthrite

### 1. Généralités

Une articulation est composée de quatre éléments principaux :

- l'**os sous-chondral** : partie de l'os située juste au-dessous du cartilage ;
- le **cartilage** : tissu conjonctif dense et élastique ;
- la **membrane synoviale** : délimite l'articulation et fait la jonction entre les extrémités de deux os recouverts à leur extrémité de cartilage ;
- le **tendon** : tissu fibreux par l'intermédiaire duquel un muscle s'attache à un os (**Figure 29**).



**Figure 29 : Schéma d'une articulation en condition normale et en condition d'arthrite.** D'après Alam *et al*, 2017 (Alam, Jantan, and Bukhari 2017). Deux os sont maintenus ensemble par des ligaments. À proximité de l'articulation, les muscles se rejoignent et se fixent à l'os par des tendons. Au sein de l'articulation, l'extrémité des os est protégée par du cartilage et l'articulation est recouverte et maintenue en place par une capsule dont la paroi intérieure est tapissée d'une membrane, la membrane synoviale. Celle-ci produit le liquide synovial ayant un rôle protecteur et nourricier pour l'articulation et le cartilage.

L'arthrite est une affection inflammatoire aiguë ou chronique de la membrane synoviale. Elle se caractérise par une sécrétion anormale de liquide synovial, liquide nourricier du cartilage présent dans l'espace articulaire (délimité par la capsule articulaire à l'intérieur de la membrane synoviale) et qui a pour fonction de réduire la friction en lubrifiant l'articulation. Ce liquide va s'accumuler dans l'articulation qui devient alors gonflée et douloureuse. C'est l'épanchement de synovie.

Ce phénomène peut être associé à une synovite caractérisée par une prolifération anormale des cellules de la membrane synoviale aboutissant à un épaissement de celle-ci, formant une véritable tumeur non maligne nommée pannus synovial (McInnes and Schett 2017, 2011).

Si une seule articulation est atteinte, on parlera de monoarthrite ; lorsque 2, 3 ou 4 articulations sont touchées, on parle d'oligoarthrite et au-delà il s'agit de polyarthrite. L'arthrite chronique est définie par une atteinte datant de plus de 3 mois. On distingue différentes catégories d'arthrite :

- les arthrites d'origine infectieuse (dites exogènes), appelées arthrites septiques qui sont dues à la présence d'un germe pyrogène dans l'articulation ;
- les arthrites d'origine inflammatoire endogène, elles même subdivisées en deux catégories :
  - les maladies-auto-immunes, dues à la présence d'auto-anticorps avec pour exemples la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la spondylarthrite ou les vascularites ;
  - les maladies microcristallines dues à la présence de microcristaux dans l'articulation, avec pour exemple la goutte ou la chondrocalcinose.

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement au cas de la PR qui est la maladie inflammatoire chronique la plus fréquemment rencontrée.

## 2. La polyarthrite rhumatoïde

### 2.1. Epidémiologie

La prévalence de cette pathologie est d'environ 1% au sein de la population mondiale (McInnes and Schett 2017). La PR est retrouvée partout dans le monde sans distinction de groupes ethniques. Elle peut se déclarer à tout âge (il existe des PR juvéniles) mais s'observe principalement entre 40 et 60 ans. Les femmes sont majoritairement atteintes, avec un sex-ratio de 4 femmes pour un homme (McInnes and Schett 2017). Cette différence tend à s'estomper après 70 ans (Sany 1999).

### 2.2. Manifestations cliniques

La manifestation clinique de l'arthrite repose sur les signes cardinaux suivants :

- douleur de rythme inflammatoire avec horaire nocturne ou matinal, réveils nocturnes et raideur matinale d'une durée supérieure à 30 min ;
- gonflement articulaire ;
- chaleur locale ;
- rougeur locale.

La PR se manifeste généralement par une atteinte d'au moins 3 articulations affectant préférentiellement les articulations périphériques telles que les mains, les poignets et les pieds, de

façon symétrique. La maladie évolue par poussées inflammatoires de durée et d'intensité variables et gagne progressivement de nouvelles articulations. Une inflammation des gaines tendineuses, ténosynovites, est présente dans la quasi-totalité des cas (Miossec and Sany 1987). Même s'il n'existe aucune déformation articulaire au début de la maladie (Sany 1999), il peut y avoir une évolution vers la destruction des éléments articulaires adjacents (cartilages, os, ligaments et tendons) pouvant induire des déformations et des dysfonctionnements responsables d'un handicap pouvant être extrêmement invalidant (**Figure 30**). Bien que le handicap ne soit pas systématiquement présent, plus de la moitié des patients se trouvent dans l'obligation de cesser leur activité professionnelle moins de cinq ans après le début de la maladie et la PR entraîne une invalidité grave en moins de deux ans dans 10% des cas (Sany 1999). La PR est aussi associée à des comorbidités d'ordre psychatriques (van 't Land *et al.* 2010; Sturgeon, Finan, and Zautra 2016).

Des signes généraux tels que des malaises, de la fatigue, de la fièvre ou une tachycardie peuvent être associés, ainsi que des manifestations extra-articulaires telles que des nodules rhumatoïdes, tuméfactions sous cutanées (s.c.) voire tissulaires, formant des sortes de "boules", situées préférentiellement au niveau des coudes ou des articulations des doigts (**Figure 30**). Des sécheresses oculaires ou buccales (syndrome sec de Gougerot-Sjögren), des manifestations pleuro-pulmonaires, des péricardites ou des affections neurologiques, peuvent également apparaître et menacer le pronostic vital du patient (McInnes and Schett 2011). Ces manifestations extra-digestives se déclarent principalement chez le sujet masculin présentant une PR ancienne (Sany 1999).



**Figure 30 : Polyarthrite rhumatoïde établie**

Sources : <http://www.sante-nutrition.org/5-recettes-de-jus-pour-soulager-la-douleur-de-larthrite;rhumatoide>

### 2.3. Diagnostic

Un diagnostic précoce est indispensable afin de limiter au mieux les symptômes et la progression de la maladie vers une déformation irréversible et invalidante des articulations. En effet, un traitement mis en place dès le début de la pathologie a plus de chance d'être efficace et peut diminuer significativement la progression de la maladie (Combe 2007; Anderson *et al.* 2000; Lard *et al.* 2001).

Le diagnostic est essentiellement clinique (McInnes and Schett 2011; Aletaha *et al.* 2010) et repose sur des critères de l'ACR « American College of Rheumatology » (Morel and Combe 2006; Catrina *et al.* 2016; Arnett *et al.* 1988) (**Tableau 8**) ou bien sur des critères européens de l'EULAR (« European League

Against Rheumatism ») basés sur le score DAS (« Disease Activity Score ») (Alam, Jantan, and Bukhari 2017; Catrina *et al.* 2016; Aletaha *et al.* 2010; Smolen *et al.* 2017) (Tableau 9). Il consiste en l'examen des articulations, plus particulièrement de leur mobilité, la cotation de l'intensité de la douleur, le constat d'un gonflement ou d'une chaleur, afin d'affirmer la présence d'un processus inflammatoire intra-articulaire. L'interrogatoire du patient sur l'horaire inflammatoire des douleurs et sur l'altération éventuelle de son état général aide à la pose du diagnostic.

**Tableau 8 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde proposés en 1987 par l'ACR.** D'après Morel and Combe, 2006

① Raideur articulaire matinale de durée > 1 heure durant un minimum de 6 semaines
② Gonflement des parties molles, touchant au moins 3 articulations simultanément
③ Gonflement d'au moins une articulation des mains (poignet, MCP ou IPP*) durant un minimum de 6 semaines, observé par un médecin
④ Atteinte articulaire simultanée symétrique (une atteinte bilatérale sans symétrie absolue des MCP, IPP ou MTP* est acceptée)
⑤ Atteinte radiologique typique de PR des mains (IPP, MCP*) et poignets avec présence nécessaire d'érosions ou de déminéralisation touchant les articulations atteintes de façon exclusive et prédominante
⑥ Nodules sous-cutanés rhumatoïdes observés par un médecin (saillies osseuses faces d'extension, régions juxta-articulaires)
⑦ Sérologie rhumatoïde positive (taux anormal par toute méthode où la positivité n'existe que chez < 5 % d'une population témoin normale)

Quatre critères sur 7 présents permettent un diagnostic de PR.  
 Pour les critères 1 à 4, une durée minimale de 6 semaines est exigée.  
 \* MCP : articulations métacarpo-phalangiennes ; IPP : articulations inter-phalangiennes proximales ; MTP : articulations métatarso-phalangiennes.

**Tableau 9 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde proposés en 2010 par l'ACR et l'EULAR.** (Score ≥ 6/10 = PR). D'après Alam *et al.* 2017

<b>JOINT INVOLVEMENT</b>	a. 1 large joint	a = 0
	b. 2-10 large joint	b = 1
	c. 1-3 small joint (with or without the involvement of large joints)	c = 2
	d. 4-10 small joint (with or without the involvement of large joints)	d = 3
	e. >10 joints (at least 1 small joint)	e = 5
<b>SEROLOGY</b>	a. Negative RF and Negative ACPA	a = 0
	b. Low positive RF or low positive ACPA	b = 2
	c. High positive RF or High positive ACP (at least one test result is need)	c = 3
<b>ACUTE PHASE REACTANT</b>	a. Normal CRP & Normal ESR	a = 0
	b. Abnormal CRP or abnormal ESR (at least one test result is need)	b = 1
<b>DURATION OF SYMPTOMS</b>	a. Less than 6 week	a = 0
	b. Greater than or equal to 6 week	b = 1

Peuvent être retrouvées chez le patient atteint de PR (Morel and Combe 2006) :

- une augmentation de la vitesse de sédimentation globulaire (VS);
- une augmentation de la CRP ;
- la présence de facteur rhumatoïde, qui est un anticorps anti-gammaglobuline de la classe des IgM dirigé contre les immunoglobulines G. A la phase d'état, le FR est présent dans 70 à 80% des cas, ce sont les PR dites séropositives. Cependant ce facteur n'est ni indispensable ni suffisant pour affirmer le diagnostic ;
- la présence d'anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) (Verpoort *et al.* 2007; Schellekens *et al.* 2000) qui sont des anticorps de type anti-peptides citrullinés, d'abord connus sous le nom d'anticorps anti-kératine, anticorps anti-périnucléaires ou anticorps anti-filaggrines ;
- la présence d'anticorps antinucléaires (AAN) (positifs dans 15 à 30% des cas).

### **Analyse du liquide synovial**

Une ponction articulaire est réalisée en vue d'analyser le liquide synovial. Le profil inflammatoire est caractérisé par un liquide exsudatif (protéine > 30 g/l), fluide, trouble, avec une forte présence de polynucléaires neutrophiles (> 50%), de macrophages et de cellules lymphocytaires (Morel and Combe 2006; McInnes and Schett 2011; Bradfield *et al.* 2003; Hardy *et al.* 2006). Un liquide synovial sain étant visqueux, citrin, avec une présence de polynucléaires neutrophiles <50%.

Une analyse de l'acide lactique réalisée rapidement après la ponction peut avoir un intérêt diagnostique complémentaire à la numération des leucocytes. En effet, le lactate est significativement augmenté passant de 2,5 mmol/l chez le sujet sain à des concentrations allant de 3,5 à 7 mmol/l dans la PR (Pejovic, Stankovic, and Mitrovic 1992).

### **Examens d'imagerie : IRM ou échographie articulaire**

Ce type d'examen permet de rechercher des dégâts articulaires, pouvant apparaître dès les premiers mois de la maladie, sous la forme d'érosions ou de pincements des articulations (Combe 2007; Ostergaard, Ejbjerg, and Szkudlarek 2005). L'œdème articulaire peut également être détecté par IRM.

## **2.4. Etiologies**

L'étiologie de cette maladie auto-immune est multifactorielle avec une implication de facteurs génétiques, immunologiques, environnementaux, endocriniens et psychologiques.

### **Facteurs génétiques**

Le taux de concordance pour la PR chez les jumeaux homozygotes atteints est en moyenne de 30% (McInnes and Schett 2011; MacGregor *et al.* 2000). Plus de 100 *loci* sont associés au risque et à la progression de la maladie (McInnes and Schett 2017; Okada *et al.* 2014; Stahl *et al.* 2010). L'association génétique la plus forte est observée avec les gènes codant les molécules « human leukocyte antigen » (HLA) qui sont des gènes impliqués dans la présentation antigénique, notamment les HLA de classe II (protéines de surface des leucocytes). Les HLA-II ont un rôle dans la présentation antigénique aux lymphocytes T (CD4+) auxiliaires et dans l'expression des molécules de classe II à la surface des cellules présentant l'antigène (CPA) (Sany 1999). Deux groupes d'allèles du système HLA-II semblent plus particulièrement impliqués dans la PR : il s'agit de HLA-DR1 (DRB1\*01) et de HLA-DR4 (DRB1\*04) (Catrina *et al.* 2016; van der Helm-van Mil *et al.* 2006). Les molécules HLA codées par ces allèles possèdent une séquence d'acides aminés commune (QKRAA), située entre les positions 70 et 74 de la chaîne  $\beta$ , correspondant au site impliqué dans la reconnaissance antigénique (McInnes and Schett 2011; Gregersen, Silver, and Winchester 1987). Cette séquence commune, autrement appelée « épitope partagé », pourrait être au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes T (Olsson *et al.* 2012; McInnes and Schett 2011; De Almeida *et al.* 2010).

D'autres gènes peuvent intervenir dans la susceptibilité à la PR ; il s'agit de gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  du récepteur des lymphocytes T, de gènes codant pour des immunoglobulines ou des cytokines, de gènes des voies apoptotiques et de gènes codant pour les séquences régulatrices du TNF $\alpha$  (Miossec and Sany 1987).

### **Facteurs immunologiques**

La PR est une maladie auto-immune, caractérisée par la production d'auto-anticorps, par le système immunitaire, qui sont dirigés contre les constituants de l'organisme, appelés constituants du « soi ». Dans cette pathologie, il y a une production d'auto-anticorps dirigés contre le fragment Fc des immunoglobulines G. Cet auto-anticorps, nommé facteur rhumatoïde, est sécrété par les lymphocytes B dans le sang et le liquide synovial. Son dosage est ainsi utilisé pour poser le diagnostic mais sa présence n'exclut pas une autre maladie. Il faut donc tenir compte du contexte clinique. Une apparition précoce de facteur rhumatoïde au cours de la polyarthrite est un facteur de mauvais pronostic et sa concentration se trouve corrélée avec la sévérité de la maladie (McInnes and Schett 2011; Rantapaa-Dahlqvist *et al.* 2003). Il a également été identifié un anticorps comme facteur prédictif du développement d'une PR, il s'agit de « l'anti citrullinated protein antibody » (ACPA), immunoglobuline A (IgA) (Nielen *et al.* 2004; Rantapaa-Dahlqvist *et al.* 2003).

### **Facteurs environnementaux**

Différents facteurs environnementaux ont été évoqués dans la PR. Au premier rang d'entre eux, se trouvent les **agents infectieux**, avec notamment les mycobactéries, les *Escherichia coli* ou le virus d'Epstein Barr (EBV) ainsi que certains rétrovirus (McInnes and Schett 2011; Auger and Roudier 1997; Kamphuis *et al.* 2005). En effet, ils pourraient initier la pathologie, en développant une immunité croisée, par un mécanisme de similitude antigénique (Sany 1999).

**Le microbiote** semble également être impliqué dans la PR. En effet, différentes études menées sur le microbiote de patients atteints de PR, et sur des modèles animaux d'arthrite, suggèrent une augmentation de l'abondance des bactéries de type *Prevotella copri* (Maeda and Takeda 2017). Au contraire, la présence d'autres bactéries de type *Prevotella* constituerait un facteur protecteur contre le déclenchement de la maladie (Maeda and Takeda 2017). L'impact d'une dysbiose dans la PR peut s'expliquer par une action des bactéries sur la régulation immunitaire et le maintien de la tolérance de l'hôte. En effet, la présence de *Porphyromonas gingivalis* ou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* au niveau de la muqueuse buccale favoriserait l'apparition de la maladie en affectant la citrullination des tissus (McInnes and Schett 2017; König *et al.* 2016; Scher *et al.* 2013).

### **Facteurs psychologiques**

Il n'a pas été montré à ce jour qu'un terrain psychologique pouvait être à l'origine d'une PR. Toutefois, un traumatisme d'ordre affectif peut affecter la sévérité de la pathologie. En effet, de fortes poussées inflammatoires peuvent apparaître à la suite d'un deuil, divorce ou accident (Gross *et al.* 2017).

### **Hormonaux**

Certaines observations cliniques pourraient évoquer l'implication de facteurs hormonaux dans la PR. En effet, la prédominance de cette pathologie est majoritairement féminine, survenant généralement en période péri-ménopausique ; une rémission est fréquente en période de grossesse avec une poussée inflammatoire suite à l'accouchement ; les femmes ayant allaité ont des PR plus sévères. Le système endocrinien étant en étroite interaction avec le système immunitaire, il est possible que des facteurs hormonaux interviennent pour faciliter le processus inflammatoire (Catrina *et al.* 2016).

## **2.5. Physiopathologie**

La PR semble être la résultante d'une reconnaissance anormale d'un ou de plusieurs antigènes qui déclencherait une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée aboutissant à une réaction inflammatoire exagérée, en particulier de la membrane synoviale. Les cellules composant la synoviale produisent alors des médiateurs de l'inflammation menant à une résorption osseuse et cartilagineuse. Différentes phases peuvent être distinguées :

- la phase de déclenchement de la maladie, avec les différents facteurs responsables de l'initiation de la PR ;
- la phase d'inflammation de la membrane synoviale ;
- la phase de destruction articulaire.

### **2.5.1. Phase de déclenchement de la maladie**

Le mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Certains facteurs hormonaux, environnementaux, immunologiques ou génétiques induiraient des conditions favorables au déclenchement de la maladie. Un antigène serait présenté aux lymphocytes T CD4+ par les molécules du système HLA de classe II. Ceci déclencherait alors la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN  $\gamma$ , IL-2) par les lymphocytes (réponse Th1) (Sany 1999).

### **2.5.2. Phase d'inflammation de la membrane synoviale**

L'inflammation de la synoviale, ou synovite, implique de nombreux acteurs (Figure 31).

**Acteurs cellulaires : complexe tripartite CPA / lymphocytes T / synoviocytes**

- **CPA (pour cellules présentatrices d'anticorps)** : ces cellules sont capables de présenter un antigène aux lymphocytes T. Elles expriment en effet à la surface de leur membrane des molécules HLA de classe II qui sont indispensables au déclenchement d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. Parmi les CPA, on distingue les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques.
- **Lymphocytes T** : l'activation des lymphocytes TCD4+ lors de la phase de déclenchement induit une cascade d'activation des autres cellules immunitaires comme les lymphocytes B ou les macrophages. Les lymphocytes T activés interagissent avec les cellules endothéliales, elles-mêmes activées par des cytokines produites par les monocytes ou les lymphocytes T activés. L'interaction lymphocyte T /cellules endothéliales, *via* l'expression de molécules d'adhésion et d'intégrines, permet le passage des lymphocytes T circulants dans la membrane synoviale. Les lymphocytes T migrent ensuite dans la synoviale et produisent des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 activant ainsi les cellules résidentes : lymphocytes B, macrophages résidents, cellules dendritiques et fibroblastes. Celles-ci produisent alors de nombreux médiateurs de l'inflammation mais aussi des métalloprotéases (cathépsine, collagénases, stromélysine) et des prostaglandines comme la PGE<sub>2</sub> aboutissant à une destruction du tissu cartilagineux, une résorption osseuse et une prolifération des synoviocytes (Saber *et al.* 2011).
- **Synoviocytes** : ils constituent le principal composant cellulaire de la couche bordante de la membrane synoviale. Stimulés par l'IL-1 et le TNF $\alpha$ , ils produisent des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires.

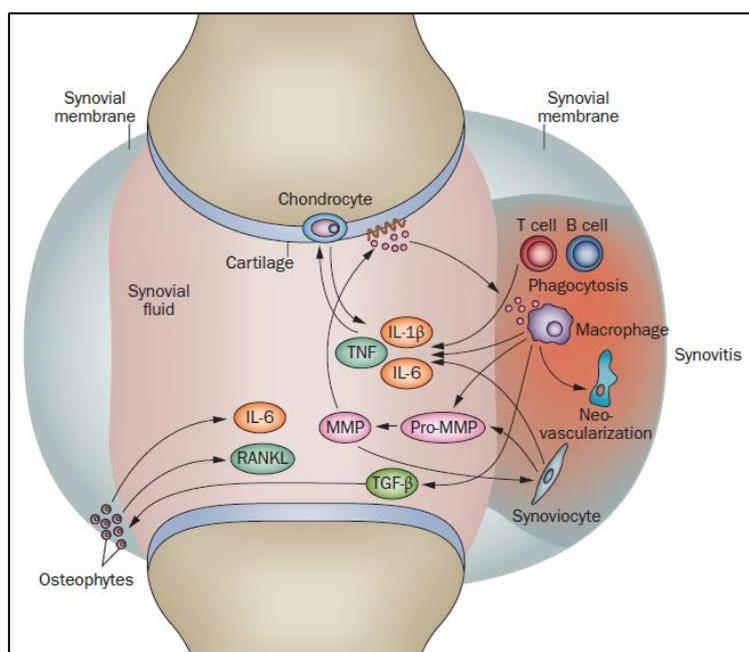
**Acteurs intercellulaires : les cytokines**

Les cytokines jouent un rôle important dans l'immunopathologie de la PR. En effet, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires (Th1) telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-15, l'IL-7, l'IL-18 (Dinarello 1997; McInnes and Schett 2011) sont présentes en excès dans le liquide synovial mais aussi dans le sérum des patients atteints de PR alors que les cytokines anti-inflammatoires (Th2) telles que l'IL-4, IL-10, L'IL-13 sont produites en quantités insuffisantes.

**2.5.3. Phase de destruction articulaire**

La destruction ostéoarticulaire rencontrée dans la PR est la conséquence à la fois de la prolifération pseudotumorale de la synoviale et de l'action des cytokines. En effet, les cytokines pro-inflammatoires induisent la synthèse de facteurs de croissance, responsables de la prolifération de la synoviale, et

également la production de diverses protéases par les synoviocytes, à l'origine de la dégradation des principaux composants du cartilage. Le système RANK/RANKL est majoritairement impliqué dans cette résorption osseuse (McInnes and Schett 2017; Schett *et al.* 2008; McInnes and Schett 2011; Gravallesse *et al.* 1998). Le « Receptor Activator of NFκB Ligand », RANKL, est une cytokine exprimée à la surface des ostéoblastes (cellules élaborant la matrice protéique du tissu osseux), des lymphocytes activés et des cellules endothéliales. Sa synthèse est régulée par les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα, IL-17) (McInnes and Schett 2011; Schett and Teitelbaum 2009). La liaison de RANKL à son récepteur membranaire RANK, situé sur les préostéoclastes, induit la différenciation et l'activation des ostéoclastes (cellules destructrices du tissu osseux). Des concentrations élevées de RANKL ont été observées dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR (Yeo *et al.* 2011).



**Figure 31 : L'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde.** Des cytokines telles que le TNF, l'IL-1β et IL-6 sont produites par des chondrocytes, des macrophages, des lymphocytes T et des ostéophytes. Les cellules T et les cellules B sont alors recrutées dans le liquide synovial et contribuent à la synovite locale. Abréviations : MMP, *matrix metalloproteinase*; RANKL, *Receptor Activator of Nuclear factor κB Ligand*, TNF, tumor necrosis factor, TGF-β, Transforming Growth Factor β. D'après Chevalier, Eymard, and Richette 2013 .

## 2.6. Prise en charge du patient arthritique

### 2.6.1. Prise en charge médicamenteuse

Les objectifs thérapeutiques sont d'améliorer la qualité de vie du patient en réduisant l'intensité des symptômes (douleur, raideur, fatigue), en stabilisant les lésions présentes et en prévenant l'apparition de nouvelles lésions (Alam, Jantan, and Bukhari 2017; Smolen *et al.* 2017). Les principaux traitements actuels sont décrits dans le **Tableau 10**.

Deux types de traitements médicamenteux sont utilisés dans la PR :

- les traitements de la crise : à action immédiate, visant à réduire et soulager rapidement les symptômes ;
- les traitements de fond : destinés à prévenir la progression de la maladie sur le long terme.

#### **2.6.1.1. Les traitements de la crise**

##### ***Les anti-inflammatoires non stéroïdiens***

Les AINS sont des médicaments, non salicylés, inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (Cox), une enzyme impliquée dans une cascade enzymatique, aboutissant à la formation de substances impliquées dans l'inflammation, la fièvre, l'agrégation plaquettaire ainsi que dans la protection de la muqueuse gastrique. On distingue 2 types de Cox : la Cox 1, physiologique et la Cox 2, inductible, synthétisée lors de l'inflammation. Les AINS agissent sur les Cox 1 et 2, selon des rapports variables. Des molécules ciblant spécifiquement la Cox 2, afin de conserver les effets physiologiques de la Cox 1 ont été développées, il s'agit des Coxibs. La Cox transforme l'acide arachidonique, provenant de la transformation des phospholipides membranaires par la phospholipase A2, en prostaglandines et thromboxane. Les AINS, *via* l'inhibition de l'action de la Cox, inhibent ainsi la synthèse des prostaglandines et du thromboxane, leur conférant un effet antalgique par l'inhibition des prostaglandines nociceptives ; un effet antipyrétique par l'inhibition de prostaglandines pyrogènes ; une action anti-inflammatoire par l'inhibition de prostaglandines inflammatoires ; et un effet antiagrégant par l'inhibition du thromboxane A2 (Rainsford 2007). Les AINS sont utiles dans les phases de poussées de la maladie. En effet, leur action anti-inflammatoire et antalgique permet de soulager les symptômes (Sany 1999). Néanmoins, ils n'ont pas de conséquence sur l'évolution de la maladie (Goodman *et al.* 2017; Tabas and Glass 2013). Ils présentent une incidence élevée d'effets indésirables, notamment une atteinte digestive, pouvant avoir des répercussions importantes : perforations digestives, ulcères gastroduodénaux et saignements digestifs. Le Célécoxib semble améliorer les symptômes cliniques des patients atteints PR, tout en présentant des effets indésirables inférieurs aux autres AINS (Garner *et al.* 2017).

##### ***Les corticoïdes***

Ce sont des anti-inflammatoires stéroïdiens qui possèdent une action anti-inflammatoire liée à l'inhibition de la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires d'une part, et à une stimulation de la synthèse de facteurs anti-inflammatoires d'autre part. En effet, ces médicaments se lient dans la cellule au récepteur cytosolique endogène des corticoïdes. Ils forment alors un complexe qui pénètre dans le noyau pour interagir avec des régions spécifiques de l'ADN, les « glucocorticoïdes responsive elements » (GRE), aboutissant à l'activation ou à l'inhibition de plusieurs

milliers de gènes impliqués dans l'inflammation. Ainsi, les corticoïdes induisent d'une part, une augmentation de la synthèse de I-KB (*Inhibitor of NF-KB*) qui, une fois phosphorylé par une protéine kinase C, se lie avec NF-KB et retient ce dernier dans le cytoplasme de la cellule sous une forme inactive l'empêchant ainsi de migrer vers le noyau de la cellule et d'induire la transcription de cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, ils agissent également sur la NO-synthase inductible et sur la phospholipase A2 en inhibant respectivement la production de NO et la production de prostaglandines et de leucotriènes (Barnes 2014).

Les corticoïdes sont prescrits à faible dose, dans les premiers mois de la PR afin de soulager rapidement les symptômes avec une efficacité supérieure à celle des AINS (Laev and Salakhutdinov 2015). Ils pourraient également freiner la progression de la maladie (Saag *et al.* 1996; Anderson *et al.* 2000; Kirwan 1995; van Everdingen *et al.* 2002). Leur utilisation est donc recommandée dans la PR débutante ainsi que dans les poussées inflammatoires, en association avec un traitement de fond (Combe *et al.* 2007; Gotzsche and Johansen 1998; Hansen *et al.* 1999; van Everdingen *et al.* 2002).

Un traitement par corticoïdes d'une durée supérieure à trois mois est associé à un risque accru de développement d'une ostéoporose, ce qui implique un suivi régulier de la densité osseuse. En plus de cela, un traitement chronique par corticoïdes peut induire un syndrome de Cushing iatrogène, des ulcères et saignements gastro-intestinaux, une immunosuppression favorisant la survenue d'infections, des troubles neuropsychiques (de type euphorie/insomnie) et des troubles oculaires (cataracte, glaucome) (Ethgen *et al.* 2013). Ce type de médicament est administré généralement par voie orale mais il est possible d'avoir recours à la voie intraveineuse à de plus fortes doses en milieu hospitalier pour certains cas de PR (Sany 1999). Il est également envisageable de pratiquer une injection de corticoïdes directement dans l'articulation (Goodman *et al.* 2017). Cette technique est très efficace sur la douleur et l'inflammation. Cependant, les effets restent temporaires et il est important de respecter un intervalle d'au moins trois mois entre deux injections dans une même articulation.

#### **2.6.1.2. Les traitements de fond**

Ils consistent en l'utilisation des DMARD « disease-modifying antirheumatic drugs » dans l'objectif de contrôler les manifestations inflammatoires cliniques de la maladie, et de freiner son évolution destructrice. Ils en agissant de manière différée et doivent donc être utilisés en association aux traitements à visée symptomatique pendant les premières semaines.

##### ***Le méthotrexate***

Le méthotrexate est un antagoniste de l'acide folique qui appartient à la classe d'agents cytotoxiques appelés antimétabolites. Il agit par inhibition compétitive de l'enzyme dihydrofolate réductase et inhibe ainsi la synthèse de l'ADN. Il n'a pas encore été clairement déterminé si l'efficacité du méthotrexate dans le traitement du psoriasis, du rhumatisme psoriasique et de la polyarthrite

rhumatoïde est due à un effet anti-inflammatoire ou immunosuppresseur et dans quelle mesure l'augmentation induite par le méthotrexate de la concentration extracellulaire d'adénosine au niveau des sites inflammatoires contribue à ces effets. Il présente une activité antiproliférative et immunosuppressive et constitue le traitement de fond de référence dans la PR. Il est prescrit en première intention (sauf dans les cas particulièrement sévères) (Combe *et al.* 2007; Anderson *et al.* 2000; Lopez-Olivo *et al.* 2014). Il agit sur la qualité de vie du patient en réduisant les symptômes et en améliorant la mobilité des articulations. Ce médicament est généralement bien supporté, les effets indésirables les plus fréquents étant d'ordre digestif (diarrhées, nausées) (Combe 2007). Toutefois, les patients sous traitement au méthotrexate sont régulièrement suivis (examen clinique et prise de sang) afin de déceler d'éventuels effets indésirables, notamment hépatiques, infectieux, pulmonaires et sanguins (Combe 2007; Walker *et al.* 1993).

### **La sulfasalazine**

Ce médicament est un anti-inflammatoire intestinal. Il agirait en régulant l'activité des lymphocytes et aurait ainsi une action locale immunorégulatrice. Il peut être prescrit seul ou en association avec le méthotrexate. Il a montré une efficacité dans le soulagement des symptômes, en particulier chez les patients en début de PR (Danis *et al.* 1992; 'Sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. The Australian Multicentre Clinical Trial Group' 1992; Farr *et al.* 1995; Hannonen *et al.* 1993; Pullar, Hunter, and Capell 1983; Smolen *et al.* 1999; Williams *et al.* 1988). Les effets indésirables sont principalement une atteinte digestive (nausées et digestion difficile) mais certains patients peuvent développer des réactions d'hypersensibilité, nécessitant l'arrêt du traitement.

### **Les antipaludiques de synthèse**

Les antipaludiques de synthèse sont des dérivés de synthèse ou d'hémi synthèse de la quinine, alcaloïde extrait du quinquina, utilisé initialement dans le traitement et la prévention du paludisme. Ils agissent en inhibant le cycle de maturation du parasite *plasmodium falciparum* par un effet protozoacide associé au blocage de la synthèse des acides nucléiques (Wellems 1992). Ils agissent également sur l'immunité cellulaire et la transformation lymphoblastique. Ils exercent une inhibition enzymatique sur les phospholipase A2, les Cox, et les enzymes protéolytiques bloquant ainsi les voies pro-inflammatoires et leur conférant une action anti-inflammatoire (Thome *et al.* 2013). Certains antipaludiques (chloroquine et hydrochloroquine) présentent ainsi des propriétés anti-inflammatoires intéressantes dans la prise en charge de la PR. En effet, ils réduisent en effet les symptômes (Clark *et al.* 1993; Furst *et al.* 1999; Pavelka *et al.* 1989; Felson, Anderson, and Meenan 1990; O'Dell *et al.* 1996) même si leur utilisation ne prévient pas la destruction articulaire (Bunch *et al.* 1984; Faarvang *et al.* 1993; Jessop *et al.* 1998; Scott *et al.* 1989; Trnavsky *et al.* 1993). Le recours à ce type de

médicaments se fait en association avec le méthotrexate ou la sulfasalazine, dans le traitement des formes débutantes et peu actives de PR. Les effets indésirables les plus fréquents sont des troubles digestifs, des éruptions cutanées, des bourdonnements d'oreille et des vertiges. Il existe également un risque au niveau de la rétine, imposant un suivi ophtalmologique régulier.

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

Ce type de médicament agit en bloquant l'action du TNF $\alpha$ , substance produite par les cellules de l'immunité et qui joue un rôle central dans la progression de la PR (Willrich, Murray, and Snyder 2015). Les anti-TNF $\alpha$  ont une action plus rapide et plus efficace que le méthotrexate sur les symptômes et sur la progression de la pathologie (Weinblatt *et al.* 1999; Croft and Siegel 2017). Ils sont prescrits en association avec le méthotrexate ou un autre traitement de fond, lorsque la PR est particulièrement sévère, ou lorsqu'elle continue à évoluer malgré un traitement de fond classique (Klareskog *et al.* 2004). Par exemple, l'utilisation du certolizumab pégol, seul ou en association avec le méthotrexate, a montré une efficacité sur la qualité de vie du patient, une augmentation des chances de rémission de la PR ainsi qu'une réduction des lésions articulaires observées par imagerie (Ruiz Garcia *et al.* 2017). Il est nécessaire de réaliser un bilan préalable, avant la mise en place du traitement, afin de dépister une éventuelle infection, même bénigne. En effet, ces médicaments peuvent diminuer la résistance du patient aux infections, ce qui peut avoir des conséquences extrêmement graves.

### **Les médicaments immunosuppresseurs**

Depuis la découverte des médicaments ciblant le TNF- $\alpha$  à la fin du siècle dernier, de nombreux agents biologiques, possédant différents modes d'action, ont vu le jour. Ces derniers présentent une efficacité pour induire une rémission clinique ou, au moins, pour réduire l'activité de la maladie (Rein and Mueller 2017; Nam *et al.* 2017).

Les immunosuppresseurs agissent en diminuant l'activité du système immunitaire et sont indiqués lorsque le méthotrexate n'est pas suffisamment efficace. On distingue différents types d'immunosuppresseurs :

- **Le léflunomide** agit en inhibant la synthèse des pyrimidines, bases nécessaires à la multiplication des lymphocytes T. Il possède une efficacité (Mladenovic *et al.* 1995; Smolen *et al.* 1999; Osiri *et al.* 2003) et des effets indésirables semblables à ceux du méthotrexate. Il peut parfois induire une perte de poids ou une diminution de la sensibilité des doigts et des pieds ;
- **L'azathioprine**, analogue des bases puriques, agit comme un anti-métabolite en libérant la 6-mercaptopurine intervenant au niveau enzymatique du métabolisme des purines. Elle inhibe la biosynthèse des nucléotides normaux entrant dans la constitution des acides nucléiques et

empêche ainsi la prolifération de cellules participant à la détermination et à l'amplification de la réponse immune. Il peut être indiqué comme traitement de fond de la PR, notamment dans certaines formes sévères (Cash and Klippel 1994; Suarez-Almazor, Spooner, and Belseck 2000; Woodland *et al.* 1981). Des analyses sanguines doivent être réalisées à intervalles réguliers, du fait du risque de toxicité pour les cellules sanguines ;

- **L'anakinra**, il neutralise l'activité biologique de l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  par inhibition compétitive de la liaison de l'IL-1 à son récepteur de type I. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire majeure intervenant dans la médiation de nombreuses réponses cellulaires, notamment celles jouant un rôle important dans l'inflammation synoviale. L'IL-1 est présente dans le plasma et le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et une corrélation a été rapportée entre les concentrations plasmatiques d'IL-1 et l'activité de la maladie. Il constitue un traitement de dernier recours dans le traitement de fond de la PR (Bresnihan *et al.* 1998; Jiang *et al.* 2000) lorsque le méthotrexate aux doses maximales ou les autres traitements, présentent une efficacité insuffisante. Il peut provoquer des réactions allergiques et des céphalées chez le patient.

### **Les autres biothérapies**

Utilisés en association au méthotrexate, et administrés en milieu hospitalier, ces nouvelles biothérapies sont réservées, aux patients adultes chez qui les traitements de fond cités précédemment ont échoué pour ralentir la progression de la PR.

On distingue notamment :

- **le rituximab** : anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20, une phosphoprotéine non glycosylée située sur les lymphocytes B. Initialement prescrit dans le traitement des lymphomes, le rituximab est indiqué en association avec le méthotrexate pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde active, sévère, chez les patients adultes qui ont présenté une réponse inadéquate ou une intolérance aux traitements de fond, dont au moins un inhibiteur du facteur de nécrose tumorale (anti-TNF) (McInnes and Schett 2017; Vos *et al.* 2007; Chatzidionysiou *et al.* 2011). L'association rituximab-méthotrexate réduit le taux de progression des dommages structuraux articulaires mesurés par radiographie et améliore les capacités fonctionnelles ;
- **l'abatacept** est une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire de l'antigène 4 cytotoxique humain associé au lymphocyte T (CTLA-4) lié à une partie Fc modifiée d'immunoglobuline humaine G1 (IgG1). L'abatacept module sélectivement un signal clé de costimulation nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T exprimant le CD28. En effet, l'activation complète des lymphocytes T nécessite deux signaux transmis par les CPA : la reconnaissance d'un antigène spécifique par le récepteur du lymphocyte T, le TCR (1er signal) et un

second signal de costimulation. L'une des principales voies de costimulation passe par la liaison des molécules CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, au récepteur CD28 exprimé sur les lymphocytes T (2<sup>ème</sup> signal). L'abatacept inhibe sélectivement cette voie de costimulation en se liant spécifiquement à CD80 et CD86 (McInnes and Schett 2017; Buch *et al.* 2009; Kanbe, Chiba, and Nakamura 2013). Des études cliniques évaluant l'effet de l'abatacept en association au méthotrexate dans le traitement de la PR hautement active ainsi que chez les patients atteints de PR présentant une réponse insuffisante au méthotrexate ou aux inhibiteurs du TNF, ont révélé une bonne efficacité clinique avec une bonne tolérance au traitement (Blair and Deeks 2017) ;

- **le tocilizumab** : anticorps monoclonal qui se lie de manière spécifique aux récepteurs solubles et membranaires de l'IL-6 et inhibe la transmission du signal médié par les récepteurs à l'IL-6 (Fleischer *et al.* 2017; Kikuchi *et al.* 2017). L'IL-6 participe à différents processus physiologiques, tels que l'activation des lymphocytes T, l'induction de la sécrétion d'immunoglobulines, l'induction de la synthèse des protéines hépatiques de la phase aiguë de l'inflammation et la stimulation de l'hématopoïèse. Le rôle de l'IL-6 a été mis en évidence dans la pathogenèse d'un certain nombre de maladies, notamment les affections inflammatoires, l'ostéoporose et les néoplasies. Le tocilizumab peut être utilisé seul dans certains cas. Son utilisation en monothérapie et en association avec le méthotrexate ou d'autres biothérapies, représente un traitement efficace pour réduire les signes et les symptômes de la PR (Shetty *et al.* 2014). Ces substances exposent toutefois le patient à un risque d'infections, pouvant être gravissimes, et nécessitent les mêmes mesures de précaution qu'avec les anti-TNF $\alpha$  ou les autres immunosuppresseurs. Une hyperlipidémie, une baisse des globules blancs, des atteintes hépatiques peuvent également être retrouvées (Shetty *et al.* 2014). Les agents biologiques ont considérablement amélioré la qualité de vie des patients atteints de troubles rhumatismaux et immunologiques. Néanmoins, ce type de médicaments peut induire des effets indésirables particulièrement graves et il est par conséquent important d'effectuer un bilan clinique et biologique systématiquement avant l'administration du médicament. Les biothérapies ne doivent pas être utilisées chez les patients présentant un risque d'infections graves ou de réactivation d'infections, y compris la tuberculose et les maladies virales comme l'hépatite. L'état cardiovasculaire; la présence de maladies auto-immunes concomitantes (en particulier le lupus); les déficits neurologiques antérieurs (polyneuropathies, sclérose en plaques) ou le statut vaccinal doivent également être pris en compte (Boyman, Comte, and Spertini 2014).

**Tableau 10 : Principaux médicaments actuellement disponibles dans le traitement de la PR.**

D'après <https://eurekasante.vidal.fr/maladies/appareil-locomoteur/polyarthrite-rhumatoide.html>

AINS		Sulfasalazine	
Acéclofénac *	CARTREX	Sulfasalazine	SALAZOPYRINE
Acide niflumique	NIFLURIL		
Acide tiaprofénique *	SURGAM	Antipalludiques de synthèse	
Célécoxib *	CELEBREX	Chloroquine	NIVAQUINE
Diclofénac *	VOLTARÈNE	Hydroxychloroquine	PLAQUENIL
Etodolac	LODINE		
Flurbiprofène	ANTADYS	Immunosuppresseurs	
	CEBUTID	Anakinra	KINERET
Ibuprofène *	BRUFEN	Azathioprine *	IMUREL
Indométacine	CHRONO-INDOCID	Léflunomide *	ARAVA
	INDOCID		
Kétoprofène *	BI-PROFÉNID	Agents anti-TNF	
	PROFÉNID	Adalimumab	HUMIRA
Méloxiam *	MOBIC	Certolizumab	CIMZIA
Nabumétone	NABUCOX	Etanercept	BENEPALI
Naproxène *	APRANAX		ENBREL
		NAPROSYNE	Golimumab
Piroxicam*	BREXIN	Infliximab	INFLECTRA
	CYCLADOL		REMICADE
	FELDÈNE injectable		REMSIMA
	FELDÈNE oral, rectal		
Sulindac	ARTHROCINE	Les autres biothérapies	
Ténoxiam	TILCOTIL	Rituximab	MABTHERA
		Abatacept	ORENCIA
Corticoïdes		Tocilizumab	ROACTEMRA
Prednisolone *	SOLUPRED	* Existe aussi en médicament générique	
Prednisone *	CORTANCYL		
Méthotrexate			
Méthotrexate*	IMETH solution injectable		
	MÉTHOTREXATE BELLON		
	MÉTHOTREXATE BIODIM		
	METOJECT seringues		
	METOJECT stylos		
	NORDIMET		
	NOVATREX		

### 2.6.2. Prise en charge non médicamenteuse

Au début de la maladie, il est conseillé de maintenir une **activité physique** permettant de préserver les articulations (Buljina *et al.* 2001; Geneen *et al.* 2017). Un **programme de rééducation fonctionnelle** peut être mis en place pour permettre au patient de maintenir sa mobilité et son autonomie, et prévenir les déformations articulaires. Cela consiste en une rééducation globale de toutes les articulations, associée à des massages visant à soulager les douleurs ou les contractures.

### La physiothérapie

Parmi les traitements dispensés par un physiothérapeute, on retrouve notamment la **thermothérapie** qui consiste à appliquer du froid sur les articulations atteintes, lors des poussées inflammatoires. En dehors des poussées, l'application de chaleur semble bénéfique et faciliterait la rééducation (boues

chaudes ou fangothérapie). On retrouve également l'électrothérapie, qui consiste en une électrostimulation des fibres nerveuses, par neurostimulation électrique transcutanée (TENS), et qui permet de réduire la douleur arthritique en affectant la transmission par les fibres nerveuses des signaux de douleur au cerveau (Li *et al.* 2004).

**La kinésithérapie** permet de lutter contre l'enraidissement, les déformations articulaires et la fonte musculaire, tout en maintenant une certaine flexibilité des articulations (Dumitrache *et al.* 2013).

**L'ergothérapie** consiste à apprendre au patient à préserver son autonomie en dépit du handicap, en adaptant ses gestes et son environnement. Cela repose sur l'utilisation d'orthèses, d'aides techniques et l'adaptation des lieux de vie et professionnels (Dumitrache *et al.* 2013).

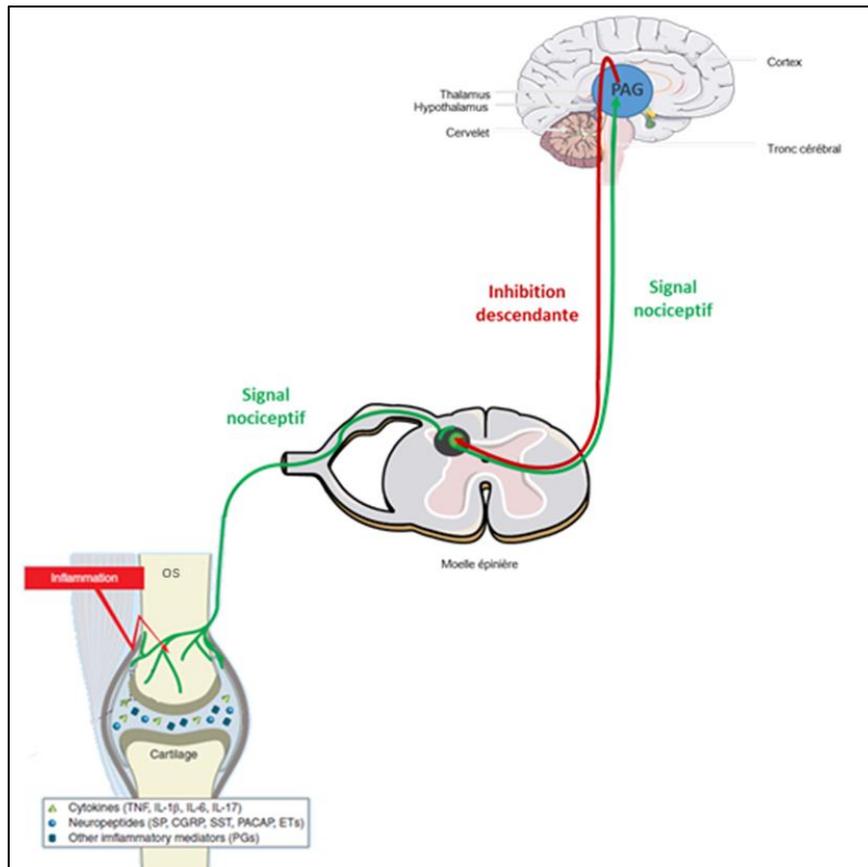
### 3. La douleur dans l'arthrite

La douleur constitue le motif principal de consultation de patients atteints de rhumatismes inflammatoires (Berthelot *et al.* 2009; Bas *et al.* 2016). Plus de 70% des patients souffrant de PR, placent dans leurs attentes thérapeutiques le soulagement de la douleur au premier plan en comparaison des autres symptômes de la maladie (Bas *et al.* 2016; Heiberg *et al.* 2005; ten Klooster *et al.* 2007). La douleur inflammatoire peut se manifester aussi bien lorsque l'articulation est sollicitée que lorsque l'individu reste au repos. Elle est caractérisée par des décharges lancinantes, ainsi que par une hypersensibilité douloureuse en réponse aux stimulations mécaniques et thermiques chaudes avec pour rôle d'induire un comportement de protection vis-à-vis de la zone enflammée et de limiter ainsi les mouvements de l'individu.

La douleur dans la PR est traditionnellement considérée comme étant d'origine nociceptive périphérique, c'est-à-dire provoquée par l'activation de fibres nerveuses sensorielles (fibres C) au sein de la synoviale enflammée (Schaible *et al.* 2010). Néanmoins, de récentes études démontrent que la douleur ne serait pas uniquement due à l'inflammation mais que de multiples mécanismes notamment une sensibilisation périphérique et centrale seraient en cause (Bas *et al.* 2016). En effet, certains patients atteints de PA peuvent présenter une douleur sur une localisation non inflammatoire (Hewlett *et al.* 2012). D'autres études ont confirmé ces observations en montrant qu'il n'y a pas de corrélation entre l'inflammation et la douleur (Studenic *et al.* 2012; Courvoisier *et al.* 2008; Boyden *et al.* 2016). Les processus inflammatoires décrits dans la PR impliquent une libération de nombreux facteurs vaso-actifs et chimiotactiques, qui établissent un environnement chimique complexe qualifié de "soupe" inflammatoire. De nombreuses substances algogènes, cytokines (telles que IL-6 IL-1 $\beta$ , TNF), des facteurs de croissance (tel que le «  $\beta$  nerve growth factor »,  $\beta$ -NGF) ou des chimiokines sont ainsi retrouvées en quantité importante au niveau du liquide synovial de patients atteints de PR (Walsh and McWilliams 2014; Brennan and McInnes 2008; Fava *et al.* 1994). Ces facteurs sont libérés par les cellules de la lignée inflammatoire ou immunitaire (monocytes/macrophages, lymphocytes), les

cellules de l'endothélium vasculaire, les thrombocytes, mais également par les terminaisons nerveuses nociceptives. Ces dernières jouent un rôle crucial dans l'entretien de la réaction inflammatoire ainsi que dans la douleur qui en découle. Une activation ainsi qu'une sensibilisation de fibres afférentes primaires localisées au niveau de l'articulation est ainsi à l'origine de la douleur inflammatoire. En effet, les nocicepteurs ont la capacité de percevoir et d'intégrer l'environnement inflammatoire dans lequel ils projettent. Ils ont également la possibilité de contribuer à cet environnement inflammatoire en sécrétant deux médiateurs peptidiques vasodilatateurs qui interviennent dans la dégranulation mastocytaire : la SP et le CGRP (« Calcitonin Gene-Related Peptide »). Ces neuropeptides algogènes vont contribuer à l'entretien de la réaction inflammatoire mais vont aussi permettre son expansion. En effet, suite à l'activation d'une terminaison nociceptive, le message nerveux va se propager aux terminaisons avoisinantes par un réflexe d'axone et provoquer la libération de SP et de CGRP. Cette composante à part entière de l'inflammation, dite "neurogène", est responsable d'une zone d'hypersensibilité secondaire entourant généralement le site d'inflammation initial. En effet, il est retrouvé chez les patients atteints de PR, une diminution des seuils de perception de la douleur mécanique et thermique. Cette sensibilité accrue à la douleur est présente non seulement au niveau des articulations enflammées mais aussi sur des sites non-articulaires éloignés (Edwards *et al.* 2009; Pollard *et al.* 2012). La SP et le CGRP libérés peuvent à leur tour venir activer les fibres nociceptives, créant ainsi une boucle d'autoactivation.

L'hypersensibilité peut se maintenir même lorsque les signes d'inflammation disparaissent (Woolf 2011). Des données émergentes expliqueraient le maintien de la douleur en dehors des phases d'inflammation, par une sensibilisation centrale et/ou un dysfonctionnement des systèmes de modulation descendants de la douleur (Meeus *et al.* 2012; Boyden *et al.* 2016) (**Figure 32**).



**Figure 32 : Contribution périphérique et centrale dans la douleur arthritique.** D'après Schaible 2014 .

Les stratégies thérapeutiques dans l'arthrite inflammatoire reposent sur des critères essentiellement cliniques prenant en compte la perception de la douleur par le patient. L'hypersensibilité à la douleur peut conduire à une surévaluation de l'activité inflammatoire, et à un traitement inapproprié. Or, il ne faut pas perdre de vue que l'inflammation présente peut induire des déformations ou des destructions des structures articulaires et péri-articulaires, à l'origine d'un handicap sévère. L'identification des mécanismes mis en jeu dans la douleur sous-jacente et le soulagement de celle-ci seraient ainsi d'une grande utilité dans la prise en charge du patient arthritique.

---

## Objectifs du travail de thèse

---

Il ressort de notre étude bibliographique que les canaux calciques de type T, notamment les canaux Cav3.2, semblent jouer un rôle fondamental dans la douleur. Différentes études ont montré leur implication dans des modèles animaux de douleur aiguë et chronique, notamment dans des modèles de douleur neuropathique (diabétique (Choe *et al.* 2011; Latham *et al.* 2009; Obradovic *et al.* 2014; Orestes *et al.* 2013; Messinger *et al.* 2009; Cao *et al.* 2011; Jagodic *et al.* 2007; Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2011), chimio-induite (Flatters and Bennett 2004; Okubo *et al.* 2011; Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2013) ou traumatique (Yue *et al.* 2013; Jagodic *et al.* 2008; Wen *et al.* 2010; Bourinet *et al.* 2005; Matthews and Dickenson 2001a; Dogrul *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2010). Une inhibition ciblée de ces canaux a montré une analgésie chez les rongeurs pouvant mener jusqu'à une restauration d'un phénotype normal (Latham *et al.* 2009; Messinger *et al.* 2009; Obradovic *et al.* 2014).

La connaissance des mécanismes impliquant les canaux Cav3.2 dans la signalisation douloureuse est à l'heure actuelle très incomplète. Une surexpression du canal (Takahashi *et al.* 2010; Scanzi *et al.* 2016) ou une augmentation de son activité (Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2011; Marger *et al.* 2011; Wen *et al.* 2010; Jagodic *et al.* 2008), en condition pathologique peuvent être mis en cause.

De nombreuses pathologies sont associées à la présence d'une douleur chronique, avec de fortes répercussions sur la qualité de vie des patients (Bouhassira *et al.* 2008; Attal *et al.* 2011). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement, basés sur l'utilisation d'AINS, d'opioïdes, d'anticonvulsivants et d'antidépresseurs, ont souvent une efficacité limitée ou sont mal tolérés. C'est le cas notamment dans les pathologies du syndrome de l'intestin irritable ou de la polyarthrite rhumatoïde. Par conséquent, afin de pallier le manque d'efficacité et/ou de réduire les effets indésirables des antalgiques prescrits jusqu'à présent dans les douleurs chroniques, il est nécessaire de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Dans ce contexte l'objectif de cette thèse est d'étudier l'implication des canaux Cav3.2 dans deux modèles de douleur chronique, l'un viscéral et l'autre somatique, au travers de stratégies à la fois génétiques et pharmacologiques, afin de comprendre les mécanismes par lesquels les canaux Cav3.2 sont mis en jeu dans le développement et le maintien de la douleur chronique. Ces travaux permettront *in fine* de proposer le canal Cav3.2 comme nouvelle cible afin de développer une thérapeutique pharmacologique alternative et/ou complémentaire aux antalgiques prescrits jusqu'à présent dans les douleurs chroniques.**

Afin de répondre à cet objectif, la thèse se découpe en plusieurs axes. Le premier axe consiste à évaluer l'implication des canaux Cav3.2 dans un modèle murin de douleur chronique d'origine viscérale, obtenu par utilisation de dextran sodium sulfate (DSS) à une concentration de 0,5%. Ce modèle est représentatif de pathologies cliniques d'hypersensibilité intestinale associées à une inflammation à bas bruit telle qu'elle peut être rencontrée chez certains patients présentant un syndrome de l'intestin irritable (SII), ou chez des patients présentant une hypersensibilité colique d'origine inflammatoire lors de période de rémission.

Le second axe porte sur l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique d'origine inflammatoire somatique sur des modèles murins, soit dans un contexte de douleur subaiguë, induit par injection i.pl. de carragénine, soit dans un contexte de douleur chronique, induit par injection intra-articulaire d'adjuvant complet de Freund (CFA). Ces deux modèles conduisent à une infiltration de cellules inflammatoires et à une hypertrophie synoviale, aspects similaires à ceux rencontrés chez les patients atteints de PR.

Différentes approches expérimentales *via* l'utilisation d'outils génétiques et pharmacologiques visant à bloquer les canaux Cav3.2, ont été appliquées dans chacun de ces modèles de douleur afin de caractériser l'implication fonctionnelle de ces canaux et de localiser cette implication.

Enfin, dans une perspective clinique, nous avons évalué l'effet de l'éthosuximide, utilisé en clinique dans le traitement de l'épilepsie, afin d'apporter une preuve de concept pour son utilisation dans la douleur chronique de diverses origines.

Cette étude a été conduite au travers de l'évaluation de différents paramètres :

- la **douleur**, *via* des tests comportementaux, de distension colorectale pour le modèle de douleur viscérale et des tests de von Frey pour les modèles de douleurs inflammatoires somatiques.
- l'évaluation de l'**inflammation**, systémique, locale, ou à bas bruit, par analyse des paramètres anatomiques et par dosages immunologiques d'indicateurs.
- l'évaluation de l'**expression de Cav3.2** dans les DRG, par technique d'immunohistochimie.



---

## Matériel et Méthodes

---

### 1. Animaux

Des souris mâles C57Bl/6J (Laboratoires Janvier, Le Genest Saint Isle, France) ainsi que des souris génétiquement modifiées (cf description ci-dessous) pesant environ 25 g, ont été élevées et stabulées dans l'Unité de Stabulation Animale des Facultés de Médecine et de Pharmacie à l'Université Clermont d'Auvergne. Il s'agit d'une animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) dans laquelle les souris sont hébergées en conditions environnementales contrôlées (température :  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , hygrométrie : 50%). Les animaux sont répartis par groupes de 8 par cage et reçoivent un régime alimentaire standard avec eau et nourriture disponibles *ad libitum*. Les expérimentations sont réalisées après au moins une semaine d'acclimatation aux conditions de stabulation de l'animalerie. Les expérimentations limitent au maximum le nombre d'animaux utilisés, en suivant les consignes éthiques de l'IASP (Zimmermann M., 1983). Elles sont de plus, en accord avec les consignes du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (décret n°874848). Les deux protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional :

- **Etude de douleur viscérale**

Référence du dossier : 8143

Titre du Projet : Evaluation de nouvelles cibles thérapeutiques pour la douleur viscérale, les canaux calciques voltage-dépendants

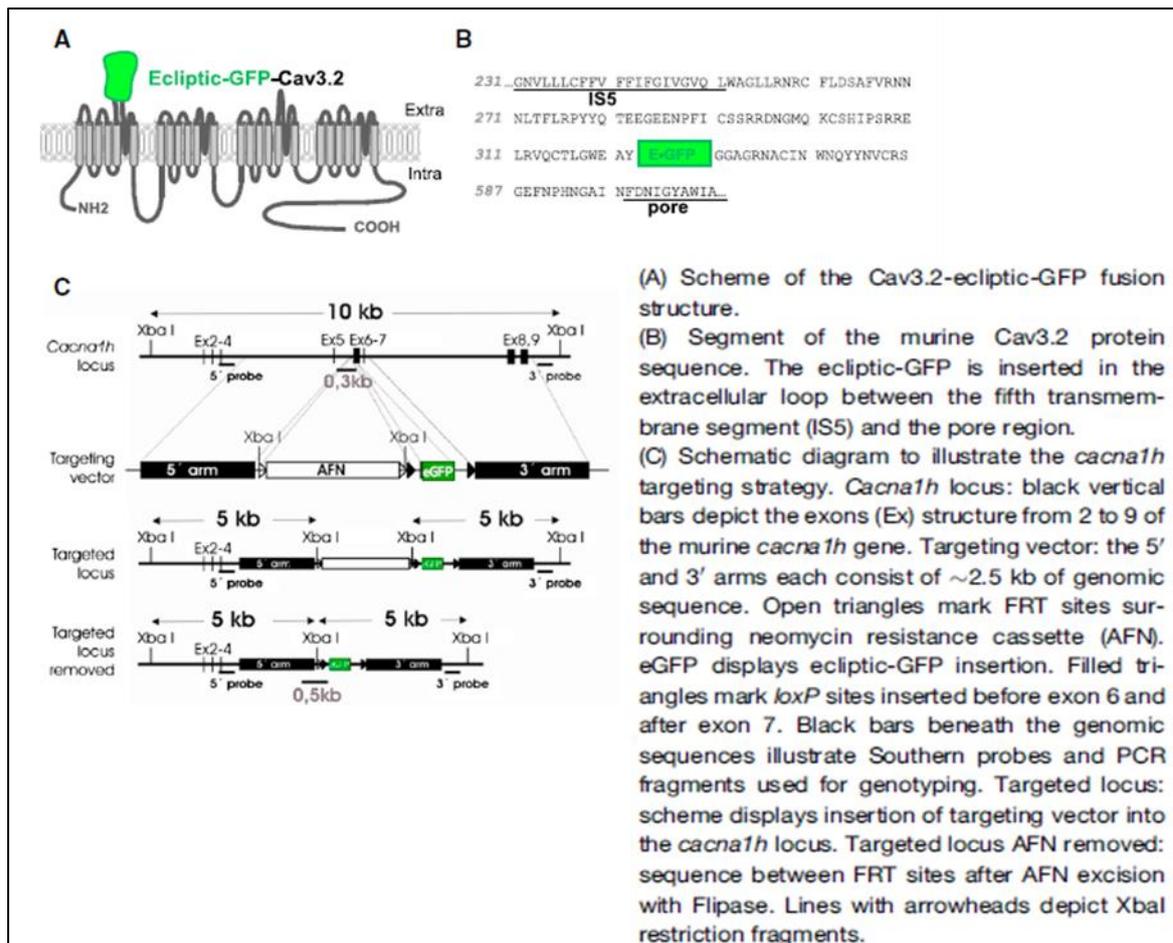
- **Etude de douleur inflammatoire somatique**

Référence du dossier : 6295

Titre du Projet : Implication des canaux calciques Cav3.2 dans les douleurs chroniques de type inflammatoire : une opportunité thérapeutique

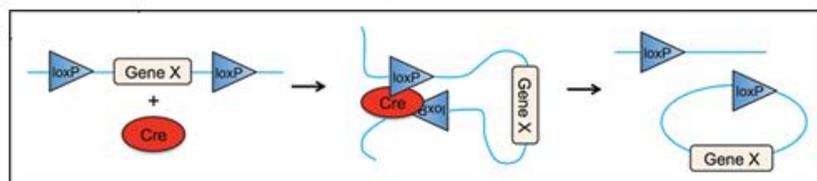
Les souris génétiquement modifiées utilisées dans cette étude sont :

- des souris avec invalidation du gène codant le canal Cav3.2 (**KO Cav3.2**) (Chen, Lamping, *et al.* 2003) ;
- des **souris Knock-in Cav3.2-GFP**, présentant 2 sites lox P flanqués d'un tag ecliptic-GFP dans l'exon 6 du gène *Cav3.2* (Francois *et al.* 2015). C'est une lignée de souris Knock-in/Flox où *Cav3.2* est remplacé par un *Cav3.2* fusionné à la protéine eclipticGFP et présentant un exon floxé (**Figure 33**) ;



**Figure 33 : Construction génétique des souris KI/Flox Cav3.2-GFP, d'après François *et al.*, 2015**

- des souris présentant un **Knock-out conditionnel** avec une délétion de *Cav3.2* spécifiquement dans les neurones DRG de petit diamètre (Small diameter Neuron Specically), souris nommées **SNS-KO** (Francois *et al.* 2015). Ces souris sont obtenues par croisement de souris KI/Flox *Cav3.2*-GFP avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le promoteur *Nav1.8* (Stirling *et al.* 2005), *Nav1.8* étant exprimé dans la plupart des fibres de petit calibre peu myélinisées A $\delta$  et/ou amyéliniques C (**Figure 34**).



**Figure 34 : Schéma explicatif du système Cre/Lox**

La Cre est une recombinaise, de la famille des intégrases du bactériophage P1. C'est une protéine de 38 kDa qui catalyse la recombinaison entre deux sites de reconnaissance, les sites LoxP. LoxP est une séquence d'ADN de 34 pb comprenant aux extrémités 13 nucléotides palindromiques. Il est impossible de trouver cette séquence dans un génome eucaryote. Ainsi, la cre-recombinase fonctionne dans les cellules eucaryotes génétiquement modifiées comportant deux sites LoxP et permet d'éliminer la région entre les deux sites.

Pour chaque génotype, les littermates sauvages (WT pour « wild type ») de ces souris sont également utilisées comme contrôles.

## 2. Modèles expérimentaux

### 2.1. Modèle de douleur viscérale

Afin d'induire un modèle d'hypersensibilité colique, nous avons administré du DSS (laboratoires MP Biomedicals) à 0,5% dans l'eau de boisson des souris, pendant 12 jours. Le DSS est habituellement utilisé à de plus fortes concentrations afin d'induire un modèle de colite (Okayasu *et al.* 1990). Nous avons choisi de l'utiliser à une très faible concentration afin d'induire une hypersensibilité colique (HSC) ainsi qu'une inflammation à bas bruit, sans lésion morphologique ni d'inflammation colique (Chassaing *et al.* 2012).

### 2.2. Modèle de douleur inflammatoire somatique

#### 2.2.1. Induction du modèle d'arthrite

L'administration de CFA est un modèle de polyarthrite rhumatoïde humaine (Brand 2005; Pearson 1956; Waksman 2002; Alvarado-Vazquez *et al.* 2015). Le CFA provoque une inflammation des articulations distales des membres et conduit à des manifestations comportementales évocatrices d'une douleur spontanée. Cinq microlitres de CFA (Difco Laboratories, Detroit, Etats-Unis) sont injectés au niveau des deux côtés de l'articulation de la cheville droite de la souris, sous anesthésie légère à l'isoflurane 2,5% (dans 3L/min d'air).

#### 2.2.2. Induction du modèle d'inflammation subaiguë

Vingt microlitres de  $\lambda$ -carragénine (Sigma-Aldrich, France) dilué à 3% dans du sérum physiologique sont administrés par injection au niveau de la voûte plantaire de la patte de l'animal.

## 3. Substances pharmacologiques

Le blocage des canaux calciques Cav3.2 a également été réalisé par voie pharmacologique, en administrant différents bloqueurs spécifiques :

- le **TTA-A2** (Alomone labs, Israel), de la famille des TTAs (T Type Antagonist) qui sont des dérivés des piperidines et qui possèdent une très grande sélectivité envers les canaux de type T, avec une action préférentielle sur les canaux Cav3.2 ;
- l'**ABT-639** (Clinisciences, France), bloqueur à action périphérique (Jarvis *et al.* 2014), ne passant pas la BHE ;

- l'**éthosuximide** (ETX, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), un antiépileptique utilisé chez l'homme et inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants, est testé.

(\*La morphine est utilisée dans le modèle de douleur viscérale, comme contrôle induisant une réduction maximale de la sensibilité colique).

Les véhicules (VEH) de chacun des différents bloqueurs sont utilisés comme contrôles :

- **VEH du TTA-A2** : 10% DMSO, 10% Tween 80 dans du NaCl
- **VEH de l'ABT-639** : 10% DMSO dans du NaCl
- **VEH de l'éthosuximide** : NaCl

## 4. Evaluation de la douleur

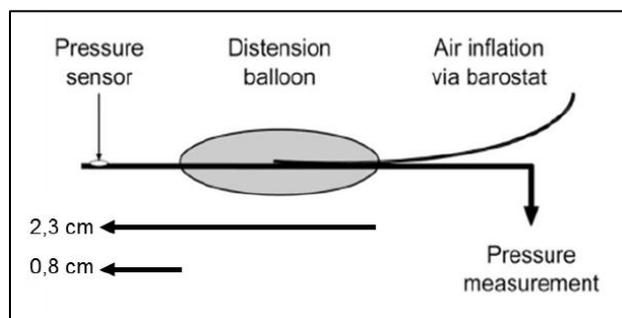
Afin d'évaluer l'effet des différentes stratégies d'inhibition des canaux Cav3.2 sur la perception douloureuse de l'animal, différents tests comportementaux sont réalisés.

### 4.1. Evaluation de la sensibilité colique : test de distension colorectale

La sensibilité colique de l'animal est évaluée par distensions colorectales, cette méthode est proche de celle utilisée chez l'Homme (Ritchie 1973) et consiste en l'inflation d'un ballonnet dans le côlon distal des souris. Nous avons utilisé dans cette étude la méthode manométrique non invasive (Larauche *et al.* 2009) . Un cathéter PE100 est fixé à 1cm sous le capteur de pression d'un cathéter transducteur de pression miniaturisé (cathéter Mikro-Tip SPR-254, Millar Instruments, Houston, TX, USA). Un ballonnet sur mesure, d'une longueur de 1,5cm, réalisé à partir d'un sac en plastique de polyéthylène, est fixé sur le cathéter à 8 mm sous le capteur de pression grâce à un fil de polyester (Ethicon® 3-0) (**Figure 35**). Les points de ligature sont recouverts de parafilm afin d'éviter toute fuite d'air. Au début de chaque expérimentation, chaque capteur de pression est étalonné avec des pressions connues (20 et 100 mmHg) à l'aide d'un barostat (Distender Series II, G&J Electronics Inc., Toronto, Canada). La sortie de tension est convertie en pression à l'aide d'un convertisseur analogique numérique (PowerLab, AD Instruments, Sydney, Australie) et grâce au logiciel LabChart7 (AD Instruments).

Les animaux sont placés en habitude dans le système de contention durant l'heure précédant le test de distensions colorectales. La phase d'habitude permet non seulement de diminuer le stress des animaux au moment du test comportemental mais également l'évacuation des fèces, facilitant ainsi l'introduction du ballonnet dans le côlon. Les animaux sont ensuite légèrement anesthésiés à l'isoflurane 2,5% (dans 3L/min d'air) pour permettre l'insertion du ballonnet associé au capteur de pression dans le *colorectum* à 1 cm de la marge anale. Le ballonnet est alors fixé à la queue de l'animal grâce à du ruban adhésif. L'animal est ensuite replacé dans la cage de contention et laissé à nouveau 30 minutes en habitude (**Figure 36**).

Chaque ballonnet couplé au capteur de pression est connecté au barostat ainsi qu'à un pré-amplificateur (PCU-2000 Dual Channel Pressure Control Unit, Millar Instruments) lui-même relié à l'interface PowerLab. Le protocole de distension consiste en un ensemble de distensions de pression croissante (20, 40, 60, 80 et 100 mmHg), répétées deux fois pour chacune des pressions, pendant 20 secondes avec un intervalle inter-stimulus de 4 minutes. L'analyse des tracés est effectuée à l'aide du logiciel LabChart (AD Instruments). Le signal brut (pression intracolique) est lissé sur une période de 2 secondes puis positivé. La réponse des animaux est calculée pour chaque pression de distension en soustrayant l'intégrale du signal traité correspondant aux 20 secondes précédant la stimulation à l'intégrale du signal traité pendant les 20 secondes de stimulation.



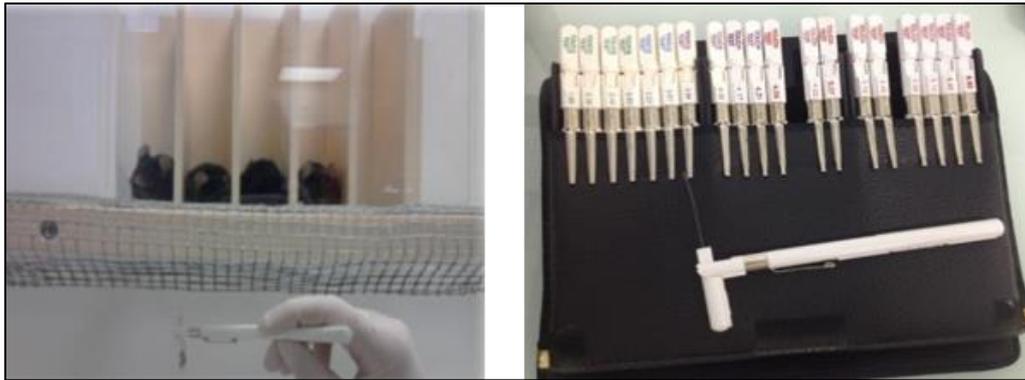
**Figure 35 : Schéma du cathéter transducteur de pression miniaturisé équipé du ballonnet en polyéthylène.** D'après Larauche *et al.*, 2010.



**Figure 36 : Test de distension colorectale par la méthode manométrique non invasive de Larauche *et al.*, 2010.**

#### 4.2. Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgésie : Test de von Frey

Ce type de test permet d'évaluer la perception de la douleur induite par une pression mécanique (Bell-Krotoski and Tomancik 1987). Il est également utilisé en clinique. Les souris sont placées dans des compartiments individuels sur le dessus d'une surface grillagée et laissées en habitude pendant une heure avant le test. Les seuils de douleur sont évalués par des filaments de von Frey calibrés à 0,4 et 1,4 g (Bioseb, France) afin d'évaluer respectivement l'allodynie et l'hyperalgésie. L'allodynie est une sensation de douleur ressentie pour une stimulation non douloureuse et l'hyperalgésie une sensation exagérée de douleur, en réponse à une stimulation douloureuse. Le filament est pressé perpendiculairement cinq fois contre l'œdème au niveau de l'articulation de la patte de l'animal et maintenu pendant 3 secondes (**Figure 37**). Les filaments sont passés par ordre de force croissante. Une réponse douloureuse est notée seulement quand la patte est retirée, ou léchée, et un score de réponse à la douleur (de 0 à 5) est déterminé.



**Figure 37 : Test de von Frey.** Réalisation du test (gauche) et kit complet de filaments de von Frey (droite).

## 5. Evaluation de l'inflammation

### 5.1. Inflammation systémique

#### 5.1.1 Paramètres anatomiques (\*dans le modèle de douleur viscérale)

Après sacrifice de l'animal, l'intestin et la rate sont prélevés, mesurés et pesés, afin d'évaluer les éventuelles différences physiologiques entre les groupes.

#### 5.1.2. Paramètres physiologiques

##### Dosage par ELISA de l'interleukine-6 (IL-6) plasmatique

Le sang est prélevé par ponction rétro-orbitaire puis centrifugé (5500 rpm, 30 minutes, 4°C) afin de récupérer le plasma qui est alors conservé à -20°C jusqu'au dosage. Un dosage de l'IL-6 est ensuite réalisé par l'utilisation de kits de dosage, kits Duo Set de chez R&D (IL-6 # DY 406 Minneapolis, USA) qui utilisent la technique des « sandwichs » en phase solide. Pour cela un anticorps primaire monoclonal est fixé au fond des puits d'une microplaque 96 puits (Plaques maxisorp F96 x60, #55133, Thermo Scientific, Brumath, France) durant une nuit. Après rinçage, les puits sont saturés à l'aide de BSA « bovin serum albumine » à 1% durant 1h, puis les échantillons dilués, et une gamme d'étalonnage sont déposés et incubés durant 2h. Après une nouvelle étape de 3 rinçages, un anticorps biotinylé est incubé pendant 2h dans les puits. Une dernière étape de 3 lavages est réalisée, et un substrat chromogène, la streptavidine-horseradich peroxydase qui va se fixer à la biotine, est ajouté dans les puits. Enfin, une solution de substrat (0,1 mg/ml de tetraméthylbenzidine (TMB), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,003%, diluée dans du tampon acétate, pH 6) est ajoutée afin de révéler l'activité peroxydase se traduisant par une coloration bleue qui se développe durant 20 min puis se transforme en jaune après ajout de la solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1,2 M). La lecture de la densité optique (DO) à 450 nm est ensuite réalisée par un lecteur de microplaques (Epoch™, BioTek Instruments®). Les concentrations des échantillons sont alors déterminées à partir de la gamme étalon.

## 5.2. Inflammation locale

### 5.2.1. Evaluation de la taille de l'œdème (\*dans le modèle de douleur inflammatoire somatique)

L'évolution de l'œdème de la patte est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

### 5.2.2. Dosage par ELISA de l'IL6 au niveau de l'œdème (\*dans le modèle de douleur inflammatoire somatique)

Après sacrifice, l'œdème de l'animal est prélevé et le tissu est incubé dans du milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplémenté de 10% d'un cocktail d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, #P11-010, PAA, Autriche), dans une étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Après une nuit d'incubation, le surnageant est prélevé, conservé à -20°C jusqu'au dosage. Un dosage ELISA de l'IL-6 est ensuite réalisé d'après le protocole précédemment décrit paragraphe 4.1.2.

### 5.2.3. Dosage par ELISA de la myéloperoxydase (MPO) et de l'IL-6 colique (\*dans le modèle de douleur viscérale)

Après sacrifice, la partie du côlon distal des animaux est prélevée, congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à leur utilisation, en vue de réaliser un dosage de MPO.

Les prélèvements sont broyés sur glace dans 300 µl de tampon de lyse constitué de Tris-HCl pH7,4 à 50 mM, d'EDTA à 0,5 mM (acide éthylène diamine tétraacétique, #E5134, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), de Triton 100X à 1%, de PMSF à 0,5mM (Phenylmethanesulfonyl fluoride, #P7626, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) en DMSO, d'aprotinine (#A6279, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) à 100UI/ml et de leupeptine à 20 µM (#SP-04-2217-B, Euromedex). Les échantillons sont ensuite passés au sonicateur durant 2 min dans un bain glacé puis placés sur de la glace pendant 20 min. Après centrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C), le surnageant de chaque échantillon est récupéré et conservé afin d'être dosé et dénaturé. La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée à l'aide du kit Pierce® BCA protein assay (# 23225, Thermo Scientific, France). Un dosage ELISA de la MPO est ensuite réalisé d'après le protocole précédemment décrit au paragraphe 5.1.2.

## 5.3. Inflammation à bas bruit

### Dosage par ELISA de la lipocaline-2 (Lcn-2) fécale (\*dans le modèle de douleur viscérale)

Cinquante à 100 mg de fèces sont dilués dans 1mL de tampon *Phosphate Buffer Saline* 1X (PBS), puis centrifugés 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et servira de matrice pour le dosage ELISA de la Lcn-2, dont les concentrations sont ramenées au poids de fèces diluées initialement (protocole précédemment décrit au paragraphe 5.1.2).

## 6. Evaluation de l'expression de Cav3.2, par immunohistochimie sur DRG

Afin d'évaluer l'expression des canaux Cav3.2 dans nos deux modèles de douleur chronique, des immunohistochimies sur coupes de DRG, provenant de souris KI Cav3.2-GFP sont réalisées.

Dans le modèle de douleur viscérale, un rétro-marquage des neurones coliques est préalablement effectué chez les souris afin d'étudier l'expression des canaux Cav3.2 uniquement au niveau des nocicepteurs coliques (Gold *et al.* 2002; Beyak *et al.* 2004; Marger *et al.* 2011). Pour ceci, une laparotomie est réalisée sur des souris KI Cav3.2-GFP, anesthésiées avec du mélange Ketamine (5%) Xylazine (10%) dans du NaCl (10 ml/kg, i.p.). Vingt microlitres de traceur neuronal rétrograde fluorescent Fluorogold (FG, hydroxystilbamidine bis méthanesulfonate, Sigma Aldrich, Allemagne) dilués à 4% dans du NaCl, sont injectés dans la paroi distale du côlon des souris pour permettre le marquage rétrograde des neurones coliques. Le muscle et la peau sont ensuite suturés. Six jours plus tard, les souris reçoivent du DSS (ou de l'eau) pendant 12 jours, les DRG correspondant aux étages T12 - T13 - L6 - S1 - S2 sont alors prélevés.

Dans le modèle de douleur inflammatoire somatique, les souris reçoivent une administration intra-articulaire de CFA et les DRG correspondant aux étages L4-L5 sont prélevés à J7 post-CFA.

Pour le prélèvement des DRG, les souris sont anesthésiées avec du mélange Ketamine-Xylazine dans du NaCl, injecté en i.p. (10 ml/kg) puis perfusées en intracardiaque avec 5 ml de sérum physiologique, puis 10 ml de paraformaldéhyde (PFA) 2% à une vitesse de 1 ml/min. Les DRG sont ensuite retirés et lavés trois fois 10 minutes dans du PBS. Les échantillons sont ensuite inclus dans de l'agarose à 4% (Ultrapure LMP agarose, Invitrogen, France), et des coupes de 30 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT 100 S). Les coupes sont ensuite déposées dans des plaques 12 puits contenant du PBS 1X. Une étape de saturation est réalisée par incubation des coupes flottantes dans du PBS-T-BSA (0,2% et 1% de BSA dans du TBS) à température ambiante (Ta) pendant 1 h. Les coupes sont ensuite incubées pendant une nuit à Ta avec un anticorps primaire (1: 500, chicken anti-GFP, Invitrogen, France), dilué dans une solution de PBS-T-BSA. Les sections sont ensuite lavées quatre fois avec du PBS-T (0,2% de Triton X-100 dans du TBS) et incubées à température ambiante pendant 1 h avec un anticorps secondaire (anticorps anti-chicken conjugué 1: 500, CF488A, Sigma, France) dilué dans du PBS-T-BSA, puis rincées à nouveau quatre fois avec du PBS-T. Les coupes sont montées sur des lames de verre gélatinées puis couvertes avec des lamelles 24X60 mm (Knittel glass) en utilisant du milieu de montage dédié à l'immunofluorescence (Dako fluorescent Mounting Medium, Dako®, USA). Après séchage, les lames marquées sont observées au microscope confocal ZEISS LSM 800 et enregistrées à l'aide du logiciel d'acquisition (Zen®). Les photos prises au grossissement X20 sont ensuite analysées en utilisant le logiciel IMARIS® (Bitplane, USA) pour quantification du marquage.

## 7. Evaluation de la l'activation gliale : immunohistochimie sur des coupes de moelle épinière (\* dans le modèle de douleur viscérale)

Les souris sont anesthésiées au pentobarbital (Ceva Santé Animale) dilué au ½ dans du sérum physiologique (10 ml/kg, i.p.). Elles sont ensuite perfusées par voie intracardiaque avec 25 ml de sérum physiologique, puis 100 ml de PFA 4%. La moelle épinière est ensuite prélevée et placée dans des tubes Falcon de 15 ml contenant du PFA 4% durant toute la nuit à 4°C pour une post-fixation. Le jour suivant, les échantillons sont transférés dans un bain de sucrose (Sigma-Aldrich) à 30% dilué dans du PBS, à 4°C sur la nuit. Des coupes de 20 µm d'épaisseur des segments L5 à S1 de la moelle épinière, ont ainsi été réalisées à l'aide d'un cryotome (Thermo Scientific), et conservées dans des plaques 12 puits contenant du PBS. Le jour de l'expérience, les coupes flottantes sont rincées dans une solution de PBS-T contenant du triton X-100 (0.2% de Triton X-100 dans du PBS). La saturation des sites de fixation aspécifique est alors réalisée par une incubation des coupes dans une solution de PBS-T- BSA (0,2% de Triton X-100, 1% de BSA du PBS). Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué au 1/1000 (anticorps anti-GFAP et anti-Iba-1 pour la détection respectivement des astrocytes et de la microglie) pendant 2h à Ta. Après 3 rinçages avec du PBS-T, les coupes sont incubées pendant 1h à Ta avec un anticorps secondaire fluorescent marqué Alexa fluor 488 dilué (1:600, Invitrogen Molecular Probes). Les coupes sont montées sur des lames de verre gélatinées puis couvertes avec des lamelles 24 X 60 mm (Knittel glass) en utilisant du milieu de montage dédié à l'immunofluorescence (Dako). Après séchage, l'observation se fait avec un microscope à fluorescence (Nikon eclipse Ni) et l'acquisition des images est réalisée à l'aide d'une caméra CCD (Hamamatsu) et d'un logiciel d'acquisition (NIS Elements AR, Nikon). Les photos prises au grossissement X20 sont ensuite analysées à l'aide d'un outil de seuillage du logiciel Fiji (USA National Institute of Health) pour la mesure de la surface marquée.

## 8. Culture cellulaire

### 8.1. Culture de BMDM

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM pour « Bone Marrow Derivated Macrophage ») ont été préparés et cultivés suivant le protocole décrit dans la littérature (Gersuk, Razai, and Marr 2008). Brièvement, les fémurs et tibia des souris ont été vidés de leur moelle osseuse avec du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM). La suspension cellulaire obtenue a été ensuite mise en culture à hauteur de 10<sup>6</sup> cellules / ml. Les cellules ont été cultivées et différenciées en BMDM en utilisant un milieu DMEM supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF), 1% glutamine, 1% antibiotique (néomycine) et 50% de surnageant de culture de cellule L929, contenant le facteur de différenciation macrophagique (M-CSF). Pour les expériences in vitro, les BMDM ont été cultivés et placés à

l'incubateur au moins 5 jours avant d'être stimulés par du LPS (lipopolysaccharide) en milieu de culture sans SVF.

## 8.2. Culture primaire enrichie en astrocytes ou en microglie

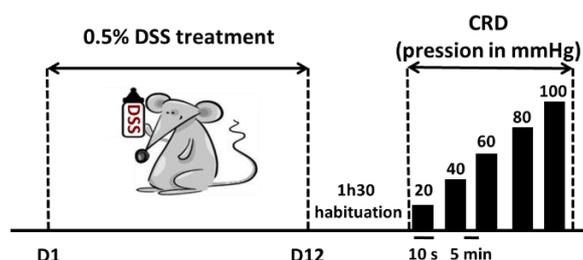
Les cortex de 5 à 6 nouveau-nés de 1-3 jours sont prélevés et placés dans une boîte de pétri contenant 1,5 ml de PBS. Les cortex sont ensuite dissociés mécaniquement à l'aide d'une pipette P1000 puis P200. Une fois dissociés, les cellules sont transférées dans un tube Falcon® complété à 15 mL avec du DMEM. Le tube est ensuite centrifugé 10 min à 800 rpm et 4°C. Le culot est remis en suspension avec 15 mL de DMEM. Cette étape est répétée 3 fois et à la troisième fois le culot est re-suspendu dans du milieu DMEM supplémenté (1% de N-2 supplément, 10% FBS (« Fetal Bovine Serum »), 1% d'antibiotique dans du DMEM). Les cellules sont ensuite transférées dans une flasque T-75 et placée à l'incubateur. Une fois la confluence totale atteinte (à J9-10), la flasque est mise à agitation sur de la glace durant 1h à 100 rps afin de décoller les cellules microgliales qui se trouvent sur le tapis astrocytaire. Le milieu est ensuite collecté dans un tube Falcon et centrifugé à 800 rpm 5 min et à 4°C. Après la centrifugation, le culot cellulaire est re-suspendu afin d'obtenir  $2 \cdot 10^5$  cellules par mL. Les cellules sont ensuite distribuées dans une plaque 6 puits. La plaque est mise à l'incubateur overnight et permet d'obtenir les cultures primaires enrichie en microglies. Du milieu frais est ajouté dans les flasques contenant les astrocytes, celle-ci est remise à l'incubateur et correspond aux cultures primaires enrichies en astrocytes.

## 9. Protocoles expérimentaux

### 9.1. Dans le modèle de douleur viscérale

#### 9.1.1. Mise en place du modèle et effet d'une invalidation génétique des canaux Cav3.2

Les souris sont mises sous DSS à 0,5% sur une période de 12 jours. A J12 la sensibilité colique des animaux est évaluée par distensions colorectales (CRD). Les différents prélèvements biologiques sont réalisés après distensions colorectales.



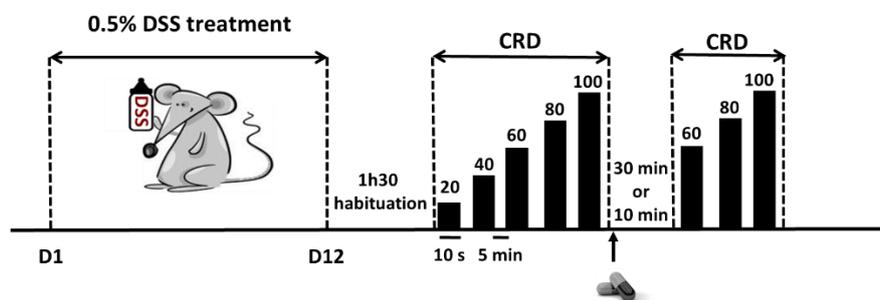
#### 9.1.2. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration aiguë.

L'effet d'une administration aiguë est évalué au niveau de la sensibilité colique par distensions colorectales de la façon suivante : un premier set de distensions avec des pressions allant de 20 à 100

mmHg est réalisé à J12 post DSS, puis la substance pharmacologique ou le véhicule contrôle, sont administrés et 30 min plus tard (10 min concernant les administrations spinales), un second set de distension avec les pressions les plus fortes allant de 60 à 100 mmHg est effectué, ainsi la souris constitue son propre témoin.

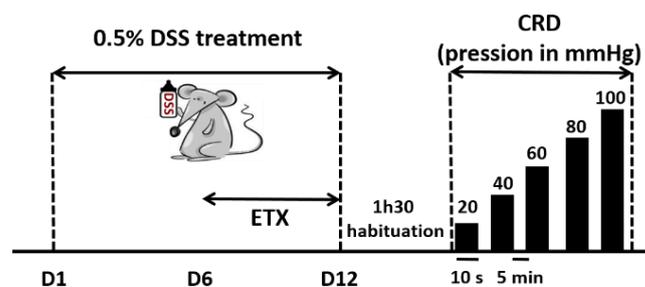
Les différentes substances pharmacologiques administrées sont les suivantes :

- **TTA-A2 aigu** (unique injection en s.c., 1mg/kg)
- **ABT-639** (unique injection en s.c., 30 mg/kg)
- **ABT-639** (unique injection en i.t., 10 µg / 5µl)
- **ETX aigu** (unique injection en s.c., 200 mg/kg)
- **Morphine** (unique injection en s.c., 1 mg/kg)



### 9.1.3. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration répétée

L'effet d'une administration répétée d'ETX (200 mg/kg, i.p.) avec 3 injections par jour pendant 6 jours, de J6 à J7, est évalué par distensions colorectales se déroulant à une distance de 12h de la dernière injection.



## 9.2. Modèle de douleur inflammatoire somatique

### 9.2.1. Effet d'une invalidation génétique des canaux Cav3.2

#### En modèle carragénine

Des tests de von Frey sont réalisés à T0 (avant administration) afin de définir la sensibilité basale de l'animal. L'effet d'une injection i.pl. de carragénine chez la souris est ensuite mesuré à 2h, 4h, 6h, 8h et 24h post-injection.

### En modèle CFA

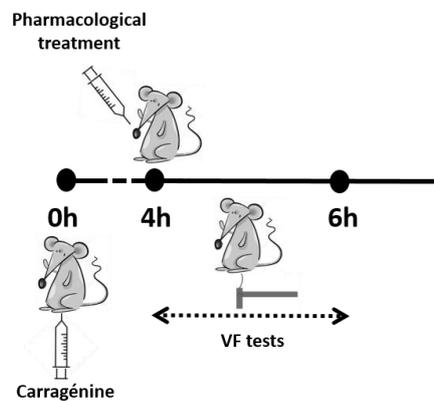
Des tests de von Frey sont réalisés à J0 (avant administration) afin de définir la sensibilité basale de l'animal. L'effet d'une injection intra-articulaire de CFA chez la souris est ensuite mesuré quotidiennement de J1 à J7.

#### 9.2.2. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administration aiguë

**En modèle carragénine :** les différentes substances pharmacologiques administrées sont les suivantes :

- **TTA-A2 aigu** (injection unique per os, 1 mg/kg)
- **ETX aigu** (unique injection en i.p., 200 mg/kg)

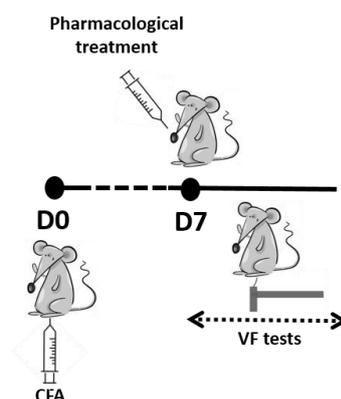
Les traitements sont administrés à 4h post injection de carragénine. Leur effet est évalué par test de von Frey 15, 30, 45 minutes, 1, 2, 4, 6 heures après injection.



**En modèle CFA :** les différentes substances pharmacologiques administrées sont les suivantes :

- **TTA-A2 aigu** (injection unique per os, 1 mg/kg)
- **ABT-639** (injection unique en i.p., à J7, 10, 30 ou 100 mg/kg)
- **ABT-639** (injection unique en i.t., à J7, 10 µg / 5µl)
- **ABT-639** (injection unique en i.pl., à J7, 0,1 mg/kg)
- **ETX aigu** (injection unique en i.p., à J7, 200 mg/kg)

Les traitements sont administrés à J7 post injection de CFA. Leur effet est évalué par test de von Frey 15, 30, 45 minutes, 1, 2, 4, 6 heures après injection.

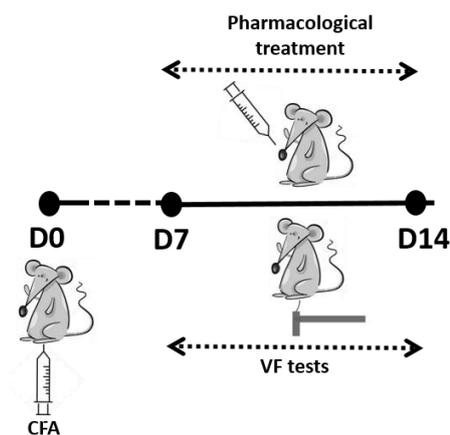


### 9.2.3. Effet d'une invalidation pharmacologique des canaux Cav3.2 par administrations répétées

Les différentes substances pharmacologiques administrées sont les suivantes :

- **TTA-A2 répété** (administrations répétées en *per os*, 3 fois par jour pendant 6 jours, de J7 à J14, 1 mg/kg)
- **ETX répété** (administrations répétées en i.p., 3 fois par jour pendant 6 jours, de J7 à J14, 200 mg/kg)

Les animaux reçoivent une administration intra-articulaire de CFA, puis à J7 post CFA, débute un traitement pharmacologique avec 3 administrations par jour jusqu'à J14. Des tests de von Frey sont réalisés chaque jour, à distance de la dernière administration.



## 10. Analyses Statistiques

Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne. Les valeurs de réponse viscéraomotrices (VMR) obtenues à la distensions colorectales sont analysées en utilisant une ANOVA à 2 voies (effet groupes x effet pressions) suivie par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples. Une ANOVA une voie (effet traitement) a été réalisée lorsque l'effet d'un traitement pharmacologique (TTA-A2, ABT-639, ETX, morphine) a été comparé à la sensibilité basale des animaux.

Les valeurs de von Frey sont également analysées en utilisant une ANOVA à 2 voies (effet groupe x effet temps) puis par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples.

Les concentrations en Il-6, MPO ou en Lcn-2 sont analysées par la réalisation d'une ANOVA à 1 voie (effet traitement), suivie par le test post-hoc de *Bonferroni* pour les comparaisons multiples et par un test T de Student à l'aide d'un test de Mann-Whitney lorsqu'uniquement deux groupes sont comparés. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque  $P < 0,05$ .

---

## Résultats

---

### I. Implication des Canaux Calciques Cav3.2 dans la douleur viscérale

---

# Article 1

---

## COLONIC OVEREXPRESSION OF THE T-TYPE CALCIUM CHANNEL CAV<sub>3.2</sub> IN A MOUSE MODEL OF VISCERAL HYPERSENSITIVITY AND IN IRRITABLE BOWEL SYNDROME PATIENTS.

J. Scanzi, A. Accarie, E. Muller, B. Pereira, Y. Aissouni, M. Goutte, J. Joubert-Zakeyh, **E. Picard**,  
L. Boudieu, C. Mallet, A. Gelot, D. Ardid, F. A. Carvalho & M. Dapoigny

---

### Synthèse des travaux de l'article

#### *Contexte de l'étude*

L'hypersensibilité viscérale, mise en évidence par le test de distension colorectale, constitue un facteur physiopathologique majeur des douleurs abdominales associées au syndrome de l'intestin irritable (SII). Cette hypersensibilité colique peut résulter d'une sensibilisation périphérique et/ou centrale. Cette étude s'est focalisée sur l'aspect périphérique de l'hypersensibilité colique. Une perturbation de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, suite à une infection ou une dysbiose, peut permettre l'entretien d'un état inflammatoire à bas bruit au niveau de la muqueuse, induisant *in fine* une sensibilisation des fibres afférentes primaires coliques. Une surexpression de canaux ioniques, au niveau de la muqueuse colique, peut participer à cette sensibilisation. Aussi, cette étude s'est intéressée à l'implication des canaux calciques voltage-dépendants de type T, les canaux Cav3.2. De précédents travaux avaient mis en évidence l'implication de ces canaux dans différents types de douleur chronique, certaines ayant porté sur la douleur viscérale, dans des modèles murins de cystite (Murakami-Nakayama *et al.* 2015) ou de colite (Matsunami *et al.* 2011; Matsunami *et al.* 2009; Tsubota-Matsunami *et al.* 2012; Murakami-Nakayama *et al.* 2015; Terada *et al.* 2015). Très peu d'études se sont intéressées à l'implication des canaux Cav3.2 dans le SII (Marger *et al.* 2011; Francois *et al.* 2013) et uniquement dans un modèle d'instillation rectale de butyrate chez le rat.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons mis au point un modèle d'HSC associé à une inflammation à bas bruit pouvant refléter la pathologie du SII. Pour cela nous nous sommes basés sur une étude de Chassaing *et al.*, (2012) portant sur l'effet de différentes concentrations de Dextran Sodium Sulfate

(DSS) ajoutées dans l'eau de boisson, sur l'état inflammatoire de souris. A une concentration de 0,5% et sur une période d'administration de 12 jours, le DSS induit une inflammation à bas bruit, mesurée par une augmentation de la lipocaline-2 fécale. Aucune inflammation locale (mesurée par dosage de MPO et d'IL-6 colique) ou systémique (mesurée par dosage d'IL-6 sérique) sévère n'est cependant retrouvée chez ces souris.

Nous avons donc évalué l'effet du DSS sur la sensibilité colique en administrant celui-ci à la même concentration de 0,5%, sur une durée plus longue de 12 jours, afin d'induire un modèle plus chronique, se rapprochant au mieux de la clinique. Nous avons retrouvé le même profil inflammatoire que dans l'étude de Chassaing *et al.*, (2012), à savoir la présence d'inflammation à bas-bruit et l'absence d'inflammation locale ou systémique sévère, chez les souris recevant du DSS comparativement aux souris contrôles (ne recevant que de l'eau). De plus, nous avons démontré pour la première fois la présence d'HSC induite par le DSS utilisé à 0,5%. L'inflammation à bas bruit et l'HSC sont retrouvées chez la plupart des patients souffrant de SII, plaçant notre modèle comme un bon modèle pour l'étude de la physiopathologie de cette maladie.

### Résultats

Cette étude s'est organisée en deux parties. La première a porté sur l'implication des canaux Cav3.2 dans le modèle murin de SII décrit précédemment. L'effet de l'inhibition génétique des canaux Cav3.2, par l'utilisation de souris KO Cav3.2 et de leur WT littermates, sur la sensibilité colique, a été analysé par technique de distension colorectale. Les niveaux d'expression des canaux Cav3.2 ont été étudiés par qPCR.

**Suite au traitement DSS, une HSC a été observée chez les souris WT mais n'a pas été retrouvée chez les souris KO qui ont présenté une sensibilité colique similaire en présence ou non de DSS (Figure 1A de l'article 1).** De plus, l'analyse transcriptionnelle des canaux Cav3.2 chez des souris sauvages ayant reçu du DSS ou de l'eau, a montré **une surexpression significative de Cav3.2 en condition pathologique (DSS) comparativement au groupe contrôle (Figure 1B).** L'ensemble de ces résultats suggère une implication des canaux Cav3.2 dans le développement de l'HSC

La seconde partie, dans un but de recherche translationnelle, a consisté en l'étude de l'expression des canaux Cav3.2 au niveau de la muqueuse colique de patients atteints du SII par rapport à des patients témoins. Vingt-neuf patients, 13 présentant un SII (répondant aux critères de Rome) et 16 témoins (adressés pour dépistage de polype(s) ou de cancer colorectal, mais ne présentant ni polype, ni cancer, ni inflammation colique visible) ont été inclus dans l'étude. Des biopsies sigmoïdiennes systématiques ont été réalisées chez ces individus. Les niveaux d'expression au niveau transcriptionnel et protéique des canaux Cav3.2 ont été étudiés respectivement par qPCR et immunohistochimie. L'analyse

transcriptionnelle des canaux Cav3.2 chez les patients atteints de SII comparativement aux témoins a montré **une surexpression significative des canaux Cav3.2 en contexte pathologique comparativement aux sujets contrôles (Figure 2)**. Les biopsies de côlons des patients atteints de SII et des témoins, ont également été utilisées pour rechercher la présence de la **protéine Cav3.2** par immunohistochimie. Les résultats révèlent sa **localisation au niveau de la muqueuse colique, en particulier dans les fibres nerveuses (Figure 3)**. Ils confirment une augmentation de l'abondance de la protéine chez les patients atteints de SII (**Figure 4**).

### **Discussion/Conclusion**

Ainsi, ces travaux dont l'originalité est d'associer, dans un esprit de recherche translationnelle, des approches précliniques et cliniques, démontrent une **implication des canaux Cav3.2 dans l'HSC présente dans un modèle murin de SII et dans la douleur abdominale observée chez les patients souffrant de SII**. Ces résultats suggèrent que la surexpression des canaux Cav3.2 observée chez les patients atteints de SII, pourrait jouer un rôle dans la survenue de la douleur viscérale possiblement liée à l'hypersensibilité colique. Ils ouvrent de **nouvelles perspectives quant à l'utilisation d'un blocage spécifique de ces canaux à des fins thérapeutiques**.

Ma contribution à cet article a apporté un résultat majeur (**Figure 1A**) puisque l'utilisation de souris KO pour le gène *Cav3.2* dans un modèle de SII associant présence d'HSC et inflammation à bas-bruit, a démontré pour la première fois dans ce type de modèle, l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur abdominale associée au SII. Ces résultats sont en accord avec ceux de Marger *et al.* (2011) utilisant un knock-down *in vivo* des canaux *Cav3.2* dans un modèle de SII obtenu par instillation intra colique de butyrate chez le rat. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition des canaux Cav3.2 réduit l'hypersensibilité douloureuse induite par le butyrate. D'autres travaux menés dans des modèles de cystite (Murakami-Nakayama *et al.* 2015) ou de pancréatite (Matsunami *et al.* 2011; Terada *et al.* 2015 ; Matsunami *et al.* 2009; Tsubota-Matsunami *et al.* 2012; Murakami-Nakayama *et al.* 2015) chez la souris, confirment l'intérêt de cibler les canaux Cav3.2 dans la douleur viscérale. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les canaux Cav3.2 contribuent à la signalisation douloureuse sont peu connus et demandent à être clarifiés. Aussi, la suite de ma thèse a porté plus particulièrement sur cet aspect. Pour cela, nous avons utilisé une double stratégie visant à inhiber les canaux Cav3.2 par des approches génétiques et pharmacologiques (**ARTICLE 2**).



















## Article 2

---

### NEW HIGHLIGHTS ABOUT CAV<sub>3.2</sub> CHANNELS INVOLVEMENT IN A MICE MODEL OF COLONIC HYPERSENSITIVITY ASSOCIATED WITH LOW-GRADE INFLAMMATION

Picard E., Carvalho F. A., Bourinet E., Ardid D., Eschalier A., Daulhac L., Mallet C.

---

#### Synthèse des travaux de l'article

##### *Contexte de l'étude*

Dans l'ARTICLE 1, nous avons démontré que la présence des canaux Cav3.2 était indispensable au développement d'une HSC induite par l'administration de DSS 0,5% dans l'eau de boisson des animaux. En effet, aucune HSC n'a été retrouvée chez les souris KO Cav3.2, suite au traitement DSS. De plus, la partie clinique de ce travail a également montré l'intérêt de cibler les canaux Cav3.2 dans le SII, en révélant une augmentation des niveaux d'expression des canaux Cav3.2 aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique, chez les patients souffrant de SII comparativement aux sujets témoins. Ces résultats confortent l'intérêt d'approfondir les recherches concernant la compréhension du rôle de ces canaux dans la douleur abdominale.

Ainsi, **les objectifs de cette étude étaient dans un premier temps de mieux caractériser notre modèle de DSS 0,5% et dans un second temps de confirmer et de comprendre l'implication physiologique des canaux Cav3.2 dans la douleur abdominale associée à une HSC.** Dans une démarche de recherche translationnelle inverse, nous avons réalisé cette seconde étude dans le modèle murin d'HSC associée à une inflammation à bas bruit, décrit précédemment.

##### *Résultats*

Nous avons tout d'abord caractérisé notre modèle en démontrant la présence HSC en réponse à la distension colrectale (**Figure 1.A de l'article 2**), l'absence de variation au niveau des paramètres anatomiques comme le poids et la longueur des organes viscéraux (rate et côlon ; **Figure 1B**), l'absence d'inflammation systémique (IL-6 sérique ; **Figure 1C**), l'absence d'inflammation locale (MPO et IL-6 colique, **Figure 1C**) et la présence d'inflammation à bas bruit (Lcn-2 fécale ; **Figure 1D**).

Nous avons dans premier temps **confirmé l'implication des canaux Cav3.2 dans l'HSC induite par le DSS**. Pour cela, nous avons utilisé une approche génétique avec des **souris KO Cav3.2** et une approche pharmacologique par l'utilisation du **TTA-A2, un bloqueur pharmacologique des canaux de type T, présentant une forte affinité pour les canaux de type T**. Nos résultats ne montrent aucune modification de la sensibilité colique chez les souris KO Cav3.2 ayant reçu du DSS (**Figure 2 A**). De plus, une suppression de l'HSC induite par le DSS a été observée suite à l'administration du TTA-A2 (**Figure 2C**). Ces résultats confirment **l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement et le maintien de l'hypersensibilité colique induite par le DSS**.

Nous avons également évalué l'effet de l'ETX, un bloqueur des canaux de type T, utilisé en clinique pour le traitement de l'épilepsie. Nous avons démontré une **action antalgique de l'ETX, avec une forte réduction de l'HSC suite à une administration aiguë d'ETX (Figure 2C)**. L'ETX étant connu pour avoir une spécificité non limitée aux canaux Cav3.2 (Goren and Onat 2007), nous avons étudié son effet chez des souris KO Cav3.2 et WT littermates soumises au DSS. Nous avons utilisé pour cette expérimentation la morphine comme contrôle permettant d'abaisser au maximum la sensibilité colique de l'animal. Nous avons retrouvé chez les souris WT un effet antalgique de l'ETX, se traduisant par une diminution des réponses viscéromotrices de l'animal suite à la distension. Ces réponses sont encore plus diminuées suite à l'usage de la morphine. Chez les souris KO Cav3.2, contrairement à la morphine, l'ETX n'a pas diminué la sensibilité colique des animaux. Ces résultats démontrent **un effet antalgique de l'ETX impliquant spécifiquement les canaux Cav3.2 (Figure 2D)**. De plus, une administration répétée d'ETX, à raison de 3 injections i.p. quotidienne, de J6 à J12, a également montré le même type d'effet antalgique chez la souris ; les tests de distensions colorectales ayant été réalisés à distance de la dernière administration (**Figure 2E**).

Afin de comprendre l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans l'HSC, nous étudié son expression chez des souris ayant préalablement reçu une injection de marqueur rétrograde au niveau de la paroi colique afin de rétro-marquer les nocicepteurs coliques. **Aucune différence significative n'a été observée quant à l'abondance protéique** de Cav3.2 évaluée par technique d'immunohistochimie sur des coupes de DRG issus de souris Cav3.2-GFP rétro-marquées et soumises au DSS (ou contrôles) (**Figure 3A et B**). Ces souris Cav3.2-GFP sont obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Docteur Emmanuel Bourinet (François *et al.* 2015). Elles ont été utilisées dans cette étude afin de pallier le manque d'anticorps spécifiques de Cav3.2 chez la souris.

Le résultat majeur de cette étude est la localisation de l'effet antalgique résultant du blocage des canaux Cav3.2. Afin de discriminer l'implication centrale et périphérique, deux stratégies originales et complémentaires ont été mises en œuvre :

- La première est une approche génétique utilisant des **souris présentant un KO conditionnel dans lesquelles le gène Cav3.2 est invalidé uniquement dans les DRG de petit diamètre (souris SNS-KO, obtenues en collaboration avec Emmanuel Bourinet).**
- La seconde consiste en l'application d'un traitement pharmacologique avec un **bloqueur de Cav3.2 à action périphérique, l'ABT-639.**

L'utilisation des souris SNS-KO a tout d'abord permis de **localiser l'implication des Cav3.2 dans l'HSC, au niveau des fibres C des DRG.** En effet, ces souris n'ont pas développé d'HSC suite au traitement DSS (**Figure 4A**). Au niveau des fibres C des DRG, l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 peut provenir de la périphérie et/ou des niveaux spinaux. Nous avons alors utilisé l'ABT-639 par différentes voies d'administration, afin de distinguer la contribution périphérique *versus* spinale des canaux Cav3.2 dans l'HSC. Cette substance ne traversant pas la BHE, son utilisation systémique permet une inhibition des canaux Cav3.2 restreinte à la périphérie. Les résultats d'une administration en s.c. (systémique) n'indiquent aucun effet de l'ABT-639 sur l'HSC (**Figure 4B**). Néanmoins, une administration i.t. du composé a permis de réduire de façon significative l'HSC induite par le DSS, indiquant une **implication spinale des Cav3.2 (Figure 4C)**. Administré par voie i.t., l'ABT-639 peut exercer son action antalgique par l'inhibition des canaux Cav3.2 localisés sur les neurones médullaires pré- et/ou postsynaptiques. Afin de différencier les deux localisations, l'effet de l'ABT-639 (i.t.) a été évalué chez les souris SNS-KO. Aucune modification de l'HSC n'a été observée, contrairement à la morphine qui a induit une diminution significative de la sensibilité colique de ces souris (**Figure 4D**). Ces résultats nous permettent de conclure à une **implication des canaux Cav3.2 présynaptiques de la moelle épinière.**

De façon intéressante, une administration d'ETX chez les souris SNS-KO n'a pas généré de diminution de la sensibilité colique chez les SNS-KO alors qu'un effet antalgique est retrouvé chez leurs WT littermates, traduisant un **effet antalgique de l'ETX impliquant spécifiquement les canaux Cav3.2 localisés sur les fibres C des DRG (Figure 4E).**

### Discussion/Conclusion

Tout d'abord, cette étude a permis de **caractériser un nouveau modèle murin d'HSC associée à une inflammation à bas bruit.** Ce modèle consistant en une administration de DSS à 0,5% dans l'eau de boisson des souris sur une période de 12 jours, induit une symptomatologie proche de celle rencontrée dans le SII, mais aussi des MICI en phase de rémission. L'utilisation de stratégies combinant des approches génétiques et pharmacologiques, a permis de mettre en évidence une implication

fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans l'HSC. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées dans un modèle de SII consistant en l'instillation colique de butyrate chez des rats (Marger *et al.*, 2011 ; Francois *et al.*, 2013).

Cette implication des canaux Cav3.2 dans l'HSC peut s'expliquer par une surexpression du canal et/ou une augmentation de son activité, et/ou peut résulter de modifications post-traductionnelles ou de perturbations physiologiques induites par le contexte pathologique. Nous n'avons **pas observé d'augmentation significative de l'abondance protéique du canal Cav3.2 spécifiquement dans les neurones innervant le côlon chez les souris traitées au DSS**. Les résultats de la littérature concernant l'expression protéique du canal sont divergents. En effet, certaines études ont démontré une augmentation de l'abondance de la protéine en condition pathologique (Takahashi *et al.* 2010; Scanzi *et al.* 2016; Li *et al.* 2017) alors que d'autres n'ont observé aucune différence significative (Okubo *et al.* 2011; Lin *et al.* 2016). Ces résultats controversés, peuvent s'expliquer par le manque d'anticorps spécifiques de Cav3.2 disponibles sur le marché (Francois *et al.* 2015). Pour pallier cet inconvénient, nous avons utilisé l'outil génétique puissant et original, que sont les souris KI Cav3.2- GFP.

Des travaux précédents ont expliqué l'implication des canaux Cav3.2 dans des modèles de douleur neuropathique (Jagodjic *et al.* 2007 ; Latham *et al.* 2009 ; Yue *et al.* 2013 ; Lin *et al.* 2016) ou viscérale (Matsunami *et al.* 2009 ; Marger *et al.* 2011; Camilleri and Boeckxstaens 2017), par une hyperactivation des canaux Cav3.2. Nous pouvons ainsi supposer l'existence d'une augmentation des courants des canaux Cav3.2 dans notre modèle d'HSC. Des études complémentaires sont nécessaires afin de pouvoir vérifier cette hypothèse. Toutefois, une augmentation de l'activité d'un canal ionique n'est pas forcément associée à l'implication du dit canal dans la douleur. En effet, une étude récente a démontré l'implication des canaux HCN2 « hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 » dans un modèle animal de douleur neuropathique diabétique sans présence d'augmentation ni de l'expression ni de l'activité du canal (Tsantoulas *et al.* 2017). D'autres mécanismes tels que des modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination et la déubiquitination ont été décrites concernant les canaux Cav3.2 (Garcia-Caballero *et al.* 2014).

Notre étude a également permis de démontrer **l'implication fonctionnelle des canaux médullaires Cav3.2 présynaptiques issus des fibres C des DRG dans le développement et le maintien de l'hypersensibilité colique**. Ces résultats concordent avec ceux obtenus suite à l'administration i.t. d'oligonucléotides antisens Cav3.2, réduisant la douleur dans différents modèles de douleurs chroniques (Obradovic *et al.* 2014 ; Bourinet *et al.* 2005 ; Wen *et al.* 2010 ; Marger *et al.* 2011).

Enfin, toujours dans une démarche de recherche translationnelle, nous avons apporté une ouverture clinique à notre étude avec l'utilisation de l'ETX. L'effet antalgique que nous avons observé est retrouvé dans d'autres types de douleurs (Matthews and Dickenson 2001a; Dogrul *et al.* 2003; Flatters and Bennett 2004; Hamidi *et al.* 2012; Kawabata *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010). De façon intéressante, nos résultats démontrent que **l'action antalgique de l'ETX est obtenue via le blocage spécifique des canaux Cav3.2** ; en effet, l'ETX perd toute action antalgique chez les souris KO *Cav3.2*. Mieux encore, l'ETX se révèle inefficace chez les souris SNS-KO, démontrant une **action antalgique de l'ETX via son action sur les canaux Cav3.2 localisés au niveau des fibres C des DRG**. L'avantage de l'utilisation de l'ETX est qu'il dispose d'ores et déjà d'une AMM qui permettrait donc d'accéder plus rapidement à une expertise en clinique. Ceci a d'ailleurs conduit notre équipe à débiter une évaluation clinique de l'effet de l'ETX chez le patient atteint de SII (Kerckhove *et al.* 2017).

Ainsi, dans un modèle d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit, l'ensemble de ces résultats démontre l'implication des canaux Cav3.2. De plus, cette étude a permis d'amener des informations quant à la **localisation au niveau présynaptique des fibres C des DRG**. Ainsi, une **inhibition ciblée de ces canaux peut constituer une stratégie thérapeutique attrayante dans le soulagement de la douleur abdominale présente chez les patients souffrant de SII ou de MICI en phase de rémission**. Ces résultats ouvrent ainsi de **nouvelles perspectives thérapeutiques dans la prise en charge de ces pathologies viscérales**.

**New highlights about Cav3.2 channels involvement in a mice model of colonic hypersensitivity associated with low-grade inflammation**

**Short title: Role of Cav3.2 channels in colonic hypersensitivity**

Elodie Picard <sup>1,2</sup>, Frederic Antonio Carvalho <sup>1,2</sup>, Emmanuel Bourinet <sup>3</sup>, Denis Ardid <sup>1,2</sup>,  
Alain Eschali er <sup>1,2,4</sup>, Laurence Daulhac <sup>1,2</sup>, Christophe Mallet <sup>1,2 \*</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INSERM U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>ANALGESIA Institute, Faculty of Medicine, F-63000 Clermont-Ferrand. <sup>3</sup>Université de Montpellier, Institut Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR50203, INSERM U1191, LABEX ICST, F-34094 Montpellier, France. <sup>4</sup>Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, INSERM U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

**Grant support:**

This work was supported by ANR (ANR-15-CE16-0012-01, LABEX ICST), Pierre Dunand & Marie-Thérèse Chevalier (from the French Society of Gastroenterology), FRM (équipe FRM 2015) grants and by INSERM, CNRS, Clermont Auvergne and Montpellier University. Authors acknowledge the support received from the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program "Investissements d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

**Abbreviations:**

**Cav3.2:** calcium channel voltage dependent 3.2; **CHS:** colonic hypersensitivity; **CRD:** colorectal distension; **DSS:** dextran sodium sulfate; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **ETX:** ethosuximide; **KI:** knock in; **KO:** Knock out; **SNS-KO:** small-neuron specific knock out; **TTA-A2:** T-type antagoniste A2; **VEH:** vehicle; **VMR:** visceromotor response; **WT:** wild type.

**Correspondance:** Christophe Mallet\*, INSERM, Université Clermont Auvergne, U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; christophe.mallet@uca.fr; Phone : + 33 4 73 17 81 03.

Disclosures: The authors declare that they have no conflict of interest.

**Author contributions:**

Conceived the study: AE and CM. Designed the experiments: EP, FAC, EB, AE, LD, CM. Performed the experiments: EP, FAC, EB. Analyzed the data: EP, FAC, EB, AE, LD, CM. EP, LD, CM wrote the manuscript with FAC, EB, DA providing critical output.

## Abstract

**Background & Aims:** Abdominal pain associated to low-grade inflammation is frequently encountered in the irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD) in remission phase. Aims of this study were to establish a murine model of colonic hypersensitivity (CHS) associated to low-grade inflammation and evaluate the involvement of T-type calcium channels, mainly the 3.2 isoform (Cav3.2) in this context.

**Methods:** Mice received water or 0.5% dextran sulfate sodium (DSS) during 12 days. CHS was evaluated by colorectal distension and inflammatory markers with ELISA. The Cav3.2 channels involvement was analyzed using both genetic and pharmacological blockage strategies.

**Results:** Mice treated with 0.5% DSS developed low-grade inflammation associated with CHS. In this model, genetic and pharmacologic inhibitions of Cav3.2 channels showed a high reduction of CHS. Using a conditional KO strategy (SNS KO), we demonstrated that Cav3.2 located on the peripheral C fiber were required. Moreover, despite that ABT-639, a peripherally acting T type blocker did not modify CHS when systemically administrated, it reduced CHS after an intrathecal injection. This latter action is not modified in SNS KO which uncovers the major role of presynaptic Cav3.2 in the spinal cord. Finally, both acute and repeated treatment of ethosuximide, a clinically used T-type blocker, reduced CHS.

**Conclusion:** These findings demonstrated the involvement of Cav3.2 calcium channels located presynaptically in the spinal cord in the physiopathology of CHS. They provide evidence that targeting these channels constitutes an attractive therapeutic strategy to relieve CHS encountered in IBS or IBD in remission phase and pave the way for a clinical proof-of-concept study.

**Keywords:** T type calcium channels; irritable bowel syndrome; inflammatory bowel disease; Dextran sodium sulfate model; colorectal distension.

## Introduction

Abdominal pain treatment is an essential clinical challenge. It is a common symptom of two major gastrointestinal disorders, inflammatory bowel diseases (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS). IBD, such as ulcerative colitis or Crohn's disease, are characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract which affects approximately 1.4 million individuals in the United States and 2.2 million Europeans<sup>1-3</sup>. It evolves with alternation of active inflammatory periods and remission phases<sup>4</sup>. Even if inflammation is thought to source visceral pain during active phase, patients still suffer of this latter in quiescent periods where inflammation is reduced, called low-grade inflammation<sup>5-7</sup>. IBS is a functional gastrointestinal disorder<sup>8</sup> characterized by Rome IV criteria<sup>9</sup>. It affects 10 to 20% of the

population in developed countries<sup>10</sup> and is frequently associated with low-grade inflammation<sup>6, 11, 12</sup>. Another feature, encountered in most of patients suffering of IBD and IBS<sup>13, 14</sup>, is the colonic hypersensitivity (CHS). Such chronic abdominal pain has a negative impact on the patient quality of life both in IBD<sup>15, 16</sup> and IBS<sup>12, 17</sup>. Current therapies are aimed to reduce inflammation in IBD and motility disturbance in IBS. In both cases, they are associated with analgesics or antidepressant drugs. However, these therapeutics are not consistently effective and associated with adverse effects<sup>18</sup>. Therefore, the aim of this study was to investigate T type calcium channels inhibition as a potential pharmacological strategy to reduce visceral pain. Indeed, these channels, also called “low voltage-activated” (LVA) channels because of their low threshold for activation, closer to the neuronal resting membrane potential, are recognized an important contributor to nociceptive signalization pathway. These channels family is composed by Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3. The Cav3.2 isoform is expressed along the nociceptive pathway including peripheral nociceptive nerve endings, dorsal root ganglia (DRG)<sup>19</sup>, presynaptic<sup>20</sup> and postsynaptic terminals of nociceptive fibers in the spinal cord. Moreover, Cav3.2 emerged as a pertinent target for chronic pain states like painful post-traumatic or diabetic neuropathy<sup>21-23</sup>. They also contribute to butyrate-induced CHS in rat<sup>24</sup> and it has been shown that Cav3.2 transcripts were increased in animal IBS model and IBS patients and that deletion of this channel reduced CHS in animals<sup>25</sup>. To further investigate the involvement of Cav3.2 channels, we performed both pharmacological and genetic studies to deeply analyze their influence in the CHS and the location of the involved channels.

After validation of a mouse model combining CHS and low grade inflammation, this analyze demonstrates (1) the functional involvement of Cav3.2 channels in CHS, (2) the interest to evaluate a marketed drug, ethosuximide, as a novel pharmacological treatment for pain in IBS patients and (3) opens new pharmacological routes based on the inhibition of spinally-located Cav3.2 channels.

## **Materials and Methods**

### ***Animals***

All experiments were performed following the ethical guidelines set out by the International Association for the Study of Pain with EU guidelines and with approval from the Institutional Ethic Committee for animal experiments (CEMEA Auvergne; reference: 8143). Eight-week-old males C57BL/6j mice purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, FRANCE) and eight-week-old C57BL/6j Cav3.2 knock-out (KO) male mice, originally generated by Chen *et al.* (2003)<sup>26</sup> and their wild type (WT) littermates were used. Another type of mice were used: a Cav3.2-GFP Knock-in (KI) mice generated by Francois *et al.* (2015)<sup>19</sup> which have two loxP site-flanked by a fusion of a pH-sensitive green protein fluorescent, ecliptic-GFP tag<sup>27</sup> into exon 6 of the Cav3.2 locus to permit genetic labelling of Cav3.2 channels. These mice allowed the conception of a conditional KO with deletion of Cav3.2

specifically in small diameter dorsal root ganglion (DRG) neurons by crossing the KI mice with mice expressing Cre recombinase under the Nav1.8 promoter<sup>19,28</sup>. These mice were called SNS-KO and their WT littermates were also used. All animals were housed under standard laboratory conditions (12-hour light/dark cycle, temperature of 21 to 22°C, 55% humidity in specific pathogen free conditions). Food and water were available ad libitum.

#### ***Low-grade inflammation associated colonic hypersensitivity mouse model***

Mice received 0.5% Dextran Sulfate Sodium (DSS, MP Biomedicals formerly ICN Biomedicals, M.W 36-50 kDa) in autoclaved drinking water ad libitum for 12 days. Control mice received only water. This model has been described by Chassaing *et al* (2012)<sup>29</sup> as a low grade inflammation model. We thus performed behavioral, anatomical and biochemical analysis in the same animals to ensure a better characterization of the model.

#### ***Colorectal Distension (CRD)***

Colorectal distension was performed using the non-invasive manometric method of Larauche *et al.*, (2009)<sup>30</sup>. A miniaturized pressure transducer catheter equipped with a custom-made balloon (1 cm wide × 2 cm long) prepared from a polyethylene plastic bag was used to create a “balloon-pressure sensor” which is calibrated at the beginning of each experiment. On the experimental day, mice were accustomed to the holding device for 1 h before colorectal distension (CRD). Then, they were briefly anaesthetized (2% Isoflurane) to allow the introduction of the balloon into the rectum such that the distal end of the balloon was at 1 cm from the anal margin. Animals were then placed in homemade restriction cages, tape-maintained on the tail and allowed to recover for 30 min prior to CRD. The balloon coupled to the pressure sensor was connected to the barostat and to a preamplifier (PCU-2000 Dual Channel Pressure Control Unit, Millar Instruments) connected to the PowerLab interface. The distension protocol consisted of a set of increasing pressure distension (20, 40, 60, 80 and 100 mmHg), repeated twice for each of the pressures, for 20 s with a 4 min inter-stimulus interval. Data analysis is performed using the LabChart software (AD Instruments). The response of the animals is calculated for each distension pressure by subtracting the integral of the treated signal corresponding to the 20 s preceding the stimulation to the integral of the treated signal during the 20 s of stimulation and was expressed in visceromotor response (VMR).

#### ***Biological samples***

Feces were collected before and after the DSS treatment period to evaluate the fecal lipocaline-2 (Lcn-2) level, a marker of low grade inflammation by ELISA. At the end of the DSS treatment period and after CRD, mice were anesthetized with i.p. injection of Ketamine-Xylazine mix (5% Ketamine 10%

Xylazine in NaCl, 100 mg/kg) and were bled by retro-orbital venous plexus (a sample of serum was taken). Then were perfused in the ascending aorta with saline buffer followed by 2% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Tris-Buffered Saline (TBS). Spleen and colon were removed before the PFA administration and their weights and lengths were measured. In order to evaluate the inflammatory state in mice, a small sample (50 mg) of proximal colon was taken for myeloperoxidase (MPO) and interleukine-6 (IL-6) ELISA.

### ***ELISA***

All ELISA kits are Duoset kits from R&D Systems and assays (Minneapolis, MN, and Quansys Biosystems, Logan, UT). The assays were performed according to the manufacturer protocol.

Fecal Lcn-2. Fecal samples were reconstituted in PBS containing 0.1% Tween 20 (100 mg/ml) and vortexed for 20 min to get a homogenous fecal suspension. These samples were then centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and 4°C. Clear supernatants were collected and Lcn-2 levels were measured in the supernatants using Duoset murine Lcn-2 ELISA kit.

Serum IL-6. After collection of 250 µL, blood was centrifuged at 5500 rpm for 30 min and the supernatant corresponding to the serum was collected. IL-6 was quantified using commercially available ELISA kits.

Colonic IL-6 and MPO. Colon samples were first homogenized in a lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 0.5 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 1% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 20 µM leupeptin (Euromedex), 100 IU/ml aprotinin (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then sonicated for 10 s in this solution. Then, samples were centrifuged at 5500 rpm at 4°C for 45 min. Supernatants were collected and the total protein concentration was determined using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce Protein Biology). IL-6 and MPO were quantified using commercially available ELISA kits.

### ***Immunofluorescence analysis***

A midline laparotomy was realized on mice beforehand anesthetized with Ketamine-Xylazine mix in NaCl. Twenty microliter of fluorescent retrograde neuronal tracer 4% Fluorogold (FG, hydroxystilbamidine bis methanesulfonate, Sigma Aldrich, Germany) diluted in NaCl, were injected in the distal colon wall of Cav3.2-GFP KI mice to allow retrograde labelling of colonic nociceptor. The overlying muscle and skin were then sutured closed. After 6 days, mice received DSS (or water) during 12 days. Retrolabelled mice were anesthetized at day 12 post DSS with Ketamine-Xylazine mix (100 mg/kg, i.p.) and perfused in the ascending aorta with saline buffer followed by 2% PFA diluted in TBS. The DRGs were dissected from the perfused mice were fixed in TBS containing 2% PFA at room

temperature (RT) for 60 min. Tissues were then washed three times 10 min in TBS. The samples were then embedded in 4% agarose (Ultrapure LMP agarose, Invitrogen, France) and sectioned at 30  $\mu$ m using a vibratome. Then, sections were proceeded in free floating section and blocked with TBS containing 0.05% Tween 20 (TBST), 0.2% Triton X-100 and 10% normal donkey serum at RT for 1 h. Tissue sections were incubated with primary antibody (1:500, chicken against GFP, Invitrogen, France) diluted in blocking solution overnight at RT. Sections were washed four times with TBST, and incubated with secondary antibody (1:500, CF488A conjugated donkey anti-chicken antibody, Sigma, France) diluted in blocking solution at RT for 1 h at RT, washed again four times with TBST and put on superfrost slices to be mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako, USA). The images acquisition was realized with a ZEISS LSM 800 and acquisition software (Zen<sup>®</sup>). The quantification of colonic nociceptor expressing Cav3.2 was realized with IMARIS<sup>®</sup> software (Bitplane, USA).

### ***Experimental protocol for the evaluation of drug effects***

The design, analysis and reporting of the research were carried out according to the ARRIVE guidelines (see supplementary data). Animals were randomly divided into 8–10 mice per group. Randomized treatment administrations were performed according to the method of equal blocks, in order to assess the effect of the different treatments at the same time interval to avoid unverifiable and time-variable environmental influences.

Acute pharmacological treatments were performed at day 12 after DSS administration. The colonic sensitivity was evaluated using the CRD test and then animals received a sub-cutaneous (s.c.) injection of vehicle (VEH), various blockers of Cav3.2 [the T-type calcium channel antagonist TTA-A2 (1 mg/kg, 10 ml/kg, Alomone labs, Jerusalem, ISRAEL dissolved in NaCl, 10% DMSO, 10% Tween 80), ethosuximide (200 mg/kg, 10 ml/kg, ETX, Sigma-Aldrich, FRANCE, dissolved in NaCl), the peripherally acting ABT-639 (10, 30 and 100 mg/kg, 10 ml/kg, Medchem Express, USA, dissolved in NaCl, 10% DMSO)] or morphine (1mg/kg, 10 ml/kg, dissolved in NaCl) as a positive control. Another CRD test was performed 30 min after these injections to evaluate the drug treatment effect. ABT-639 was also administered intrathecally to evaluate its spinal analgesic effect (10  $\mu$ g / 5  $\mu$ l). The ABT-639 doses were chosen according to results of our team studying several dose effect relationships in another pain model (unpublished results). The second CRD tests were performed 10 min after the injection in this case due to the rapid effect of spinal drug administration.

Repeated pharmacological treatments were performed from day 6 to day 12 after DSS administration. Mice received 3 intraperitoneal injections per day of ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg) or VEH (NaCl, 10 ml/kg). The effect of this drug treatment on the colonic sensitivity was evaluated by CRD test at day 12 after DSS administration.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (US). All data were expressed as mean  $\pm$  SEM. For colorectal distension analysis, we used a two-way (Pressure of distension & Treatment) analysis of variance followed by the Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. For other analysis when more than 2 groups were compared, we used a one-way analysis of variance followed by the Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons and when only two groups were compared we used a Student-t test. Data were considered statistically significant when  $p$  was  $\leq 0.05$ .

### **Results**

**0.5% DSS induced low-grade inflammation associated with colonic hypersensitivity in mice.** Mice subjected to 0.5% DSS during 12 days exhibited a significant increase of their responses to CRD for the pressure 80 and 100 mmHg compared to control mice receiving water (Figure 1A). This is characteristic of a colonic CHS. Colon shortening and spleen enlargement are generally correlated with the extent of robust colitis<sup>31,32</sup>. In DSS treated animals, no significant changes in such anatomical parameters (colon or spleen weights) were observed (Figure 1B & supplementary Figure 1). Moreover, no significant modification in serum IL-6 (Figure 1C, left) was found demonstrating the absence of severe inflammation in this model. Furthermore, colonic levels of IL-6 and MPO were also not changed (Figure 1C middle and right) attesting the absence of local inflammation in the model. On the contrary, a significant increase level of the low-grade inflammatory marker, Lcn-2 in feces, was found at day 12 in mice receiving DSS (Figure 1D). These results validate that long term treatment with 0.5% DSS, is a relevant model for colonic hypersensitivity associated with low-grade inflammation encountered in IBS or IBD in remission phase.

### **Cav3.2 calcium channels are functionally involved in colonic hypersensitivity.**

The genetic inhibition of Cav3.2 channels reduced DSS-induced hypersensitivity without any influence in a non-pathological condition (water treated animals) (Figure 2A). This evidence of Cav3.2 involvement was confirmed by a pharmacological strategy. TTA-A2, a pharmacological blocker of Cav3.2 channels, was devoid of any effect in water-treated animals (Figure. 2B, left), but totally suppressed DSS-induced CHS (Figure 2B, right). Similarly, acute injection of ethosuximide (ETX), a clinically used T-type blocker, significantly reduced DSS-induced CHS (Figure 2C). Due to the lack of specificity of ETX for Cav3.2 channels<sup>33</sup>, we compared its effect in Cav3.2 KO and littermate mice. Significantly effective as morphine in hypersensitive littermate mice, ETX, contrary to morphine, failed to induce any change in KO mice sensitivity (Figure 2D) demonstrating that ETX-induced analgesia is dependent on Cav3.2 channels. Interestingly, three injections per day of ETX, for 6 days, also induced a high decrease of CHS assessed 24h after the last injection (Figure 2E).

### **Cav3.2 channels expression in DSS-treated mice.**

To specifically study Cav3.2 located in DRG neurons innervating the colon, injections of fluorescent dye Fluorogold were previously done in the colon wall of KI Cav3.2-GFP mice. These mice were used to compensate the lack of specific antibody against Cav3.2 channels 34. The immunohistochemistry study performed on DRG neurons of colonic nociceptors of these mice, sampled on day 12 after 0.5% DSS treatment, revealed the presence of Cav3.2 channels with GFP and Fluorogold labeling. However any difference in their expression between DSS and water-treated animals were found (Figure 3A and Figure 3B).

### **Inhibition of Cav3.2 located on the presynaptic afferent fibers terminals reduces colonic hypersensitivity.**

Compared to the littermate mice, SNS-KO mice showed a significant decrease responses to CRD after DSS (Figure 4A). These results suggest a requirement of Cav3.2 channels localized on C-fibers of the DRG to induce CHS.

From DRG, Cav3.2 channels can migrate to the periphery and/or to the spinal levels. Thus, the contribution of peripheral versus spinal Cav3.2 channels in the CHS was investigated by a pharmacological strategy. The effect of ABT-639, a peripherally restricted Cav3.2 inhibitor, was analyzed after a systemic (to block peripheral Cav3.2) or an intrathecal injection (to block spinal Cav3.2). The systemic administration did not affect the responses to CRD in DSS mice at any concentrations tested (Figure 4B). On the contrary, the intrathecal administration of ABT-639 significantly reduced the CHS induced by DSS, comparatively to VEH control (Figure 4C), suggesting an analgesic effect of ABT-639 only at a spinal level. Administered intrathecally, ABT-639 could inhibit Cav3.2 at both pre- and post-synaptic levels of afferent fibers. To decipher each level, the effect of ABT-639 (i.t.) was evaluated in SNS-KO mice. Despite that ABT-639 induced a reduction of CHS induced by DSS in WT littermate mice, it did not modify CHS in SNS-KO mice (Figure 4D). Interestingly, ETX, systematically administered, also failed to induce a reduction of CHS in SNS-KO mice (Figure 4E). Conversely, morphine has an antihyperalgesic effect in both littermate and SNS-KO mice demonstrating the ability to obtain analgesia in SNS-KO and confirming the lack of Cav3.2 in its effect (Figure 4D).

Altogether, these results demonstrated the implication of pre-synaptic Cav3.2 channels located at the spinal terminals of C-fibers on CHS in this model and demonstrate that CHS can be inhibited by Cav3.2 channels blockers.

## Discussion

CHS is frequently encountered in IBS and IBD in remission patients. Available treatments to relieve CHS present unfortunately limited efficacy or high side effects in most of the patients. Therefore, comprehensive studies of CHS pathophysiology are required to identify novel therapeutic targets to relieve CHS. In that perspective, the present study focusing on the comprehension of the involvement of T-type calcium channels, mainly the Cav3.2 isoform, in a murine model of CHS, highlighted the involvement of Cav3.2 channels in CHS, localized on C-fibers of the DRG, at the pre-synaptic level. These original results have been obtained thanks to the combined approach of genetic and pharmacological inhibition of Cav3.2 channels.

We firstly developed a CHS murine model associated with low-grade inflammation. This model was based on the study of Chassaing *et al.* (2012)<sup>29</sup> which compared the effect of several DSS treatment concentrations on the inflammatory state in mice. Among the different DSS concentrations used, the 7 days 0.5% DSS treatment induced a low-grade inflammation detected by an augmentation of the fecal Lcn-2, a sensitive and non-invasive biomarker<sup>29</sup>. With this concentration, DSS does not induce severe local or systemic inflammation. Indeed, no significant modification neither of colonic and serum IL-6 or colonic myeloperoxidase levels were found. With the same dose of 0.5% DSS but with a longer treatment period of 12 days to reflect a more chronic pathology, we founded the same low grade inflammatory state. Moreover, in this context, our results demonstrated CHS symptoms in mice treated with 0.5% DSS compared to control mice. These two characteristics (low-grade inflammation and CHS) are similarly encountered in most of patients suffering from IBS and IBD in remission<sup>5-7, 12</sup>. Consequently, this model can be validated as a good animal model of such gastrointestinal diseases. Moreover, we used, for the first time in this DSS model, the non invasive manometric method of Larauche *et al.*, (2009)<sup>30</sup>. The benefit of this recording of animal response to CRD is the suppression of surgical implantation of electrode into the abdominal oblique muscle of mice.

In the present study we demonstrated an involvement of Cav3.2 channels in the DSS-induced CHS, by a genetic (KO Cav3.2 mice) and a pharmacological (TTA-A2) blockage strategies. Indeed, both conditions allowed a suppression of CHS. These results are in accordance with those of Marger *et al.*, (2011)<sup>24</sup> and Francois *et al.*, (2013)<sup>34</sup> in a model of colonic hypersensitivity induced by butyrate instillations. Several other studies also revealed a crucial role of Cav3.2 in acute and chronic visceral pain associated with inflammation such as colitis or cystitis pain models<sup>35-41</sup>. Beyond the confirmation of these findings in a new model of colonic hypersensitivity, we further explored the pathophysiological involvement of Cav3.2 channel in CHS. Various studies point toward a predominant role of Cav3.2 in sensory neurons for pain perception<sup>19, 21, 42, 43</sup>.

A possible explanation of Cav3.2 channels involvement in CHS could be an up-regulation of Cav3.2 expression and/or an overactivity of these channels and/or post-translational modification and/or indirect physiological mechanisms induced by pathological context. In the present study, we did not revealed an overexpression of Cav3.2 channels following the DSS treatment. In the literature, some authors described an overexpression of Cav3.2 in DRG <sup>25, 43, 44</sup> and others observed no modification of Cav3.2 channels expression <sup>45, 46</sup>. These controversial results could be explained by the lack of specificity of commercial antibodies <sup>19</sup>. To avoid this discrepancy, we used in our study the genetic tool, the GFP-Cav3.2 KI mice, in which we realized an immunohistochemistry on retrogradely labeled colonic nociceptor. Previous results obtained in animal models of neuropathic pain <sup>45, 47-49</sup> or visceral pain <sup>18, 37</sup> revealed a hyperactivity of Cav3.2 channels. Therefore, we could hypothesize the presence of Cav3.2 channels current increase in our CHS model. Further investigations are necessary to validate this hypothesis. However, an up-regulation of the ionic channels activity is not systematically associated with their involvement in chronic pain. Indeed, a recent study focusing on the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels in mouse models of diabetic neuropathic pain, concluded to an involvement of these channel in neuropathic pain, without any modification of neither their expression nor their activity <sup>50</sup>. The involvement of Cav3.2 in CHS might also result from a post-transcriptional mechanism. Among them, maturation of the channels and/or the association of Cav3.2 with modulating proteins and/or ubiquitination and deubiquinisation <sup>22</sup> and/or PKC involvement <sup>51</sup> could be implicated.

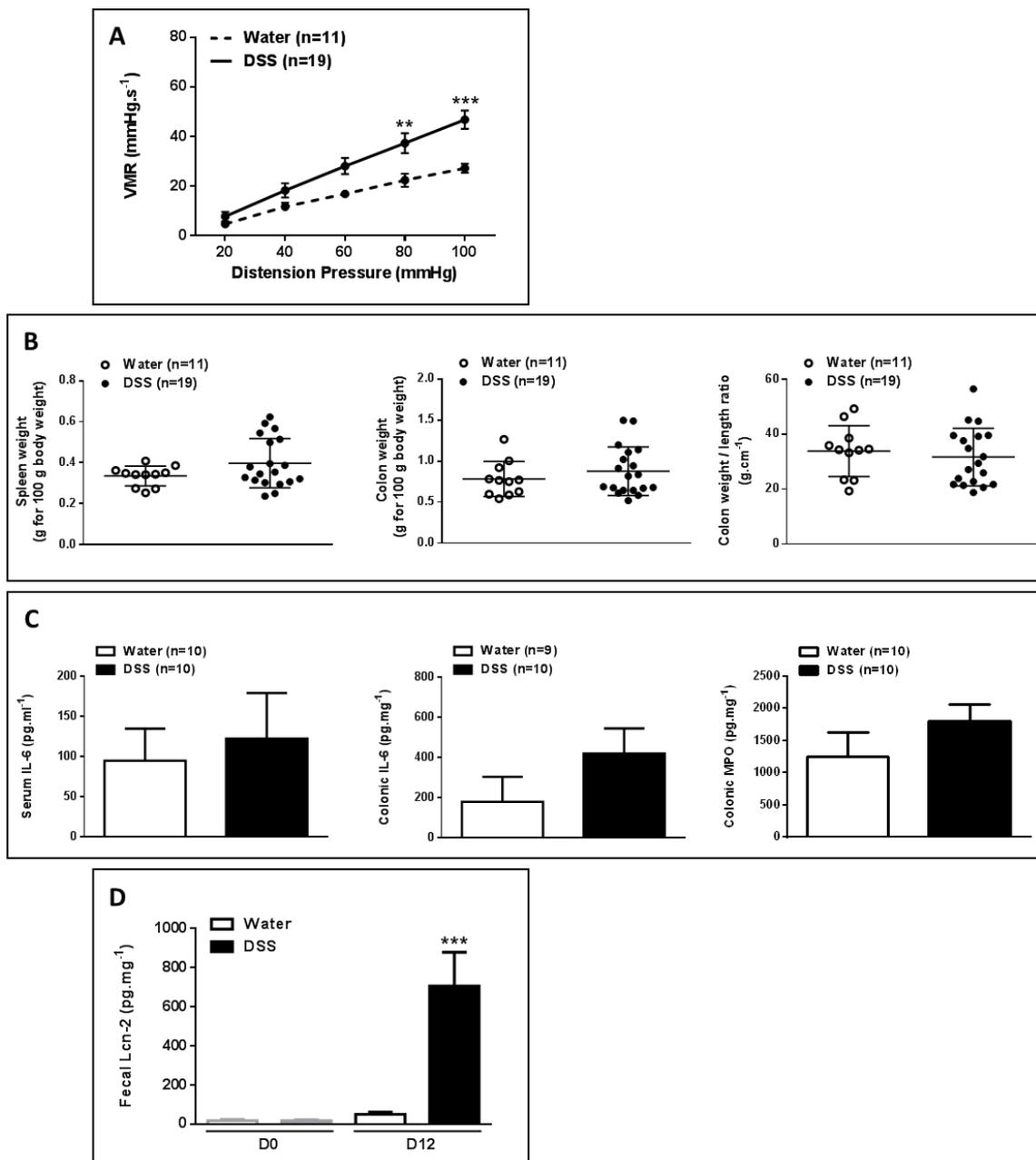
Another original result of our work is the demonstration of the functional role of Cav3.2 in sensory neurons with the SNS-KO mice, a powerful genetic tool allowing deletion of Cav3.2 specifically in small-diameter DRG neurons. We showed that the CHS-DSS induced is dampened in the SNS-KO mice. This result demonstrated the major role of Cav3.2 from C-fibers in CHS associated with a low-grade-inflammation. Interestingly, using these mice, François *et al.* (2015) <sup>19</sup> showed that mechanical and cold allodynia were reduced in a model of traumatic neuropathy. In the same line, other studies reducing the RNAm of Cav3.2 in DRG by an intrathecal antisense strategy reduced pain in different chronic models <sup>21, 23, 24, 52</sup>.

From the DRG, we deciphered the contribution in CHS of Cav3.2 channels located in the primary afferent fibers at the periphery and those located in the spinal cord. Therefore, we used an interesting pharmacological tool, the ABT-639. This compound is a Cav3.2 blocker which does not cross the blood-brain barrier <sup>53</sup>. Administered systematically to inhibit peripheral Cav3.2 channels, ABT-639 did not affected the CHS in mice. However, the intrathecal administration of the ABT-639, inhibiting both spinal pre- and post-synaptic located Cav3.2 channels, allowed a robust reduction of the CHS. The lack of analgesic effect of intrathecal administration of ABT-639 in SNS-KO mice confirmed the Cav3.2-

dependent effect of ABT-639 and demonstrated, for the first time, the involvement of Cav3.2 located at the presynaptic level of afferent fiber terminals in the pathophysiology of CHS.

From a clinical point of view, our results highlight Cav3.2 as an important player in IBS and IBD in remission, opening up the prospect of a new avenue for the pharmacological treatment of these patients. In line with this prospect and in a translational perspective, we assessed the effect of ETX, a low-affinity blocker of all three Cav3 channel isoforms, commonly used in childhood absence epilepsy treatment. As shown in other pain conditions<sup>54, 55-59</sup>, our data reported a strong analgesic effect of ETX after acute administration and a maintenance of the effect after prolonged treatment. Interestingly, the effect of ETX in CHS is lost in Cav3.2 KO mice. This result showed that, even if ETX is not specific to Cav3.2<sup>33</sup>, ETX exerts its analgesic action *via* these channels. Furthermore, the use of ETX in SNS-KO mice in the present study, pointed out a beneficial effect in CHS through its action on spinal presynaptically located Cav3.2 channels. The main advantage of ETX is its actual use in clinic and thus the ability to quickly go into the clinic. In this line, our team proposed to investigate the effect of ETX in IBS patients<sup>60</sup> for a clinical proof of concept.

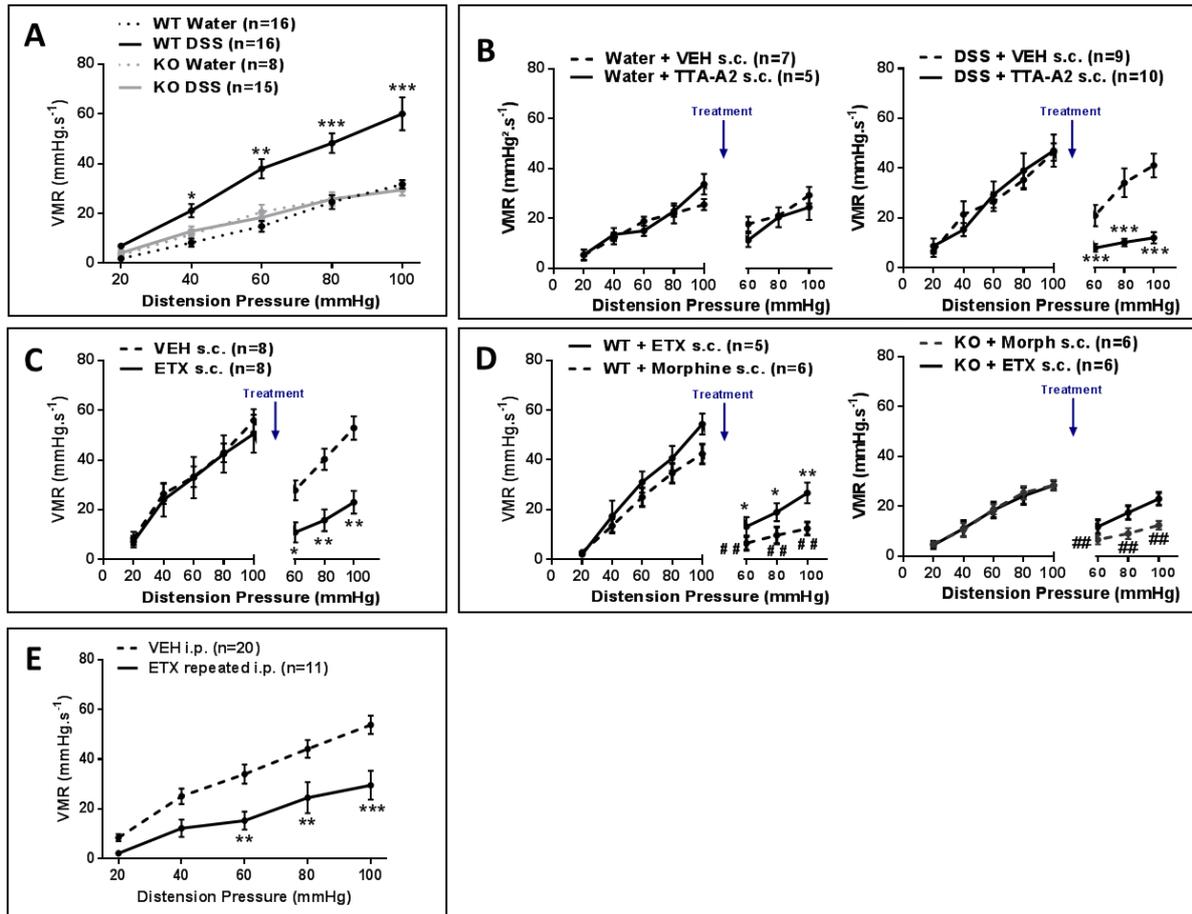
In conclusion, we provided evidence using both genetic and pharmacological strategies, that Cav3.2 channels are involved in CHS associated with a local low-grade inflammation. We showed, in a CHS mice model, that Cav3.2 blockage, induces an interesting antihyperalgesic effect. Mostly, we determined for the first time that Cav3.2 channels involved in CHS, are localized in C-LTMR at the pre-synaptic level in the spinal dorsal horn. This knowledge allows considering new therapeutic perspectives in the treatments of abdominal pain encountered in IBS patients.



**Figure 1: 0.5% DSS induced low-grade inflammation associated with colonic hypersensitivity in mice.**

WT mice received dextran sodium sulfate (DSS) or water for 12 days. (A) Visceromotor responses (VMR) to colorectal distension (CRD) to evaluate colonic sensitivity. (B) Measurement of anatomical parameters on biological samples collected at day 12 (D12), after the CRD: spleen weight reported to 100 g of body weight, colon weight reported to 100 g of body weight, colon weight reported to length. (C) Inflammatory process evaluated by levels of serum interleukine-6 (IL-6), colonic IL-6 and myeloperoxidase (MPO). (D) Low grade inflammation evaluated by levels of fecal lipocaline-2 (Lcn-2) at both D0 and D12.

Statistical differences were assessed by two-way ANOVA (treatment; Distension pressure) followed by Bonferroni post-hoc test for (A), by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for (D) and by Mann-Whitney test for graphs in (B) and (C) [significant differences between DSS and water group are indicating by asterisks (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )]. Data represent mean  $\pm$  SEM.

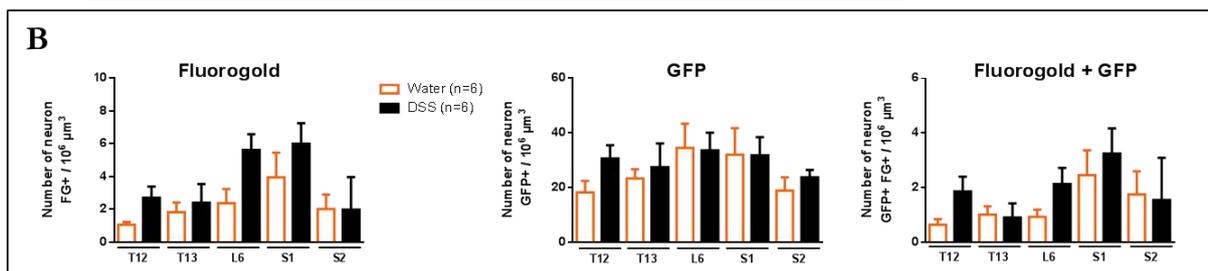
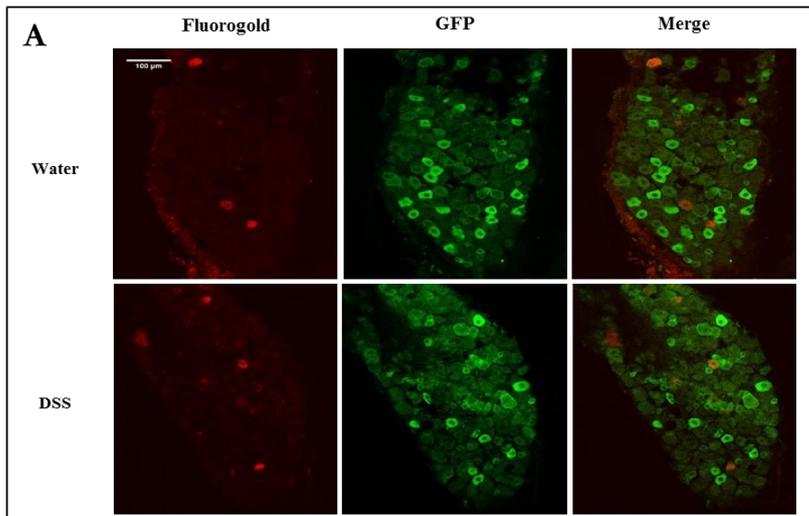


**Figure 2: Cav3.2 calcium channels are functionally involved in colonic hypersensitivity.**

Different groups of mice received dextran sodium sulfate (DSS) or water for 12 days. The colonic sensitivity was evaluated at day 12 (D12) by colorectal distension (CRD). The effect of acute pharmacological treatment was performed submitting mice to a first set of CRD with pressure from 20 to 100 mmHg, then the pharmacological drug was administrated by subcutaneous injection and 30 min later, another set of CRD with pressures from 60 to 100 mmHg was realized to evaluate the effect of the drug. The effect of repeated pharmacological treatment was performed with intraperitoneal administrations of drugs, 3 times a day, during 6 days and the CRD was realized at D12, 24h after the last injection. Pharmacological drug was administrated by subcutaneous (s.c.) or intrathecal (i.t.) injection.

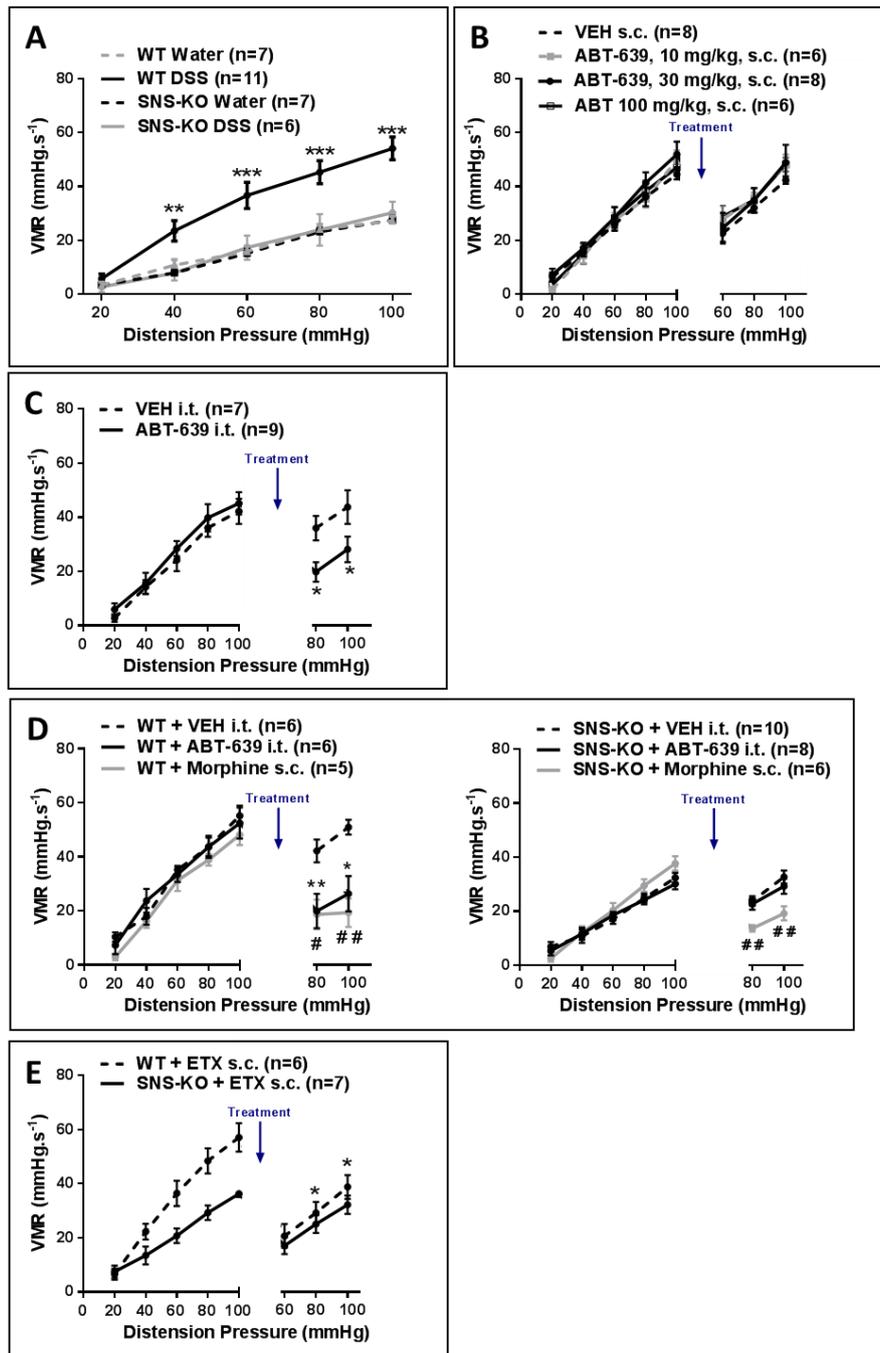
(A) Responses of wild type (WT) and knock-out (KO) Cav3.2 mice. (B) Effect of TTA-A2 (1 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) or vehicle (VEH: NaCl, 10% DMSO, 10% Tween 80, 10 ml/kg) on CRD in WT mice receiving water (left) or DSS (right). (C) Effect of ethosuximide (ETX, 200 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) or vehicle (VEH: NaCl, 10 ml/kg, s.c.) in WT mice receiving DSS. (D) Responses to CRD to evaluate the effect of acute administration of ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) or Morphine (1 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) on colonic hypersensitivity in WT (left) and KO Cav3.2 (right) mice. (E) Effect of repeated administration of ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg, i.p.) or vehicle (VEH: NaCl, 10 ml/kg) in WT mice.

Statistical differences were assessed by two-way ANOVA (Groups; Distension pressure) followed by Bonferroni post-hoc test for the effect of treatment on WT or KO mice (A) [significant differences between WT water group and other groups are indicating by \* (\* P<0.05, \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)]. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney test for the effect of acute pharmacological treatment ((B) (C) and (D)) [significant differences between T-Type blockers groups for the first set of CRD and for the second set of CRD are indicating by \* (\* P<0.05, \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001) and significant differences between morphine group for the first set of CRD and for the second set of CRD are indicating by # (## P<0.01)]. Statistical differences were assessed by two-way ANOVA (Pharmacological treatment; Pressure) followed by Bonferroni post-hoc test for the effect of repeated pharmacological treatment (e) [significant differences between ETX group and VEH groups are indicating by \* (\* P<0.05, \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Figure 3: DRG-located Cav3.2 channels are hyperactivated in DSS-treated mice.**

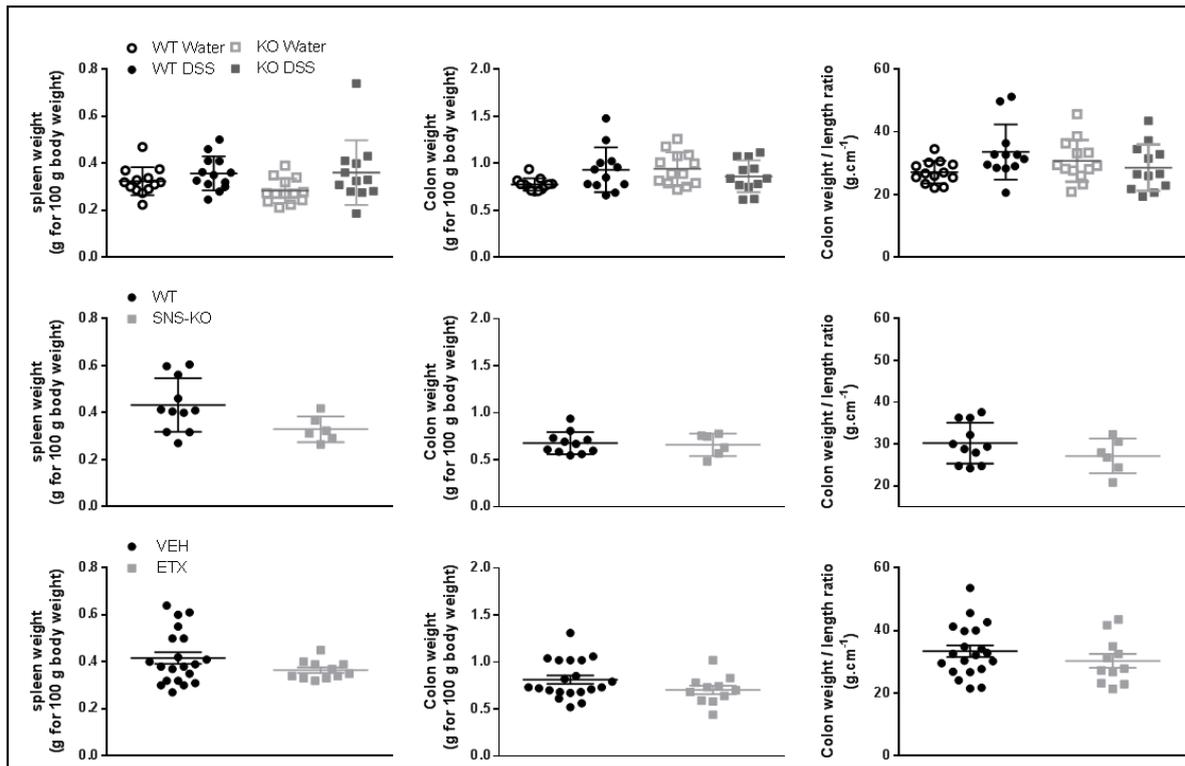
Fluorescent tracer Fluorogold (FG, 20  $\mu$ l in NaCl) was injected in the distal colon wall of Cav3.2-GFP KI mice to allow retrograde labeling. Five days later, mice received dextran sodium sulfate (DSS) or water during 12 days. (A) Histological identification of mice dorsal root ganglion (DRG) colonic sensory neurons (FG positive, left), of Cav3.2 channels (GFP positive, middle) and merge (right) in Cav3.2-GFP KI mice receiving water (up) or DSS (down). (B) Quantitative data of the number of FG positive-, GFP positive- and FG+GFP positive- neurons, in water or DSS condition. Statistical differences were assessed by a one-way ANOVA, with no significant differences between water and DSS groups for any DRG level. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Figure 4: Inhibition of Cav3.2 located on the presynaptic afferent fibers terminals reduces colonic hypersensitive.**

Different groups of mice received dextran sodium sulfate (DSS) for 12 days. The colonic sensitivity was evaluated at day 12 (D12) by colorectal distension (CRD). The effect of acute pharmacological treatment was performed submitting mice to a first set of CRD with pressure from 20 to 100 mmHg, then the pharmacological drug was administrated by subcutaneous (s.c.) or intrathecal (i.t.) injection and 30 or 10 min later respectively, another set of CRD the pressures from 60 to 100 mmHg or of from 80 to 100 mmHg was realized to evaluate the effect of the drug. (A) Responses to CRD in WT and SNS-KO mice receiving water or DSS. (B) Effect of ABT-369 (10, 30 or 100 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) or vehicle (VEH: NaCl, 10% DMSO, 10 ml/kg) on CRD in WT mice. (C) Effect of ABT-639 (10 µg / 5 µl, i.t.) or vehicle (VEH: NaCl, 10% DMSO) on CRD in WT mice. (D) Effect of ABT-639 (10 µg / 5 µl, i.t.), VEH or morphine (1mg/kg) on CRD in WT (left) and SNS-KO (right) mice. (E) Effect of ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.) on CRD in WT and SNS-KO mice.

Statistical differences were assessed by two-way ANOVA (Groups; Pressure) followed by Bonferroni post-hoc test for the effect of treatment on WT or SNS-KO mice (A) [significant differences between WT water group and other groups are indicating by \* (\* P<0.05, \*\* P< 0.01)]. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney test for the effect of acute pharmacological treatment [significant differences between T-Type blockers groups for the first set of CRD and for the second set of CRD are indicating by \* (\* P<0.05, \*\* P< 0.01) and significant differences between morphine group for the first set of CRD and for the second set of CRD are indicating by # (# P<0.05, ## P< 0.01)]. Data represent mean ± SEM.



**Supplementary figure 1: No modification of anatomical parameters in both studied groups.**

Mice received dextran sodium sulfate (DSS) (or water) for 12 days. Measurement of anatomical parameters at day 12 (D12): spleen weight reported to 100 g of body weight, colon weight reported to 100 g of body weight, colon weight reported to length, in (A) WT and KO Cav3.2 mice received DSS or water; (B) WT and SNS-KO mice received DSS and (C) WT mice received DSS and repeated administration of ETX. Statistical differences were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for (A) and by Mann-Whitney test for others. Data represent mean  $\pm$  SEM.

## References:

1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066-78.
2. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:205-17.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
4. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
5. Long MD, Drossman DA. Inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, or what?: A challenge to the functional-organic dichotomy. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1796-8.
6. Piche T, Ducrotte P, Sabate JM, *et al.* Impact of functional bowel symptoms on quality of life and fatigue in quiescent Crohn disease and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:626-e174.
7. Stacher G, Christensen J. Visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: a summary review. *Dig Dis Sci* 2006;51:440-5.
8. Chey WD, Kurlander J, Eswaran S. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *JAMA* 2015;313:949-58.
9. Mearin F, Lacy BE, Chang L, *et al.* Bowel Disorders. *Gastroenterology* 2016.
10. Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:712-721 e4.
11. Guilarte M, Santos J, de Torres I, *et al.* Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007;56:203-9.
12. Halpin SJ, Ford AC. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1474-82.
13. Lembo T, Naliboff B, Munakata J, *et al.* Symptoms and visceral perception in patients with pain-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1320-6.
14. Matricon J, Barnich N, Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* 2010;1:299-309.
15. Gracie DJ, Irvine AJ, Sood R, *et al.* Effect of psychological therapy on disease activity, psychological comorbidity, and quality of life in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2:189-199.
16. Zeitz J, Ak M, Muller-Mottet S, *et al.* Pain in IBD Patients: Very Frequent and Frequently Insufficiently Taken into Account. *PLoS One* 2016;11:e0156666.
17. Nellesen D, Yee K, Chawla A, *et al.* A systematic review of the economic and humanistic burden of illness in irritable bowel syndrome and chronic constipation. *J Manag Care Pharm* 2013;19:755-64.
18. Camilleri M, Boeckstaens G. Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut* 2017;66:966-974.
19. Francois A, Schuetter N, Laffray S, *et al.* The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep* 2015.
20. Jacus MO, Uebele VN, Renger JJ, *et al.* Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *J Neurosci* 2012;32:9374-82.
21. Bourinet E, Alloui A, Monteil A, *et al.* Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 2005;24:315-24.
22. Garcia-Caballero A, Gadotti VM, Stemkowski P, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity. *Neuron* 2014;83:1144-58.
23. Obradovic A, Hwang SM, Scarpa J, *et al.* 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* 2014;9:e91467.
24. Marger F, Gelot A, Alloui A, *et al.* T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:11268-73.

25. Scanzi J, Accarie A, Muller E, *et al.* Colonic overexpression of the T-type calcium channel Cav 3.2 in a mouse model of visceral hypersensitivity and in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 2016;28:1632-1640.
26. Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, *et al.* Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 2003;302:1416-8.
27. Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998;394:192-5.
28. Stirling LC, Forlani G, Baker MD, *et al.* Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain* 2005;113:27-36.
29. Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA, *et al.* Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 2012;7:e44328.
30. Larauche M, Gourcerol G, Wang L, *et al.* Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G215-27.
31. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2014;104:Unit 15 25.
32. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:79-94.
33. Goren MZ, Onat F. Ethosuximide: from bench to bedside. *CNS Drug Rev* 2007;13:224-39.
34. Francois A, Kerckhove N, Meleine M, *et al.* State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* 2013;154:283-93.
35. Choi S, Na HS, Kim J, *et al.* Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* 2007;6:425-31.
36. Gadotti VM, Caballero AG, Berger ND, *et al.* Small organic molecule disruptors of Cav3.2 - USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain* 2015;11:12.
37. Matsunami M, Tarui T, Mitani K, *et al.* Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 2009;58:751-61.
38. Matsunami M, Kirishi S, Okui T, *et al.* Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. *Neuroscience* 2011;181:257-64.
39. Tsubota-Matsunami M, Noguchi Y, Okawa Y, *et al.* Colonic hydrogen sulfide-induced visceral pain and referred hyperalgesia involve activation of both Ca(v)3.2 and TRPA1 channels in mice. *J Pharmacol Sci* 2012;119:293-6.
40. Terada Y, Fujimura M, Nishimura S, *et al.* Roles of Cav3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis. *J Neurosci Res* 2015;93:361-9.
41. Murakami-Nakayama M, Tsubota M, Hiruma S, *et al.* Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice. *J Pharmacol Sci* 2015;127:223-8.
42. Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, *et al.* In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* 2009;145:184-95.
43. Takahashi T, Aoki Y, Okubo K, *et al.* Upregulation of Ca(v)3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain* 2010;150:183-91.
44. Li Y, Tatsui CE, Rhines LD, *et al.* Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels (Cav3.2) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Pain* 2017;158:417-429.
45. Lin SF, Yu XL, Liu XY, *et al.* Expression patterns of T-type Cav3.2 channel and insulin-like growth factor-1 receptor in dorsal root ganglion neurons of mice after sciatic nerve axotomy. *Neuroreport* 2016;27:1174-81.

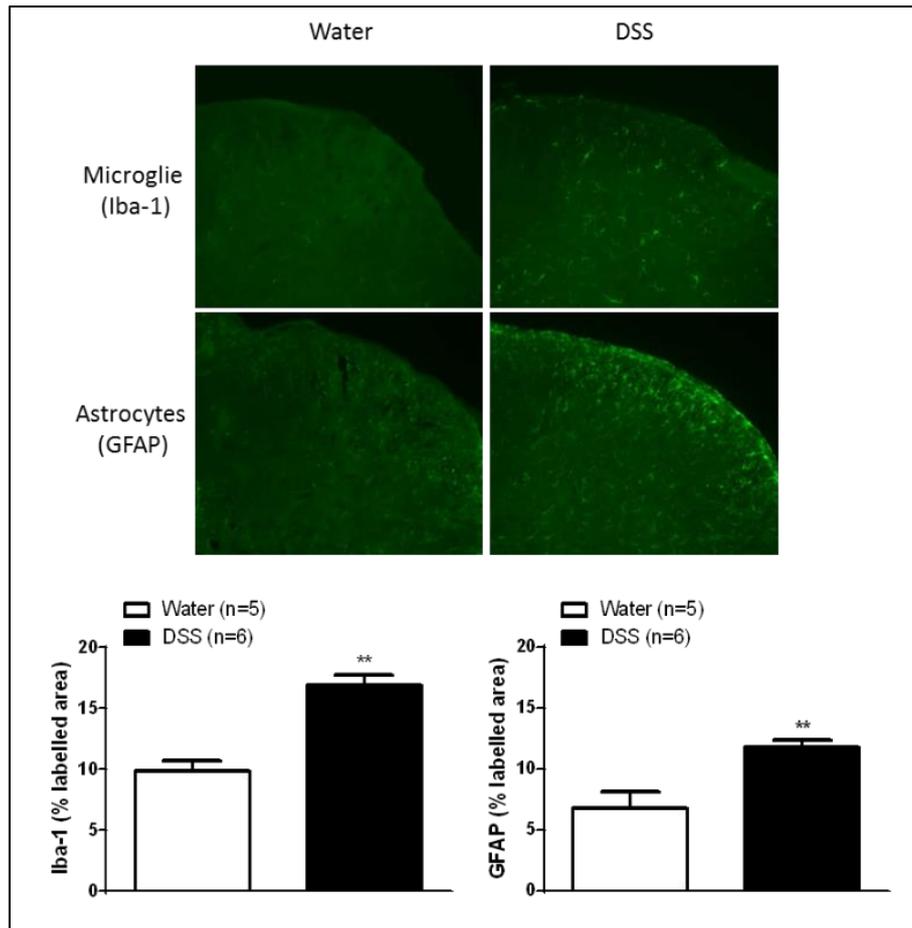
46. Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, *et al.* Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 2011;188:148-56.
47. Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, *et al.* Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* 2007;27:3305-16.
48. Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, *et al.* Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 2009;58:2656-65.
49. Yue J, Liu L, Liu Z, *et al.* Upregulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013;38:463-70.
50. Tsantoulas C, Lainez S, Wong S, *et al.* Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels drive pain in mouse models of diabetic neuropathy. *Sci Transl Med* 2017;9:eaam6072.
51. Park JY, Kang HW, Moon HJ, *et al.* Activation of protein kinase C augments T-type Ca<sup>2+</sup> channel activity without changing channel surface density. *J Physiol* 2006;577:513-23.
52. Wen XJ, Xu SY, Chen ZX, *et al.* The roles of T-type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. *Pharmacology* 2010;85:295-300.
53. Jarvis MF, Scott VE, McGaraughty S, *et al.* A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats. *Biochem Pharmacol* 2014;89:536-44.
54. Chen WK, Liu IY, Chang YT, *et al.* Ca(v)3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *J Neurosci* 2010;30:10360-8.
55. Matthews EA, Dickenson AH. Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;415:141-9.
56. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, *et al.* Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003;105:159-68.
57. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109:150-61.
58. Hamidi GA, Ramezani MH, Arani MN, *et al.* Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2012;674:260-4.
59. Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, *et al.* Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 2007;132:74-81.
60. Kerckhove N, Scanzì J, Pereira B, *et al.* Assessment of the effectiveness and safety of ethosuximide in the treatment of abdominal pain related to irritable bowel syndrome - IBSET: protocol of a randomised, parallel, controlled, double-blind and multicentre trial. *BMJ Open* 2017;7:e015380.

### Résultats complémentaires

Un rôle important des interactions neuro-immunes dans le développement de la douleur a été mise en évidence ces dernières années (Cao and Zhang 2008; Mika *et al.* 2013). Il a été démontré que l'activation des cellules gliales au niveau spinal constitue un facteur contribuant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres facteurs cruciaux pour la transmission nociceptive (Watkins and Maier 2003). Une activation gliale est retrouvée dans différents modèles animaux de douleur chronique (Gosselin *et al.* 2010). Même si les mécanismes physiopathologiques restent encore mal caractérisés, plusieurs auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle l'hyperactivité neuronale entraîne l'activation de la glie. Celle-ci va à son tour sensibiliser les neurones au travers de la libération de facteurs pro-inflammatoires (McMahon, Cafferty, and Marchand 2005). C'est donc un « cercle vicieux » entre glie et neurones qui se met en place, à l'origine d'une plasticité neuronale appelée sensibilisation centrale. Des altérations nociceptives au niveau spinal ou périphérique mènent à une activation morphologique et physiologique des cellules de la glie, particulièrement les astrocytes et la microglie (Colburn, Rickman, and DeLeo 1999; Hanisch and Kettenmann 2007). Le rôle des autres cellules gliales dans la transmission nociceptive n'a jusqu'à présent pas été établi (Mika *et al.* 2013). Toute modification de l'homéostasie du SNC induit un passage de la microglie et des astrocytes d'un état quiescent à un état activé. Cette réponse adaptative se traduit par un rapide changement de morphologie accompagné d'une modification du profil d'expression génique avec notamment une surexpression de la protéine ionisée d'adaptation à la fixation du calcium (Iba-1 pour « ionized calcium-binding adaptor molecule ») par les cellules microgliales (Ping *et al.*, 2009) et une augmentation de la production de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP pour « Glial Fibrillary Acidic Protein ») par cellules astrocytaires (Watkins and Maier 2003).

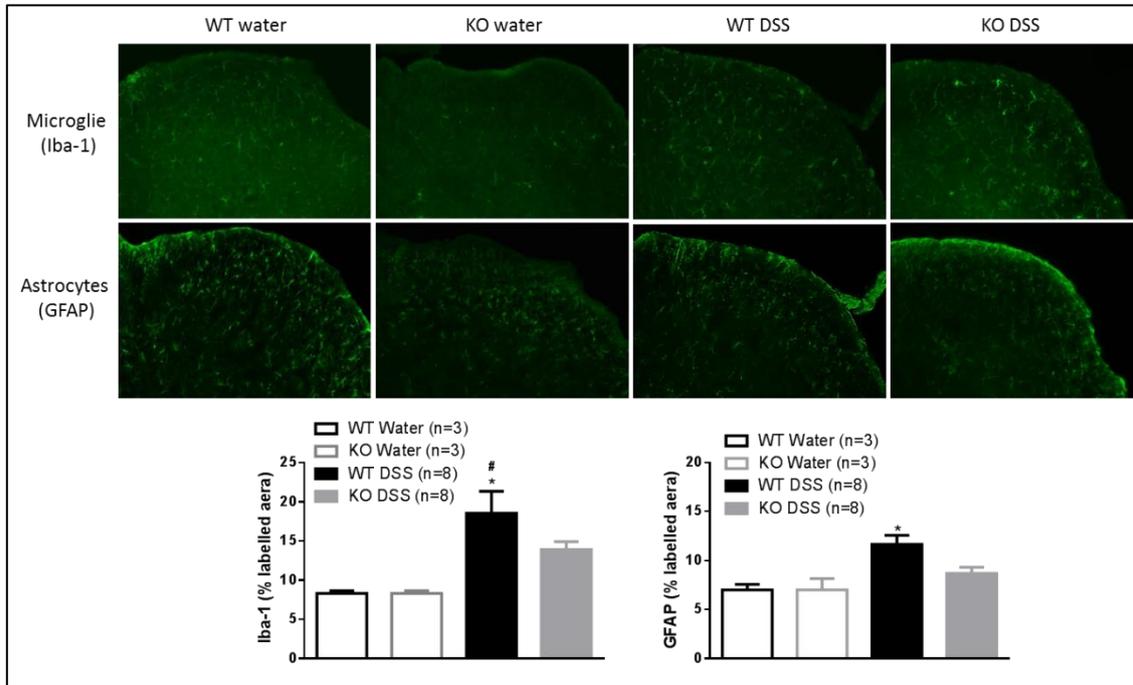
Ainsi, en s'appuyant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une activation gliale, microgliale et/ou astrocytaire, dans notre modèle d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit. Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé des immunohistochimies sur coupes de moelle épinière, au niveau de la corne dorsale, à hauteur des étages L6-S1. Nous avons ciblé l'Iba-1 pour évaluer l'activation microgliale et la GFAP pour l'activation astrocytaire.

Nos résultats montrent une augmentation significative des deux marqueurs Iba-1 et GFAP chez les souris soumises au DSS comparativement aux animaux n'ayant reçu que de l'eau (**Figure 38**). Ceci traduit la présence d'une activation gliale, à la fois microgliale et astrocytaire, dans notre modèle.

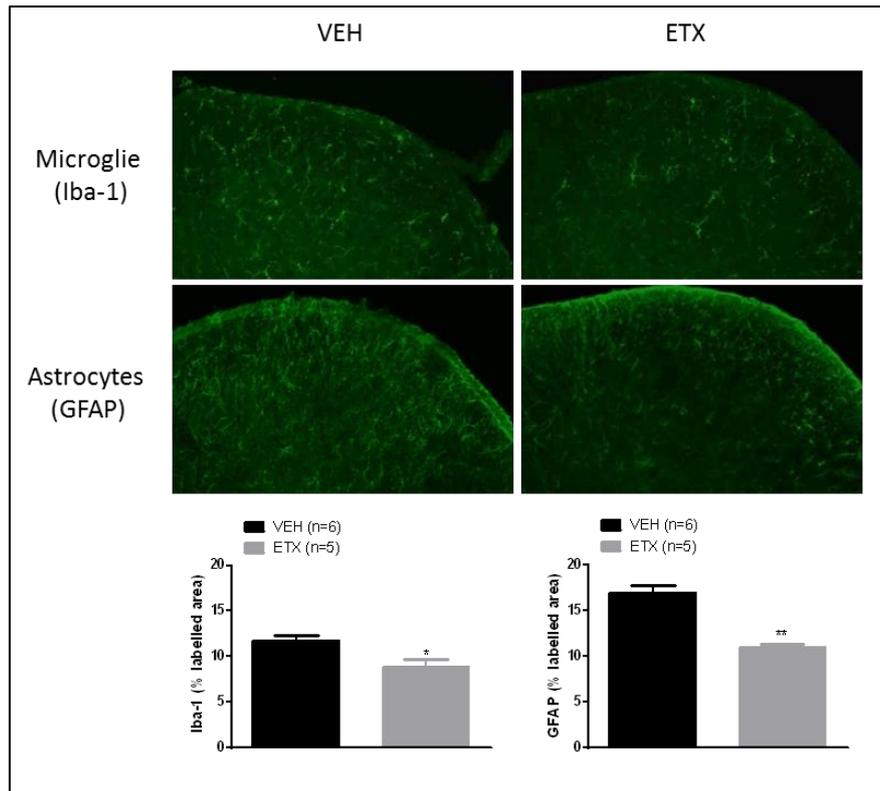


**Figure 38. Evaluation de l'activation gliale dans le modèle d'hypersensibilité colique induit par l'administration de DSS 0,5%.** Des souris WT ont reçu du DSS ou de l'eau durant 12 jours. L'activation microgliale et astrocytaire révélée respectivement à l'aide des marqueurs Iba-1 et GFAP a été évaluée par technique d'immunohistochimie sur des coupes de corne dorsale de moelle épinière (L6-S1) prélevée à J12 post DSS. Les différences statistiques ont été analysées par un test de Mann-Whitney ; [les différences significatives entre les groupes DSS et eau sont indiquées par des \* (\*\* P < 0,01)]. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Cette activation gliale semble être réduite chez les souris KO *Cav3.2* (**Figure 39**). De plus, l'utilisation répétée d'ETX de J6 à J12 post DSS, a également permis une réduction significative de l'activation microgliale et astrocytaire chez les animaux (**Figure 40**).



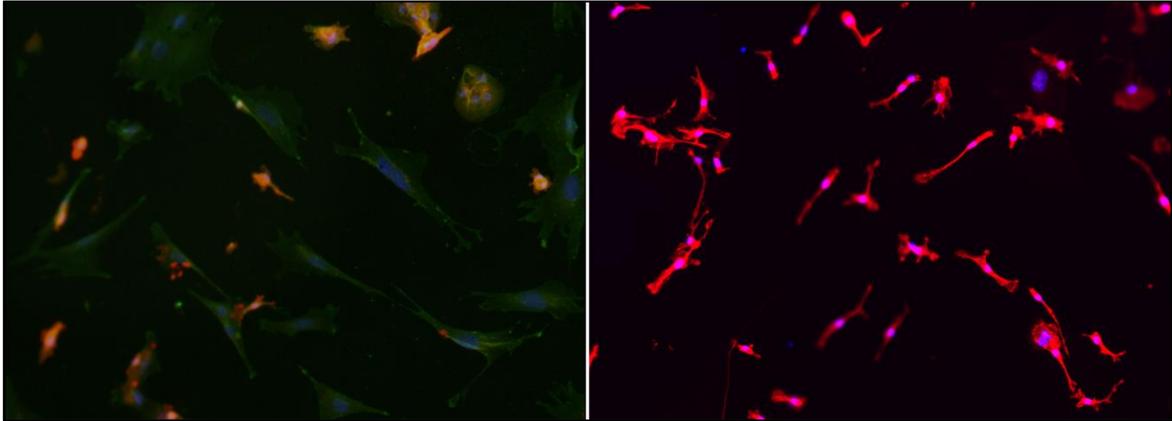
**Figure 39. Evaluation de l'inhibition génétique des canaux *Cav3.2* sur l'activation gliale dans le modèle d'hypersensibilité colique induite par l'administration de DSS 0,5%.** Des souris WT et KO *Cav3.2* ont reçu du DSS ou de l'eau durant 12 jours. L'activation microgliale et astrocytaire révélée respectivement à l'aide des marqueurs Iba-1 et GFAP a été évaluée par technique d'immunohistochimie sur des coupes de corne dorsale de moelle épinière (L6-S1) prélevée à J12 post DSS. Les différences statistiques ont été analysées par une ANOVA 1 voie (Traitement) suivie d'un test post-hoc de Bonferroni ; [les différences significatives entre le groupe WT Eau et les autres groupes sont indiquées par des \* (\*  $P < 0,05$ ) ; les différences significatives entre les groupes KO Eau et les autres groupes sont indiquées par des # (#  $P < 0,05$ )]. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.



**Figure 40. Evaluation de l'effet d'un traitement répété d'ETX sur l'activation gliale dans le modèle d'hypersensibilité colique induit par l'administration de DSS 0,5%.** Des souris WT ont reçu du DSS durant 12 jours ainsi que des administrations répétées d'ETX (3 administrations i.p. par jour ; à 200 mg/kg, de J6 à J12) ou de VEH. L'activation microgliale et astrocytaire révélée respectivement à l'aide des marqueurs Iba-1 et GFAP a été évaluée par technique d'immunohistochimie sur des coupes de corne dorsale de moelle épinière (L6-S1) prélevée à J12 post DSS. Les différences statistiques ont été analysées par un test de Mann-Whitney ; [les différences significatives entre les groupes ETX et VEH sont indiquées par des \* (\* $p < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$ )]. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Ces deux derniers résultats démontrent que l'activation gliale est réduite lors de l'inhibition des canaux Cav3.2. L'implication des canaux Cav3.2 peut être directe, en modulant l'activation des cellules gliales, ou indirecte, par une diminution de l'activation gliale consécutive à une diminution de l'inflammation neurogène.

Dans l'optique d'approfondir les recherches concernant le rôle des cellules gliales dans l'hypersensibilité colique induite par le DSS, nous avons mis au point un protocole de réalisation de cultures primaires enrichies en astrocytes ainsi que des cultures primaires enrichies en microglie (**Figure 41**). Ces modèles *in vitro* peuvent être utilisés afin de préciser l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 au sein de ces cellules.



**Figure 41 : Cultures primaires de cellules gliales, réalisées à partir de cortex de souris (nouveau-nés)**

---

## Résultats

---

### II. Implication des Canaux Calciques Cav3.2 dans la douleur inflammatoire somatique

---

## Article 3

---

### CAV<sub>3.2</sub> CALCIUM CHANNELS ROLE IN INFLAMMATION AND RELATED PAIN

**Picard E.**, Kerckhove N., Bourinet E., Boudieu L., Billard E., François A., Aissouni Y.,  
Eschalier A., Daulhac L., Mallet C.

---

#### Synthèse des travaux de l'article

##### *Contexte de l'étude*

La douleur est le symptôme le plus délétère chez les patients souffrant de douleur inflammatoire chronique comme l'arthrite. Elle constitue en effet le motif principal de consultation de patients atteints de rhumatismes inflammatoires (Berthelot *et al.* 2009; Bas *et al.* 2016). Plus de 70% des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR), placent au premier plan dans leurs attentes thérapeutiques, le soulagement de la douleur en comparaison des autres symptômes de la maladie (Bas *et al.* 2016; Heiberg *et al.* 2005; ten Klooster *et al.* 2007). La douleur inflammatoire est caractérisée par des décharges lancinantes qui peuvent se manifester aussi bien lorsque l'articulation est sollicitée que lorsque l'individu reste au repos. La douleur exerce ainsi un impact majeur, non seulement sur le bien-être physique, mais aussi sur le bien-être mental des patients, en altérant leur qualité de vie (Conrad *et al.* 2013; Giesecke *et al.* 2005) et en induisant une mortalité prématurée (Wolfe *et al.* 2003). Les objectifs thérapeutiques dans les maladies inflammatoires chroniques sont d'améliorer la qualité de vie du patient, en réduisant l'intensité des symptômes (douleur, raideur, fatigue), en stabilisant les lésions présentes et en prévenant l'apparition de nouvelles lésions (Alam, Jantan, and Bukhari 2017; Smolen *et al.* 2017). Les médicaments les plus couramment utilisés (paracétamol, AINS, corticoïdes, agents biologique (DMARD) et anti-TNF) présentent une efficacité parfois limitée et sont associés à d'importants effets indésirables (Graham *et al.* 2013; Samad, Sapirstein, and Woolf 2002; Hojsted and Sjogren 2007) (Curtis *et al.* 2006) (Boyman, Comte, and Spertini 2014; Ioannidis *et al.* 2013). Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de soulager la douleur du patient atteint de rhumatismes inflammatoires.

Comme décrit précédemment, les canaux calciques voltage-dépendants de type T, et plus particulièrement les canaux Cav3.2 sont des acteurs clés dans le développement et le maintien de la douleur chronique. Si leur implication a fortement été décrite dans des modèles de douleur neuropathique, elle reste peu étudiée dans la douleur inflammatoire chronique. Les principales études réalisées dans ce contexte douloureux reposent sur l'utilisation du modèle au formol (Shin *et al.* 2008; Orestes *et al.* 2011; Gadotti *et al.* 2015 ; Choe *et al.* 2011; Choi *et al.* 2007). Ce modèle consiste à administrer du formol, une substance irritante, dans la patte de l'animal ; il s'en suit une première phase de douleur aiguë, liée à une stimulation chimique directe des nocicepteurs puis une seconde phase qui dépend de l'inflammation périphérique (Tjolsen *et al.* 1992). D'autres études concernant l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire ont été menées dans des modèles induits par administration i.pl. de CFA (Garcia-Caballero *et al.* 2014; Gadotti *et al.* 2015). Ces études confortent l'intérêt de cibler les canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire chronique et d'identifier les mécanismes mis en jeu. Des recherches portant sur cet axe avaient déjà été initiées au sein du laboratoire (Kerckhove, 2013).

Ainsi, **l'objectif de cette étude était de confirmer et de mieux caractériser l'implication physiologique des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire chronique.** Pour cela, nous avons réalisé cette étude dans deux modèles murins de douleur inflammatoire, un premier modèle de **douleur subaiguë** et un second modèle de douleur chronique d'**arthrite**, obtenus respectivement par administration i.pl. de carragénine ou par injection intra-articulaire de CFA.

### Résultats

Par une double approche, à la fois génétique et pharmacologique, le rôle des canaux Cav3.2 a été recherché dans l'inflammation et la douleur associée. Dans un premier temps, l'approche génétique avec des souris KO Cav3.2 a montré que ces animaux n'ont développé aucune allodynie ni hyperalgésie mécanique, que ce soit dans le modèle carragénine (**Figures 1A, 1B**) ou induit par le CFA (**Figures 1E, 1F**). De plus, l'œdème présent chez ces animaux est significativement réduit comparativement aux souris WT, dans les deux modèles (**Figures 1C, 1G**) et les niveaux d'IL-6 de l'œdème sont également réduits chez les animaux KO (**Figures 1D, 1H**). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus après administration pharmacologique d'un bloqueur des canaux Cav3.2, le TTA-A2. En effet, après installation d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique ainsi que le développement d'un œdème, l'utilisation du TTA-A2 a montré une rapide et robuste action antalgique, avec un effet durant environ 1 à 2 h, dans chacun des deux modèles (**Figures 2A, 2B, 2D, 2E**). L'effet d'une administration aiguë induit également une diminution significative de la taille de l'œdème, uniquement dans le modèle carragénine (**Figures 2C et 2F**).

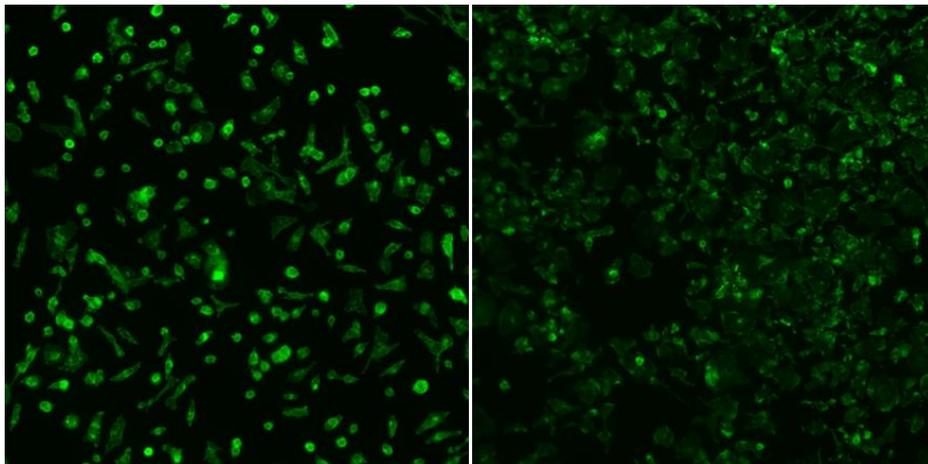
Dans le modèle de douleur chronique d'arthrite, nous avons également étudié l'effet d'un traitement répété de TTA-A2, débuté 7 jours post CFA et maintenu jusqu'à J14, à raison de 3 administrations par jour. Les paramètres douleur et taille de l'œdème ont été mesurés quotidiennement à distance de la dernière administration de TTA-A2, afin de « minimiser » au maximum l'effet aigu du traitement. De façon intéressante, une action antalgique sur les deux symptômes douloureux étudiés (**Figures 2G, 2H**) ainsi qu'une action anti-inflammatoire révélée par une diminution de la taille de l'œdème ainsi que des taux d'IL-6 au sein de l'œdème. Ces effets apparaissent simultanément, à J11 post CFA, soit 5 jours après le début de traitement au TTA-A2 et sont maintenus jusqu'à la fin des expérimentations (J14) (**Figures 2I, 2J**). Ces résultats confirment **l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement et le maintien de l'inflammation et de la douleur inflammatoire associée.**

Afin d'apporter une ouverture clinique à notre étude, nous avons également évalué l'effet de l'ETX. Nous avons démontré une **action antalgique de l'ETX**, avec une forte réduction de l'allodynie et de l'hyperalgésie induites par la carragénine suite à une administration aiguë d'ETX (**Figures 3A, 3B**). Les mêmes effets antalgiques sont retrouvés suite à une administration répétée d'ETX, à raison de 3 injections i.p. quotidiennes, de J7 à J14, dans le modèle d'arthrite (**Figures 3D, 3E**) (les tests de von Frey et mesure de l'œdème ayant été réalisés à distance de la dernière administration d'ETX). Une **action anti-inflammatoire de l'ETX**, objectivée par la mesure de l'œdème, a également été observée chez ces souris dans les deux modèles (**Figures 3C, 3F**).

Des souris chimériques ont été générées précédemment au laboratoire (Kerckhove, 2013). Pour la génération de ces souris, des souris KO *Cav3.2* et leur littermates (WT) ont été irradiées afin de supprimer leur système immunitaire. Immédiatement après l'irradiation, les souris ont reçu des cellules de moelles osseuses issues de souris WT ou KO *Cav3.2*. Ces souris sont ainsi soit invalidées pour le gène codant le canal *Cav3.2* au niveau du système immunitaire (Receveur WT ; Donneur KO *Cav3.2*), soit invalidées dans la totalité du corps excepté pour le système immunitaire (Receveur KO *Cav3.2* ; Donneur WT) (**Supplementary figure 1**). Ces animaux ont ensuite été utilisés dans le modèle carragénine. Les souris présentant une délétion spécifique des canaux *Cav3.2* au niveau du système immunitaire ont montré une réduction de la taille de l'œdème, de manière équivalente aux souris *Cav3.2* KO (KO total). Au contraire, le développement œdémateux a été restauré dans le cas des souris *Cav3.2* KO ayant reçu un système immunitaire de souris WT (**Figure 4A**). Les mêmes résultats ont été obtenus concernant les taux d'IL-6 au niveau de l'œdème (**Figure 4B**). **Ces résultats démontrent une implication des canaux Cav3.2 dans le développement œdémateux et le processus inflammatoire, spécifiquement au niveau immunitaire.**

Afin de confirmer ces données, nous avons utilisé les souris SNS-KO dans le modèle carragénine. Ces souris n'ont pas présenté de modification dans le développement œdémateux (**Figure 4C**). **Ces résultats confirment une implication des canaux Cav3.2 localisée au niveau périphérique.**

Afin de mieux comprendre l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans l'action anti-inflammatoire associée à leur blocage, nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux cellules de type macrophages qui jouent un rôle majeur dans les réactions inflammatoires. Nous avons ainsi orienté notre hypothèse vers une implication des canaux Cav3.2 dans le phénomène d'activation macrophagique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'activité du canal au sein de ces types cellulaires, sur culture de BMDM « bone marrow derived macrophage » par technique d'électrophysiologie. Nous n'avons pas retrouvé la présence de courant de type T dans ces cellules (**Figure 42 ci-dessous**), que ce soit en condition basale ou pathologique, c'est-à-dire activée par le LPS (**Figure 5**). **Ces résultats suggèrent une absence des canaux Cav3.2 au sein des macrophages.**



**Figure 42 : Culture de BMDM avant et après activation au LPS.**

La suite de cette étude a porté sur la compréhension de l'implication des canaux Cav3.2 dans l'analgésie associée à leur blocage. Afin de discriminer l'implication centrale et périphérique, deux stratégies complémentaires ont été utilisées : génétique avec les **souris SNS-KO** et pharmacologique avec **l'ABT-639**. Les souris SNS-KO ont tout d'abord permis de **localiser l'implication des canaux Cav3.2 au niveau des fibres C des DRG**. En effet, ces souris n'ont pas développé d'allodynie ou d'hyperalgésie suite à une administration de carragénine (**Figures 6A, 6B**).

A partir du DRG, les canaux Cav3.2 peuvent migrer vers la périphérie et/ou vers la moelle épinière. Afin de distinguer la contribution périphérique *versus* spinale des canaux Cav3.2, un outil pharmacologique original a été utilisé ; il s'agit de l'ABT-639, un bloqueur des canaux Cav3.2 ne passant pas la BHE. Les résultats d'une administration systémique par voie intrapéritonéale (i.p.) d'ABT-639, à l'origine d'un blocage des canaux Cav3.2 restreint à la périphérie, démontrent un puissant effet antalgique de l'ABT

639 pour les deux doses de 30 et 100 mg/kg sur l'allodynie et l'hyperalgie mécanique (**Figures 7A, 7B**). Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus pour une administration i.pl. d'ABT-639 (**Figures supplémentaires 2A, 2B**). Une administration i.t. d'ABT-639 a également permis de réduire dans une moindre mesure l'allodynie et l'hyperalgésie induites par le CFA (**Figures 7C, 7D**). Aucune modification de la taille de l'œdème n'est retrouvée suite à une administration i.p. ou i.t. (**Figures supplémentaires 3A, 3B**). Ces résultats suggèrent une **implication au niveau des fibres C des DRG, à la fois périphérique et spinale, des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire avec une implication majeure au niveau périphérique.**

### *Discussion/Conclusion*

Ces travaux ont été conduits en associant des méthodes ex vivo et in vivo ainsi que des stratégies génétiques et pharmacologiques permettant d'une part de démontrer l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement et le maintien de l'inflammation et de la douleur inflammatoire qui en résultent, et d'autre part de localiser l'implication fonctionnelle de ces canaux dans ces deux paramètres (douleur et inflammation).

Nous avons dans un premier temps utilisé dans deux modèles de douleur, un de douleur subaiguë et le second d'arthrite, 2 stratégies de blocage : les souris KO *Cav3.2* et le TTA-A2, bloqueur à forte affinité pour le canal Cav3.2. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement de l'inflammation et de la douleur inflammatoire qui en résulte. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées chez des souris KO *Cav3.2* soumises au test au formol (Shin *et al.* 2008; Orestes *et al.* 2011; Gadotti *et al.* 2015) ou à une administration de CFA (Gadotti *et al.* 2015) ainsi que d'autres études ayant évalué l'effet de bloqueurs des canaux de type T chez le rat suite à une administration i.pl. de sulfite d'hydrogène (Kawabata *et al.* 2007; Maeda *et al.* 2009).

Suite au blocage des canaux Cav3.2, nous avons observé une diminution significative de la taille de l'œdème et des taux de cytokines pro-inflammatoires. Cet effet anti-inflammatoire peut s'expliquer par l'implication d'une inflammation neurogène par un réflexe d'axone et /ou par une l'implication au niveau du système immunitaire. Afin de dissocier ces deux aspects, nous avons utilisé des souris chimériques pour lesquelles une délétion spécifique des canaux Cav3.2 est réalisée au niveau du système immunitaire ainsi que les souris SNS-KO. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer une implication des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire localisé spécifiquement au niveau des cellules immunitaires. Afin de mieux caractériser cette implication, nous nous sommes intéressés à ces cellules avec dans un premier temps l'hypothèse d'un rôle fonctionnel du canal Cav3.2 dans l'activation des cellules macrophagiques. Cette hypothèse n'a pas été confirmée par les analyses électrophysiologiques réalisées sur cultures de cellules BMDM. L'absence de courants de canaux de

type T dans ces cellules suggère une autre origine pour le rôle des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire. Une étude récente ayant montré la présence de canaux de type T au sein des lymphocytes T (Wang *et al.* 2016). L'hypothèse d'une implication des canaux Cav3.2 dans le phénomène d'activation lymphocytaire reste ainsi à être approfondie.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation de l'effet antalgique induit par le blocage des canaux Cav3.2. Pour cela nous avons utilisé les souris SNS-KO ainsi que l'ABT-639. Les résultats montrent une implication fonctionnelle des canaux Cav3.2, localisée sur les fibres C des DRG. Une action aussi bien au niveau centrale que périphérique a été observée, avec néanmoins un effet antalgique nettement plus marqué suite à une inhibition périphérique des canaux Cav3.2.

L'implication centrale des canaux Cav3.2 dans la douleur a été mise en évidence dans diverses études ayant consisté en l'administration i.t. d'oligonucléotides antisens Cav3.2 et réduisant la douleur dans différents modèles de douleur chronique (Obradovic *et al.* 2014 ; Bourinet *et al.* 2005 ; Wen *et al.* 2010 ; Marger *et al.* 2011). Nous avons ainsi montré la présence d'une composante périphérique qui peut suffire à induire l'effet antalgique escompté. Ces résultats originaux ouvrent de nouvelles pistes dans le développement de thérapeutiques originales pour le traitement de la douleur inflammatoire. En effet, de tels médicaments qui ne traversent pas la BHE, présentent l'avantage considérable de limiter les effets indésirables potentiels d'une inhibition centrale des canaux Cav3.2.

Comme évoqué dans l'ARTICLE 2, des études précliniques menées précédemment dans différents modèles de douleur (Matthews and Dickenson 2001a; Dogrul *et al.* 2003; Hamidi *et al.* 2012; Flatters and Bennett 2004; Marger *et al.* 2011; Kawabata *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010) ont montré un effet antalgique de l'ETX. Dans notre étude, nous avons également observé un effet anti-inflammatoire associé, ce qui positionne l'ETX comme une stratégie thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la douleur inflammatoire chronique.

En conclusion, nos travaux démontrent le rôle crucial des canaux Cav3.2 dans le développement et le maintien de l'inflammation et de la douleur inflammatoire associée, dans deux modèles murins de douleur inflammatoire, un modèle de douleur subaiguë (carragénine) et un modèle d'arthrite (CFA). Notre étude permet également de localiser l'implication fonctionnelle de ces canaux dans la douleur inflammatoire au niveau des fibres C des DRG, avec une composante à la fois spinale et périphérique ; cette dernière présentant un caractère majeur puisqu'une inhibition des canaux Cav3.2 restreinte à la périphérie suffit à induire un effet antalgique robuste chez les souris. Ces travaux permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la prise en charge des patients souffrant de rhumatismes inflammatoires.

## **Cav3.2 calcium channels role in inflammation and related pain**

Elodie Picard <sup>1,2</sup>, Nicolas Kerckhove <sup>1,2,4</sup>, Emmanuel Bourinet <sup>3</sup>, Ludivine Boudieu <sup>1,2</sup>, Elisabeth Billard<sup>5</sup>  
Justine Bourdier <sup>1,2</sup>, Youssef Aissouni <sup>1,2</sup>, Alain Eschalier <sup>1,2,4</sup>, Laurence Daulhac <sup>1,2</sup>, Christophe Mallet <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INSERM U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>ANALGESIA Institute, Faculty of Medicine, F-63000 Clermont-Ferrand. <sup>3</sup>Université de Montpellier, Institut Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR50203, INSERM U1191, LABEX ICST, F-34094 Montpellier, France. <sup>4</sup>Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, INSERM U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>5</sup>UMR1071 Inserm/Université d'Auvergne - USC INRA 2018 M2iSH 28 Place Henri Dunant, F-63000 Clermont-Ferrand, France

### **\*Correspondance:**

Christophe Mallet, INSERM, Université Clermont Auvergne, U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; christophe.mallet@uca.fr; Phone : + 33 4 73 17 81 03.

### **Author contributions:**

Conceived the study: AE and CM. Designed the experiments: EP, NK, EB, EB, AE, LD, CM. Performed the experiments: EP, NK, LB, EB, JB, YA, EB. Analyzed the data: EP, NK, EB, LB, EB, JB, AE, LD, CM. EP, NK, LD, AE, CM wrote the manuscript with EB providing critical output.

### **Conflict of Interest:**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments:**

This work was supported by ANR (ANR-15-CE16-0012-01, LABEX ICST), Pierre Dunand & Marie-Thérèse Chevalier (from the French Society of Gastroenterology), FRM (équipe FRM 2015) grants and by INSERM, CNRS, Clermont Auvergne and Montpellier University. Authors acknowledge the support received from the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program "Investissements d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

**Abréviations:** **Cav3.2:** calcium channel voltage dependent 3.2; **CFA:** complete Freund adjuvant; **DMARD:** disease-modifying antirheumatic drugs; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **ETX:** ethosuximide; **i.p.:** intraperitoneal; **i.t.:** intrathecal; **KO:** Knock out; **NSAIDs:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; **SNS-KO:** small-neuron specific knock out; **RA:** rheumatoid arthritis; **s.c.:** subcutaneous; **TNF:** tumor necrosis factor; **TTA-A2:** T-type antagoniste A2; **VEH:** vehicle; **WT:** wild type.

**Abstract:**

Relieve chronic inflammatory pain is the major clinical challenge in rheumatoid arthritis (RA). Actual pharmacological therapeutics consisting in directly acting analgesic drugs and biologic agents, have a limited effectiveness and could induce strong adverse effects over the long term. A therapeutic innovation is thus expected. Therefore, we investigated the T-type calcium channels involvement, mainly the Cav3.2 subtype, in inflammation and related pain. These channels are recognized as important contributor to nociceptive signalization pathway and their implication in various types of chronic pain has been previously described. Using both genetic and pharmacological inhibition, we demonstrated in the present study the role of Cav3.2 channels in the development of mechanical allodynia and hyperalgesia and the edema development in different murine inflammatory pain models. We showed that Cav3.2 channels located specifically in hematopoietic cells contribute to inflammation process. Concerning inflammatory pain, we localized for the first time the involvement of Cav3.2 channels on C-fibers of the DRG, at both spinal and peripheral level. This work highlights a crucial involvement of Cav3.2 channels in inflammation and related pain and suggests that targeting Cav3.2 channels with pharmacological agents may be an attractive strategy to relieve chronic inflammatory pain encountered in patients suffering from RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis (RA), inflammatory pain, T type calcium channels.

Pain is the most challenging symptom for patients suffering from chronic inflammatory diseases<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>. It is commonly encountered in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, psoriasis, contact dermatitis, interstitial cystitis or inflammatory bowel disease<sup>6</sup> and constitutes a capital challenge<sup>7, 8</sup>. Indeed, pain has a major impact, not only on physical, but also on mental well-being of patients, by altering their quality of life<sup>1, 9, 10, 11, 12, 13</sup> and inducing premature mortality<sup>14</sup>. Moreover, inflammatory-related pain induces economic impact, either directly because of public health costs or indirectly in consequence of reduced productivity at work<sup>15, 16</sup>. Pharmacological treatments<sup>17, 18</sup> improving rheumatoid arthritis (RA) pain include directly acting analgesic agents and drugs suppressing the inflammation. Directly acting analgesic agents as paracetamol or opioids for examples are not consistently effective and/or associated with strong adverse effects<sup>19, 20, 21</sup>. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are aimed at reducing pain by suppressing the inflammation. However, adverse effects of these treatments remain a major concern for prolonged usage<sup>22</sup>. Biologic agents, consisting in disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) and anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) have substantially improved the quality of life of patients with rheumatic and immunological disorders. Nonetheless, such drugs have been associated with serious adverse effects including allergic, immunological and other severe reactions<sup>23, 24</sup>. Moreover, patients do not express an equally

response to the treatments and some of them have no response to biologic agents <sup>25</sup>. More importantly, pain may remain present despite inflammatory disease is optimally controlled <sup>12, 26, 27, 28</sup>. Thus, there is a considerable interest to find new strategies to develop efficient analgesics to relieve chronic inflammatory-related pain.

Previous studies have reported that an activation of T-type calcium voltage dependent channels, contributed to nociceptive signaling pathway and consequently revealed an involvement of these channels in pain. Moreover, T-type calcium channels play an important role in cell excitability and calcium signaling, contributing to a wide variety of physiological functions. In the nervous system, T-type channels are involved in spontaneous discharges, deep sleep, epilepsy and perception of pain <sup>29, 30, 31, 32, 33</sup>. These channels belong to family composed by Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3; among them, the Cav3.2 subtype has been reported to have the major pronociceptive function <sup>31, 32, 34</sup>.

Several studies demonstrated that inhibition of Cav3.2 channels strongly reduced pain in different chronic pain animal models, in a context of neuropathic (diabetic <sup>35, 36, 37, 38, 39</sup>, traumatic <sup>40, 41, 42, 43, 44 45, 46, 47, 48</sup> and chemo-induced <sup>49, 50</sup>) or visceral pain (pancreatitis <sup>51, 52, 53, 54, 55</sup>, cystitis <sup>56</sup> and irritable bowel syndrome <sup>57, 58</sup>). However, the role of Cav3.2 channels in somatic inflammatory chronic pain remains poorly studied.

The aim of the present study was to demonstrate and understand the involvement of T-type calcium channels, mainly the Cav3.2 member, in inflammation and inflammatory related-pain, in subacute inflammatory and monoarthritis murine models. We used original strategies with a genetic Cav3.2 inhibition using *Cav3.2* knock-out (KO) mice<sup>59</sup> and the conditional KO specifically on the C-low thresholds mechanoreceptor (C-LTMR), the SNS-KO mice<sup>47</sup>. A pharmacological Cav3.2 inhibition strategy was also applied with several T-type chemical blockers, the T-Type antagonist A2 (TTA-A2), ethosuximide (ETX) and the peripherally acting blocker, ABT-639.

This study highlights the functional implication of T type channels in inflammation and inflammatory pain and shows the interest of drug re-positioning strategy with ethosuximide, as a novel pharmacological treatment for chronic inflammatory pain. Finally, we demonstrate that the involvement of Cav3.2 channel in inflammatory pain is localized at both central and peripheral levels with a major implication on the peripheral C fibers of the DRG. These results open new pharmacological routes for the development of analgesics relieving chronic inflammatory pain.

## Results

### ***Evidence for a functional involvement of Cav3.2 channels in the development of inflammation and related pain***

WT mice subjected to carrageenan paw injection exhibited a significant increase of their responses to von Frey tests, demonstrating the presence of mechanical allodynia and hyperalgesia in these animals.

Interestingly, these results were not similar in KO *Cav3.2* mice who did not developed any allodynia (Figure 1A) or hyperalgesia (Figure 1B) following carrageenan administration. An edema development was observed in both WT and KO *Cav3.2* mice. However, the edema size was significantly reduced in KO *Cav3.2* mice (Figure 1C). Moreover, levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 contained in edema were significantly decreased in KO *Cav3.2* mice (Figure 1D).

In a more relevant clinical context, we studied the *Cav3.2* involvement in another inflammatory pain model consisting in an intraarticular administration of the complete Freund's adjuvant (CFA), inducing an ankle arthritis in mice; this model mimics some features of RA with a good predictive validity 60, 61. Thus, we analyzed the effect of CFA administration in WT and KO *Cav3.2* mice. We founded the same results as previously, characterized by an absence of mechanical nociceptive behavior (Figures 1E, 1F), a significant decrease of the edema (Figure 1G) and edema IL-6 levels (Figure 1H) in *Cav3.2* KO mice compared to WT animals. Altogether, these results demonstrated for the first time the functional involvement of *Cav3.2* channels in the development of inflammation.

#### ***Pharmacological evidence of a functional involvement of Cav3.2 channels in the development and the maintenance of inflammation and related pain***

We analyzed the effect of pharmacological treatment on inflammation and inflammatory pain by using TTA-A2, a pharmacological blocker with a great selectivity for *Cav3.2* channels. In the carrageenan model, TTA-A2 quickly and strongly suppressed nociceptive behavior with a lasting effect of around 1-2 hours (Figure 2A and Figure 2B). Interestingly, TTA-A2 administration also reduced the paw edema size (Figure 2C).

In the CFA model, acute treatment with TTA-A2, administrated at D7 post CFA, demonstrated as previously in the carrageenan model, a rapid and important analgesic effect in mice, during approximatively 2 hours (Figure 2D and Figure 2E). No effect on edema paw size was observed (Figure 2F). We secondly performed repeated administration of TTA-A2, from D7 to D14 and analyzed the pharmacological effect every day, away from the last administration in order to distinguish this effect from the drug acute effect. We demonstrated an analgesic effect which occurred at D11 post CFA, corresponding to 5D after the beginning of TTA-A2 treatment (Figure 2G and Figure 2H). This effect was maintained until the D14 (end of experiments). Contrary to the acute TTA-A2 treatment, chronic treatment induced a high reduction of the edema size, with the same kinetic than those obtained for the analgesic effect (Figure 2I). Moreover, IL-6 level in edema at D14 was reduced in mice receiving TTA-A2 compared to the VEH control (Figure 2J). Altogether these results demonstrated an interesting robust analgesic and anti-inflammatory effect of TTA-A2 confirming the interest of targeting the *Cav3.2* calcium channels in inflammatory pain.

### ***Ethosuximide decreased inflammation and related pain***

We analyzed the effect of the ETX, a T-type channels blocker available on the market since 1988 for the treatment of childhood absence epilepsy. Acute administration of ETX led to the same effect as the one previously obtained with TTA-A2, reducing both mechanical allodynia, hyperalgesia and edema induced by carrageenan injection (Figure 3A, Figure 3B and Figure 3C). We also performed repeated ETX administrations from D7 to D14 post CFA. As previously with TTA-A2, we analyzed the treatment effect away from the last administration in order to evaluate only the chronic treatment effect. We showed a beneficial effect on the mechanical nociception (Figure 3D and Figure 3E) and also on the edema (Figure 3F). These results demonstrated an interesting analgesic and anti-inflammatory effect of ETX in both subacute and chronic inflammatory pain.

### ***Anti-inflammatory effect of Cav3.2 inhibition is mediated by immune cells***

We demonstrated that both pharmacologic and genetic inhibition of Cav3.2 induced a reduction of the edema formation. Cav3.2 channels could contribute to the edema formation by the immune cells and/or the nervous system. Concerning the immune cells, we hypothesized that Cav3.2 located on these cells could modulate their activation. Indeed, recently, it has been demonstrated that T-type calcium channels played an important role in immune cells<sup>62,63,64</sup>. Our second hypothesis is that Cav3.2 channels contribute to edema encouraging the axonal reflex (neurogenic inflammation). Both hypotheses are not exclusive. To investigate the reciprocal contribution of the two systems, chimeric mice harboring *cacna1h* gene deletion only in hematopoietic cells (progenitor cells of macrophages) or only in non-hematopoietic cells were generated. For that purpose, we used irradiated WT or KO *Cav3.2* mice in which bone-marrow from WT or KO mice were transferred. The inflammatory status of these chimeric mice was assessed 4 hours after intraplantar injection of carrageenan. The absence of Cav3.2 channels specifically in the immune system reduced edema development, similarly to total *Cav3.2* KO mice. On the opposite, edema was restored in the case of *Cav3.2* KO mice receiving WT hematopoietic cells (Figure 4A). Thus, this result demonstrated the involvement of hematopoietic cell-expressed Cav3.2 channels in the edema development. Consistently, the absence of Cav3.2 channels only in hematopoietic cells (KO mice transfected with WT immune cells) significantly reduced the production of pro-inflammatory mediators, as previously observed in total *Cav3.2* KO mice (KO mice transfected with KO immune cells), and conversely (Figure 4B). Our results show that Cav3.2 channels expressed by immune cells are strongly involved in edema development and pro-inflammatory mediator production.

To confirm these data, we used SNS-KO mice in which *Cav3.2* channels were deleted specifically in C-fibers. The edema developed in these mice following the carrageenan administration did not significantly differ compared to the WT animals (Figure 4C). These results suggested that the

implication of Cav3.2 channels in inflammatory process was not done through a neurogenic inflammation but specifically by an action on the immune's cells.

In order to mechanistically understand the anti-inflammatory effect that we reported by Cav3.2 inhibition, we firstly focused on the implication of these channels in macrophages cells. We realized electrophysiological analysis from BMDM cultures, activated by LPS incubation during 24 h. We found no presence of T-type channels current in these cells, neither in LPS activated nor in naive conditions (Figure 5), excluding the presence and a possible role of Cav3.2 channels at the macrophage level.

### ***Cav3.2 channels located in C-fibers contribute to inflammatory pain***

The SNS-KO mice subjected to carrageenan exhibited a significant decrease of their responses to allodynia and hyperalgesia von Frey tests (Figure 6A and Figure 6B) compared to their control littermates. These results demonstrated the requirement of the Cav3.2 channels in inflammatory pain localized on C-fibers of the DRG.

### ***Contribution of peripheral and spinal located Cav3.2 in inflammatory pain***

The involvement of C-fibers located Cav3.2 channels could arise from either periphery or spinal levels. The contribution of peripheral versus spinal Cav3.2 channels in the inflammatory pain was analyzed by the use of the ABT-639, a peripherally restricted Cav3.2 inhibitor. Firstly, we performed intraperitoneal ABT-639 injection in order to block Cav3.2 channels located at peripheral level. We reported a robust analgesic effect on allodynia and hyperalgesia for the two highest doses tested of 30 mg/kg and 100 mg/kg (Figure 7A and Figure 7B). This result has been confirmed performing an injection of ABT-639 directly in edema with (Supplementary Figure 2A and 2B). Secondly, we evaluated the effect of ABT-639 injected in the spinal cord. Such an intrathecal administration reduced the responses to the von Frey test were reduced, but with a lesser extent that with the systemic use (Figure 7C and Figure 7D). No effects on the edema were found in both cases (Supplementary Figure 3A and 3B). Altogether, these results highlighted an analgesic effect of ABT-639 efficient both at periphery and in the spinal cord, underlying a dual action of Cav3.2 channels at these two levels of pain integration.

## **Discussion**

Using ex vivo and in vivo methods coupled with genetic and pharmacological strategies, this work highlighted the involvement of Cav3.2 channels in the development and the maintenance of inflammatory pain, with a requirement of Cav3.2 channels located in immune cells and in the primary afferent fibers.

We firstly demonstrated the implication of Cav3.2 channels in the development of mechanical allodynia and hyperalgesia in both subacute and inflammatory chronic pain model.

Indeed, constitutive KO *Cav3.2* mice did not expressed any pain behavior in response to von Frey test following carrageenan or CFA injections. We then showed that the use of pharmacological *Cav3.2* inhibitors, with the TTA-A2, which have a high specificity toward *Cav3.2* induced a robust and rapid analgesic effect, suppressing the mechanical allodynia and hyperalgesia obtained by carrageenan or CFA. These results are consistent with those of studies performed in KO *Cav3.2* mice who displayed a decreased analgesia in response to formalin-induced inflammatory pain <sup>31, 65, 66</sup> and with studies evaluating pharmacological blockage of *Cav3.2* in rat submitted to intraplantar formalin administration <sup>67</sup>.

Interestingly, the analgesic effect highlighted in the present study was associated to an anti-inflammatory effect, with a significant decrease of the edema size and local pro-inflammatory cytokine levels. Nevertheless, we did not observe any variation in the size of the edema following acute administration of T-type blockers in the CFA model. This results can be explained by the robustness of this chronic inflammation model. Indeed, in this model, the edema persists for several weeks while it totally disappears after 24 hours in the carrageenan model. Thus, it seems easier to detect an anti-inflammatory effect of acute drug administration in the carrageenan model.

The inflammation present can be result to the involvement of a neurogenic inflammation with an axon reflex and / or to the implication in the immune system. In order to separate these two aspects, we used the chimeric mice, demonstrating that the absence of *Cav3.2* channels in hematopoietic cells (progenitors of macrophages) was sufficient to reduced edema development and pro-inflammatory mediator release. Interestingly, this reduction was close to that observed in total *Cav3.2* KO mice, suggesting that only *Cav3.2* channels expressed by hematopoietic cells were involved in the inflammatory process. Accordingly, transplantation of hematopoietic cells expressing *Cav3.2* channels in total *Cav3.2* KO animals completely restored edema development and inflammatory pro-mediators release. Thus, these in vivo experiments demonstrated that inflammation induced by carrageenan and CFA needed *Cav3.2* channels expressed in hematopoietic cells. The use of SNS-KO mice allowed us to confirm these results. Indeed, we did not observed any modification of the edema size in these mice, confirming an implication in inflammation located at peripheral level, and thus involving the immune cells. To deeply analyze this effect, the contribution of macrophages cell lines involved in inflammation was explored. The hypothesis of functional role of the *Cav3.2* channels in macrophages cells, which have a crucial role in the immunity and inflammatory responses, was not confirmed by the electrophysiological analyzes that we performed in BMDM. Indeed, we did not found any T-type calcium channels currents in these cells, suggesting a *Cav3.2* implication in the inflammatory process located at another level. A recent study revealed the functional expression of T-type channels in T cells <sup>62</sup>. Thus, further studies are needed to confirm the hypothesis of a functional implication of *Cav3.2* channels at lymphocytes level in the edema development and inflammatory process.

In a clinical perspective, we investigated the effect of ethosuximide. Despite its lack of specificity towards the Cav3.2 channels, it has the advantage to be available on the market for clinical use in epilepsy. Several preclinical studies have also reported the analgesic effect of ETX mainly in animal model of neuropathic pain<sup>40, 41, 45, 49</sup>. In line with these results, ETX was recently evaluated in patients suffering from non-diabetic peripheral neuropathic pain (ref). Results of this randomized, parallel, controlled, double-blinded, multicenter clinical study led on 220 patients, has shown an interesting analgesic effect of ETX with a per protocol analysis but no effect with an intention-to-treat analyze (Kerckhove *et al.*, in submission). Concerning inflammatory pain, ETX were only tested in acute inflammation of the formalin test<sup>59</sup>. Indeed, no study were performed in chronic inflammation. Our data demonstrated that ETX is effective to reduce both parameters of inflammation and pain in a chronic context of inflammation. Due to the lack of specificity of ETX<sup>68</sup>, more studies are needed to investigate the involvement of Cav3.2 in this effect. However, in a visceral pain model (Picard *et al.*, submitted), the analgesic effect of ETX was dependent on Cav3.2 channels. Data from this study combined with the advantage of ETX mentioned above would permit a rapid translation in clinic which justifies the performing of a clinical study in patients suffering from inflammatory diseases.

Another original result of the present study is to have located the Cav3.2 inhibition analgesic effect on the C-fibers of the DRG, at both peripheral and spinal levels, thanks to genetic and pharmacological strategies. The genetic strategy, using the SNS-KO mice, allowed us to demonstrate the requirement of Cav3.2 located on the C-LTMR afferent fibers to develop inflammatory pain. These results are consistent with the study of François *et al.* (2015)<sup>47</sup> demonstrating a decrease of the response of the SNS-KO mice to the formalin test at both phase; and in a neuropathic pain model, a reduction of the mechanical allodynia and a suppression of the cold allodynia. Moreover, in the present study, systemic administrations of ABT-639 revealed a strong analgesic effect, confirming and specifying the involvement of Cav3.2 channels in the development and the maintenance of inflammatory pain, located at peripheral level, on the primary afferent fiber terminals. An analgesic effect was also observed with the intrathecal use of ABT-639, demonstrating both a peripheral and a spinal implication of the T-type channels in the inflammatory pain. Interestingly, the blockage peripherally restricted succeed to induce the analgesic effect expected. These original result open new avenues in drug development for the treatment of inflammatory pain. Indeed, a peripherally acting blocker, which does not cross the blood-brain barrier, presents the great advantage to limit any potential central adverse effects of Cav3.2 inhibition. The study of Jarvis *et al.* (2014)<sup>69</sup> also demonstrated the analgesic effect of ABT-639 in different murine models of neuropathic pain. A clinical trial evaluating the effect of ABT-639 in patients with diabetic neuropathy showed good tolerance, without toxic effect of the molecule. However, results were disappointing. The lack of efficacy can be explained by the low doses used in

patients<sup>70,71</sup>. Moreover, recent clinical evaluations of local TTA-A2 injections effect in the skin showed a decrease in mechanical and cold allodynia<sup>69,70</sup>. Altogether these results demonstrated the need of a better expertise in the use of peripheral T type blockers to clearly conclude on the potential clinical efficacy of this therapeutic approach in the treatment of chronic pain.

## **Conclusion**

This study provided evidence that Cav3.2 channels are involved in the development and the maintenance of inflammation and related pain in murine model of subacute inflammatory and chronic monoarthritis pain. Mostly, we determined for the first time that Cav3.2 channels localized on the C-fibers of the DRG, at both peripheral and spinal levels, played a crucial role in inflammatory pain. Finally, we demonstrated the beneficial effect of pharmacological T-type blockers, such as ETX, on mechanical allodynia and hyperalgesia, as well as on edema size which can open on a clinical proof-of-concept study. Overall, the present study ostensibly supports the possibility of considering Cav3.2 inhibition as new therapeutic perspectives in the treatments of inflammation and related pain.

## **Materials and Methods**

### ***Animals***

All experiments were performed following the ethical guidelines set out by the International Association for the Study of Pain with EU guidelines and with approval from the Institutional Ethic Committee for animal experiments (CEMEA Auvergne; reference: 6295). Eight-week-old males C57BL/6j mice purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, FRANCE), Cav3.2 knock-out (KO) male mice, originally generated by Chen *et al.* (2003)<sup>74</sup> and their wild type (WT) littermates and conditional KO mice with deletion of Cav3.2 specifically in small diameter dorsal root ganglion (DRG) neurons (SNS-KO) and their WT littermates were used. Conditional KO mice are generated by crossing KI mice which have two loxP site-flanked into exon 6 of the Cav3.2 locus with mice expressing Cre recombinase under the Nav1.8 promoter<sup>47,75</sup>. All animals were housed under standard laboratory conditions (12-hour light/dark cycle, temperature of 21 to 22°C, 55% humidity in specific pathogen free conditions). Food and water were available ad libitum.

### ***Carrageenan and monoarthritic model***

#### Carrageenan model

Subacute paw inflammation was induced by an intraplantar (i.pl.) (left hindpaw) subcutaneous injection of 20 µl of physiologic serum - 3% λ-carrageenan (Sigma-Aldrich, France).

### Monoarthritic model

Five microliters of 5% Complete Freund Adjuvant (CFA) (Difco Laboratories, Detroit, USA) were injected at the two sides of the left ankle joint under brief anesthesia with 2.5% isoflurane (in 3L / min of air).

### **Drugs**

Pharmacological treatments consisted in the administration of TTA-A2 (Alomone labs, Jerusalem, ISRAEL dissolved in NaCl, 10% DMSO, 10% Tween 80), 1 mg/kg, 10 ml/kg, per os; ethosuximide (ETX, Sigma-Aldrich, FRANCE, dissolved in NaCl), 200 mg/kg intraperitoneally (i.p.) and the peripherally acting ABT-639 (Medchem Express, USA, dissolved in NaCl, 10% DMSO) 10, 30, 100 mg/kg, 10 ml/kg, i.p. and 10 µg / 5µl. intrathecally (i.t.).

### **Assessment of mechanical allodynia and hyperalgesia**

Mice purchased were acclimated one week to the testing environment before baseline testing. On the behavior testing day, mice were placed in individual compartments on top of a wire surface and allowed to acclimatize for 1 h before testing. Mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed with the 0.04 and 1.4 g calibrated von Frey filaments (Bioseb, France) respectively. The latter was pressed perpendicularly 5 times against the mid paw and held for 3 s. A positive response was noted if the paw was withdrawn or licked and a pain score (from 0 to 5) response was determined.

### **Assessment of the inflammation state**

Paw edema, induced by i.pl. carrageenan and periarticular CFA injections was measured 3 times with a caliper and then averaged. The percentage of the augmentation of the edema is calculated by the calcul  $((\text{size} - \text{basal size}) / \text{basal size}) \times 100$ . For the assessment of interleukine-6 (IL-6), the paw edema was removed and the tissue is incubated in RPMI medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplemented with 10% of an antibiotic cocktail (penicillin, streptomycin, # P11-010, PAA, Austria) at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After one night of incubation, the supernatant was removed. Then, IL-6 assays was performed to quantify IL-6 levels using an ELISA DuoSet kit from R & D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer protocol.

### **Experimental design**

The design, analysis and reporting of the research were carried out according to the ARRIVE guidelines (see supplementary data). Animals were randomly divided into 8–10 mice per group. Randomized treatment administrations were performed according to the method of equal blocks, in order to assess the effect of the different treatments at the same time interval to avoid unverifiable and time-variable

environmental influences. Experiments were carried out blind, the genotype and the pharmacological treatments tested were not known from the experimenter.

#### **Acute pharmacological treatments**

The mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated using the von Frey test, before (baseline) carrageenan or CFA injections; then animals received an administration of vehicle (VEH) or various blockers of Cav3.2 channels [TTA-A2, ethosuximide or ABT-639] at 4 h post-injection for carrageenan and after 7 days for CFA. The acute drug treatment effect is evaluated with time-response effect.

Repeated pharmacological treatments

**The repeated pharmacological treatment** was performed in CFA model. The mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated daily from day 7 to 14 post CFA in mice receiving 3 administrations per day of TTA-A2, ETX or VEH. The effect of these drug treatments was evaluated each day before the first drug administration of the day.

The paw edema were also measured after each mechanical hyperalgesia Von Frey tests.

#### ***Bone-marrow derived macrophage and edematous tissue culture***

Bone-marrow derived macrophage (BMDM) cells were prepared and cultured as previously described<sup>76</sup>. Briefly, mouse femurs were washed out and flushed with DMEM and bone-marrow cells were plated at an initial density of 10<sup>6</sup> cells/ml. Then, cells were cultured and differentiated into BMDM using DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine, 1% antibiotic (neomycin) and 50% L929 supernatants containing macrophage-stimulating factor (M-CSF). For in vitro experiments, BMDM cells were cultured for at least 5 days before LPS stimulation in serum-free BMDM culture medium.

To perform edematous tissues culture, edema (30 mg tissue / mouse) was withdrawn at the end of the experiment and cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% glutamine and 1% antibiotic. After 24 h, the medium was harvested and supernatant used to quantify pro-inflammatory factors by ELISA.

#### ***Generation of chimeric mice.***

The objective was to determine the role of Cav3.2 located in immune versus neuronal cells in inflammation. For that purpose, chimeric mice generation was realized by: 1) Irradiating WT and Cav3.2 KO mice with a total dose of 10 Gy (1 Gy/min) by the X-RAD 320 irradiator (320kV, 45mAmp, Precision X-RAY Inc. Brandford-CT) performed at the PAVIRMA platform (Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France); 2). Immediately after irradiation, these mice were transferred with 10<sup>7</sup> total bone marrow (BM) cells (in 100  $\mu$ L DMEM) retrieved from un-irradiated WT or Cav3.2

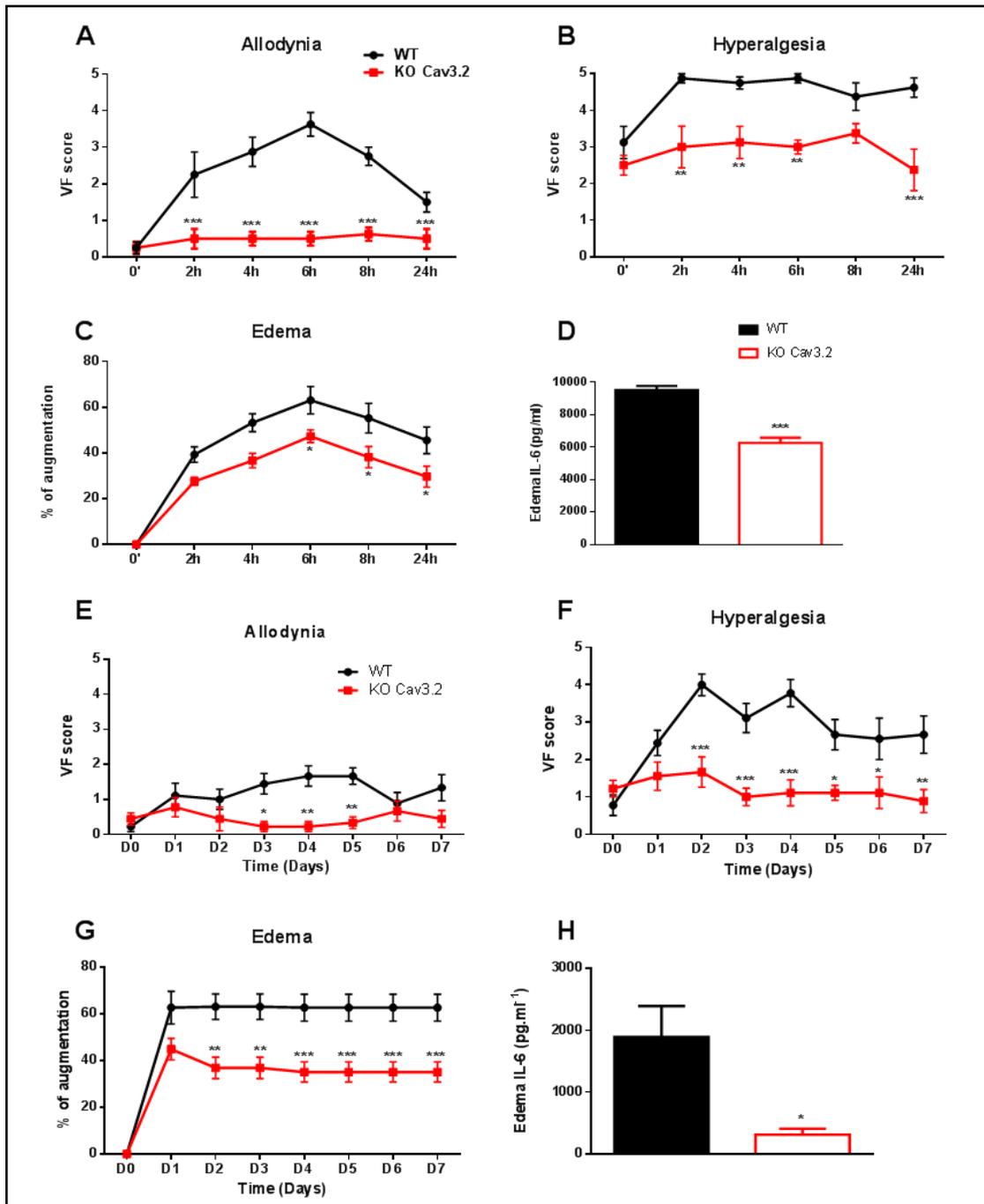
KO mouse. This procedure led us to obtain 4 experimental groups of irradiated mice including controls [WT mice transferred with BM cells from WT donors; *Cav3.2* KO mice transferred with BM cells from KO donors and chimeric animals [WT mice transferred with BM cells from *Cav3.2* KO donors; *Cav3.2* KO mice transferred with BM cells from WT donors]. During 2 weeks after the irradiation, mice received a drinking water complemented with 2 mg/ml of neomycin. Eight weeks after the BM transplantation, chimeric mice were used for experiments.

### ***Electrophysiology recording***

BMDM cells were treated with 2 mg/ml collagenase (Boehringer Mannheim) for 40 min at 37°C, washed in Neurobaal A / 10% B27, and suspended in 2 ml of Neurobasal B27 supplemented with GlutaMax and 25 ng/ml nerve growth factor (NGF 7S, Invitrogen), 10 ng/ml neurotrophin 4 (NT4, Peprotech), and 2 ng/ml glial derived neurotrophic factor (GDNF, Invitrogen). Single-cell suspensions were obtained by 3 passages through a 3 needle tips of decreasing diameter (gauge 18, 21, and 26) as described previously<sup>47,58</sup>. Cells were plated onto polyornithine/laminin coated dishes and kept at 37°C until used. Whole cell patch-clamp recordings were performed 3–16 h after plating with and Axopatch200B amplifier interfaced with a Digidata 1440 acquisition board and the pClamp10 software suite (Molecular Devices) in the voltage clamp mode. For calcium current recordings, the extracellular solution contained (in mM): 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 TEACl, 2 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 130 Choline Cl, 10 Glucose, 5 4AP, HEPES 10 (pH to 7.4 with TEAOH 300 mOsM). Pipettes with a resistance of 1-1.5 MΩ were filled with an internal solution containing (in mM): 110 CsCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, 0.6 GTP (pH to 7.4 with CsOH, 300 mOsM). Series resistance were not compensated. Cells were identified under the inverted microscope (IX 70 Olympus) with the adapted filter set just prior to perform electrophysiological recordings.

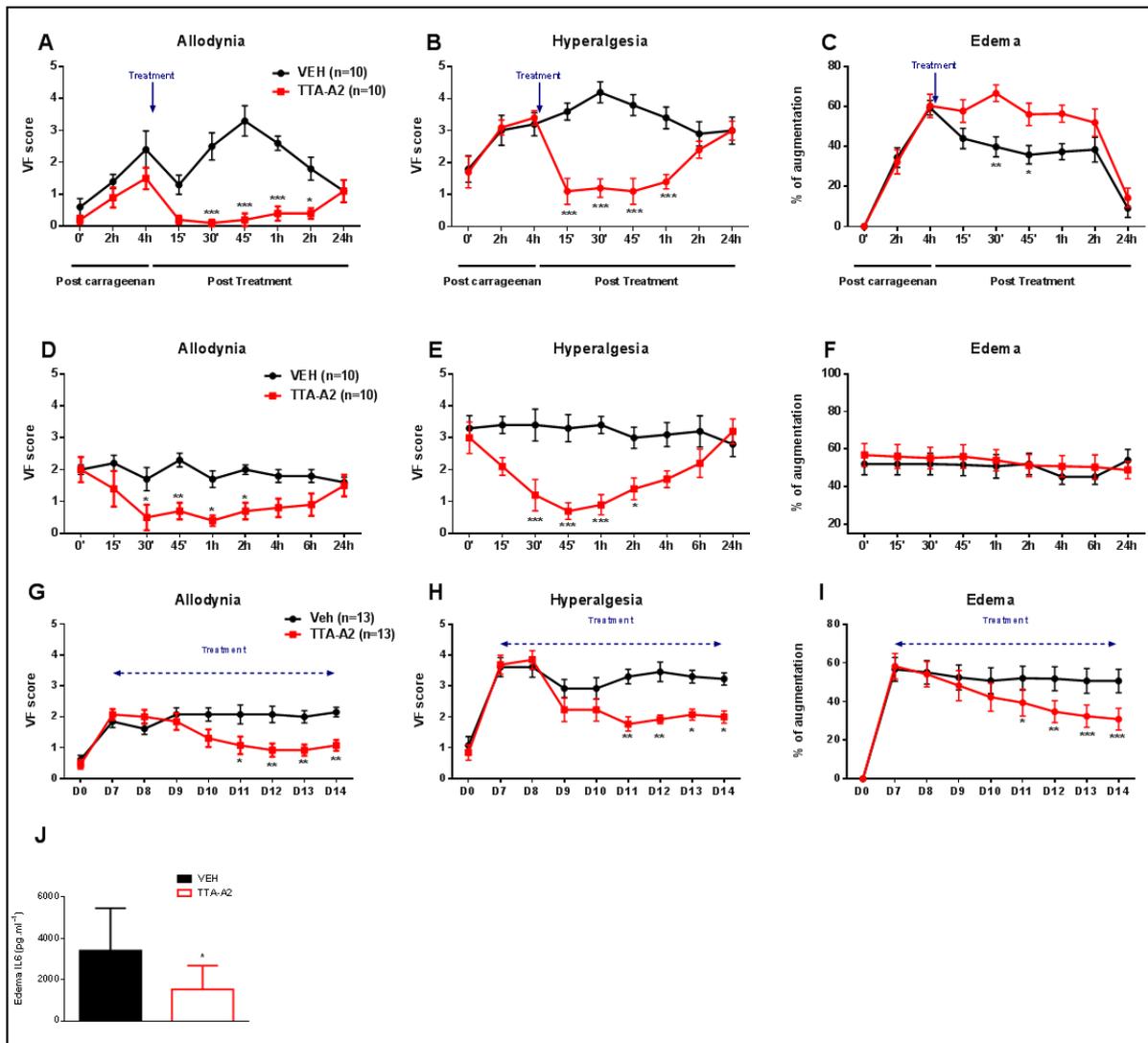
### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, US). All data were expressed as mean ± SEM. We used a two-way (Time & Pharmacological treatment, or Time and Genotype) analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. For other analysis, we used a Student-t test or by Kruskal-Wallis/Friedman test in the case of data that were not normally distributed. Data were considered statistically significant when p was ≤ 0.05.



**Figure 1. Evidence for a functional involvement of Cav3.2 channels in the development of inflammation and related pain** Cav3.2 knockout mice (KO Cav3.2) and their wild type littermates (WT) received an intraplantar carrageenan administration. The mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively; the edema size was measured with a caliper; the edema IL-6 level was analyzed by ELISA in supernatant from culture of edema dissected 24 h post carrageenan injection. (A) Mechanical allodynia; (B) Mechanical hyperalgesia; (C) Paw edema; (D) Edema IL-6 level.

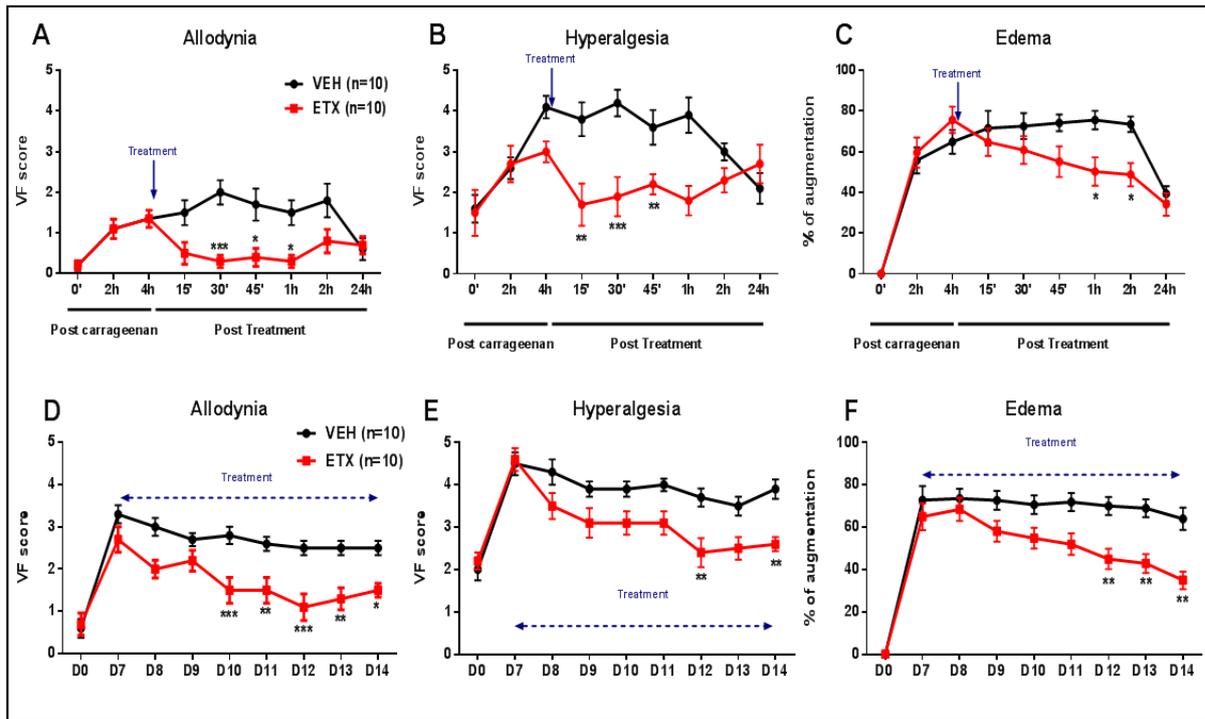
Other KO Cav3.2 and WT mice received an intraarticular complete Freund adjuvant (CFA). The mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated by von Frey test; the edema size was measured with a caliper; the edema IL-6 level was analyzed by ELISA in supernatant from culture of edema dissected 7 days post carrageenan injection. (E) Mechanical allodynia; (F) Mechanical hyperalgesia; (G) Paw edema; (H) Edema IL-6 level. Statistical differences for Von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Genotype) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between WT and KO Cav3.2 group are indicating by asterisks (\* P< 0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\* P<0.001)]. Statistical differences for Edema IL-6 levels were assessed by Mann-Whitney test [significant differences between WT and KO Cav3.2 group are indicating by asterisks (\* P< 0.05; \*\*\* P<0.001)]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Figure 2. Pharmacological evidence of a functional involvement of T-type channels in the development and the maintenance of inflammation and related pain**

Wild type (WT) mice received an intraplantar injection of carrageenan. Then, animals received an administration of TTA-A2 (1 mg/kg, 10 ml/kg, per os) or vehicle (VEH; NaCl, 10% DMSO, 10% Tween 80, 10 ml/kg per os), at 4h post injection for carrageenan and the time-response effect on mechanical allodynia and hyperalgesia was evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively and on the edema size with a caliper. (A) Mechanical allodynia; (B) Mechanical hyperalgesia; (C) Paw edema induced.

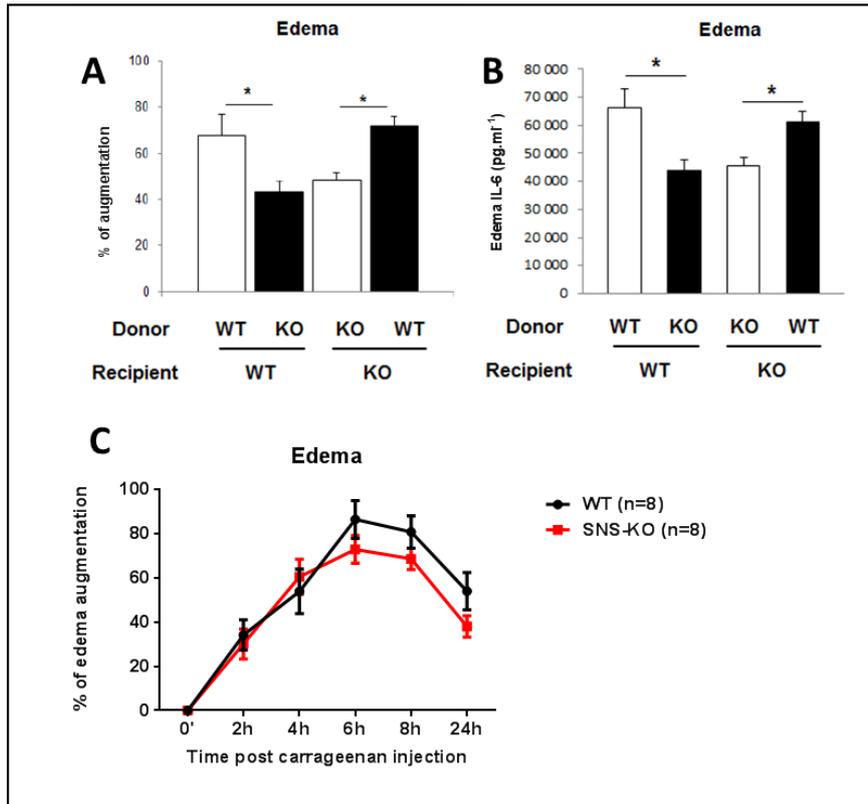
Other groups of WT mice received an intraarticular administration of complete adjuvant of Freund (CFA) and after 7 days for CFA, animals received an acute administration of TTA-A2 (1 mg/kg, 10 ml/kg, per os) or VEH and the treatment effect is evaluated. (D) Mechanical allodynia; (E) Mechanical hyperalgesia; (F) Paw edema. In CFA model, the effect of repeated TTA-A2 (1 mg/kg, 10 ml/kg, per os, 3 time a day) (or VEH) administrations from D7 to D14 was also performed by the same way than previously, moreover the edema IL-6 level in supernatant from culture of edema dissected 14 day post CFA injection was analyzed by ELISA. (G) Mechanical allodynia; (H) Mechanical hyperalgesia; (I) Paw edema (J) Edema IL-6 level. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Treatments) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between VEH and TTA-A2 group are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )]. Statistical differences for Edema IL-6 levels were assessed by Mann-Whitney test [significant differences between VEH and TTA-A2 group are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ )]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



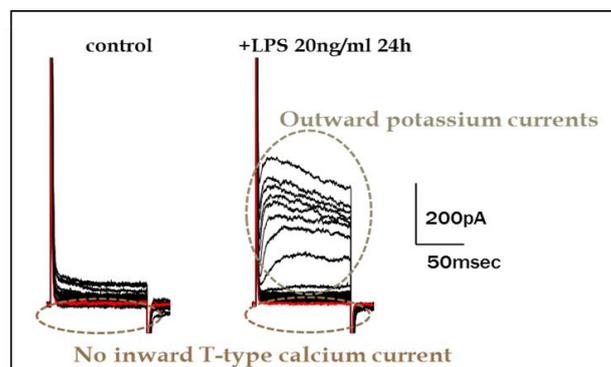
**Figure 3. Ethosuximide decreased inflammation and related pain**

Different groups of WT mice received an intraplantar carrageenan administration. Animals received an acute injection of ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg, i.p.) or vehicle (VEH; NaCl, 10 ml/kg), at 4h post carrageenan and the time-response effect on mechanical allodynia and hyperalgesia was evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively and on the edema size with a caliper. (A) Mechanical allodynia; (B) Mechanical hyperalgesia; (C) Paw edema.

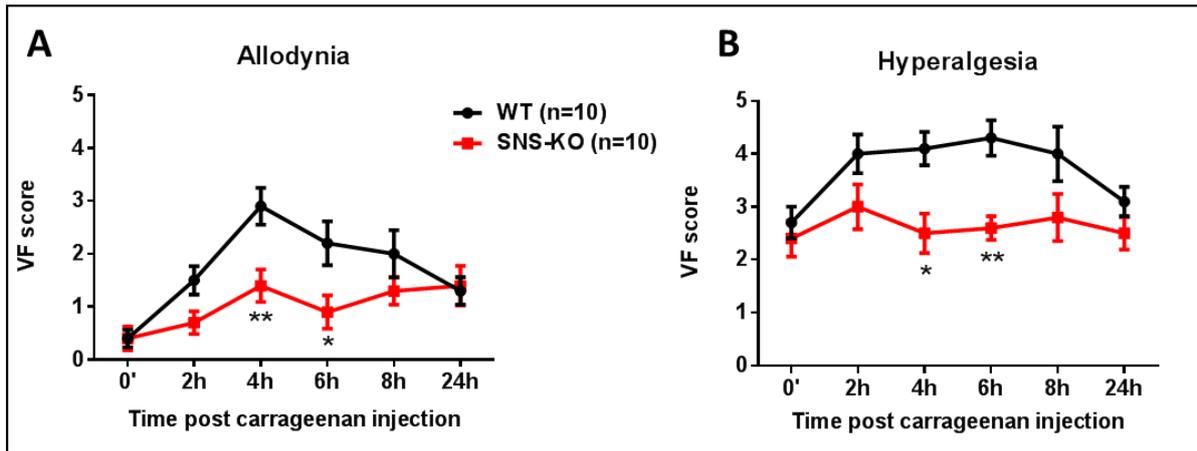
Others groups of mice received an intraarticular injection of complete adjuvant of Freund (CFA). The effect of repeated ETX (200 mg/kg, 10 ml/kg, i.p.) (or VEH) administrations from D7 to D14 was performed. (D) Mechanical allodynia induced by CFA injection; (E) Mechanical hyperalgesia; (F) Paw edema. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Treatments) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between VEH and ETX group are indicating by asterisks (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Figure 4. Anti-inflammatory effect of *Cav3.2* inhibition is mediated by immune cells.** The assessment of edema development was measured with a caliper and edema IL-6 production was analyzed by ELISA in chimeric mice, 8 weeks after their irradiation and bone marrow transplantation, before (baseline, white histogram) and 4 hours after an intraplantar carrageenan injection (black histogram). Donor: mouse bone marrow donor, Recipient: transplanted mouse; KO: *Cav3.2* knock-out mice and WT: wild type littermate mice. (A) Paw edema; (B) edema IL-6. The assessment of the edema development was also performed in SNS-KO (small-diameter neurons specifically knock out) mice and their WT littermates following a carrageenan administration. (C) Paw edema. Statistical differences for the edema size and edema IL-6 levels in chimeric mice were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc [significant differences are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ )]. Statistical differences for the edema size in SNS-KO and WT mice were assessed by two-way ANOVA (Time, Genotype) followed by Bonferroni post-hoc, [no significant differences between SNS-KO and WT mice were found]. Data represent mean  $\pm$  SEM.

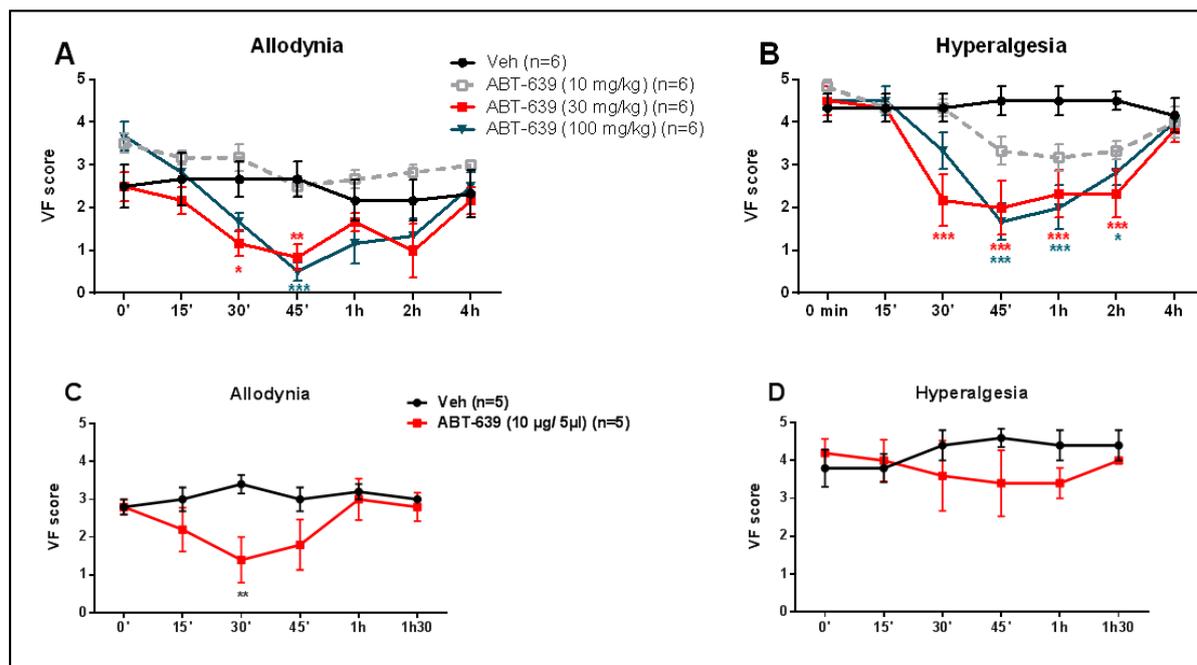


**Figure 5. Anti-inflammatory effect of *Cav3.2* inhibition is not mediated by macrophages cells** Analysis of currents from BMDM cells at basal or LPS activated states. Currents were evoked by 100-ms pulses from  $-100$  to  $-35$  mV.



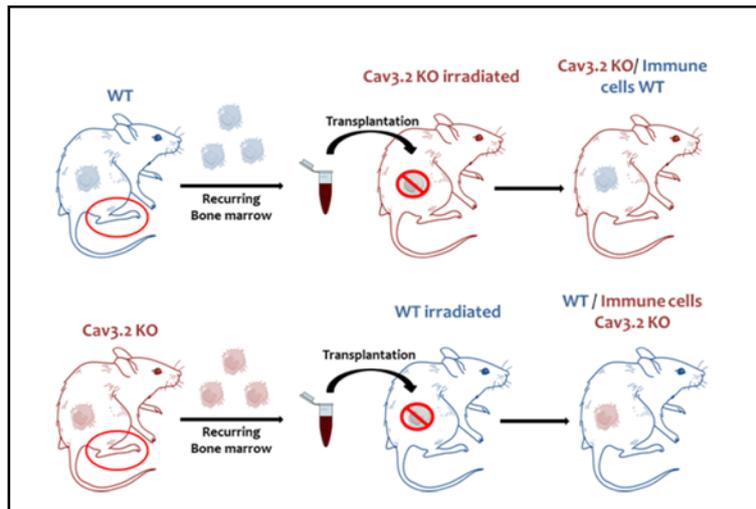
**Figure 6. Cav3.2 channels located in C-fibers contribute to inflammatory pain**

SNS-KO (small-diameter neurons specifically knock out) mice and their wild type littermates (WT) received an intraplantar injection of carrageenan, the time-response effect on mechanical allodynia and hyperalgesia was evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively. (A) Mechanical allodynia; (B) Mechanical hyperalgesia. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Genotype) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between SNS-KO and WT group are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ )]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



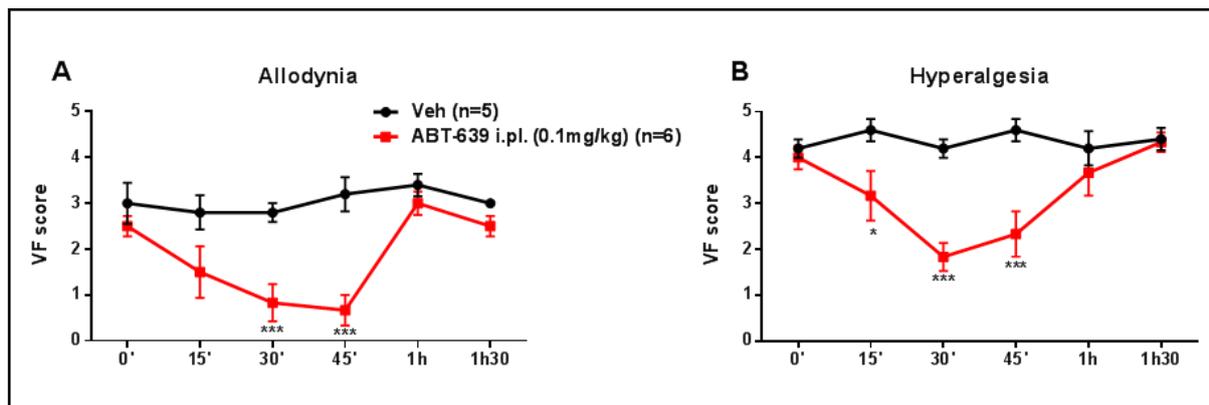
**Figure 7. Contribution of peripheral and spinal located Cav3.2 in inflammatory pain**

WT mice received an intra-articular administration of complete adjuvant of Freund (CFA). Then, animals received intraperitoneal (i.p.) (10, 30 or 100 mg/kg, 10 ml/kg) injections of ABT-639 or vehicle (VEH; NaCl, 10% DSO, 10 ml/kg) at 7 days post CFA. The time-response effect on mechanical allodynia and hyperalgesia was evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively. (A) Mechanical allodynia; (B) Mechanical hyperalgesia. The effect of intrathecal (i.t.) (10  $\mu$ g / 5 $\mu$ l) injections of ABT-639 or VEH are also performed. (C) Mechanical allodynia; (D) Mechanical hyperalgesia. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Treatments) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between VEH and ABT-639 group are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



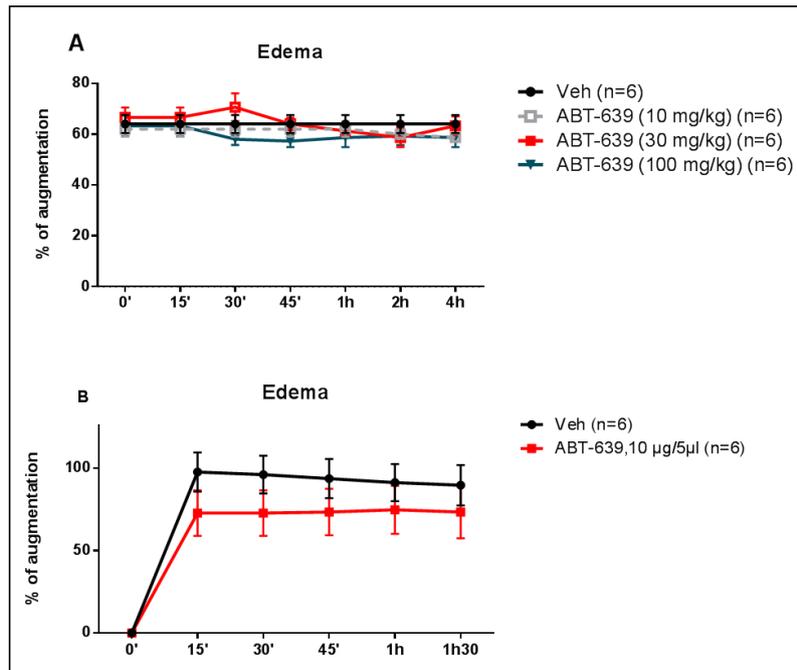
**Supplementary Figure 1**

Representation of chimeric mice generation. WT and *Cav3.2* KO mice (recipients) are irradiated with a total dose of 10 Gy. In these irradiated mice, 107 total bone marrow (BM) cells retrieved from un-irradiated WT or *Cav3.2* KO mouse (donors) are transplanted by i.v injection immediately after irradiation. This procedure led us to obtain four experimental groups of irradiated mice including chimeric mice [WT mice transplanted with BM cells from *Cav3.2* KO (Recipient WT/Donor KO); *Cav3.2* KO mice transferred with BM cells from WT donors (Recipient KO/Donor WT)] and control mice (not represented) [WT mice transferred with BM cells from WT donors (Recipient WT/Donor WT); *Cav3.2* KO mice transferred with BM cells from KO donors (Recipient KO/Donor KO)].



**Supplementary Figure 2**

WT mice received an intraarticular administration of complete Freund adjuvant (CFA). Seven days later, animals received an intraplantaire (i.pl.) injection of ABT-639 (0.1 mg/kg, 10 ml/kg) or vehicle (VEH; NaCl, 10% DMSO, 10 ml/kg). The time-response effect on mechanical allodynia and hyperalgesia was evaluated by von Frey test using 0.04 g and 1.4 g filament respectively and the paw edema was measured with a caliper. (A) Mechanical allodynia (b) Mechanical hyperalgesia (c) Paw edema. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Treatments) followed by Bonferroni post-hoc [significant differences between VEH and ABT-639 group are indicating by asterisks (\*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )]. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Supplementary Figure 3**

WT mice received an intraarticular administration of complete Freund adjuvant (CFA). Seven days later, animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of ABT-639 (10, 30 or 100 mg/kg, 10 ml/kg) or an intrathecal (i.t.) injection of ABT-639 (10 µg / 5µl) or vehicle (VEH; NaCl, 10% DMSO, 10 ml/kg). The time-response effect on the paw edema was measured with a caliper. (A) i.p. effect of ABT-639 on the paw edema; (B) i.t. effect of ABT-639 on the paw edema. Statistical differences for von Frey test were assessed by two-way ANOVA (Time, Treatments) followed by Bonferroni post-hoc [no significant differences between VEH and ABT-639 group were found]. Data represent mean ± SEM.

## References

1. Da Rocha Castelar Pinheiro G, Khandker RK, Sato R, Rose A, Piercy J. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life, work productivity and resource utilisation: an observational, cross-sectional study in Brazil. *Clinical and experimental rheumatology* 31, 334-340 (2013).
2. Ten Klooster PM, Veehof MM, Taal E, van Riel PL, van de Laar MA. Changes in priorities for improvement in patients with rheumatoid arthritis during 1 year of anti-tumour necrosis factor treatment. *Annals of the rheumatic diseases* 66, 1485-1490 (2007).
3. Ward MM, Guthrie LC, Dasgupta A. Direct and Indirect Determinants of the Patient Global Assessment in Rheumatoid Arthritis: Differences by Level of Disease Activity. *Arthritis care & research* 69, 323-329 (2017).
4. Minnock P, FitzGerald O, Bresnihan B. Women with established rheumatoid arthritis perceive pain as the predominant impairment of health status. *Rheumatology* 42, 995-1000 (2003).
5. Carr A, *et al.* Rheumatology outcomes: the patient's perspective. *The Journal of rheumatology* 30, 880-883 (2003).
6. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Jr., Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in immunology* 38, 5-19 (2017).
7. Van der Heijde D, *et al.* Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis and rheumatism* 52, 582-591 (2005).
8. Da Silva JA, Ramiro S, Pedro S, Rodrigues A, Vasconcelos JC, Benito-Garcia E. Patients- and physicians- priorities for improvement. The case of rheumatic diseases. *Acta reumatologica portuguesa* 35, 192-199 (2010).
9. Conrad R, Wegener I, Geiser F, Kleiman A. Temperament, character, and personality disorders in chronic pain. *Current pain and headache reports* 17, 318 (2013).
10. Giesecke T, Gracely RH, Williams DA, Geisser ME, Petzke FW, Clauw DJ. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. *Arthritis and rheumatism* 52, 1577-1584 (2005).
11. Smolen JS, *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Annals of the rheumatic diseases* 75, 3-15 (2016).
12. Walsh DA, McWilliams DF. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology* 10, 581-592 (2014).
13. Sturgeon JA, Finan PH, Zautra AJ. Affective disturbance in rheumatoid arthritis: psychological and disease-related pathways. *Nature reviews Rheumatology* 12, 532-542 (2016).
14. Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Choi HK. Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 1530-1542 (2003).
15. Bergman MJ. Social and economic impact of inflammatory arthritis. *Postgraduate medicine Spec No*, 5-11 (2006).
16. Lenssinck ML, Burdorf A, Boonen A, Gignac MA, Hazes JM, Luime JJ. Consequences of inflammatory arthritis for workplace productivity loss and sick leave: a systematic review. *Annals of the rheumatic diseases* 72, 493-505 (2013).
17. Smolen JS, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases* 76, 960-977 (2017).
18. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370, 1861-1874 (2007).
19. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* 21, 201-232 (2013).
20. Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in molecular medicine* 8, 390-396 (2002).
21. Hojsted J, Sjogren P. Addiction to opioids in chronic pain patients: a literature review. *European journal of pain* 11, 490-518 (2007).
22. Curtis JR, *et al.* Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. *Arthritis and rheumatism* 55, 420-426 (2006).
23. Boyman O, Comte D, Spertini F. Adverse reactions to biologic agents and their medical management. *Nature reviews Rheumatology* 10, 612-627 (2014).
24. Loannidis JP, Karassa FB, Druyts E, Thorlund K, Mills EJ. Biologic agents in rheumatology: unmet issues after 200 trials and \$200 billion sales. *Nature reviews Rheumatology* 9, 665-673 (2013).

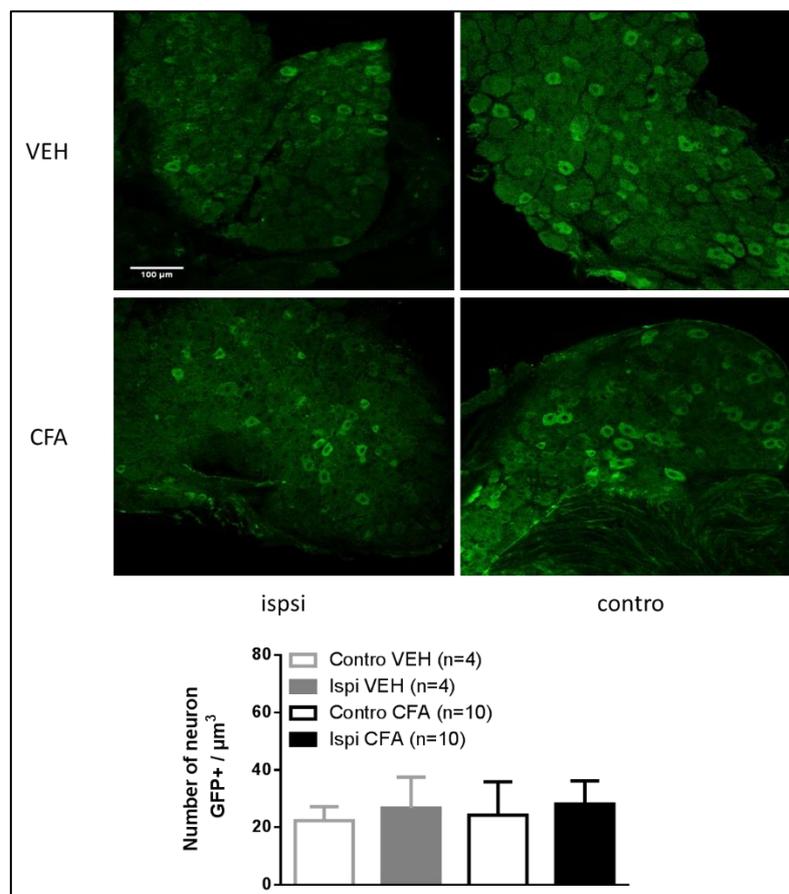
25. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clinical and translational gastroenterology* 7, e135 (2016).
26. Lee YC, *et al.* Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study. *Arthritis research & therapy* 13, R83 (2011).
27. Smolen JS, Strand V, Koenig AS, Szumski A, Kotak S, Jones TV. Discordance between patient and physician assessments of global disease activity in rheumatoid arthritis and association with work productivity. *Arthritis research & therapy* 18, 114 (2016).
28. Taylor P, *et al.* Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis. *The Journal of international medical research* 38, 1213-1224 (2010).
29. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews* 83, 117-161 (2003).
30. Lee J, Kim D, Shin HS. Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 18195-18199 (2004).
31. Choi S, *et al.* Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes, brain, and behavior* 6, 425-431 (2007).
32. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Mennerick S, Perez-Reyes E, Zorumski CF. Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Molecular pharmacology* 60, 603-610 (2001).
33. Lee WY, *et al.* Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 9500-9509 (2009).
34. Jacus MO, Uebele VN, Renger JJ, Todorovic SM. Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 9374-9382 (2012).
35. Jagodic MM, *et al.* Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 3305-3316 (2007).
36. Latham JR, *et al.* Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 58, 2656-2665 (2009).
37. Messinger RB, *et al.* In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* 145, 184-195 (2009).
38. Cao XH, Byun HS, Chen SR, Pan HL. Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons. *Journal of neurochemistry* 119, 594-603 (2011).
39. Orestes P, *et al.* Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)3.2 T-type calcium channels. *Diabetes* 62, 3828-3838 (2013).
40. Matthews EA, Dickenson AH. Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *European journal of pharmacology* 415, 141-149 (2001).
41. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105, 159-168 (2003).
42. Bourinet E, *et al.* Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO journal* 24, 315-324 (2005).
43. Wen XJ, Xu SY, Chen ZX, Yang CX, Liang H, Li H. The roles of T-type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. *Pharmacology* 85, 295-300 (2010).
44. Takahashi T, *et al.* Upregulation of Ca(v)3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain* 150, 183-191 (2010).
45. Hamidi GA, Ramezani MH, Arani MN, Talaei SA, Mesdaghinia A, Banafshe HR. Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 674, 260-264 (2012).
46. Yue J, Liu L, Liu Z, Shu B, Zhang Y. Upregulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine* 38, 463-470 (2013).
47. Francois A, *et al.* The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell reports*, (2015).

48. Lin SF, *et al.* Expression patterns of T-type Cav3.2 channel and insulin-like growth factor-1 receptor in dorsal root ganglion neurons of mice after sciatic nerve axotomy. *Neuroreport* 27, 1174-1181 (2016).
49. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109, 150-161 (2004).
50. Okubo K, *et al.* Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 188, 148-156 (2011).
51. Matsunami M, *et al.* Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 58, 751-761 (2009).
52. Matsunami M, Kirishi S, Okui T, Kawabata A. Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. *Neuroscience* 181, 257-264 (2011).
53. Tsubota-Matsunami M, Noguchi Y, Okawa Y, Sekiguchi F, Kawabata A. Colonic hydrogen sulfide-induced visceral pain and referred hyperalgesia involve activation of both Ca(v)3.2 and TRPA1 channels in mice. *Journal of pharmacological sciences* 119, 293-296 (2012).
54. Terada Y, Fujimura M, Nishimura S, Tsubota M, Sekiguchi F, Kawabata A. 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, 361-369 (2015).
55. Scanzi J, *et al.* Colonic overexpression of the T-type calcium channel Cav 3.2 in a mouse model of visceral hypersensitivity and in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 28, 1632-1640 (2016).
56. Murakami-Nakayama M, *et al.* Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice. *Journal of pharmacological sciences* 127, 223-228 (2015).
57. Marger F, *et al.* T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11268-11273 (2011).
58. Francois A, *et al.* State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* 154, 283-293 (2013).
59. Chen WK, *et al.* Ca(v)3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 10360-10368 (2010).
60. Bendele A, *et al.* Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicologic pathology* 27, 134-142 (1999).
61. Bendele A, McAbee T, Sennello G, Frazier J, Chlipala E, McCabe D. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis and rheumatism* 42, 498-506 (1999).
62. Wang H, *et al.* Low-Voltage-Activated CaV3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles. *Immunity* 44, 782-794 (2016).
63. Lacinova L, Weiss N. It takes two T to shape immunity: emerging role for T-type calcium channels in immune cells. *General physiology and biophysics* 35, 393-396 (2016).
64. Badou A, Jha MK, Matza D, Flavell RA. Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes. *Frontiers in immunology* 4, 243 (2013).
65. Orestes P, *et al.* Free radical signalling underlies inhibition of CaV3.2 T-type calcium channels by nitrous oxide in the pain pathway. *The Journal of physiology* 589, 135-148 (2011).
66. Gadotti VM, *et al.* Small organic molecule disruptors of Cav3.2 - USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain. *Molecular pain* 11, 11 (2015).
67. Choe W, *et al.* TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Molecular pharmacology* 80, 900-910 (2011).
68. Goren MZ, Onat F. Ethosuximide: from bench to bedside. *CNS drug reviews* 13, 224-239 (2007).
69. Jarvis MF, *et al.* A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats. *Biochemical pharmacology* 89, 536-544 (2014).
70. Serra J, Duan WR, Locke C, Sola R, Liu W, Nothaft W. 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, 2175-2183 (2015).
71. Ziegler D, Duan WR, An G, Thomas JW, Nothaft W. A randomized double-blind, placebo-, and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain* 156, 2013-2020 (2015).

72. Nagi SS, Dunn JS, Birznieks I, Vickery RM, Mahns DA. 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 (2015).
73. Samour MS, Nagi SS, Mahns DA. 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, 1566-1575 (2015).
74. Chen CC, *et al.* Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 302, 1416-1418 (2003).
75. Stirling LC, *et al.* Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain* 113, 27-36 (2005).
76. Gersuk GM, Razai LW, Marr KA. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *Journal of immunological methods* 329, 157-166 (2008).

### Résultats complémentaires

L'expression des canaux Cav3.2 a été évaluée dans le modèle d'arthrite après administration de CFA dans la patte ipsilatérale (ipsi) des animaux. Comme pour l'ARTICLE 2, afin de pallier le manque d'anticorps spécifiques de Cav3.2, les souris KI Cav3.2 ont été utilisées. L'expression des canaux Cav3.2 au niveau protéique n'a révélé aucune modification significative en condition pathologique (7 jours après l'administration de CFA) comparativement aux souris contrôles ayant reçu le véhicule (VEH) ou au niveau de la patte controlatérale (contro) (**Figure 43**). Il s'agit là de la première étude s'intéressant à un changement d'expression des canaux Cav3.2 en condition de douleur inflammatoire.



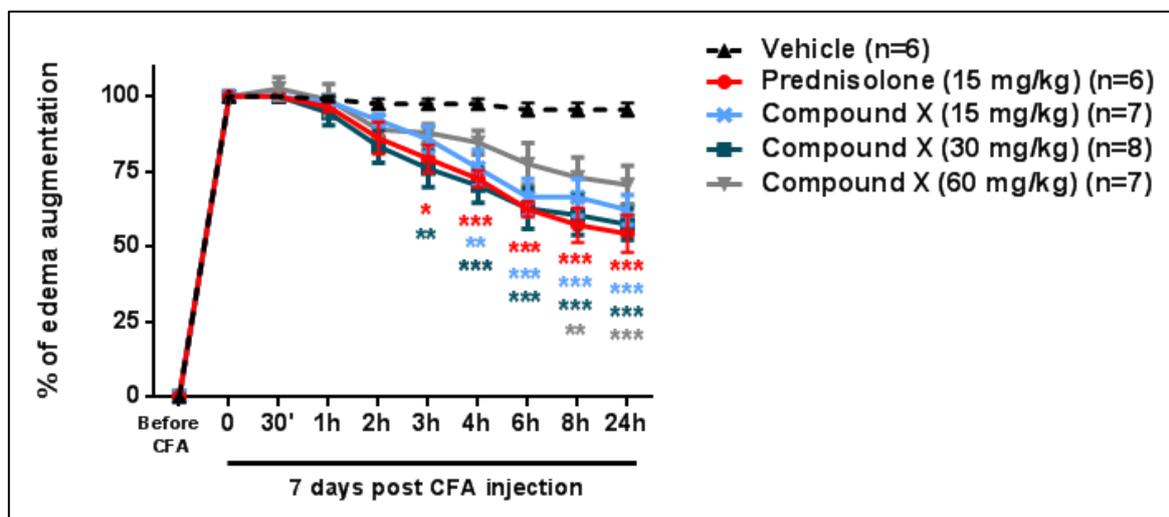
**Figure 43 : Expression des canaux Cav3.2 dans le modèle d'arthrite.** L'immunohistochimie sur coupes de DRG (étages L4-L5) prélevés chez des souris KI Cav3.2-GFP ayant reçu une administration intra-articulaire d'adjuvant complet de Freund (CFA) ou de véhicule (VEH) (ipsi : patte ipsilatérale ; contro : patte controlatérale). Les différences statistiques ont été analysées par une ANOVA 1 voie (Traitement) suivie d'un test post-hoc de Bonferroni. Aucune différence significative entre les groupes n'a été observée. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

## Résultats

### Analyse de l'effet anti-inflammatoire d'une nouvelle molécule

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à une étude conduite avec un groupe industriel pharmaceutique, portant sur **l'analyse de l'effet anti-inflammatoire potentiel d'une molécule nouvellement synthétisée**. Ces travaux se sont déroulés en collaboration avec l'Ecole de chimie de Clermont-Ferrand, SIGMA Clermont et vont faire l'objet d'une publication dans une revue internationale à comité de lecture (Jouve *et al.*, en préparation, voir **Annexe 1**).

Ma contribution à cet article a consisté à analyser dans le modèle murin d'arthrite induite par une administration de CFA dans la voute plantaire de l'animal, l'effet anti-inflammatoire de la molécule X, administrée à différentes concentration (15, 30 et 60 mg/kg, i.p.). L'effet anti-inflammatoire de la molécule, évalué par mesure de la taille de l'œdème à l'aide d'un pied à coulisse, est comparé à celui d'une molécule corticoïde de référence, la prédnisolone (15 mg/kg, i.p.), ainsi qu'au véhicule contrôle (20% DMSO, 10% Tween 80, dans du NaCl, 10 ml/kg). Les résultats montrent un effet anti-inflammatoire de la molécule X similaire à la prédnisolone (**Figure 44**).



**Figure 44. Effet anti-inflammatoire d'une molécule nouvellement synthétisée.** Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Les valeurs sont analysées en utilisant une ANOVA à 2 voies (Temps x Traitement) suivie par le test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque  $p < 0,05$ .

---

## Discussion générale et Perspectives

---

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis une avancée des connaissances quant à l'implication des canaux de type T et plus particulièrement des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique de différentes origines, viscérale telle que le SII et les MICI en phase de rémission et somatique comme la PR. Ces connaissances permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la prise en charge de la douleur associée à ces pathologies.

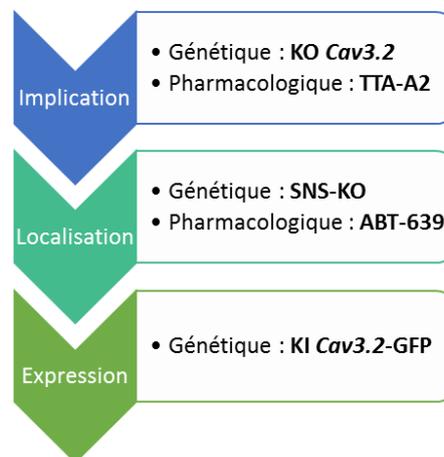
## 1. Une démarche scientifique originale

Les résultats présentés dans les différentes études de ce manuscrit, ont été obtenus grâce à la mise en œuvre d'une **stratégie combinant l'utilisation d'outils génétiques et pharmacologiques (Figure 45)**.

L'invalidation constitutive du gène *Cav3.2*, chez les **souris KO-Cav3.2** ainsi que le blocage pharmacologique des canaux de type T, *via* l'utilisation du **TTA-A2** qui possède une forte affinité envers ces derniers, ont permis de démontrer l'implication des canaux Cav3.2 dans le développement de la douleur présente dans nos différents modèles.

De plus, l'invalidation conditionnelle du gène *Cav3.2*, spécifiquement dans les fibres C des DRG chez les **souris SNS-KO**, a conduit à mettre en évidence la localisation fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur. L'administration par voie systémique ou i.t. de **l'ABT-639**, bloqueur à action périphérique des canaux de type T, a amené de nouvelles données quant à la localisation de ces cibles, en discriminant les composantes spinales et périphériques mises en jeu.

D'autre part, l'utilisation des souris *Cav3.2* KI-GFP a permis de pallier le manque d'anticorps spécifiques des canaux Cav3.2, et de révéler sans ambiguïté l'expression du canal au niveau des DRG, dans les différents modèles de douleur que nous avons étudiés.



**Figure 45 : Schéma de la démarche scientifique** appliquée pour les travaux de cette thèse afin d'analyser l'implication, la localisation fonctionnelle et l'expression des canaux Cav3.2 dans les différents modèles de douleur étudiés.

L'utilisation des souris génétiquement modifiées SNS-KO et KI *Cav3.2*-GFP a été rendue possible grâce à une collaboration avec l'équipe du Docteur Emmanuel Bourinet, de l'IGF de Montpellier (CNRS UMR50203, INSERM U1191). Les précédents travaux de cette équipe, pour lesquels ces souris avaient été générées, avaient permis d'identifier les canaux Cav3.2 comme marqueur sélectif de deux catégories majeures de mécanorécepteurs à bas seuil d'activation, A $\delta$ - et C-LTMRs, innervant la

plupart des follicules pileux les plus abondants de la peau. Avec le modèle de souris SNS-KO, une participation des canaux Cav3.2 a été établie dans la régulation de la perception du toucher léger, du froid nocif mécanique et des sensations chimiques ainsi que leur rôle quant à l'établissement des symptômes allodymiques des douleurs neuropathiques (Francois *et al.* 2015).

Chacune de ces approches génétique et pharmacologique présente des limites. En effet, l'invalidation d'un gène spécifique, dans le cas présent celui codant le canal Cav3.2, peut induire des phénomènes de compensation chez les souris résultant en des modifications phénotypiques secondaires. Un KO chez la souris supprime non seulement l'expression d'un gène mais peut également modifier des processus physiologiques en réponse à l'absence du gène. Il peut aussi arriver qu'un autre gène puisse «suppléer» la fonction du gène ciblé et compenser ainsi son absence, masquant alors les conséquences attribuables directement à la mutation (Crawley 1996).

D'autre part, les agents pharmacologiques peuvent avoir une spécificité plus ou moins grande envers la cible visée et induire ainsi des effets pharmacologiques *via* l'occupation d'autres sites. Peu de médicaments possèdent une spécificité « totale » envers une cible unique. Dans ces travaux de thèse, nous avons utilisé différents agents bloqueurs des canaux Cav3.2, le TTA-A2, l'ABT-639 et l'ETX. Le TTA-A2 est un puissant bloqueur des canaux de type T avec une haute sélectivité envers les trois isoformes (Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3) avec des  $IC_{50}$  (concentration d'un composé inhibant 50% de l'effet observé), de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de nM. Les caractéristiques de cette molécule sont une administration par voie orale, un passage de la BHE et l'induction d'un effet antalgique chez l'animal qui semble plus spécifique pour l'isoforme Cav3.2 (Kraus *et al.* 2010; Francois *et al.* 2013). L'ABT-639 a initialement été développé par les laboratoires Abbott afin de cibler sélectivement l'isoforme Cav3.2. Cette molécule possède une sélectivité envers les trois isoformes des canaux de type T ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ) mais aussi les canaux Cav de type L ( $IC_{50} = 8 \mu M$ ) et d'autres Cav (Cav1.2, Cav2.2) ( $IC_{50} > 30 \mu M$ ) (Jarvis *et al.* 2014). L'éthosuximide est un bloqueur non sélectif des canaux calciques voltage-dépendants de type T (Goren and Onat 2007) Ce point sera détaillé dans la partie 4 de cette discussion générale.

Dans nos travaux, l'utilisation complémentaire des deux approches génétique et pharmacologique pour inhiber les canaux Cav3.2 a permis de réduire les biais de chaque approche et ainsi de conférer à nos travaux une validité puissante.

## 2. Avancée des connaissances sur l'implication des Cav3.2 dans la douleur chronique

L'application de cette démarche associant l'utilisation d'outils génétiques et pharmacologiques a amené de nouvelles données sur le rôle fonctionnel des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique, *via* différents modèles de différentes origines.

## 2.1. Implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur viscérale

### 2.1.1. Mise en place d'un nouveau modèle d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit

Afin d'étudier le rôle des canaux Cav3.2 dans la douleur abdominale présente chez les patients atteints de SII, nous avons mis au point un modèle murin d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit, reflétant la physiopathologie de cette maladie (Mertz *et al.* 1995). Ce modèle peut également être utilisé afin de mimer la symptomatologie des patients atteints de MICI en phase de rémission (Farrokhyar *et al.* 2006; Long and Drossman 2010).

Dans la littérature, différents modèles murins mimant les symptômes rencontrés dans le SII ont été décrits, en particulier des modèles post-inflammatoires et post-infectieux induits par des agents chimiques (*TNBS, acide acétique, zymosan*), par des parasites (*Trichinella spiralis, Nippostrongylus brasiliensis...*) ou par des bactéries (*Campylobacter jejuni, Escherichia Coli, salmonella et shigella*) (pour revue Qin *et al.* 2011). Toutefois, pour ces modèles animaux de SII-PI, les principales caractéristiques du SII, telles que l'hypersensibilité viscérale, les altérations de la motilité et de la sécrétion, sont faibles, voire parfois absentes (Yang, Zhou, and Lan 2015). Ainsi, l'utilisation de ce type de modèle animal pour représenter le SII-PI est controversée, c'est pourquoi nous n'avons pas retenue cette approche pour notre étude.

Des études cliniques ont révélé que certains abus (physiques et/ou psychologiques) au cours de la petite enfance, sont souvent associés au développement du SII à l'âge adulte. Ainsi, des modèles murins induisant un stress au cours du développement précoce de l'animal ont été développés (pour revue Barreau *et al.* 2007). Un des modèles le plus couramment utilisé consiste en une séparation des nouveau-nés de leur mère durant 3 heures par jour, du 2<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour post-natal. Une HSC est retrouvée chez ces animaux à l'âge adulte (Coutinho *et al.* 2002). Ce modèle de séparation néonatale présente l'inconvénient d'être relativement long à mettre en œuvre puisqu'il comprend des manipulations à l'âge néonatal et qu'il faut attendre l'âge adulte des animaux pour observer une HSC. De plus, l'étiologie de ce type de SII ne correspond (heureusement) qu'à une très faible proportion de patients souffrant de cette pathologie. D'autre part, les répercussions de ce modèle au niveau du tractus gastro-intestinal ne sont pas spécifiques, d'autres modulations physiologiques induites par des perturbations neuroendocriniennes sont retrouvées chez ces animaux. Nous pouvons citer : une faible capacité d'apprentissage et de mémoire associées à une activité acétylcholinestérase réduite au niveau du SNC (Dorner *et al.* 1981) ; une diminution de la réponse locomotrice exploratoire immédiate en réponse au « novelty test » (Matthews, Wilkinson, and Robbins 1996) ; un comportement anxieux ; de l'anhédonie ; une attirance accrue pour l'alcool ainsi qu'une altération du comportement sexuel masculin (Ladd *et al.* 2000; Wigger and Neumann 1999; Huot *et al.* 2001). Pour ces différentes raisons nous n'avons pas choisi ce modèle.

Des données cliniques rapportent un excès de butyrate dans le côlon des patients atteints de SII, aussi d'autres auteurs ont utilisé un modèle d'origine nutritionnelle consistant à l'instillation intracolique de butyrate, à raison de 6 instillations réparties sur 4 jours (Bourdu *et al.* 2005). Le butyrate est un acide gras à chaîne courte, produit par les bactéries anaérobies, qui constitue le substrat énergétique préférentiel des cellules de l'épithélium colique. Le butyrate a des effets trophiques et immunomodulateurs induisant de nombreux effets physiologiques au niveau colique (McCafferty and Zeitlin 1989). Dans ce modèle, les auteurs ont retrouvé une présence d'HSC qui pourrait être induite par une acidification de la lumière intestinale conduisant à la sensibilisation des nocicepteurs (Bourdu *et al.* 2005). Nous n'avons cependant pas choisi d'utiliser le butyrate qui nous paraissait trop invasif chez la souris.

Nous nous sommes orientés vers un autre modèle utilisant le DSS. En effet, une publication récente (Chassaing *et al.* 2012) avait étudié l'effet de différentes concentrations de DSS, initialement utilisé comme un modèle de colite ulcéraire (Okayasu *et al.* 1990), sur l'état inflammatoire des animaux. Les travaux de Chassaing *et al.* révèlent qu'une utilisation du DSS à une concentration de 0,5% sur une durée de 7 jours induit la présence d'inflammation à bas bruit, sans entraîner d'inflammation locale ou systémique sévère ni de lésion tissulaire. Ce modèle, consistant en l'administration *ad libitum* de DSS dans l'eau de boisson des animaux, présente l'avantage d'une mise en place simple pour l'expérimentateur et non contraignante pour l'animal. Nous avons ainsi caractérisé un modèle consistant en l'utilisation de DSS à la concentration de 0,5% sur une durée de 12 jours. Cette durée plus longue a été choisie afin d'obtenir un modèle plus chronique. Dans ces conditions, un état inflammatoire restreint à un stade d'inflammation à bas bruit ainsi que la présence d'une HSC chez les souris ont été observés. Ces deux caractéristiques sont décrites chez la plupart des patients souffrant de SII et de MICI en phase de rémission). **Ainsi, notre modèle murin peut être considéré comme proche de la symptomatologie clinique et par conséquent peut être validé comme modèle « relevant » de recherche préclinique pour l'étude de ces deux pathologies.**

### **2.1.2. Implication et localisation fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans le modèle DSS à 0,5%**

L'utilisation de ce modèle, a permis de caractériser l'implication des canaux Cav3.2 dans l'HSC. **Le résultat majeur de cette étude consiste en la révélation d'une implication fonctionnelle des Cav3.2 dans les fibres C des DRG, au niveau présynaptique de la moelle épinière.** Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la prise en charge de la douleur chez les patients atteints de SII ou de MICI en phase de rémission. Nous avons en effet démontré qu'une administration i.t. de bloqueurs de canaux Cav3.2 pouvait induire un puissant effet antalgique chez les souris soumises au DSS à 0,5%. Ces résultats originaux sont cohérents avec la description de l'implication des canaux de type T dans la transmission synaptique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Jacus *et al.*

2012; Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2013). Même si le rôle des canaux de type T au niveau spinal est peu connu, des relargages de neurotransmetteurs sensibles au nickel ont été observés entre les neurones afférents primaires et les neurones de projection de la lamina externe ou les interneurones (Bao, Li, and Perl 1998). L'expression des canaux de type T a été mise en évidence au niveau postsynaptique des projections spinales et/ou des interneurones (Ikeda *et al.* 2003; Ku and Schneider 2011; Walsh *et al.* 2009). De plus, l'observation des synapses par microscopie électronique a révélé la présence des canaux Cav3.2 à la fois au niveau pré- et postsynaptique (Francois *et al.* 2015). Aussi, l'implication des canaux Cav3.2 dans le relargage des neurotransmetteurs au niveau présynaptique est un concept émergent (Huang *et al.* 2011; Weiss and Zamponi 2013; Weiss *et al.* 2012).

### **2.1.3. La glie, une cible des canaux Cav3.2 ?**

Une activation gliale, responsable d'une inflammation neurogène, a été observée en contexte de douleur chronique (Gosselin *et al.* 2010). Pharmacologiquement, la minocycline, un antibiotique tétracyclique utilisé en tant qu'inhibiteur de la microglie, ou la propentofylline, qui modifie l'activation des astrocytes (mais aussi celle de la microglie), réduit la douleur présente dans différents modèles animaux de douleur chronique (Raghavendra, Tanga, and DeLeo 2003; Tsuda *et al.* 2003). Chez l'Homme, ce concept reste encore à être démontré. Dans une étude *post-mortem*, une activation gliale (astrocytes et microglie) a été rapportée dans la moelle épinière de patients présentant une douleur chronique (Del Valle, Schwartzman, and Alexander 2009). De plus, une augmentation d'un marqueur glial a été observée dans le liquide céphalorachidien de patients atteints d'une hernie discale lombaire et dans le plasma d'un patient présentant des migraines chroniques (Brisby *et al.* 1999).

Ces différentes données nous ont conduits à nous intéresser à cet aspect dans notre modèle en analysant l'activation spinale gliale. Nous avons observé une augmentation des taux d'Iba-1 et de GFAP au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (niveau L6-S1), reflétant respectivement une activation microgliale et astrocytaire induite par le DSS. De manière intéressante, cette activation semble réduite chez les souris KO *Cav3.2*. et est significativement diminuée par une utilisation répétée d'ETX. La réduction de l'activation gliale que nous avons observée suite à un usage prolongé d'ETX pourrait expliquer que ce dernier conserve une action antalgique à distance de son administration.

Cependant, ces observations ne permettent pas de savoir si la diminution de l'activité gliale est médiée de manière directe par des canaux potentiellement localisés sur ces cellules ou de manière indirecte par l'inhibition de la douleur chronique. Dans la perspective de faire la part entre ces deux possibilités, j'ai mis au point durant ce travail de thèse des cultures primaires enrichies en astrocytes ou en microglie afin d'étudier *in vitro* la présence du canal Cav3.2 et sa fonctionnalité au sein de ces cellules gliales. Ces outils opérationnels pourront permettre la réalisation de prochains travaux dans cette

thématique. Il serait en effet intéressant de rechercher la présence du canal Cav3.2 sur ces cellules, en réalisant des immunocytochimies sur des cultures primaires obtenues à partir de souris KI *Cav3.2*-GFP.

## 2.2. Implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire somatique

Une des originalités de l'ARTICLE 3 est d'avoir utilisé deux modèles de douleur inflammatoire, un premier de douleur subaiguë par injection i.pl. de carragénine, et un second d'arthrite par injection intra-articulaire de CFA. L'association de ces deux modèles a permis de démontrer l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire et de localiser cette implication au niveau des fibres C des DRG, avec la présence de composantes à la fois périphérique et spinale.

**Un des résultats les plus originaux est d'avoir démontré qu'une inhibition restreinte à la périphérie, via l'administration d'ABT-639, pouvait suffire à engendrer l'effet antalgique escompté.** Ces résultats permettent d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement le blocage des canaux de type T au niveau périphérique avec des agents pharmacologiques ne passant pas la BHE. Ce type de traitement présente l'avantage de ne pas induire les potentiels effets indésirables dus au blocage des canaux de type T centraux.

Cette étude a également permis de mettre en évidence l'implication des canaux Cav3.2 dans l'inflammation et de démontrer une action anti-inflammatoire obtenue par le blocage de ces canaux. Dans le modèle carragénine, un effet anti-inflammatoire avec une réduction de la taille de l'œdème chez l'animal suite à l'administration de bloqueurs pharmacologiques des canaux de type T a été observé. Un effet similaire a été constaté suite à une administration répétée de TTA-A2 ou d'ETX dans le modèle CFA. Néanmoins, nous n'avons pas observé de variation de la taille de l'œdème suite à une administration aiguë de ces composés dans le modèle CFA. Ceci peut s'expliquer par la sévérité et la persistance de l'inflammation induite par le CFA. Dans ce modèle, lorsque l'inflammation est installée, seuls des agents anti-inflammatoires puissants administrés en aigu comme les corticoïdes peuvent réduire l'œdème. Les agents moins puissants tels que les AINS ne sont pas efficaces lors d'une administration aiguë mais uniquement lors d'une exposition chronique ; c'est le cas par exemple du diclofénac (Macedo *et al.* 2016).

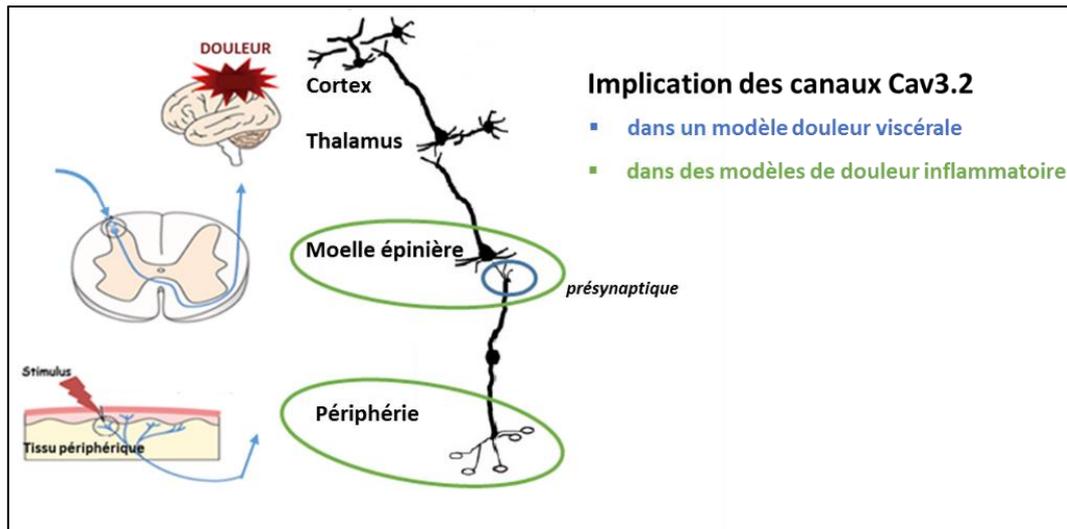
Afin de mieux comprendre cet effet anti-inflammatoire dû au blocage des canaux de type T, des souris chimériques qui avaient été générées au sein du laboratoire, ont été utilisées pour évaluer l'impact de la délétion spécifique des canaux Cav3.2 au niveau du système immunitaire sur l'inflammation. **Les résultats obtenus ont démontré une implication des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire localisée spécifiquement au niveau des cellules immunitaires.** De plus, l'absence de modification significative de la taille de l'œdème chez les souris SNS-KO permet d'exclure la possibilité d'une

inflammation neurogène et a donc confirmé une implication restreinte aux cellules immunes. Le rôle fonctionnel des canaux Cav3.2 dans l'activation de ces cellules demande toutefois à être mieux compris. Après avoir vérifié l'hypothèse de leur implication dans l'activation des macrophages, hypothèse que nous n'avons pas confirmée, une étude est en cours afin de rechercher une potentielle implication dans l'activation lymphocytaire dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe M2ISH « Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte », de l'UMR1071 Inserm/Université Clermont Auvergne. Pour cela, des cultures cellulaires de lymphocytes T CD4+ purifiés, obtenus à partir de prélèvements de rates de souris WT et KO Cav3.2, sont utilisées. Après activation de ces cellules par l'utilisation des clusters de différenciation CD3/CD28, la prolifération lymphocytaire est analysée par technique de cytométrie de flux afin de rechercher d'éventuels différences dans les profils de prolifération entre les souris WT et KO Cav3.2. Cette étude devrait nous permettre de vérifier l'hypothèse d'une implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire, localisée au niveau lymphocytaire.

### **2.3. Des mécanismes physiologiques possibles de l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique.**

Nos résultats, dans les deux modèles de douleur d'origine différente, somatique et viscérale, révèlent une implication des canaux Cav3.2 localisés au niveau des fibres C des DRG. Ces résultats sont en accord avec l'expression élevée des canaux Cav3.2 rapportée dans les neurones des DRG de petit et de moyen calibres (Talley *et al.* 1999; Shin *et al.* 2003; Francois *et al.* 2015 ; Allen Brain Atlas : [www.brain-map.org](http://www.brain-map.org)).

Dans le modèle de douleur viscérale, nous avons montré, *via* l'utilisation de l'ABT-639, une localisation spinale de l'implication des canaux de type T, avec une efficacité induite par une administration intrathécale qui n'est pas retrouvée *via* une administration systémique (donc périphérique) de l'ABT-639. L'administration de l'ABT-639 chez les souris SNS-KO a précisé l'implication des canaux Cav3.2 au niveau présynaptique des fibres C des DRG. Dans les modèles de douleurs inflammatoires somatiques, l'utilisation de l'ABT-639 a généré un effet antalgique par une utilisation à la fois périphérique et spinale, avec cependant une action périphérique qui suffit à induire l'effet antalgique escompté. Ces résultats traduisent donc une implication différente des canaux Cav3.2 selon l'origine de la douleur (Figure 46).



**Figure 46 : Schéma de la transmission du message nociceptif d'origine viscérale ou somatique.**  
D'après Seikiguchi et Kawabata, 2013 ; Shin *et al.*, 2008.

Afin de mieux comprendre l'implication fonctionnelle des canaux Cav3.2 dans l'HSC, nous nous sommes intéressés à leur expression protéique, par une approche génétique s'appuyant sur l'utilisation des souris KI Cav3.2-GFP. Aucune modification de l'expression des canaux Cav3.2 n'a été observée dans les modèles que nous avons étudiés. Dans l'ARTICLE 1 de ce manuscrit, nous avons observé une augmentation du taux de transcrits mais l'abondance de la protéine n'a pas été analysée (Scanzi *et al.* 2016), du fait du manque d'anticorps spécifiques de Cav3.2 chez la souris. Néanmoins, une augmentation d'un ARNm n'est pas toujours corrélée de manière positive avec une augmentation de l'abondance de la protéine correspondante.

L'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique pourrait s'expliquer par une augmentation de son activité. En effet, plusieurs études ont montré par des techniques d'électrophysiologie, une augmentation de l'activité des canaux calciques de type T dans les fibres afférentes sensorielles dans différents modèles de douleur chronique neuropathique d'origine traumatique (Jagodic *et al.* 2008; Wen *et al.* 2010; Yue *et al.* 2013), diabétique (Cao *et al.* 2011; Jagodic *et al.* 2007) ou chimio-induite (Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2013; Okubo *et al.* 2011). Des travaux en collaboration avec l'IGF de Montpellier sont actuellement en cours afin de vérifier, par techniques d'électrophysiologie, l'existence d'une suractivité des canaux Cav3.2 dans nos modèles. Toutefois, des auteurs ont montré une implication de canaux ioniques dans un contexte pathologique, sans pour autant avoir observé de modification de leur expression, ni de leur activité (Tsantoulas *et al.* 2017).

L'implication des canaux Cav3.2 en contexte pathologique peut découler de divers mécanismes tels qu'une augmentation de la transcription impliquant le facteur de transcription Egr1 qui est activé par l'activité électrique dans un contexte douloureux (van Loo *et al.* 2012; Mamet *et al.* 2014). Elle pourrait également être une conséquence indirecte de modifications post-traductionnelles ou du recyclage des

canaux à la membrane. En effet, dans un contexte diabétique, une modulation de l'activité des canaux Cav3.2 par glycosylation a été mise en évidence (Orestes *et al.* 2013; Weiss *et al.* 2013). Des études *in vitro* et *in vivo* concernant la plasticité du canal Cav3.2 dans un modèle murin de douleur neuropathique diabétique ont montré qu'une glycosylation post-traductionnelle des résidus extracellulaires d'asparagine des canaux Cav3.2 accélère la cinétique des courants, augmente la densité de courant ainsi que l'expression du canal à la membrane. De plus, une déglycosylation, par l'utilisation de neuraminidase bloque les courants de type T des nocicepteurs supprimant ainsi l'hyperalgésie (Orestes *et al.* 2013).

D'autre part, il a été montré qu'une modulation rédox influe spécifiquement sur le fonctionnement des canaux de type T en contexte de douleur inflammatoire ou neuropathique. L'administration d'agent réducteur comme la L-cystéine induit une hyperalgésie thermique, bloquée par l'action d'agent oxydant comme le DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) mais également par le Mibéfradil, un antagoniste des canaux de type T (Maeda *et al.* 2009; Todorovic, Jevtovic-Todorovic, Meyenburg, *et al.* 2001). Une augmentation du trafic du canal à la membrane des neurones des DRG résultant d'un mécanisme de déubiquitination impliquant la déubiquitinase USP5 a récemment été mise en évidence (Garcia-Caballero *et al.* 2014; Gadotti *et al.* 2015). Le contrôle de l'activité et de la stabilité des canaux de type T semble être gouverné par un équilibre entre l'ubiquitination et la déubiquitination au niveau des domaines III et IV des canaux Cav3.2, identifiés comme des sites clés d'ubiquitination (Garcia-Caballero *et al.* 2014). Il a été montré qu'une déubiquitination induisait une augmentation de courant associée à un effet pronociceptif. Au contraire, le blocage des mécanismes d'ubiquitination a permis d'obtenir un effet antalgique en contexte de douleur inflammatoire ou neuropathique. Ces mécanismes d'ubiquitination/déubiquitination sont sous le contrôle de la voie phosphatidylinositol-3-kinase (Pi3K)/Akt elle-même « up-régulée » en contexte douloureux (Duan *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012). De plus, il a été décrit que l'ubiquitine ligase WWP1, située sur la membrane plasmique interagissait avec les canaux Cav3.2 au niveau des DRG. En effet, un KO de WWP1 induit une diminution de l'ubiquitination et une diminution de l'expression de Cav3.2 à la surface des DRG (Garcia-Caballero *et al.* 2014).

Les différences observées au niveau de la localisation fonctionnelle de l'implication des canaux Cav3.2 dans nos différents modèles peut ainsi résulter de modulations physiologiques différentes. Ceci peut être corrélé au niveau d'inflammation présent dans les modèles. En effet, dans le contexte viscéral, notre modèle n'induit pas d'inflammation importante ni au niveau local ni au niveau systémique, mais uniquement une inflammation à bas-bruit, pouvant expliquer l'absence d'une implication des canaux Cav3.2 au niveau périphérique. Au contraire, dans les modèles de douleur somatique où nous retrouvons la présence d'une inflammation sévère, une implication des canaux Cav3.2 se situe aussi bien au niveau périphérique que spinal

Afin d'expliquer précisément l'implication des canaux calciques Cav3.2 dans nos contextes douloureux, il serait intéressant d'étudier dans nos modèles les différentes voies physiologiques décrites ci-dessus.

### 3. L'utilisation d'antagonistes périphériques des canaux Cav3.2 dans le traitement de la douleur, une stratégie encore envisageable ?

Nos résultats n'ont pas montré d'efficacité d'une administration systémique d'ABT-639 dans notre modèle d'HSC associée à une inflammation à bas bruit, l'implication du Cav3.2 dans ce modèle se situant à un niveau médullaire. Cependant, dans deux modèles de douleur d'origine différente faisant suite à une inflammation somatique, nous avons mis en évidence une action antalgique intéressante de l'ABT-639. Les travaux de Jarvis *et al.* (2014) ont également montré une efficacité de l'ABT-639 dans différents modèles de douleurs neuropathiques.

Ces résultats précliniques montrent que dans certains types de douleur, un blocage des canaux Cav3.2 restreint à la périphérie peut constituer une stratégie thérapeutique efficace. Toutefois, les résultats d'un essai clinique ayant évalué l'effet de l'ABT-639 chez des patients atteints de neuropathie diabétique se sont révélés décevants ; le manque d'efficacité de la molécule peut néanmoins s'expliquer par des doses trop faibles utilisées chez les patients (Serra *et al.* 2015; Ziegler *et al.* 2015). Ces essais cliniques ont toutefois montré une bonne tolérance, sans effet toxique de la molécule, en accord avec une étude antérieure (An *et al.* 2015). D'autres investigations s'avèrent nécessaires afin de conclure sur l'efficacité clinique potentielle de ce produit.

D'autre part, nos résultats montrent un puissant effet antalgique du TTA-A2, un agent pharmacologique possédant une grande affinité envers les canaux de type T, dans nos différents modèles de douleur. Récemment une utilisation chez le volontaire sain par des injections locales dans la peau a montré une diminution de l'allodynie mécanique et au froid (Nagi *et al.* 2015; Samour, Nagi, and Mahns 2015). Ces résultats apportent des arguments en faveur de l'utilisation d'antagonistes périphériques des canaux de type T en clinique.

De plus, l'intérêt d'une utilisation d'agents pharmacologiques ne passant pas la BHE, représente l'avantage de ne pas induire d'effets indésirables imputables au blocage des canaux centraux. Des études complémentaires paraissent ainsi nécessaires, afin d'apporter une meilleure expertise de l'utilisation de ce type d'approche thérapeutique, dans le traitement de la douleur chronique.

#### 4. Preuve de concept préclinique de l'utilisation de l'éthosuximide dans la douleur chronique de différentes origines

L'ETX (Zarontin®) est un bloqueur non sélectif des canaux de Type T. Cette molécule est disponible sur le marché depuis 1988 pour le traitement de l'épilepsie de l'adulte et de l'enfant. Nos résultats ont révélé un effet antalgique de l'ETX à la fois dans la douleur viscérale (modèle murin d'HSC associé à une inflammation à bas bruit) et dans la douleur somatique (modèles murins de douleur subaiguë et d'arthrite).

En effet, une très forte réduction de l'HSC induite par le DSS (à J12 post-traitement) est observée suite à une administration aiguë d'ETX réalisée 30 min avant le test de distensions colorectales. De plus, un traitement répété d'ETX de J6 à J12 après le début de la mise sous DSS, induit également une forte diminution de l'HSC chez les souris comparativement aux souris contrôles ayant reçu le véhicule. Un puissant effet antalgique a également été observé à la fois suite à une administration aiguë d'ETX dans le modèle carragénine, avec un effet observable dès 15 min après l'injection qui perdure au moins 1h ; et suite à un traitement répété d'ETX (de J7 à J14) dans le modèle CFA. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux menés principalement dans des modèles animaux de douleurs neuropathiques de diverses origines, qui ont mis en évidence un effet antalgique de l'ETX (Matthews and Dickenson 2001b; Dogrul *et al.* 2003; Flatters and Bennett 2004; Hamidi *et al.* 2012). Marger *et al.* (2011) dans un modèle de SII induit par instillations rectales de butyrate, et Kawabata *et al.* (2007) dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le NaHS, ont également montré un effet antalgique de l'ETX dans ces types de douleur.

Afin d'évaluer la participation des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique de l'ETX, nous avons dans le modèle de douleur viscérale, grâce aux outils génétiques permettant une invalidation constitutive ou conditionnelle du gène *Cav3.2*, démontré que l'action antalgique de l'ETX observée dans notre étude était induite par le blocage spécifique des canaux Cav3.2, et plus particulièrement ceux situés sur les fibres C des DRG. En effet, l'ETX utilisé chez les souris KO *Cav3.2* ou SNS-KO, n'a induit aucun effet sur la sensibilité colique, contrairement à la morphine, utilisée comme contrôle et ayant permis un abaissement significatif des seuils de réponses aux distensions colorectales chez ces animaux. Ces résultats originaux apportent des précisions quant au mécanisme d'action antalgique de l'ETX dans l'HSC : bien que l'ETX n'ait pas une sélectivité restreinte aux canaux Cav3.2, nous avons montré que son action antalgique s'effectue spécifiquement *via* l'inhibition des canaux Cav3.2. En effet, l'ETX exerce un blocage des canaux de type T mais agit également sur d'autres cibles telles que les pompes sodium-potassium ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase) (Goren and Onat 2007), les canaux potassiques activés par le calcium (Crunelli and Leresche 2002), les canaux GIRK « G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> » aussi appelés Kir3 (Kobayashi *et al.* 2009).

Comme tout médicament, l'ETX, peut engendrer d'éventuels effets indésirables, listés selon la classification MedDRA (« multilingual European Registration Agency »). Les plus fréquemment décrits ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ) sont : diminution de l'appétit, céphalées, ataxie, somnolence, vertiges, douleurs épigastriques, douleurs abdominales, nausées, vomissements, rash érythémateux, urticaire. Ces effets indésirables pouvant s'observer en début du traitement, cessent généralement rapidement et ne réapparaissent pas ultérieurement, d'après la commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé (avis du 5 juillet 2017).

Ainsi, l'ETX, pour lequel nous disposons d'un bon recul quant à sa tolérance, présente l'avantage de pouvoir accéder à des études cliniques plus rapidement qu'avec des molécules nouvellement synthétisées. L'ensemble des résultats obtenus au sein du laboratoire a d'ores et déjà conduit notre équipe à débiter une étude clinique visant à évaluer l'effet de l'ETX chez le patient atteint de SII (Kerckhove *et al.* 2017). Une seconde étude a été conduite chez les patients souffrant de douleur neuropathique d'origine non diabétique (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02100046>). Les analyses Per Protocoles (PP), semblent montrer une efficacité de l'ETX avec un effet d'autant plus intéressant que les doses sont plus faibles (résultats non publiés). L'intérêt d'utiliser de faibles doses est de réduire les éventuels effets indésirables imputables au médicament. Une nouvelle étude visant à évaluer l'effet de plus faibles doses sur une durée plus longue que pour l'étude pilote va ainsi être prochainement initiée.

De plus, dans les modèles de douleurs inflammatoires utilisés, nous avons démontré une action anti-inflammatoire de l'ETX, avec une diminution significative de la taille de l'œdème chez l'animal. Ceci renforce l'intérêt d'évaluer l'ETX en clinique, dans le soulagement de l'inflammation et de la douleur inflammatoire associée. Cette évaluation clinique pourra permettre de proposer *in fine* une nouvelle indication de l'ETX chez les patients souffrant de rhumatismes inflammatoires pour lesquels l'arsenal thérapeutique actuellement disponible demeure inefficace. Enfin, elle pourra fournir une preuve de concept clinique du bien-fondé de l'utilisation d'inhibiteurs des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique.

---

## Conclusion

---

Les résultats présentés dans les différentes études de ce manuscrit, obtenus au travers de la mise en place de stratégies combinant l'utilisation **d'outils génétiques et pharmacologiques, d'analyse comportementale et biologique** et impliquant des **collaborations** avec plusieurs laboratoires de recherche, ont permis une avancée des connaissances quant à l'implication des canaux de type T et plus particulièrement des canaux Cav3.2 dans la douleur chronique de différentes origines.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont ainsi abouti à :

- la mise en place d'un **nouveau modèle murin d'hypersensibilité colique associée à une inflammation à bas bruit**, utilisable pour les études précliniques portant sur le SII et les MICI en phases de rémission ;
- la **caractérisation de l'implication des canaux Cav3.2 dans l'hypersensibilité colique**, avec un **rôle fonctionnel des canaux présynaptiques Cav3.2 localisés au niveau de la moelle issus des fibres C des DRG**;
- la **caractérisation de l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur inflammatoire**, avec un rôle fonctionnel des canaux **Cav3.2 localisés sur les fibres C des DRG, aussi bien au niveau périphérique que central**;
- la **caractérisation de l'implication des canaux Cav3.2 dans le processus inflammatoire** avec la mise en évidence d'un effet anti-inflammatoire et la localisation de ce rôle fonctionnel au niveau des cellules immunes ;
- **une preuve de concept de l'utilisation de l'éthosuximide dans la douleur chronique de différentes origines.**

Ces nouvelles connaissances permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques, par des stratégies visant à bloquer les canaux calciques de Type T et préférentiellement les Cav3.2, pour la prise en charge de la douleur chronique.

## Références bibliographiques

- Accarino, A. M., F. Azpiroz, and J. R. Malagelada. 1995. 'Selective dysfunction of mechanosensitive intestinal afferents in irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 108: 636-43.
- Alam, J., I. Jantan, and S. N. A. Bukhari. 2017. 'Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy', *Biomed Pharmacother*, 92: 615-33.
- Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawski-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe, and G. Hawker. 2010. '2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative', *Ann Rheum Dis*, 69: 1580-8.
- Alvarado-Vazquez, P. A., C. E. Morado-Urbina, G. Castaneda-Corral, R. I. Acosta-Gonzalez, H. Kitaura, K. Kimura, T. Takano-Yamamoto, and J. M. Jimenez-Andrade. 2015. 'Intra-articular administration of an antibody against CSF-1 receptor reduces pain-related behaviors and inflammation in CFA-induced knee arthritis', *Neurosci Lett*, 584: 39-44.
- American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel, Syndrome, L. J. Brandt, W. D. Chey, A. E. Foxx-Orenstein, L. R. Schiller, P. S. Schoenfeld, B. M. Spiegel, N. J. Talley, and E. M. Quigley. 2009. 'An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome', *Am J Gastroenterol*, 104 Suppl 1: S1-35.
- An, G., W. Liu, W. R. Duan, W. Nothaft, W. Awni, and S. Dutta. 2015. 'Population pharmacokinetics and exposure-uric acid analyses after single and multiple doses of ABT-639, a calcium channel blocker, in healthy volunteers', *AAPS J*, 17: 416-26.
- Anderson, D., W. H. Mehaffey, M. Iftinca, R. Rehak, J. D. Engbers, S. Hameed, G. W. Zamponi, and R. W. Turner. 2010. 'Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes', *Nat Neurosci*, 13: 333-7.
- Anderson, J. J., G. Wells, A. C. Verhoeven, and D. T. Felson. 2000. 'Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration', *Arthritis Rheum*, 43: 22-9.
- Annese, V., G. Bassotti, G. Napolitano, P. Usai, A. Andriulli, and G. Vantrappen. 1997. 'Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease', *Scand J Gastroenterol*, 32: 1107-17.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, and *et al.* 1988. 'The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 31: 315-24.
- Attal, N., D. Bouhassira, R. Baron, J. Dostrovsky, R. H. Dworkin, N. Finnerup, G. Gourlay, M. Haanpaa, S. Raja, A. S. Rice, D. Simpson, and R. D. Treede. 2011. 'Assessing symptom profiles in neuropathic pain clinical trials: can it improve outcome?', *Eur J Pain*, 15: 441-3.
- Auger, I., and J. Roudier. 1997. 'A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaI to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4', *J Clin Invest*, 99: 1818-22.
- Azpiroz, F., M. Bouin, M. Camilleri, E. A. Mayer, P. Poitras, J. Serra, and R. C. Spiller. 2007. 'Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders', *Neurogastroenterol Motil*, 19: 62-88.
- Azpiroz, F., and J. R. Malagelada. 2005. 'Abdominal bloating', *Gastroenterology*, 129: 1060-78.
- Baig, S. M., A. Koschak, A. Lieb, M. Gebhart, C. Dafinger, G. Nurnberg, A. Ali, I. Ahmad, M. J. Sinnegger-Brauns, N. Brandt, J. Engel, M. E. Mangoni, M. Farooq, H. U. Khan, P. Nurnberg, J. Striessnig, and H. J. Bolz. 2011. 'Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness', *Nat Neurosci*, 14: 77-84.

- Bao, J., J. J. Li, and E. R. Perl. 1998. 'Differences in Ca<sup>2+</sup> channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II', *J Neurosci*, 18: 8740-50.
- 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.
- Barnes, P. J. 2014. 'Glucocorticoids', *Chem Immunol Allergy*, 100: 311-6.
- Barreau, F., L. Ferrier, J. Fioramonti, and L. Bueno. 2007. 'New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models', *Pediatr Res*, 62: 240-5.
- Bas, D. B., J. Su, G. Wigerblad, and C. I. Svensson. 2016. 'Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms', *Pain Manag*, 6: 265-84.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius. 2009. 'Cellular and molecular mechanisms of pain', *Cell*, 139: 267-84.
- 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.
- Beedle, A. M., J. Hamid, and G. W. Zamponi. 2002. 'Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations', *J Membr Biol*, 187: 225-38.
- Bell-Krotoski, J., and E. Tomancik. 1987. 'The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments', *J Hand Surg Am*, 12: 155-61.
- Bernstein, C. N. 2016. 'Psychological Stress and Depression: Risk Factors for IBD?', *Dig Dis*, 34: 58-63.
- Bernstein, C. N., N. Niazi, M. Robert, H. Mertz, A. Kodner, J. Munakata, B. Naliboff, and E. A. Mayer. 1996. 'Rectal afferent function in patients with inflammatory and functional intestinal disorders', *Pain*, 66: 151-61.
- Berthelot, J. M., A. Blanchais, T. Marhadour, B. le Goff, Y. Maugars, and A. Saraux. 2009. 'Fluctuations in disease activity scores for inflammatory joint disease in clinical practice: do we need a solution?', *Joint Bone Spine*, 76: 126-8.
- Beuckmann, C. T., C. M. Sinton, N. Miyamoto, M. Ino, and M. Yanagisawa. 2003. 'N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences', *J Neurosci*, 23: 6793-7.
- Beyak, M. J., N. Ramji, K. M. Krol, M. D. Kawaja, and S. J. Vanner. 2004. 'Two TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287: G845-55.
- 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.
- Blair, H. A., and E. D. Deeks. 2017. 'Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis', *Drugs*, 77: 1221-33.
- Bonaz, B., and J. M. Sabate. 2009. '[Brain-gut axis dysfunction]', *Gastroenterol Clin Biol*, 33 Suppl 1: S48-58.
- 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.
- Bourdu, S., M. Dapoigny, E. Chapuy, F. Artigue, M. P. Vasson, P. Dechelotte, G. Bommelaer, A. Eschalier, and D. Ardid. 2005. 'Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats', *Gastroenterology*, 128: 1996-2008.
- 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., 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.
- Boyden, S. D., I. N. Hossain, A. Wohlfahrt, and Y. C. Lee. 2016. 'Non-inflammatory Causes of Pain in Patients with Rheumatoid Arthritis', *Curr Rheumatol Rep*, 18: 30.

- Boyman, O., D. Comte, and F. Spertini. 2014. 'Adverse reactions to biologic agents and their medical management', *Nat Rev Rheumatol*, 10: 612-27.
- Bradfield, P. F., N. Amft, E. Vernon-Wilson, A. E. Exley, G. Parsonage, G. E. Rainger, G. B. Nash, A. M. Thomas, D. L. Simmons, M. Salmon, and C. D. Buckley. 2003. 'Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue', *Arthritis Rheum*, 48: 2472-82.
- Brand, D. D. 2005. 'Rodent models of rheumatoid arthritis', *Comp Med*, 55: 114-22.
- 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, F. M., and I. B. McInnes. 2008. 'Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis', *J Clin Invest*, 118: 3537-45.
- Bresnihan, B., J. M. Alvaro-Gracia, M. Cobby, M. Doherty, Z. Domljan, P. Emery, G. Nuki, K. Pavelka, R. Rau, B. Rozman, I. Watt, B. Williams, R. Aitchison, D. McCabe, and P. Musikic. 1998. 'Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist', *Arthritis Rheum*, 41: 2196-204.
- Brisby, H., K. Olmarker, L. Rosengren, C. G. Cederlund, and B. Rydevik. 1999. 'Markers of nerve tissue injury in the cerebrospinal fluid in patients with lumbar disc herniation and sciatica', *Spine (Phila Pa 1976)*, 24: 742-6.
- Buch, M. H., D. L. Boyle, S. Rosengren, B. Saleem, R. J. Reece, L. A. Rhodes, A. Radjenovic, A. English, H. Tang, G. Vratsanos, P. O'Connor, G. S. Firestein, and P. Emery. 2009. 'Mode of action of abatacept in rheumatoid arthritis patients having failed tumour necrosis factor blockade: a histological, gene expression and dynamic magnetic resonance imaging pilot study', *Ann Rheum Dis*, 68: 1220-7.
- Bui, P. H., A. Quesada, A. Handforth, and O. Hankinson. 2008. 'The mibefradil derivative NNC55-0396, a specific T-type calcium channel antagonist, exhibits less CYP3A4 inhibition than mibefradil', *Drug Metab Dispos*, 36: 1291-9.
- Buljina, A. I., M. S. Taljanovic, D. M. Avdic, and T. B. Hunter. 2001. 'Physical and exercise therapy for treatment of the rheumatoid hand', *Arthritis Rheum*, 45: 392-7.
- Bunch, T. W., J. D. O'Duffy, R. B. Tompkins, and W. M. O'Fallon. 1984. 'Controlled trial of hydroxychloroquine and D-penicillamine singly and in combination in the treatment of rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 27: 267-76.
- Calkins, B. M. 1989. 'A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease', *Dig Dis Sci*, 34: 1841-54.
- Camilleri, M. 2012. 'Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome', *N Engl J Med*, 367: 1626-35.
- Camilleri, M., and G. Boeckxstaens. 2017. 'Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS', *Gut*, 66: 966-74.
- Camilleri, M., R. Kerstens, A. Rykx, and L. Vandeplasseche. 2008. 'A placebo-controlled trial of prucalopride for severe chronic constipation', *N Engl J Med*, 358: 2344-54.
- Cao, H., and Y. Q. Zhang. 2008. 'Spinal glial activation contributes to pathological pain states', *Neurosci Biobehav Rev*, 32: 972-83.
- Cao, X. H., H. S. Byun, S. R. Chen, and H. L. Pan. 2011. 'Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons', *J Neurochem*, 119: 594-603.
- Carbonnel, F., P. Jantchou, E. Monnet, and J. Cosnes. 2009. 'Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update', *Gastroenterol Clin Biol*, 33 Suppl 3: S145-57.
- Cash, J. M., and J. H. Klippel. 1994. 'Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis', *N Engl J Med*, 330: 1368-75.
- Catrina, A. I., V. Joshua, L. Klareskog, and V. Malmstrom. 2016. 'Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis', *Immunol Rev*, 269: 162-74.
- Catterall, W. A. 2010. 'Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology', *Neuron*, 67: 915-28.

- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch, and J. Striessnig. 2005. 'International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels', *Pharmacol Rev*, 57: 411-25.
- Chan, C. S., J. N. Guzman, E. Ilijic, J. N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G. E. Meredith, and D. J. Surmeier. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease', *Nature*, 447: 1081-6.
- Chang, K. Y., Y. G. Park, H. Y. Park, G. E. Homanics, J. Kim, and D. Kim. 2011. 'Lack of CaV3.1 channels causes severe motor coordination defects and an age-dependent cerebellar atrophy in a genetic model of essential tremor', *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 19-23.
- Chassaing, B., G. Srinivasan, M. A. Delgado, A. N. Young, A. T. Gewirtz, and M. Vijay-Kumar. 2012. 'Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation', *PLoS One*, 7: e44328.
- Chatzidionysiou, K., E. Lie, E. Nasonov, G. Lukina, M. L. Hetland, U. Tarp, C. Gabay, P. L. van Riel, D. C. Nordstrom, J. Gomez-Reino, K. Pavelka, M. Tomsic, T. K. Kvien, and R. F. van Vollenhoven. 2011. 'Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries', *Ann Rheum Dis*, 70: 1575-80.
- Chemin, J., A. Monteil, E. Perez-Reyes, J. Nargeot, and P. Lory. 2001. 'Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide', *EMBO J*, 20: 7033-40.
- Chen, C. C., K. G. Lamping, D. W. Nuno, R. Barresi, S. J. Prouty, J. L. Lavoie, L. L. Cribbs, S. K. England, C. D. Sigmund, R. M. Weiss, R. A. Williamson, J. A. Hill, and K. P. Campbell. 2003. 'Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels', *Science*, 302: 1416-8.
- Chen, K. C., W. H. Liu, and L. S. Chang. 2010. 'Suppression of ERK signaling evokes autocrine Fas-mediated death in arachidonic acid-treated human chronic myeloid leukemia K562 cells', *J Cell Physiol*, 222: 625-34.
- Chen, W. K., I. Y. Liu, Y. T. Chang, Y. C. Chen, C. C. Chen, C. T. Yen, H. S. Shin, and C. C. Chen. 2010. 'Ca(v)3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain', *J Neurosci*, 30: 10360-8.
- Chen, X. L., D. A. Bayliss, R. J. Fern, and P. Q. Barrett. 1999. 'A role for T-type Ca<sup>2+</sup> channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and K<sup>+</sup>', *Am J Physiol*, 276: F674-83.
- Chen, Y., J. Lu, H. Pan, Y. Zhang, H. Wu, K. Xu, X. Liu, Y. Jiang, X. Bao, Z. Yao, K. Ding, W. H. Lo, B. Qiang, P. Chan, Y. Shen, and X. Wu. 2003. 'Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy', *Ann Neurol*, 54: 239-43.
- Chevalier, M., P. Lory, C. Mironneau, N. Macrez, and J. F. Quignard. 2006. 'T-type CaV3.3 calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations', *Eur J Neurosci*, 23: 2321-9.
- Chevalier, X., F. Eymard, and P. Richette. 2013. 'Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments', *Nat Rev Rheumatol*, 9: 400-10.
- 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, 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.
- Chrysos, E., E. Athanasakis, J. Tsiaoussis, O. Zoras, A. Nickolopoulos, J. S. Vassilakis, and E. Xynos. 2001. 'Rectoanal motility in Crohn's disease patients', *Dis Colon Rectum*, 44: 1509-13.
- 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.
- Clark, P., E. Casas, P. Tugwell, C. Medina, C. Gheno, G. Tenorio, and J. A. Orozco. 1993. 'Hydroxychloroquine compared with placebo in rheumatoid arthritis. A randomized controlled trial', *Ann Intern Med*, 119: 1067-71.

- Colburn, R. W., A. J. Rickman, and J. A. DeLeo. 1999. 'The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior', *Exp Neurol*, 157: 289-304.
- Collins, S. M., E. Denou, E. F. Verdu, and P. Bercik. 2009. 'The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome', *Dig Liver Dis*, 41: 850-3.
- Combe, B. 2007. 'Early rheumatoid arthritis: strategies for prevention and management', *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 21: 27-42.
- Combe, B., R. Landewe, C. Lukas, H. D. Bolosiu, F. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, L. Klareskog, K. Machold, E. Martin-Mola, H. Nielsen, A. Silman, J. Smolen, and H. Yazici. 2007. 'EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT)', *Ann Rheum Dis*, 66: 34-45.
- Conrad, R., I. Wegener, F. Geiser, and A. Kleiman. 2013. 'Temperament, character, and personality disorders in chronic pain', *Curr Pain Headache Rep*, 17: 318.
- Cook, I. J., A. van Eeden, and S. M. Collins. 1987. 'Patients with irritable bowel syndrome have greater pain tolerance than normal subjects', *Gastroenterology*, 93: 727-33.
- Cosnes, J., L. Beaugerie, F. Carbonnel, and J. P. Gendre. 2001. 'Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study', *Gastroenterology*, 120: 1093-9.
- Courvoisier, N., M. Dougados, A. Cantagrel, P. Goupille, O. Meyer, J. Sibia, J. P. Dures, and B. Combe. 2008. 'Prognostic factors of 10-year radiographic outcome in early rheumatoid arthritis: a prospective study', *Arthritis Res Ther*, 10: R106.
- Coutinho, S. V., P. M. Plotsky, M. Sablad, J. C. Miller, H. Zhou, A. I. Bayati, J. A. McRoberts, and E. A. Mayer. 2002. 'Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282: G307-16.
- Crawley, J. N. 1996. 'Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains', *Trends Neurosci*, 19: 181-2; discussion 88-9.
- 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 Ca<sup>2+</sup> channel gene family', *Circ Res*, 83: 103-9.
- Croft, M., and R. M. Siegel. 2017. 'Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases', *Nat Rev Rheumatol*, 13: 217-33.
- Crunelli, V., and N. Leresche. 2002. 'Block of Thalamic T-Type Ca(2+) Channels by Ethosuximide Is Not the Whole Story', *Epilepsy Curr*, 2: 53-56.
- Curtis, J. R., A. O. Westfall, J. Allison, J. W. Bijlsma, A. Freeman, V. George, S. H. Kovac, C. M. Spettell, and K. G. Saag. 2006. 'Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use', *Arthritis Rheum*, 55: 420-6.
- Danese, S., and C. Fiocchi. 2011. 'Ulcerative colitis', *N Engl J Med*, 365: 1713-25.
- Danis, V. A., G. M. Franic, D. A. Rathjen, R. M. Laurent, and P. M. Brooks. 1992. 'Circulating cytokine levels in patients with rheumatoid arthritis: results of a double blind trial with sulphasalazine', *Ann Rheum Dis*, 51: 946-50.
- Dao, D. T., P. B. Mahon, X. Cai, C. E. Kovacsics, R. A. Blackwell, M. Arad, J. Shi, P. P. Zandi, P. O'Donnell, Consortium Bipolar Genome Study, J. A. Knowles, M. M. Weissman, W. Coryell, W. A. Scheftner, W. B. Lawson, D. F. Levinson, S. M. Thompson, J. B. Potash, and T. D. Gould. 2010. 'Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans', *Biol Psychiatry*, 68: 801-10.
- De Almeida, D. E., S. Ling, X. Pi, A. M. Hartmann-Scruggs, P. Pumpens, and J. Holoshitz. 2010. 'Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope', *J Immunol*, 185: 1927-34.
- Del Valle, L., R. J. Schwartzman, and G. Alexander. 2009. 'Spinal cord histopathological alterations in a patient with longstanding complex regional pain syndrome', *Brain Behav Immun*, 23: 85-91.
- Dinarello, C. A. 1997. 'Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings', *J Biol Regul Homeost Agents*, 11: 91-103.

- Dixon, Karen, Robert D. Layton, Marc A. Butorac, Paul Ryus, J. L. Gattis, Lacy Brown, Del Huntington, Vergil G. Stover, and National Research Council (U.S.). Transportation Research Board. 2016. *Access management application guidelines* (Transportation Research Board: Washington, D.C.).
- Docherty, M. J., R. C. Jones, 3rd, and M. S. Wallace. 2011. 'Managing pain in inflammatory bowel disease', *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 7: 592-601.
- Dogrul, A., L. R. Gardell, M. H. Ossipov, F. C. Tulumay, J. Lai, and F. Porreca. 2003. 'Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers', *Pain*, 105: 159-68.
- Dorner, G., R. Tonjes, K. Hecht, G. Hinz, I. Poppe, M. Poppei, and A. Tsamaloukas. 1981. 'Pyridostigmine administration in newborn rats prevents permanent mental ill-effects produced by maternal deprivation', *Endokrinologie*, 77: 101-4.
- Drewes, A. M., P. Petersen, P. Rossel, C. Gao, J. B. Hansen, and L. Arendt-Nielsen. 2001. 'Sensitivity and distensibility of the rectum and sigmoid colon in patients with irritable bowel syndrome', *Scand J Gastroenterol*, 36: 827-32.
- Drossman, D. A. 2016. 'Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV', *Gastroenterology*.
- Drossman, D. A., M. Camilleri, E. A. Mayer, and W. E. Whitehead. 2002. 'AGA technical review on irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 123: 2108-31.
- Drossman, D. A., W. D. Chey, J. F. Johanson, R. Fass, C. Scott, R. Panas, and R. Ueno. 2009. 'Clinical trial: lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome--results of two randomized, placebo-controlled studies', *Aliment Pharmacol Ther*, 29: 329-41.
- Duan, B., D. S. Liu, Y. Huang, W. Z. Zeng, X. Wang, H. Yu, M. X. Zhu, Z. Y. Chen, and T. L. Xu. 2012. 'PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity', *J Neurosci*, 32: 6351-63.
- Ducrotte, P., M. Dapoigny, B. Bonaz, and L. Siproudhis. 2005. 'Symptomatic efficacy of beidellitic montmorillonite in irritable bowel syndrome: a randomized, controlled trial', *Aliment Pharmacol Ther*, 21: 435-44.
- Duman, R. S., N. Li, R. J. Liu, V. Duric, and G. Aghajanian. 2012. 'Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine', *Neuropharmacology*, 62: 35-41.
- Dumitrache, A., K. Sanchez, S. Esnouf, A. Roren, J. Vidal, F. Rannou, S. Poiraudou, and M. M. Lefevre-Colau. 2013. '[Physical therapy, orthosis and occupational therapy in medical and surgical rheumatologic hand diseases]', *Presse Med*, 42: 1632-49.
- Edwards, R. R., A. D. Wasan, C. O. Bingham, 3rd, J. Bathon, J. A. Haythornthwaite, M. T. Smith, and G. G. Page. 2009. 'Enhanced reactivity to pain in patients with rheumatoid arthritis', *Arthritis Res Ther*, 11: R61.
- Enyeart, J. J., B. A. Biagi, R. N. Day, S. S. Sheu, and R. A. Maurer. 1990. 'Blockade of low and high threshold Ca<sup>2+</sup> channels by diphenylbutylpiperidine antipsychotics linked to inhibition of prolactin gene expression', *J Biol Chem*, 265: 16373-9.
- Ernst, W. L., Y. Zhang, J. W. Yoo, S. J. Ernst, and J. L. Noebels. 2009. 'Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy', *J Neurosci*, 29: 1615-25.
- Ertel, S. I., and J. P. Clozel. 1997. 'Mibefradil (Ro 40-5967): the first selective T-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker', *Expert Opin Investig Drugs*, 6: 569-82.
- Ethgen, O., F. de Lemos Esteves, O. Bruyere, and J. Y. Reginster. 2013. 'What do we know about the safety of corticosteroids in rheumatoid arthritis?', *Curr Med Res Opin*, 29: 1147-60.
- Faarvang, K. L., C. Egsmose, P. Kryger, J. Podenphant, M. Ingeman-Nielsen, and T. M. Hansen. 1993. 'Hydroxychloroquine and sulphasalazine alone and in combination in rheumatoid arthritis: a randomised double blind trial', *Ann Rheum Dis*, 52: 711-5.
- Farr, M., L. Waterhouse, A. E. Johnson, G. D. Kitis, R. W. Jubbs, and P. A. Bacon. 1995. 'A double-blind controlled study comparing sulphasalazine with placebo in rheumatoid factor (RF)-negative rheumatoid arthritis', *Clin Rheumatol*, 14: 531-6.

- Farrokhyar, F., J. K. Marshall, B. Easterbrook, and E. J. Irvine. 2006. 'Functional gastrointestinal disorders and mood disorders in patients with inactive inflammatory bowel disease: prevalence and impact on health', *Inflamm Bowel Dis*, 12: 38-46.
- Fava, R. A., N. J. Olsen, G. Spencer-Green, K. T. Yeo, T. K. Yeo, B. Berse, R. W. Jackman, D. R. Senger, H. F. Dvorak, and L. F. Brown. 1994. 'Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue', *J Exp Med*, 180: 341-6.
- Felson, D. T., J. J. Anderson, and R. F. Meenan. 1990. 'The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses', *Arthritis Rheum*, 33: 1449-61.
- Flatters, S. J., and G. J. Bennett. 2004. 'Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy', *Pain*, 109: 150-61.
- Fleischer, S., S. Ries, P. Shen, A. Lheritier, F. Cazals, G. R. Burmester, T. Dorner, and S. Fillatreau. 2017. 'Anti-interleukin-6 signalling therapy rebalances the disrupted cytokine production of B cells from patients with active rheumatoid arthritis', *Eur J Immunol*.
- Ford, A. C., W. D. Chey, N. J. Talley, A. Malhotra, B. M. Spiegel, and P. Moayyedi. 2009. 'Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis', *Arch Intern Med*, 169: 651-8.
- Ford, A. C., N. J. Talley, P. S. Schoenfeld, E. M. Quigley, and P. Moayyedi. 2009. 'Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis', *Gut*, 58: 367-78.
- Ford, A. C., and P. O. Vandvik. 2010. 'Irritable bowel syndrome', *BMJ Clin Evid*, 2010.
- Fox, A. P., M. C. Nowycky, and R. W. Tsien. 1987. 'Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones', *J Physiol*, 394: 149-72.
- 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)<sub>3.2</sub> selectivity and support analgesic effects', *Pain*, 154: 283-93.
- 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. 2015. 'The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function', *Cell Rep*.
- Fukudo, S., M. Kanazawa, M. Kano, Y. Sagami, Y. Endo, A. Utsumi, T. Nomura, and M. Hongo. 2002. 'Exaggerated motility of the descending colon with repetitive distention of the sigmoid colon in patients with irritable bowel syndrome', *J Gastroenterol*, 37 Suppl 14: 145-50.
- Furst, D. E., H. Lindsley, B. Baethge, G. R. Botstein, J. Caldwell, F. Dietz, R. Ettlinger, H. E. Golden, G. E. McLaughlin, L. W. Moreland, W. N. Roberts, T. W. Rooney, B. Rothschild, M. Sack, A. I. Sebba, M. Weisman, K. E. Welch, and D. Yocum. 1999. 'Dose-loading with hydroxychloroquine improves the rate of response in early, active rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind six-week trial with eighteen-week extension', *Arthritis Rheum*, 42: 357-65.
- Gadotti, V. M., A. G. Caballero, N. D. Berger, C. M. Gladding, L. Chen, T. A. Pfeifer, and G. W. Zamponi. 2015. 'Small organic molecule disruptors of Cav3.2 - USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain', *Mol Pain*, 11: 11.
- Gadotti, V. M., H. You, R. R. Petrov, N. D. Berger, P. Diaz, and G. W. Zamponi. 2013. 'Analgesic effect of a mixed T-type channel inhibitor/CB2 receptor agonist', *Mol Pain*, 9: 32.
- Gangarossa, G., S. Laffray, E. Bourinet, and E. Valjent. 2014. 'T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants', *Front Behav Neurosci*, 8: 92.
- 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.
- Garner, S. E., D. Fidan, R. R. Frankish, M. Judd, B. Shea, T. Towheed, P. Tugwell, and G. A. Wells. 2017. 'WITHDRAWN: Celecoxib for rheumatoid arthritis', *Cochrane Database Syst Rev*, 6: CD003831.

- Geneen, L. J., R. A. Moore, C. Clarke, D. Martin, L. A. Colvin, and B. H. Smith. 2017. 'Physical activity and exercise for chronic pain in adults: an overview of Cochrane Reviews', *Cochrane Database Syst Rev*, 4: CD011279.
- Gersuk, G. M., L. W. Razai, and K. A. Marr. 2008. 'Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1', *J Immunol Methods*, 329: 157-66.
- Gibson, P. R. 2017. 'The evidence base for efficacy of the low FODMAP diet in irritable bowel syndrome: is it ready for prime time as a first-line therapy?', *J Gastroenterol Hepatol*, 32 Suppl 1: 32-35.
- Giesecke, T., R. H. Gracely, D. A. Williams, M. E. Geisser, F. W. Petzke, and D. J. Clauw. 2005. 'The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort', *Arthritis Rheum*, 52: 1577-84.
- Girard, C., Lesage, F. 2004. 'Canaux K2P neuronaux : aspects moléculaires et fonctionnels' *Médecine Sciences*, 20 : 5
- Gold, M. S., L. Zhang, D. L. Wrigley, and R. J. Traub. 2002. 'Prostaglandin E(2) modulates TTX-R I(Na) in rat colonic sensory neurons', *J Neurophysiol*, 88: 1512-22.
- Gomora, J. C., A. N. Daud, M. Weiergraber, and E. Perez-Reyes. 2001. 'Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs', *Mol Pharmacol*, 60: 1121-32.
- Goodman, S. M., B. Springer, G. Guyatt, M. P. Abdel, V. Dasa, M. George, O. Gewurz-Singer, J. T. Giles, B. Johnson, S. Lee, L. A. Mandl, M. A. Mont, P. Sculco, S. Sporer, L. Stryker, M. Turgunbaev, B. Brause, A. F. Chen, J. Gililand, M. Goodman, A. Hurley-Rosenblatt, K. Kirou, E. Losina, R. MacKenzie, K. Michaud, T. Mikuls, L. Russell, A. Sah, A. S. Miller, J. A. Singh, and A. Yates. 2017. '2017 American College of Rheumatology/American Association of Hip and Knee Surgeons Guideline for the Perioperative Management of Antirheumatic Medication in Patients With Rheumatic Diseases Undergoing Elective Total Hip or Total Knee Arthroplasty', *Arthritis Rheumatol*, 69: 1538-51.
- Goren, M. Z., and F. Onat. 2007. 'Ethosuximide: from bench to bedside', *CNS Drug Rev*, 13: 224-39.
- Gosselin, R. D., M. R. Suter, R. R. Ji, and I. Decosterd. 2010. 'Glial cells and chronic pain', *Neuroscientist*, 16: 519-31.
- Gotzsche, P. C., and H. K. Johansen. 1998. 'Meta-analysis of short-term low dose prednisolone versus placebo and non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis', *BMJ*, 316: 811-8.
- Goyal, R. K., and I. Hirano. 1996. 'The enteric nervous system', *N Engl J Med*, 334: 1106-15.
- Graham, G. G., M. J. Davies, R. O. Day, A. Mohamudally, and K. F. Scott. 2013. 'The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings', *Inflammopharmacology*, 21: 201-32.
- Gravallese, E. M., Y. Harada, J. T. Wang, A. H. Gorn, T. S. Thornhill, and S. R. Goldring. 1998. 'Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis', *Am J Pathol*, 152: 943-51.
- Gregersen, P. K., J. Silver, and R. J. Winchester. 1987. 'The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 30: 1205-13.
- Gross, J., N. Oubaya, F. Eymard, A. Hourdille, X. Chevalier, and S. Guignard. 2017. 'Stressful life events as a trigger for rheumatoid arthritis onset within a year: a case-control study', *Scand J Rheumatol*: 1-2.
- Guirimand, F., and D. Le Bars. 1996. '[Physiology of nociception]', *Ann Fr Anesth Reanim*, 15: 1048-79.
- Halfvarson, J., L. Bodin, C. Tysk, E. Lindberg, and G. Jarnerot. 2003. 'Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics', *Gastroenterology*, 124: 1767-73.
- Hamidi, G. A., M. H. Ramezani, M. N. Arani, S. A. Talaei, A. Mesdaghinia, and H. R. Banafshe. 2012. 'Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain', *Eur J Pharmacol*, 674: 260-4.
- Hanisch, U. K., and H. Kettenmann. 2007. 'Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain', *Nat Neurosci*, 10: 1387-94.

- Hannonen, P., T. Mottonen, M. Hakola, and M. Oka. 1993. 'Sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. A 48-week double-blind, prospective, placebo-controlled study', *Arthritis Rheum*, 36: 1501-9.
- Hans, M., S. Luvisetto, M. E. Williams, M. Spagnolo, A. Urrutia, A. Tottene, P. F. Brust, E. C. Johnson, M. M. Harpold, K. A. Stauderman, and D. Pietrobon. 1999. 'Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine', *J Neurosci*, 19: 1610-9.
- Hansen, M., J. Podenphant, A. Florescu, M. Stoltenberg, A. Borch, E. Kluger, S. F. Sorensen, and T. M. Hansen. 1999. 'A randomised trial of differentiated prednisolone treatment in active rheumatoid arthritis. Clinical benefits and skeletal side effects', *Ann Rheum Dis*, 58: 713-8.
- Hansen, P. B. 2015. 'Functional importance of T-type voltage-gated calcium channels in the cardiovascular and renal system: news from the world of knockout mice', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308: R227-37.
- Hardy, R. S., A. Filer, M. S. Cooper, G. Parsonage, K. Raza, D. L. Hardie, E. H. Rabbitt, P. M. Stewart, C. D. Buckley, and M. Hewison. 2006. 'Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation', *Arthritis Res Ther*, 8: R108.
- Hatakeyama, S., M. Wakamori, M. Ino, N. Miyamoto, E. Takahashi, T. Yoshinaga, K. Sawada, K. Imoto, I. Tanaka, T. Yoshizawa, Y. Nishizawa, Y. Mori, T. Niidome, and S. Shoji. 2001. 'Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels', *Neuroreport*, 12: 2423-7.
- Heaton, K. W., J. Radvan, H. Cripps, R. A. Mountford, F. E. Braddon, and A. O. Hughes. 1992. 'Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study', *Gut*, 33: 818-24.
- Heiberg, T., A. Finset, T. Uhlig, and T. K. Kvien. 2005. 'Seven year changes in health status and priorities for improvement of health in patients with rheumatoid arthritis', *Ann Rheum Dis*, 64: 191-5.
- Heron, S. E., H. Khosravani, D. Varela, C. Bladen, T. C. Williams, M. R. Newman, I. E. Scheffer, S. F. Berkovic, J. C. Mulley, and G. W. Zamponi. 2007. 'Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants', *Ann Neurol*, 62: 560-8.
- Hewlett, S., T. Sanderson, J. May, R. Alten, C. O. Bingham, 3rd, M. Cross, L. March, C. Pohl, T. Woodworth, and S. J. Bartlett. 2012. 'I'm hurting, I want to kill myself': rheumatoid arthritis flare is more than a high joint count--an international patient perspective on flare where medical help is sought', *Rheumatology (Oxford)*, 51: 69-76.
- Heymen, S., W. Maixner, W. E. Whitehead, R. R. Klatzkin, B. Mechlin, and K. C. Light. 2010. 'Central processing of noxious somatic stimuli in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls', *Clin J Pain*, 26: 104-9.
- Hille, B. 1992. 'G protein-coupled mechanisms and nervous signaling', *Neuron*, 9: 187-95.
- Hojsted, J., and P. Sjogren. 2007. 'Addiction to opioids in chronic pain patients: a literature review', *Eur J Pain*, 11: 490-518.
- Holzer, P. 2001. 'Gastrointestinal afferents as targets of novel drugs for the treatment of functional bowel disorders and visceral pain', *Eur J Pharmacol*, 429: 177-93.
- Houghton, L. A., C. Fell, P. J. Whorwell, I. Jones, D. P. Sudworth, and J. D. Gale. 2007. 'Effect of a second-generation alpha2delta ligand (pregabalin) on visceral sensation in hypersensitive patients with irritable bowel syndrome', *Gut*, 56: 1218-25.
- Hsu, S. C., Y. T. Chang, and C. C. Chen. 2013. 'Early growth response 1 is an early signal inducing Cav3.2 T-type calcium channels during cardiac hypertrophy', *Cardiovasc Res*, 100: 222-30.
- Huang, C. H., Y. C. Chen, and C. C. Chen. 2013. 'Physical interaction between calcineurin and Cav3.2 T-type Ca2+ channel modulates their functions', *FEBS Lett*, 587: 1723-30.
- Huang, Z., R. Lujan, I. Kadurin, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. C. Dolphin, and M. M. Shah. 2011. 'Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses', *Nat Neurosci*, 14: 478-86.
- Huguenard, J. R. 2002. 'Block of T-Type Ca(2+) Channels Is an Important Action of Succinimide Antiabsence Drugs', *Epilepsy Curr*, 2: 49-52.

- Huot, R. L., K. V. Thirivikraman, M. J. Meaney, and P. M. Plotsky. 2001. 'Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment', *Psychopharmacology (Berl)*, 158: 366-73.
- Huttenhower, C., A. D. Kostic, and R. J. Xavier. 2014. 'Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome', *Immunity*, 40: 843-54.
- Hviid, A., H. Svanstrom, and M. Frisch. 2011. 'Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood', *Gut*, 60: 49-54.
- Ikeda, H., B. Heinke, R. Ruscheweyh, and J. Sandkuhler. 2003. 'Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia', *Science*, 299: 1237-40.
- Ioannidis, J. P., F. B. Karassa, E. Druyts, K. Thorlund, and E. J. Mills. 2013. 'Biologic agents in rheumatology: unmet issues after 200 trials and \$200 billion sales', *Nat Rev Rheumatol*, 9: 665-73.
- Jackson, J. L., P. G. O'Malley, G. Tomkins, E. Balden, J. Santoro, and K. Kroenke. 2000. 'Treatment of functional gastrointestinal disorders with antidepressant medications: a meta-analysis', *Am J Med*, 108: 65-72.
- Jacus, M. O., V. N. Uebele, J. J. Renger, and S. M. Todorovic. 2012. 'Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons', *J Neurosci*, 32: 9374-82.
- Jagodic, M. M., S. Pathirathna, P. M. Joksovic, W. Lee, M. T. Nelson, A. K. Naik, P. Su, V. Jevtovic-Todorovic, and S. M. Todorovic. 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.
- Jagodic, M. M., S. Pathirathna, M. T. Nelson, S. Mancuso, P. M. Joksovic, E. R. Rosenberg, D. A. Bayliss, V. Jevtovic-Todorovic, and S. M. Todorovic. 2007. 'Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons', *J Neurosci*, 27: 3305-16.
- Jarvis, M. F., V. E. Scott, S. McGaraughty, K. L. Chu, J. Xu, W. Niforatos, I. Milicic, S. Joshi, Q. Zhang, and Z. Xia. 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.
- Jenkins, M. A., C. J. Christel, Y. Jiao, S. Abiria, K. Y. Kim, Y. M. Usachev, G. J. Obermair, R. J. Colbran, and A. Lee. 2010. 'Ca<sup>2+</sup>-dependent facilitation of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels by densin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II', *J Neurosci*, 30: 5125-35.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F. Zdebik, A. A. 2002. 'Molecular structure and physiological function of chloride channels' *Physiol Rev*, 82 : 503-68.
- Jessop, J. D., M. M. O'Sullivan, P. A. Lewis, L. A. Williams, J. P. Camilleri, M. J. Plant, and E. C. Coles. 1998. 'A long-term five-year randomized controlled trial of hydroxychloroquine, sodium aurothiomalate, auranofin and penicillamine in the treatment of patients with rheumatoid arthritis', *Br J Rheumatol*, 37: 992-1002.
- Jiang, Y., H. K. Genant, I. Watt, M. Cobby, B. Bresnihan, R. Aitchison, and D. McCabe. 2000. 'A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores', *Arthritis Rheum*, 43: 1001-9.
- Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman, and E. Renstrom. 2005. 'Ca<sub>v</sub>2.3 calcium channels control second-phase insulin release', *J Clin Invest*, 115: 146-54.
- Johannesson, E., M. Simren, H. Strid, A. Bajor, and R. Sadik. 2011. 'Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial', *Am J Gastroenterol*, 106: 915-22.
- Julius, D., and A. I. Basbaum. 2001. 'Molecular mechanisms of nociception', *Nature*, 413: 203-10.
- Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, S. M. Smith, D. B. Wheeler, S. B. Lee, T. G. Lee, H. Chin, M. E. Adams, R. H. Scheller, R. W. Tsien, and H. S. Shin. 1999. 'Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents,

- altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 15245-50.
- Kaistha, A., and J. Levine. 2014. 'Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease', *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 44: 328-34.
- Kamphuis, S., W. Kuis, W. de Jager, G. Teklenburg, M. Massa, G. Gordon, M. Boerhof, G. T. Rijkers, C. S. Uiterwaal, H. G. Otten, A. Sette, S. Albani, and B. J. Prakken. 2005. 'Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis', *Lancet*, 366: 50-6.
- Kanbe, K., J. Chiba, and A. Nakamura. 2013. 'Immunohistological analysis of synovium treated with abatacept in rheumatoid arthritis', *Rheumatol Int*, 33: 1883-7.
- Kawabata, A. 2013. '[Targeting Ca(v)3.2 T-type calcium channels as a therapeutic strategy for chemotherapy-induced neuropathic pain]', *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 141: 81-4.
- Kawabata, A., T. Ishiki, K. Nagasawa, S. Yoshida, Y. Maeda, T. Takahashi, F. Sekiguchi, T. Wada, S. Ichida, and H. Nishikawa. 2007. 'Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger', *Pain*, 132: 74-81.
- Kellow, J. E., S. F. Phillips, L. J. Miller, and A. R. Zinsmeister. 1988. 'Dysmotility of the small intestine in irritable bowel syndrome', *Gut*, 29: 1236-43.
- Kerckhove, N. 2013. 'Implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antalgique du paracétamol et dans la douleur inflammatoire'. Thèse de l'Université d'Auvergne, spécialité Neuropharmacologie. pp 261.
- Kerckhove, N., J. Scanzi, B. Pereira, D. Ardid, and M. Dapoigny. 2017. 'Assessment of the effectiveness and safety of ethosuximide in the treatment of abdominal pain related to irritable bowel syndrome - IBSET: protocol of a randomised, parallel, controlled, double-blind and multicentre trial', *BMJ Open*, 7: e015380.
- Khosravani, H., C. Altier, B. Simms, K. S. Hamming, T. P. Snutch, J. Mezeyova, J. E. McRory, and G. W. Zamponi. 2004. 'Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy', *J Biol Chem*, 279: 9681-4.
- Khosravani, H., C. Bladen, D. B. Parker, T. P. Snutch, J. E. McRory, and G. W. Zamponi. 2005. 'Effects of Cav3.2 channel mutations linked to idiopathic generalized epilepsy', *Ann Neurol*, 57: 745-9.
- Kikuchi, J., T. Kondo, A. Shibata, R. Sakai, Y. Okada, K. Chino, A. Okuyama, T. Kurasawa, H. Takei, and K. Amano. 2017. 'Efficacy and tolerability of six-week extended dosing interval with tocilizumab therapy in a prospective cohort as remission maintenance in patients with rheumatoid arthritis', *Mod Rheumatol*: 1-8.
- 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.
- Kirwan, J. R. 1995. 'The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group', *N Engl J Med*, 333: 142-6.
- Klareskog, L., D. van der Heijde, J. P. de Jager, A. Gough, J. Kalden, M. Malaise, E. Martin Mola, K. Pavelka, J. Sany, L. Settas, J. Wajdula, R. Pedersen, S. Fatenejad, M. Sanda, and Tempo study investigators. 2004. 'Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial', *Lancet*, 363: 675-81.
- Kobayashi, T., H. Hirai, M. Iino, I. Fuse, K. Mitsumura, K. Washiyama, S. Kasai, and K. Ikeda. 2009. 'Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels', *Neuropharmacology*, 56: 499-506.
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ, 1992. 'The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia'. *Science*, 257: 797-800.
- Koloski, N. A., L. Bret, and G. Radford-Smith. 2008. 'Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature', *World J Gastroenterol*, 14: 165-73.

- Konig, M. F., L. Abusleme, J. Reinholdt, R. J. Palmer, R. P. Teles, K. Sampson, A. Rosen, P. A. Nigrovic, J. Sokolove, J. T. Giles, N. M. Moutsopoulos, and F. Andrade. 2016. 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis', *Sci Transl Med*, 8: 369ra176.
- 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.
- Ku, W. H., and S. P. Schneider. 2011. 'Multiple T-type Ca<sup>2+</sup> current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration', *J Neurophysiol*, 106: 2486-98.
- Lackner, J. M., C. Mesmer, S. Morley, C. Dowzer, and S. Hamilton. 2004. 'Psychological treatments for irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis', *J Consult Clin Psychol*, 72: 1100-13.
- Ladd, C. O., R. L. Huot, K. V. Thirvikraman, C. B. Nemeroff, M. J. Meaney, and P. M. Plotsky. 2000. 'Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience', *Prog Brain Res*, 122: 81-103.
- Laev, S. S., and N. F. Salakhutdinov. 2015. 'Anti-arthritic agents: progress and potential', *Bioorg Med Chem*, 23: 3059-80.
- 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.
- Larauche, M., G. Gourcerol, L. Wang, K. Pambukchian, S. Brunnhuber, D. W. Adelson, J. Rivier, M. Million, and Y. Tache. 2009. 'Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297: G215-27.
- Lard, L. R., H. Visser, I. Speyer, I. E. vander Horst-Bruinsma, A. H. Zwinderman, F. C. Breedveld, and J. M. Hazes. 2001. 'Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies', *Am J Med*, 111: 446-51.
- Latham, J. R., S. Pathirathna, M. M. Jagodic, W. J. Choe, M. E. Levin, M. T. Nelson, W. Y. Lee, K. Krishnan, D. F. Covey, S. M. Todorovic, and V. Jevtovic-Todorovic. 2009. 'Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice', *Diabetes*, 58: 2656-65.
- Lee, A. S., S. Ra, A. M. Rajadhyaksha, J. K. Britt, H. De Jesus-Cortes, K. L. Gonzales, A. Lee, S. Moosmang, F. Hofmann, A. A. Pieper, and A. M. Rajadhyaksha. 2012. 'Forebrain elimination of cacna1c mediates anxiety-like behavior in mice', *Mol Psychiatry*, 17: 1054-5.
- 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., M. T. Nelson, K. E. Rose, and S. M. Todorovic. 2013. 'Redox mechanism of S-nitrosothiol modulation of neuronal CaV3.2 T-type calcium channels', *Mol Neurobiol*, 48: 274-80.
- Lee, S. E., J. Lee, C. Latchoumane, B. Lee, S. J. Oh, Z. A. Saud, C. Park, N. Sun, E. Cheong, C. C. Chen, E. J. Choi, C. J. Lee, and H. S. Shin. 2014. 'Rebound burst firing in the reticular thalamus is not essential for pharmacological absence seizures in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 11828-33.
- Levy, R. L., K. R. Jones, W. E. Whitehead, S. I. Feld, N. J. Talley, and L. A. Corey. 2001. 'Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology', *Gastroenterology*, 121: 799-804.
- Levy, R. L., K. W. Olden, B. D. Naliboff, L. A. Bradley, C. Francisconi, D. A. Drossman, and F. Creed. 2006. 'Psychosocial aspects of the functional gastrointestinal disorders', *Gastroenterology*, 130: 1447-58.

- Lewis, S. J., and K. W. Heaton. 1997. 'Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time', *Scand J Gastroenterol*, 32: 920-4.
- Li, L. C., A. Maetzel, J. N. Pencharz, L. Maguire, C. Bombardier, Hypertension Community, and Team Arthritis Project. 2004. 'Use of mainstream nonpharmacologic treatment by patients with arthritis', *Arthritis Rheum*, 51: 203-9.
- Li, Y., C. E. Tatsui, L. D. Rhines, R. Y. North, D. S. Harrison, R. M. Cassidy, C. A. Johansson, A. K. Kosturakis, D. D. Edwards, H. Zhang, and P. M. Dougherty. 2017. 'Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels (Cav3.2) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy', *Pain*, 158: 417-29.
- Lin, S. F., X. L. Yu, X. Y. Liu, B. Wang, C. H. Li, Y. G. Sun, and X. J. Liu. 2016. 'Expression patterns of T-type Cav3.2 channel and insulin-like growth factor-1 receptor in dorsal root ganglion neurons of mice after sciatic nerve axotomy', *Neuroreport*, 27: 1174-81.
- Lin, S. S., B. H. Tzeng, K. R. Lee, R. J. Smith, K. P. Campbell, and C. C. Chen. 2014. 'Cav3.2 T-type calcium channel is required for the NFAT-dependent Sox9 expression in tracheal cartilage', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E1990-8.
- Loeser, J. D., and R. D. Treede. 2008. 'The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology', *Pain*, 137: 473-7.
- Long, M. D., and D. A. Drossman. 2010. 'Inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, or what?: A challenge to the functional-organic dichotomy', *Am J Gastroenterol*, 105: 1796-8.
- Lopez-Charcas, O., M. Rivera, and J. C. Gomora. 2012. 'Block of human Cav3 channels by the diuretic amiloride', *Mol Pharmacol*, 82: 658-67.
- Lopez-Olivo, M. A., H. R. Siddhanamatha, B. Shea, P. Tugwell, G. A. Wells, and M. E. Suarez-Almazor. 2014. 'Methotrexate for treating rheumatoid arthritis', *Cochrane Database Syst Rev*: CD000957.
- Lovell, R. M., and A. C. Ford. 2012. 'Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10: 712-21 e4.
- Macedo, E. M., W. C. Santos, B. P. Neto Sousa, E. M. Lopes, C. A. Piauilino, F. V. Cunha, D. P. Sousa, F. A. Oliveira, and F. R. Almeida. 2016. 'Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation', *Braz J Med Biol Res*, 49.
- MacGregor, A. J., H. Snieder, A. S. Rigby, M. Koskenvuo, J. Kaprio, K. Aho, and A. J. Silman. 2000. 'Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins', *Arthritis Rheum*, 43: 30-7.
- Maeda, Y., Y. Aoki, F. Sekiguchi, M. Matsunami, T. Takahashi, H. Nishikawa, and A. Kawabata. 2009. 'Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels', *Pain*, 142: 127-32.
- Maeda, Y., and K. Takeda. 2017. 'Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis', *J Clin Med*, 6.
- Makker, J., S. Chilimuri, and J. N. Bella. 2015. 'Genetic epidemiology of irritable bowel syndrome', *World J Gastroenterol*, 21: 11353-61.
- Mamet, J., M. Klukinov, T. L. Yaksh, S. A. Malkmus, S. Williams, S. Harris, D. C. Manning, B. K. Taylor, R. R. Donahue, F. Porreca, J. Y. Xie, J. Oyarzo, T. J. Brennan, A. Subieta, W. K. Schmidt, and D. C. Yeomans. 2014. 'Single intrathecal administration of the transcription factor decoy AYY1 prevents acute and chronic pain after incisional, inflammatory, or neuropathic injury', *Pain*, 155: 322-33.
- Mangoni, M. E., B. Couette, E. Bourinet, J. Platzer, D. Reimer, J. Striessnig, and J. Nargeot. 2003. 'Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 5543-8.
- Mangoni, M. E., A. Traboulsie, A. L. Leoni, B. Couette, L. Marger, K. Le Quang, E. Kupfer, A. Cohen-Solal, J. Vilar, H. S. Shin, D. Escande, F. Charpentier, J. Nargeot, and P. Lory. 2006. 'Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Cav3.1/alpha1G T-type calcium channels', *Circ Res*, 98: 1422-30.

- 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.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., Marumo, F. 1999. 'Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel', *Nat Genet*, 21:95-98
- Matsunami, M., S. Kirishi, T. Okui, and A. Kawabata. 2011. 'Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels', *Neuroscience*, 181: 257-64.
- Matsunami, M., T. Tarui, K. Mitani, K. Nagasawa, O. Fukushima, K. Okubo, S. Yoshida, M. Takemura, and A. Kawabata. 2009. 'Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon', *Gut*, 58: 751-61.
- Matthews, E. A., and A. H. Dickenson. 2001a. 'Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats', *Eur J Pharmacol*, 415: 141-9.
- . 2001b. 'Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy', *Pain*, 92: 235-46.
- Matthews, K., L. S. Wilkinson, and T. W. Robbins. 1996. 'Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood', *Physiol Behav*, 59: 99-107.
- Mayer, E. A., Q. Aziz, S. Coen, M. Kern, J. S. Labus, R. Lane, B. Kuo, B. Naliboff, and I. Tracey. 2009. 'Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: a Rome working team report', *Neurogastroenterol Motil*, 21: 579-96.
- Mayer, E. A., B. D. Naliboff, and A. D. Craig. 2006. 'Neuroimaging of the brain-gut axis: from basic understanding to treatment of functional GI disorders', *Gastroenterology*, 131: 1925-42.
- McCafferty, D. M., and I. J. Zeitlin. 1989. 'Short chain fatty acid-induced colitis in mice', *Int J Tissue React*, 11: 165-8.
- McCarthy, M. 2006. 'Allen Brain Atlas maps 21,000 genes of the mouse brain', *Lancet Neurol*, 5: 907-8.
- McCormick, D. A., and J. R. Huguenard. 1992. 'A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons', *J Neurophysiol*, 68: 1384-400.
- McInnes, I. B., and G. Schett. 2011. 'The pathogenesis of rheumatoid arthritis', *N Engl J Med*, 365: 2205-19.
- . 2017. 'Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis', *Lancet*, 389: 2328-37.
- McKinney, B. C., and G. G. Murphy. 2006. 'The L-Type voltage-gated calcium channel Cav1.3 mediates consolidation, but not extinction, of contextually conditioned fear in mice', *Learn Mem*, 13: 584-9.
- McMahon, S. B., W. B. Cafferty, and F. Marchand. 2005. 'Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators', *Exp Neurol*, 192: 444-62.
- Mearin, F., B. E. Lacy, L. Chang, W. D. Chey, A. J. Lembo, M. Simren, and R. Spiller. 2016. 'Bowel Disorders', *Gastroenterology*.
- Meeus, M., S. Vervisch, L. S. De Clerck, G. Moorkens, G. Hans, and J. Nijs. 2012. 'Central sensitization in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review', *Semin Arthritis Rheum*, 41: 556-67.
- Mertz, H., B. Naliboff, J. Munakata, N. Niazi, and E. A. Mayer. 1995. 'Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 109: 40-52.

- Messinger, R. B., A. K. Naik, M. M. Jagodic, M. T. Nelson, W. Y. Lee, W. J. Choe, P. Orestes, J. R. Latham, S. M. Todorovic, and V. Jevtovic-Todorovic. 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.
- Meucci, G., M. Vecchi, G. Torgano, M. Arrigoni, A. Prada, F. Rocca, M. Curzio, A. Pera, and R. de Franchis. 1992. 'Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD Study Group)', *Gastroenterology*, 103: 514-9.
- Mika, J., M. Zychowska, K. Popiolek-Barczyk, E. Rojewska, and B. Przewlocka. 2013. 'Importance of glial activation in neuropathic pain', *Eur J Pharmacol*, 716: 106-19.
- Millan, M. J. 2002. 'Descending control of pain', *Prog Neurobiol*, 66: 355-474.
- Mindell, J. A., Maduke, M. 2001. 'ClC chloride channels' *Genome Biol*, 2, 3000.1–3000.6.
- Minderhoud, I. M., B. Oldenburg, J. A. Wismeijer, G. P. van Berge Henegouwen, and A. J. Smout. 2004. 'IBS-like symptoms in patients with inflammatory bowel disease in remission; relationships with quality of life and coping behavior', *Dig Dis Sci*, 49: 469-74.
- Miossec, P., and J. Sany. 1987. '[Current aspects of the immunology of articular cartilage]', *Rev Rhum Mal Osteoartic*, 54: 595-600.
- Mishra, S. K., and K. Hermsmeyer. 1994. 'Selective inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by Ro 40-5967', *Circ Res*, 75: 144-8.
- Mitsuyama, K., M. Niwa, H. Takedatsu, H. Yamasaki, K. Kuwaki, S. Yoshioka, R. Yamauchi, S. Fukunaga, and T. Torimura. 2016. 'Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease', *World J Gastroenterol*, 22: 1304-10.
- Mladenovic, V., Z. Domljan, B. Rozman, I. Jajic, D. Mihajlovic, J. Dordevic, M. Popovic, M. Dimitrijevic, M. Zivkovic, G. Campion, and *et al.* 1995. 'Safety and effectiveness of leflunomide in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. Results of a randomized, placebo-controlled, phase II study', *Arthritis Rheum*, 38: 1595-603.
- Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema, and G. G. Kaplan. 2012. 'Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review', *Gastroenterology*, 142: 46-54 e42; quiz e30.
- 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 Ca<sup>2+</sup> channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory', *J Neurosci*, 25: 9883-92.
- Morel, J., and B. Combe. 2006. '[Rheumatoid arthritis]', *Rev Prat*, 56: 553-62.
- Mori, Y., M. Nishida, S. Shimizu, M. Ishii, T. Yoshinaga, M. Ino, K. Sawada, and T. Niidome. 2002. 'Ca(2+) channel alpha(1B) subunit (Ca(V) 2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system', *Trends Cardiovasc Med*, 12: 270-5.
- Mowat, A. M. 2003. 'Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens', *Nat Rev Immunol*, 3: 331-41.
- Murakami-Nakayama, M., M. Tsubota, S. Hiruma, F. Sekiguchi, K. Matsuyama, T. Kimura, M. Moriyama, and A. Kawabata. 2015. 'Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice', *J Pharmacol Sci*, 127: 223-8.
- Nagi, S. S., J. S. Dunn, I. Birznies, R. M. Vickery, and D. A. Mahns. 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 Neurosci*, 16: 52.
- Nam, J. L., K. Takase-Minegishi, S. Ramiro, K. Chatzidionysiou, J. S. Smolen, D. van der Heijde, J. W. Bijlsma, G. R. Burmester, M. Dougados, M. Scholte-Voshaar, R. van Vollenhoven, and R. Landewe. 2017. 'Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis', *Ann Rheum Dis*, 76: 1113-36.

- Newton, P. M., C. J. Orr, M. J. Wallace, C. Kim, H. S. Shin, and R. O. Messing. 2004. 'Deletion of N-type calcium channels alters ethanol reward and reduces ethanol consumption in mice', *J Neurosci*, 24: 9862-9.
- Nielen, M. M., D. van Schaardenburg, H. W. Reesink, R. J. van de Stadt, I. E. van der Horst-Bruinsma, M. H. de Koning, M. R. Habibuw, J. P. Vandenbroucke, and B. A. Dijkmans. 2004. 'Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors', *Arthritis Rheum*, 50: 380-6.
- Nikolaus, S., and S. Schreiber. 2007. 'Diagnostics of inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 133: 1670-89.
- O'Brien, M. D., and S. F. Phillips. 1996. 'Colonic motility in health and disease', *Gastroenterol Clin North Am*, 25: 147-62.
- O'Dell, J. R., C. E. Haire, N. Erikson, W. Drymalski, W. Palmer, P. J. Eckhoff, V. Garwood, P. Maloley, L. W. Klassen, S. Wees, H. Klein, and G. F. Moore. 1996. 'Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications', *N Engl J Med*, 334: 1287-91.
- O'Mahony, L., J. McCarthy, P. Kelly, G. Hurley, F. Luo, K. Chen, G. C. O'Sullivan, B. Kiely, J. K. Collins, F. Shanahan, and E. M. Quigley. 2005. 'Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles', *Gastroenterology*, 128: 541-51.
- 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.
- Odes, H. S., A. Fich, S. Reif, A. Halak, A. Lavy, D. Keter, R. Eliakim, J. Paz, E. Broide, Y. Niv, Y. Ron, Y. Villa, N. Arber, and T. Gilat. 2001. 'Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis', *Dig Dis Sci*, 46: 1717-21.
- Okada, Y., D. Wu, G. Trynka, T. Raj, C. Terao, K. Ikari, Y. Kochi, K. Ohmura, A. Suzuki, S. Yoshida, R. R. Graham, A. Manoharan, W. Ortmann, T. Bhangale, J. C. Denny, R. J. Carroll, A. E. Eyler, J. D. Greenberg, J. M. Kremer, D. A. Pappas, L. Jiang, J. Yin, L. Ye, D. F. Su, J. Yang, G. Xie, E. Keystone, H. J. Westra, T. Esko, A. Metspalu, X. Zhou, N. Gupta, D. Mirel, E. A. Stahl, D. Diogo, J. Cui, K. Liao, M. H. Guo, K. Myouzen, T. Kawaguchi, M. J. Coenen, P. L. van Riel, M. A. van de Laar, H. J. Guchelaar, T. W. Huizinga, P. Dieude, X. Mariette, S. L. Bridges, Jr., A. Zhernakova, R. E. Toes, P. P. Tak, C. Miceli-Richard, S. Y. Bang, H. S. Lee, J. Martin, M. A. Gonzalez-Gay, L. Rodriguez-Rodriguez, S. Rantapaa-Dahlqvist, L. Arlestig, H. K. Choi, Y. Kamatani, P. Galan, M. Lathrop, Raci consortium, Garnet consortium, S. Eyre, J. Bowes, A. Barton, N. de Vries, L. W. Moreland, L. A. Criswell, E. W. Karlson, A. Taniguchi, R. Yamada, M. Kubo, J. S. Liu, S. C. Bae, J. Worthington, L. Padyukov, L. Klareskog, P. K. Gregersen, S. Raychaudhuri, B. E. Stranger, P. L. De Jager, L. Franke, P. M. Visscher, M. A. Brown, H. Yamanaka, T. Mimori, A. Takahashi, H. Xu, T. W. Behrens, K. A. Siminovitch, S. Momohara, F. Matsuda, K. Yamamoto, and R. M. Plenge. 2014. 'Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery', *Nature*, 506: 376-81.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, and R. Nakaya. 1990. 'A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice', *Gastroenterology*, 98: 694-702.
- Okubo, K., T. Takahashi, F. Sekiguchi, D. Kanaoka, M. Matsunami, T. Ohkubo, J. Yamazaki, N. Fukushima, S. Yoshida, and A. Kawabata. 2011. 'Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats', *Neuroscience*, 188: 148-56.
- 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 Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels', *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 562-8.

- Olson, P. A., T. Tkatch, S. Hernandez-Lopez, S. Ulrich, E. Ilijic, E. Mugnaini, H. Zhang, I. Bezprozvanny, and D. J. Surmeier. 2005. 'G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain', *J Neurosci*, 25: 1050-62.
- Olsson, L. M., A. Nerstedt, A. K. Lindqvist, S. C. Johansson, P. Medstrand, P. Olofsson, and R. Holmdahl. 2012. 'Copy number variation of the gene NCF1 is associated with rheumatoid arthritis', *Antioxid Redox Signal*, 16: 71-8.
- Orestes, P., D. Bojadzic, J. Lee, E. Leach, R. Salajegheh, M. R. Digruccio, M. T. Nelson, and S. M. Todorovic. 2011. 'Free radical signalling underlies inhibition of CaV3.2 T-type calcium channels by nitrous oxide in the pain pathway', *J Physiol*, 589: 135-48.
- 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. Piro, 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.
- Orholm, M., V. Binder, T. I. Sorensen, L. P. Rasmussen, and K. O. Kyvik. 2000. 'Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study', *Scand J Gastroenterol*, 35: 1075-81.
- Orholm, M., P. Munkholm, E. Langholz, O. H. Nielsen, T. I. Sorensen, and V. Binder. 1991. 'Familial occurrence of inflammatory bowel disease', *N Engl J Med*, 324: 84-8.
- Osiri, M., B. Shea, V. Robinson, M. Suarez-Almazor, V. Strand, P. Tugwell, and G. Wells. 2003. 'Leflunomide for treating rheumatoid arthritis', *Cochrane Database Syst Rev*: CD002047.
- Ostergaard, M., B. Ejbjerg, and M. Szkudlarek. 2005. 'Imaging in early rheumatoid arthritis: roles of magnetic resonance imaging, ultrasonography, conventional radiography and computed tomography', *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 19: 91-116.
- Ozdil, K., A. Sahin, T. Calhan, R. Kahraman, A. Nigdelioglu, U. Akyuz, and H. M. Sokmen. 2011. 'The frequency of microscopic and focal active colitis in patients with irritable bowel syndrome', *BMC Gastroenterol*, 11: 96.
- Park, J. Y., H. W. Kang, H. J. Moon, S. U. Huh, S. W. Jeong, N. M. Soldatov, and J. H. Lee. 2006. 'Activation of protein kinase C augments T-type Ca<sup>2+</sup> channel activity without changing channel surface density', *J Physiol*, 577: 513-23.
- Park, M. I., and M. Camilleri. 2006. 'Is there a role of food allergy in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? A systematic review', *Neurogastroenterol Motil*, 18: 595-607.
- Park, Y. G., H. Y. Park, C. J. Lee, S. Choi, S. Jo, H. Choi, Y. H. Kim, H. S. Shin, R. R. Llinas, and D. Kim. 2010. 'Ca(V)3.1 is a tremor rhythm pacemaker in the inferior olive', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 10731-6.
- Pavelka, K., Jr., K. P. Sen, Z. Peliskova, J. Vacha, and K. Trnavsky. 1989. 'Hydroxychloroquine sulphate in the treatment of rheumatoid arthritis: a double blind comparison of two dose regimens', *Ann Rheum Dis*, 48: 542-6.
- Pearson, C. M. 1956. 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants', *Proc Soc Exp Biol Med*, 91: 95-101.
- Pejovic, M., A. Stankovic, and D. R. Mitrovic. 1992. 'Lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis', *J Rheumatol*, 19: 529-33.
- Peloquin, J. B., H. Khosravani, W. Barr, C. Bladen, R. Evans, J. Mezeyova, D. Parker, T. P. Snutch, J. E. McRory, and G. W. Zamponi. 2006. 'Functional analysis of Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy', *Epilepsia*, 47: 655-8.
- Perez-Reyes, E. 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.
- Pollard, L. C., F. Ibrahim, E. H. Choy, and D. L. Scott. 2012. 'Pain thresholds in rheumatoid arthritis: the effect of tender point counts and disease duration', *J Rheumatol*, 39: 28-31.

- Porter, C. K., D. R. Tribble, P. A. Aliaga, H. A. Halvorson, and M. S. Riddle. 2008. 'Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 135: 781-6.
- Probert, C. S., V. Jayanthi, A. O. Hughes, J. R. Thompson, A. C. Wicks, and J. F. Mayberry. 1993. 'Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire', *Gut*, 34: 1547-51.
- Pullar, T., J. A. Hunter, and H. A. Capell. 1983. 'Sulphasalazine in rheumatoid arthritis: a double blind comparison of sulphasalazine with placebo and sodium aurothiomalate', *Br Med J (Clin Res Ed)*, 287: 1102-4.
- Qin, H. Y., J. C. Wu, X. D. Tong, J. J. Sung, H. X. Xu, and Z. X. Bian. 2011. 'Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome', *J Gastroenterol*, 46: 164-74.
- Raghavendra, V., F. Tanga, and J. A. DeLeo. 2003. 'Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy', *J Pharmacol Exp Ther*, 306: 624-30.
- Rainsford, K. D. 2007. 'Anti-inflammatory drugs in the 21st century', *Subcell Biochem*, 42: 3-27.
- Rantapaa-Dahlqvist, S., B. A. de Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U. Sundin, and W. J. van Venrooij. 2003. 'Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 48: 2741-9.
- Rao, S. S., N. W. Read, P. A. Davison, J. J. Bannister, and C. D. Holdsworth. 1987. 'Anorectal sensitivity and responses to rectal distention in patients with ulcerative colitis', *Gastroenterology*, 93: 1270-5.
- Rehak, R., T. M. Bartoletti, J. D. Engbers, G. Berecki, R. W. Turner, and G. W. Zamponi. 2013. 'Low voltage activation of KCa1.1 current by Cav3-KCa1.1 complexes', *PLoS One*, 8: e61844.
- Rein, P., and R. B. Mueller. 2017. 'Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview', *Rheumatol Ther*.
- Ritchie, J. 1973. 'Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome', *Gut*, 14: 125-32.
- Ropert, A., and G. Bouguen. 2009. '[Intestinal motility disorders and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome]', *Gastroenterol Clin Biol*, 33 Suppl 1: S35-9.
- Ruiz Garcia, V., A. Burls, J. B. Cabello, P. Vela Casasempere, S. Bort-Marti, and J. A. Bernal. 2017. 'Certolizumab pegol (CDP870) for rheumatoid arthritis in adults', *Cochrane Database Syst Rev*, 9: CD007649.
- Russel, M. G., E. Dorant, R. J. Brummer, M. A. van de Kruijs, J. W. Muris, J. M. Bergers, J. Goedhard, and R. W. Stockbrugger. 1997. 'Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group', *Gastroenterology*, 113: 377-82.
- Rzhepetskyy, Y., J. Lazniewska, I. Blesneac, R. Pamphlett, and N. Weiss. 2016. 'CACNA1H missense mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis alter Cav3.2 T-type calcium channel activity and reticular thalamic neuron firing', *Channels (Austin)*, 10: 466-77.
- Saag, K. G., L. A. Criswell, K. M. Sems, M. D. Nettleman, and S. Kolluri. 1996. 'Low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis. A meta-analysis of their moderate-term effectiveness', *Arthritis Rheum*, 39: 1818-25.
- Saber, T., D. J. Veale, E. Balogh, J. McCormick, S. NicAnUltaigh, M. Connolly, and U. Fearon. 2011. 'Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis', *PLoS One*, 6: e23540.
- Saegusa, H., T. Kurihara, S. Zong, A. Kazuno, Y. Matsuda, T. Nonaka, W. Han, H. Toriyama, and T. Tanabe. 2001. 'Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel', *EMBO J*, 20: 2349-56.
- Saegusa, H., Y. Matsuda, and T. Tanabe. 2002. 'Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission', *Neurosci Res*, 43: 1-7.

- Saito, Y. A., and N. J. Talley. 2008. 'Genetics of irritable bowel syndrome', *Am J Gastroenterol*, 103: 2100-4; quiz 05.
- Samad, T. A., A. Sapirstein, and C. J. Woolf. 2002. 'Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets', *Trends Mol Med*, 8: 390-6.
- Samour, M. S., S. S. Nagi, and D. A. Mahns. 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.
- Santi, C. M., F. S. Cayabyab, K. G. Sutton, J. E. McRory, J. Mezeyova, K. S. Hamming, D. Parker, A. Stea, and T. P. Snutch. 2002. 'Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics', *J Neurosci*, 22: 396-403.
- Sany, J. 1999. '[Therapeutic immuno-intervention in rheumatoid polyarthritis]', *Rev Med Interne*, 20 Suppl 1: 33S-34S.
- Satsangi, J., M. S. Silverberg, S. Vermeire, and J. F. Colombel. 2006. 'The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications', *Gut*, 55: 749-53.
- Scanzi, J., A. Accarie, E. Muller, B. Pereira, Y. Aissouni, M. Goutte, J. Joubert-Zakey, E. Picard, L. Boudieu, C. Mallet, A. Gelot, D. Ardid, F. A. Carvalho, and M. Dapoigny. 2016. 'Colonic overexpression of the T-type calcium channel Cav 3.2 in a mouse model of visceral hypersensitivity and in irritable bowel syndrome patients', *Neurogastroenterol Motil*, 28: 1632-40.
- Schaible, H. G. 2014. 'Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis', *Arthritis Res Ther*, 16: 470.
- Schaible, H. G., G. S. von Banchet, M. K. Boettger, R. Brauer, M. Gajda, F. Richter, S. Hensellek, D. Brenn, and G. Natura. 2010. 'The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain', *Ann N Y Acad Sci*, 1193: 60-9.
- Schellekens, G. A., H. Visser, B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, J. M. Hazes, F. C. Breedveld, and W. J. van Venrooij. 2000. 'The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide', *Arthritis Rheum*, 43: 155-63.
- Scher, J. U., A. Sczesnak, R. S. Longman, N. Segata, C. Ubeda, C. Bielski, T. Rostron, V. Cerundolo, E. G. Pamer, S. B. Abramson, C. Huttenhower, and D. R. Littman. 2013. 'Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis', *Elife*, 2: e01202.
- Schett, G., C. Stach, J. Zwerina, R. Voll, and B. Manger. 2008. 'How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 58: 2936-48.
- Schett, G., and S. L. Teitelbaum. 2009. 'Osteoclasts and arthritis', *J Bone Miner Res*, 24: 1142-6.
- Schirbel, A., A. Reichert, S. Roll, D. C. Baumgart, C. Buning, B. Wittig, B. Wiedenmann, A. Dignass, and A. Sturm. 2010. 'Impact of pain on health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease', *World J Gastroenterol*, 16: 3168-77.
- Scott, D. L., P. T. Dawes, E. Tunn, P. D. Fowler, M. F. Shadforth, J. Fisher, S. Clarke, M. Collins, P. Jones, A. J. Popert, and *et al.* 1989. 'Combination therapy with gold and hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis: a prospective, randomized, placebo-controlled study', *Br J Rheumatol*, 28: 128-33.
- Sekiguchi, F., and A. Kawabata. 2013. 'T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling', *J Pharmacol Sci*, 122: 244-50.
- Serra, J., W. R. Duan, C. Locke, R. Sola, W. Liu, and W. Nothaft. 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.
- Serrano, J. R., S. R. Dashti, E. Perez-Reyes, and S. W. Jones. 2000. 'Mg(2+) block unmasks Ca(2+)/Ba(2+) selectivity of alpha1G T-type calcium channels', *Biophys J*, 79: 3052-62.
- Shetty, A., R. Hanson, P. Korsten, M. Shawagfeh, S. Arami, S. Volkov, O. Vila, W. Swedler, A. N. Shunaigat, S. Smadi, R. Sawaqed, D. Perkins, S. Shahrara, and N. J. Sweiss. 2014. 'Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond', *Drug Des Devel Ther*, 8: 349-64.
- Shin, H. S., E. J. Cheong, S. Choi, J. Lee, and H. S. Na. 2008. 'T-type Ca<sup>2+</sup> channels as therapeutic targets in the nervous system', *Curr Opin Pharmacol*, 8: 33-41.

- Shin, J. B., C. Martinez-Salgado, P. A. Heppenstall, and G. R. Lewin. 2003. 'A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor', *Nat Neurosci*, 6: 724-30.
- Shivananda, S., J. Lennard-Jones, R. Logan, N. Fear, A. Price, L. Carpenter, and M. van Blankenstein. 1996. 'Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)', *Gut*, 39: 690-7.
- Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A. 1997. 'Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III', *Nat Genet*, 17:171-8.
- Simren, M., H. Abrahamsson, and E. S. Bjornsson. 2001. 'An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome', *Gut*, 48: 20-7.
- Sinnegger-Brauns, M. J., A. Hetzenauer, I. G. Huber, E. Renstrom, G. Wietzorrek, S. Berjukov, M. Cavalli, D. Walter, A. Koschak, R. Waldschutz, S. Hering, S. Bova, P. Rorsman, O. Pongs, N. Singewald, and J. Striessnig. 2004. 'Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca<sup>2+</sup> channels', *J Clin Invest*, 113: 1430-9.
- Smolen, J. S., J. R. Kalden, D. L. Scott, B. Rozman, T. K. Kvien, A. Larsen, I. Loew-Friedrich, C. Oed, and R. Rosenburg. 1999. 'Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial. European Leflunomide Study Group', *Lancet*, 353: 259-66.
- Smolen, J. S., R. Landewe, J. Bijlsma, G. Burmester, K. Chatzidionysiou, M. Dougados, J. Nam, S. Ramiro, M. Voshaar, R. van Vollenhoven, D. Aletaha, M. Aringer, M. Boers, C. D. Buckley, F. Buttgereit, V. Bykerk, M. Cardiel, B. Combe, M. Cutolo, Y. van Eijk-Hustings, P. Emery, A. Finckh, C. Gabay, J. Gomez-Reino, L. Gossec, J. E. Gottenberg, J. M. W. Hazes, T. Huizinga, M. Jani, D. Karateev, M. Kouloumas, T. Kvien, Z. Li, X. Mariette, I. McInnes, E. Mysler, P. Nash, K. Pavelka, G. Poor, C. Richez, P. van Riel, A. Rubbert-Roth, K. Saag, J. da Silva, T. Stamm, T. Takeuchi, R. Westhovens, M. de Wit, and D. van der Heijde. 2017. 'EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update', *Ann Rheum Dis*, 76: 960-77.
- Sonnenberg, A., D. J. McCarty, and S. J. Jacobsen. 1991. 'Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States', *Gastroenterology*, 100: 143-9.
- Souza, I. A., M. A. Gandini, M. M. Wan, and G. W. Zamponi. 2016. 'Two heterozygous Cav3.2 channel mutations in a pediatric chronic pain patient: recording condition-dependent biophysical effects', *Pflugers Arch*, 468: 635-42.
- Spiller, R., and K. Garsed. 2009. 'Postinfectious irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 136: 1979-88.
- Stacher, G. 2007. 'Cilansetron in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome?', *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1: 15-27.
- Stahl, E. A., S. Raychaudhuri, E. F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B. P. Thomson, Y. Li, F. A. Kurreeman, A. Zhernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C. I. Amos, K. G. Ardlie, Birac Consortium, A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N. P. Burt, J. J. Catanese, J. Coblyn, M. J. Coenen, K. H. Costenbader, L. A. Criswell, J. B. Crusius, J. Cui, P. I. de Bakker, P. L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L. J. Hocking, T. W. Huizinga, D. L. Kastner, X. Ke, A. T. Lee, X. Liu, P. Martin, A. W. Morgan, L. Padyukov, M. D. Posthumus, T. R. Radstake, D. M. Reid, M. Seielstad, M. F. Seldin, N. A. Shadick, S. Steer, P. P. Tak, W. Thomson, A. H. van der Helm-van Mil, I. E. van der Horst-Bruinsma, C. E. van der Schoot, P. L. van Riel, M. E. Weinblatt, A. G. Wilson, G. J. Wolbink, B. P. Wordsworth, Year Consortium, C. Wijmenga, E. W. Karlson, R. E. Toes, N. de Vries, A. B. Begovich, J. Worthington, K. A. Siminovitch, P. K. Gregersen, L. Klareskog, and R. M. Plenge. 2010. 'Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci', *Nat Genet*, 42: 508-14.
- Steinberg, K. M., B. Yu, D. C. Koboldt, E. R. Mardis, and R. Pamphlett. 2015. 'Exome sequencing of case- unaffected-parents trios reveals recessive and de novo genetic variants in sporadic ALS', *Sci Rep*, 5: 9124.

- Stengel, W., M. Jainz, and K. Andreas. 1998. 'Different potencies of dihydropyridine derivatives in blocking T-type but not L-type Ca<sup>2+</sup> channels in neuroblastoma-glioma hybrid cells', *Eur J Pharmacol*, 342: 339-45.
- 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.
- Streng, T., H. E. Axelsson, P. Hedlund, D. A. Andersson, S. E. Jordt, S. Bevan, K. E. Andersson, E. D. Hogestatt, and P. M. Zygmunt. 2008. 'Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder', *Eur Urol*, 53: 391-9.
- Studentic, P., H. Radner, J. S. Smolen, and D. Aletaha. 2012. 'Discrepancies between patients and physicians in their perceptions of rheumatoid arthritis disease activity', *Arthritis Rheum*, 64: 2814-23.
- Sturgeon, J. A., P. H. Finan, and A. J. Zautra. 2016. 'Affective disturbance in rheumatoid arthritis: psychological and disease-related pathways', *Nat Rev Rheumatol*, 12: 532-42.
- Suarez-Almazor, M. E., C. Spooner, and E. Belseck. 2000. 'Azathioprine for treating rheumatoid arthritis', *Cochrane Database Syst Rev*: CD001461.
- 'Sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. The Australian Multicentre Clinical Trial Group'. 1992. *J Rheumatol*, 19: 1672-7.
- Surdea-Blaga, T., A. Baban, and D. L. Dumitrascu. 2012. 'Psychosocial determinants of irritable bowel syndrome', *World J Gastroenterol*, 18: 616-26.
- Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, and H. Lochs. 2002. 'Mucosal flora in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 122: 44-54.
- Tabas, I., and C. K. Glass. 2013. 'Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities', *Science*, 339: 166-72.
- Tack, J. 2011. 'Antibiotic therapy for the irritable bowel syndrome', *N Engl J Med*, 364: 81-2.
- Takahashi, T., Y. Aoki, K. Okubo, Y. Maeda, F. Sekiguchi, K. Mitani, H. Nishikawa, and A. Kawabata. 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.
- Takahashi, T., and A. Momiyama. 1993. 'Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission', *Nature*, 366: 156-8.
- 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.
- 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.
- ten Klooster, P. M., M. M. Veehof, E. Taal, P. L. van Riel, and M. A. van de Laar. 2007. 'Changes in priorities for improvement in patients with rheumatoid arthritis during 1 year of anti-tumour necrosis factor treatment', *Ann Rheum Dis*, 66: 1485-90.
- Terada, Y., M. Fujimura, S. Nishimura, M. Tsubota, F. Sekiguchi, and A. Kawabata. 2015. 'Roles of Cav3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis', *J Neurosci Res*, 93: 361-9.
- Thabane, M., and J. K. Marshall. 2009. 'Post-infectious irritable bowel syndrome', *World J Gastroenterol*, 15: 3591-6.
- Thome, R., S. C. Lopes, F. T. Costa, and L. Verinaud. 2013. 'Chloroquine: modes of action of an undervalued drug', *Immunol Lett*, 153: 50-7.
- Thursby, E., and N. Juge. 2017. 'Introduction to the human gut microbiota', *Biochem J*, 474: 1823-36.
- Tjolsen, A., O. G. Berge, S. Hunnskaar, J. H. Rosland, and K. Hole. 1992. 'The formalin test: an evaluation of the method', *Pain*, 51: 5-17.
- Todorovic, S. M., and V. Jevtovic-Todorovic. 2011. 'T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies', *Br J Pharmacol*, 163: 484-95.

- . 2013. 'Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling', *Pflugers Arch*, 465: 921-7.
- Todorovic, S. M., V. Jevtovic-Todorovic, S. Mennerick, E. Perez-Reyes, and C. F. Zorumski. 2001. 'Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide', *Mol Pharmacol*, 60: 603-10.
- 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.
- Traboulsie, A., J. Chemin, M. Chevalier, J. F. Quignard, J. Nargeot, and P. Lory. 2007. 'Subunit-specific modulation of T-type calcium channels by zinc', *J Physiol*, 578: 159-71.
- Treede, R. D., W. Rief, A. Barke, Q. Aziz, M. I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, S. Evers, N. B. Finnerup, M. B. First, M. A. Giamberardino, S. Kaasa, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, S. Perrot, J. Scholz, S. Schug, B. H. Smith, P. Svensson, J. W. Vlaeyen, and S. J. Wang. 2015. 'A classification of chronic pain for ICD-11', *Pain*, 156: 1003-7.
- Trimble, K. C., R. Farouk, A. Pryde, S. Douglas, and R. C. Heading. 1995. 'Heightened visceral sensation in functional gastrointestinal disease is not site-specific. Evidence for a generalized disorder of gut sensitivity', *Dig Dis Sci*, 40: 1607-13.
- 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.
- Trnavsky, K., J. Gatterova, M. Linduskova, and Z. Peliskova. 1993. 'Combination therapy with hydroxychloroquine and methotrexate in rheumatoid arthritis', *Z Rheumatol*, 52: 292-6.
- Tsantoulas, C., S. Lainez, S. Wong, I. Mehta, B. Vilar, and P. A. McNaughton. 2017. 'Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels drive pain in mouse models of diabetic neuropathy', *Sci Transl Med*, 9: eaam6072.
- Tsubota-Matsunami, M., Y. Noguchi, Y. Okawa, F. Sekiguchi, and A. Kawabata. 2012. 'Colonic hydrogen sulfide-induced visceral pain and referred hyperalgesia involve activation of both Ca(v)3.2 and TRPA1 channels in mice', *J Pharmacol Sci*, 119: 293-6.
- Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter, and K. Inoue. 2003. 'P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury', *Nature*, 424: 778-83.
- Uebele, V. N., A. L. Gotter, C. E. Nuss, R. L. Kraus, S. M. Doran, S. L. Garson, D. R. Reiss, Y. Li, J. C. Barrow, T. S. Reger, Z. Q. Yang, J. E. Ballard, C. Tang, J. M. Metzger, S. P. Wang, K. S. Koblan, and J. J. Renger. 2009. 'Antagonism of T-type calcium channels inhibits high-fat diet-induced weight gain in mice', *J Clin Invest*, 119: 1659-67.
- van 't Land, H., J. Verdurmen, M. Ten Have, S. van Dorsselaer, A. Beekman, and R. de Graaf. 2010. 'The association between arthritis and psychiatric disorders; results from a longitudinal population-based study', *J Psychosom Res*, 68: 187-93.
- van der Helm-van Mil, A. H., K. N. Verpoort, F. C. Breedveld, T. W. Huizinga, R. E. Toes, and R. R. de Vries. 2006. 'The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 54: 1117-21.
- van Everdingen, A. A., J. W. Jacobs, D. R. Siewertsz Van Reesema, and J. W. Bijlsma. 2002. 'Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial', *Ann Intern Med*, 136: 1-12.
- van Loo, K. M., C. Schaub, K. Pernhorst, Y. Yaari, H. Beck, S. Schoch, and A. J. Becker. 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.
- Verne, G. N., M. E. Robinson, L. Vase, and D. D. Price. 2003. 'Reversal of visceral and cutaneous hyperalgesia by local rectal anesthesia in irritable bowel syndrome (IBS) patients', *Pain*, 105: 223-30.
- Verpoort, K. N., E. A. Papendrecht-van der Voort, A. H. van der Helm-van Mil, C. M. Jol-van der Zijde, M. J. van Tol, J. W. Drijfhout, F. C. Breedveld, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, and R. E. Toes. 2007. 'Association of smoking with the constitution of the anti-cyclic citrullinated peptide response in the absence of HLA-DRB1 shared epitope alleles', *Arthritis Rheum*, 56: 2913-8.
- Vignali, S., V. Leiss, R. Karl, F. Hofmann, and A. Welling. 2006. 'Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells', *J Physiol*, 572: 691-706.
- Vos, K., R. M. Thurlings, C. A. Wijbrandts, D. van Schaardenburg, D. M. Gerlag, and P. P. Tak. 2007. 'Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 56: 772-8.
- Waksman, B. H. 2002. 'Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis', *Scand J Immunol*, 56: 12-34.
- Walker, A. M., D. Funch, N. A. Dreyer, K. G. Tolman, J. M. Kremer, G. S. Alarcon, R. G. Lee, and M. E. Weinblatt. 1993. 'Determinants of serious liver disease among patients receiving low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 36: 329-35.
- Walsh, D. A., and D. F. McWilliams. 2014. 'Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis', *Nat Rev Rheumatol*, 10: 581-92.
- Walsh, M. A., B. A. Graham, A. M. Brichta, and R. J. Callister. 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.
- Wang, H., X. Zhang, L. Xue, J. Xing, M. H. Jouvin, J. W. Putney, M. P. Anderson, M. Trebak, and J. P. Kinet. 2016. 'Low-Voltage-Activated CaV3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles', *Immunity*, 44: 782-94.
- Watkins, L. R., and S. F. Maier. 2003. 'Glia: a novel drug discovery target for clinical pain', *Nat Rev Drug Discov*, 2: 973-85.
- Webb, A. N., R. H. Kukuruzovic, A. G. Catto-Smith, and S. M. Sawyer. 2007. 'Hypnotherapy for treatment of irritable bowel syndrome', *Cochrane Database Syst Rev*: CD005110.
- Weiergraber, M., M. Henry, K. Radhakrishnan, J. Hescheler, and T. Schneider. 2007. 'Hippocampal seizure resistance and reduced neuronal excitotoxicity in mice lacking the Cav2.3 E/R-type voltage-gated calcium channel', *J Neurophysiol*, 97: 3660-9.
- Weinblatt, M. E., J. M. Kremer, A. D. Bankhurst, K. J. Bulpitt, R. M. Fleischmann, R. I. Fox, C. G. Jackson, M. Lange, and D. J. Burge. 1999. 'A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate', *N Engl J Med*, 340: 253-9.
- 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.
- Weiss, N., and M. De Waard. 2006. '[Voltage-dependent calcium channels at the heart of pain perception]', *Med Sci (Paris)*, 22: 396-404.
- Weiss, N., S. Hameed, J. M. Fernandez-Fernandez, K. Fablet, M. Karmazinova, C. Poillot, J. Proft, L. Chen, I. Bidaud, A. Monteil, S. Huc-Brandt, L. Lacinova, P. Lory, G. W. Zamponi, and M. De Waard. 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.
- Weiss, N., and G. W. Zamponi. 2013. 'Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels', *Biochim Biophys Acta*, 1828: 1579-86.
- Wellems, T. E. 1992. 'Malaria. How chloroquine works', *Nature*, 355: 108-9.

- Wen, X. J., S. Y. Xu, Z. X. Chen, C. X. Yang, H. Liang, and H. Li. 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.
- White, J. A., B. C. McKinney, M. C. John, P. A. Powers, T. J. Kamp, and G. G. Murphy. 2008. 'Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V 1.2 disrupts remote spatial memories in mice', *Learn Mem*, 15: 1-5.
- Whitehead, W. E., M. D. Crowell, J. C. Robinson, B. R. Heller, and M. M. Schuster. 1992. 'Effects of stressful life events on bowel symptoms: subjects with irritable bowel syndrome compared with subjects without bowel dysfunction', *Gut*, 33: 825-30.
- Wigger, A., and I. D. Neumann. 1999. 'Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats', *Physiol Behav*, 66: 293-302.
- Wilder-Smith, C. H., D. Schindler, K. Lovblad, S. M. Redmond, and A. Nirikko. 2004. 'Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls', *Gut*, 53: 1595-601.
- Wilkins, T., K. Jarvis, and J. Patel. 2011. 'Diagnosis and management of Crohn's disease', *Am Fam Physician*, 84: 1365-75.
- Williams, H. J., J. R. Ward, S. L. Dahl, D. O. Clegg, R. F. Willkens, T. Oglesby, M. H. Weisman, S. Schlegel, R. M. Michaels, M. E. Luggen, and *et al.* 1988. 'A controlled trial comparing sulfasalazine, gold sodium thiomalate, and placebo in rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 31: 702-13.
- Willrich, M. A., D. L. Murray, and M. R. Snyder. 2015. 'Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases', *Transl Res*, 165: 270-82.
- Wittmann, T., L. Paradowski, P. Ducrotte, L. Bueno, and M. C. Andro Delestrain. 2010. 'Clinical trial: the efficacy of alverine citrate/simeticone combination on abdominal pain/discomfort in irritable bowel syndrome--a randomized, double-blind, placebo-controlled study', *Aliment Pharmacol Ther*, 31: 615-24.
- Wolfe, F., K. Michaud, O. Gefeller, and H. K. Choi. 2003. 'Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheum*, 48: 1530-42.
- Woodland, J., D. M. Chaput de Saintonge, S. J. Evans, V. L. Sharman, and H. L. Currey. 1981. 'Azathioprine in rheumatoid arthritis: double-blind study of full versus half doses versus placebo', *Ann Rheum Dis*, 40: 355-9.
- 'World Gastroenterology Organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics'. 2009. *Arab J Gastroenterol*, 10: 33-42.
- Yang, B., X. Zhou, and C. Lan. 2015. 'Changes of cytokine levels in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome', *BMC Gastroenterol*, 15: 43.
- Yeo, L., K. M. Toellner, M. Salmon, A. Filer, C. D. Buckley, K. Raza, and D. Scheel-Toellner. 2011. 'Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis', *Ann Rheum Dis*, 70: 2022-8.
- You, H., V. M. Gadotti, R. R. Petrov, G. W. Zamponi, and P. Diaz. 2011. 'Functional characterization and analgesic effects of mixed cannabinoid receptor/T-type channel ligands', *Mol Pain*, 7: 89.
- 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.
- Yue, J., L. Liu, Z. Liu, B. Shu, and Y. Zhang. 2013. 'Upregulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury', *Spine (Phila Pa 1976)*, 38: 463-70.
- Zamponi, G. W. 2016. 'Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 15: 19-34.
- Zamponi, G. W., J. Striessnig, A. Koschak, and A. C. Dolphin. 2015. 'The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential', *Pharmacol Rev*, 67: 821-70.

- Zhang, L., F. Zhou, Y. Drabsch, R. Gao, B. E. Snaar-Jagalska, C. Mickanin, H. Huang, K. A. Sheppard, J. A. Porter, C. X. Lu, and P. ten Dijke. 2012. 'USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-beta type I receptor', *Nat Cell Biol*, 14: 717-26.
- Zhang, Z., Y. Xu, H. Song, J. Rodriguez, D. Tuteja, Y. Namkung, H. S. Shin, and N. Chiamvimonvat. 2002. 'Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice', *Circ Res*, 90: 981-7.
- Ziegler, D., W. R. Duan, G. An, J. W. Thomas, and W. Nothaft. 2015. 'A randomized double-blind, placebo-, and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain', *Pain*, 156: 2013-20.

---

## Annexe I

---

# Optimization of the synthesis of a key intermediate in the synthesis of glucocorticoids

Romain Jouve<sup>a</sup>, Vincent Thery<sup>a</sup>, Sylvie Ducki<sup>a</sup>, Julie Helfeinbein<sup>b</sup>, Jean-Christophe Thiery<sup>b</sup>, Elodie Picard<sup>c</sup>,  
Christophe Mallet<sup>c</sup>, Isabelle Ripoche<sup>a\*</sup>, Khalil Bennis<sup>a\*</sup>,

<sup>a</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont–Ferrand, France.

<sup>b</sup> Sanofi, Le Bourg, 63480 Vertolaye, France.

<sup>c</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm, Neuro-Dol, F-63000 Clermont-Ferrand

## Abstract

A short and efficient synthesis, based on a one step double elimination, of a key intermediate in the synthesis of various glucocorticosteroids is developed. This method is applied on large scale for a further industrial application. The synthesis allowed use to identified a novel prednisolone derivative and its anti-inflammatory activity in a mice model of inflammation is described. In order to understand the regioselectivity of the double elimination in some conditions, mechanistic studies were investigated and confirmed the experimental results. We also proposed a mechanism for the formation of the new steroid described.

## Keywords

Prednisolone derivatives, Anti-inflammatory activities, Synthesis Optimization, Mechanistic studies  
Elimination reactions, Wagner-Meerwein rearrangement

## Abbreviations

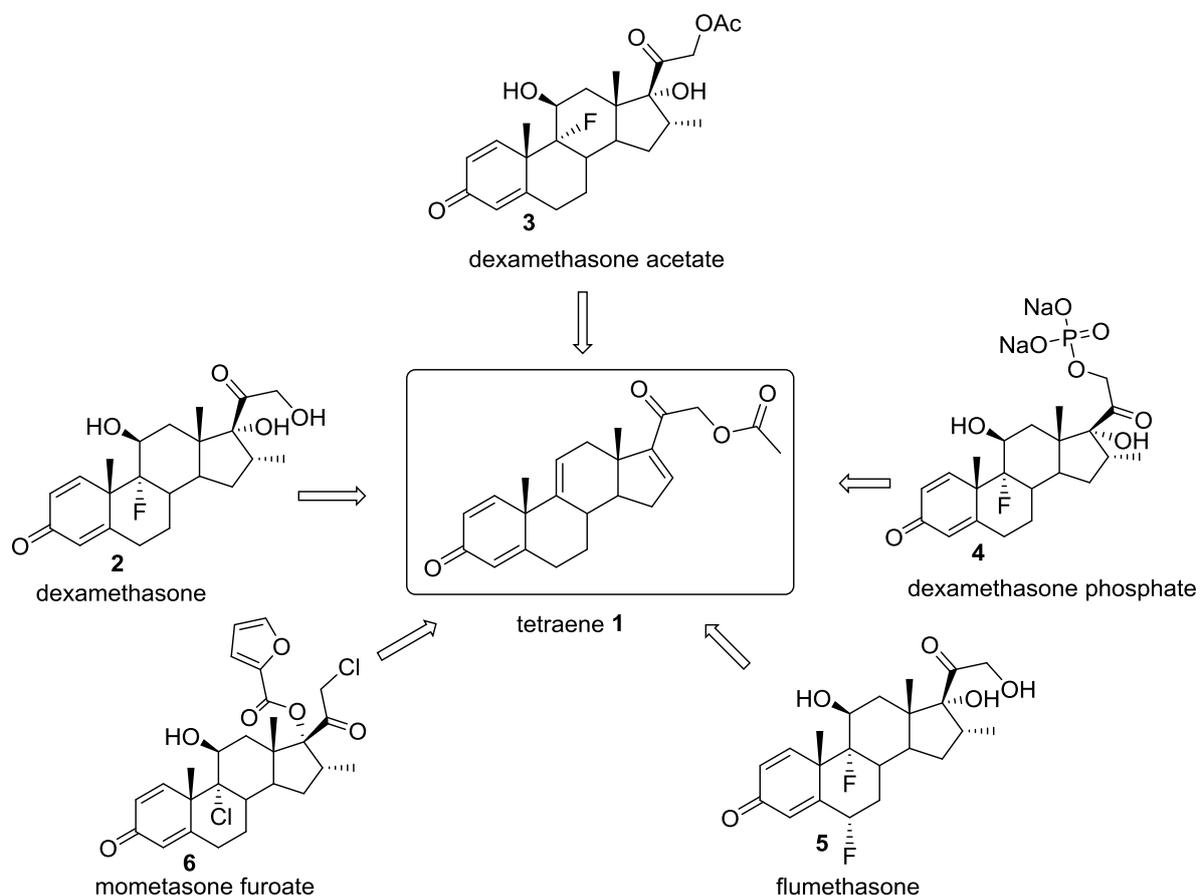
**DBU**: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ene, **DMAP**: *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine, **Ac**: acetyl, **eq**:  
equivalent

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Sanofi for the financial support, Regis Egrot, Mounir Traïka for NMR analyses, Martin Leremboire for mass analyses and Aurélie JOB for preparative HPLC.

## 1. Introduction

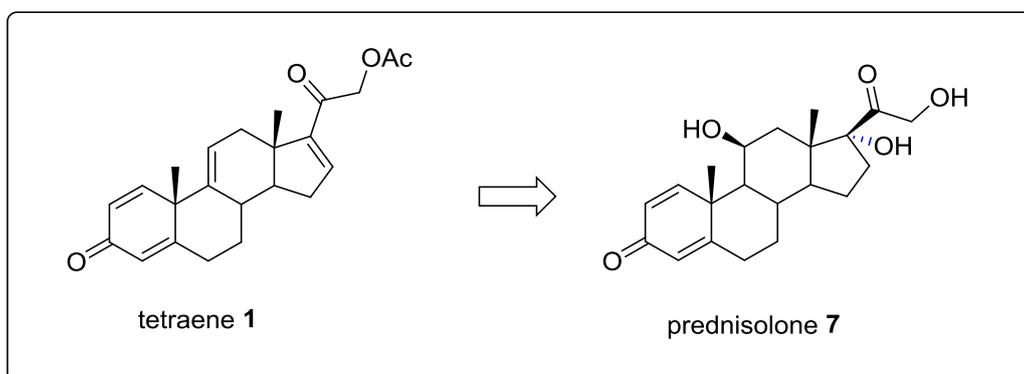
Tetraene **1** is an important industrial cornerstone in the synthesis of numerous bioactive glucocorticoids, such as dexamethasone **2**, derivatives **3** and **4**, flumethasone **5** and mometasone furoate **6** (Figure 1). These glucocorticoids are used as therapeutic agents for the treatment of inflammatory skin disorders and respiratory diseases.



**Scheme 1** examples of glucocorticosteroids synthesized from tetraene **1**

The development of an efficient, robust and economical synthesis of this common intermediate, starting from commercially available prednisolone **7** (Scheme 2) is still a challenge for delivering a resilient and economically viable supply chain for these medicines. Various syntheses of tetraene **1** have been reported but a quicker and cheaper route would offer a substantial business

advantage [1-5]. Indeed, most of these kinds of glucocorticosteroids are actually prepared in multi steps syntheses starting from cortisol derivatives or cholesterol analogues [1].



**Scheme 2:** Synthetic route considered

Among all the syntheses reported to lead to the tetraene **1** starting from prednisolone **7**, the most efficient synthesis described recently [6] uses the Mattox rearrangement. The strategy employed consists in a 3 step-route using successive protection of the primary hydroxyl group, elimination of the hydroxyl group in 11 position and rearrangement of the lateral chain in 17 position affording the tetraene **1** in a moderate yield (54%).

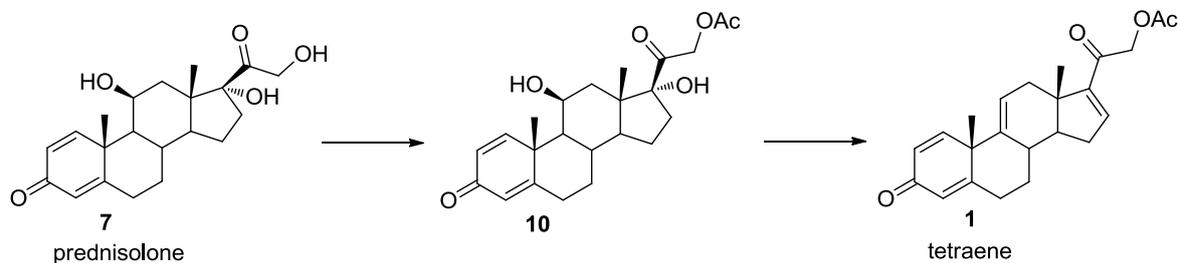
The lack of relevant methods described in the literature, together with potential economic issues with the current methods, brought us to develop a simultaneous elimination of both alcohols (on 9-11 and 16-17 positions) <sup>[7-10]</sup>.

The objective of this work is to optimize a short method to synthesize the key intermediate tetraene **1** starting from commercially available prednisolone **7** and we envisaged to develop a two-step procedure.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemistry

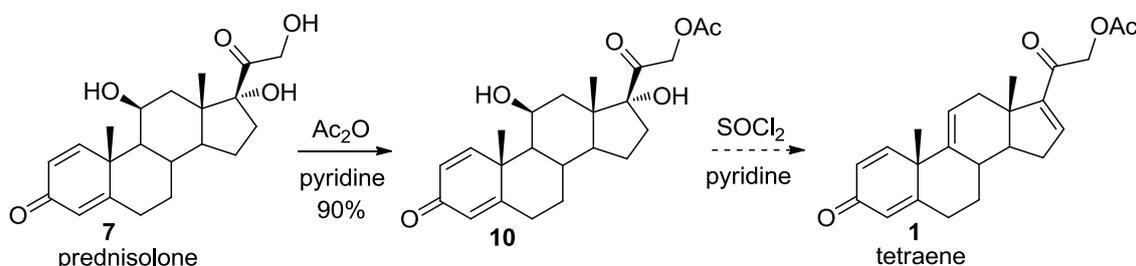
In order to avoid Mattox rearrangement [12], we envisaged first a two-step synthesis consisting in acetylating the hydroxyl group in position 21 and then in making simultaneous dehydration on 9-11 and 16-17 positions (Scheme 3).



**Scheme 3 1** : two-step procedure to prepare tetraene **1**

As the selective acetylation of the alcohol in 21 position has already been described we focused our attention on the “double” elimination on 9-11 and 16-17 positions, which is the key step in the synthesis of compound **1**.

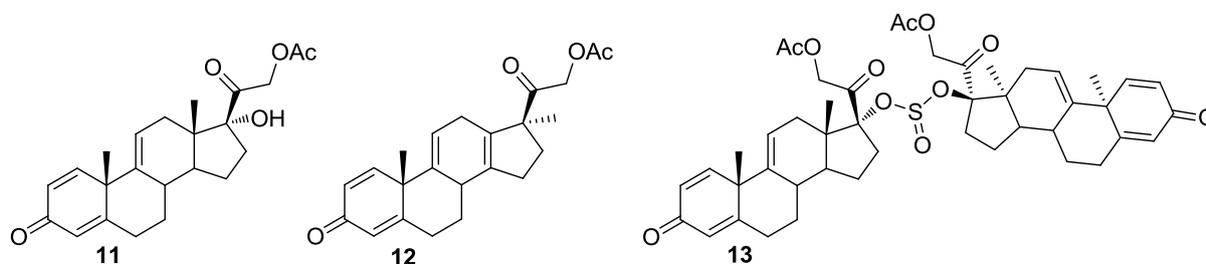
As the lateral chain in 17 position is not stable in various conditions (acidic and basic [11-14]), we first acetylated the primary hydroxyl group using pyridine and acetic anhydride. The desired compound **10** is then obtained in 90% yield.



**Scheme 3:** Synthesis of tetraene **1**

Since the only method described to eliminate simultaneously both alcohols on similar structures without the formation of a leaving group consists in using thionyl chloride in the presence of pyridine, we first applied these conditions on compound **10** [7]. So we first carried out the dehydration using 25 eq of thionyl chloride and pyridine as a solvent. Unfortunately these conditions led mostly to degradation of the media and only a small amount of the desired compound was observed.

Having previously performed similarly studies on other steroids (unpublished results), we decided to carry out the reaction in DMF using 10 eq of pyridine and to study various parameters of the reaction such as the influence of the temperature and quantity of thionyl chloride on the formation of compound **1** (Table 1) . We first made the reaction at 0°C using 3 eq of thionyl chloride (Entry 1), we obtained the desired compound **1** in 34% yield. In addition to the expected tetraene **1**, we observed the formation of by-products. We were able to identify three major by-products (Figure 1): compounds **11**, **12** and **13** characterized by NMR and mass spectroscopy. We identified the by-product **12** as a compound formed *via* a Wagner Meerwein rearrangement. This kind of rearrangement has already been described on steroids [14-22].



**Figure 1:** main by-products identified

In order to limit the degradation and the possible Mattox rearrangement, we envisaged to reduce the quantity of  $\text{SOCl}_2$  (entry 2) but the tetraene **1** was obtained in similar yield (37%).

Entry <sup>a</sup>	Conditions		Ratio of each compound (AUC)				Chemical yield (%) <sup>b</sup>
	T (°C)	SOCl <sub>2</sub> (eq)	% <b>11</b>	% <b>12</b>	% <b>13</b>	% <b>1</b>	
<b>1</b>	0	3	5	12	5	70	<b>34</b>
<b>2</b>		2	2	15	13	5	57
<b>3</b>	20		2	2	38	6	54
<b>4</b>		2.6	0	40	5	55	<b>49</b>
<b>5</b>		4	0	26	2	37	<b>29</b>
<b>6</b>	40	2	9	42	2	46	<b>50</b>

Table 1: dehydration of compound 10 to generate tetraene 1 using 10 eq. of pyridine. a: analytic method (cf. supporting information) ; we calculated the ratio of each compound considering the AUC of major compounds, b: compound **1** was not purified, the chemical yield was calculated using the AUC and the weight of crude product.

To promote the elimination on 16-17 position, the reaction was performed at 20°C using 2 eq of thionyl chloride (entry 3). We observed an increase in the yield of formation of compound **1** (50%) as well as the ratio of compound **12**. To study the influence of the quantity of thionyl chloride on the formation of compound **12**, we performed the dehydration using 2.6 eq. (entry 4) and 4 eq. (entry 5) of thionyl chloride. The ratio between compounds **1** and **12** is almost the same but the use of a higher quantity of thionyl chloride furnished respectively a yield of 49 and 29%.

We also studied the influence of the temperature on the formation of each compound. The reaction performed at 40°C (entry 6) gave a higher ratio of compound **1**, which was obtained in an acceptable yield (50%).

As we obtained similar yields carrying out the reaction at 20°C, 40°C and for economic reasons, we performed the optimization at 20°C.

We then studied the influence of the nature of the base. We chose seven bases according to their pKa values and their structure (steric hindrance) in order to enhance the formation of the desired

compound. The results showed that with bases having pKa values between 5 and 8 (entries 2 to 4, Table 2), the dehydration was efficient, probably due to steric hindrance, the elimination in 16-17 position was not completed. The use of stronger bases such as triethylamine, DMAP or DBU (entries 5 to 7) did not give the desired compound **1** but furnished mostly compound **11** respectively in 26%, 55% and 49% yield.

Entry	Conditions		Ratio of each compound (AUC)				Chemical yield
	Base (eq)	SOCl <sub>2</sub> (eq)	% <b>11</b>	% <b>12</b>	% <b>13</b>	% <b>1</b>	
<b>1</b>	Pyridine (10)	2	2	38	6	54	50%
<b>2</b>	4-Methylpyridine (10)	2	41	22	7	29	34%
<b>3</b>	2,6-Lutidine (10)	2	23	29	2	46	40%
<b>4</b>	<i>N</i> -Methylmorpholine (10)	2	50	15	5	13	14%
<b>5</b>	Triethylamine (10)	2	28	0	10	0	26% ( <b>11</b> )
<b>6</b>	DBU (10)	2	72	0	5	0	55% ( <b>11</b> )
<b>7</b>	DMAP (10)	2	80	0	2	0	49% ( <b>11</b> )

**Table 2:** optimization of the synthesis of compound **1**. a: analytic method (cf. supporting information) ; we calculated the ratio of each compound considering the AUC of major compounds, b: compound **1** was not purified, the chemical yield was calculated using the AUC and the weight of crude product.

According to all the assays on the double dehydration reaction, we found that the treatment of compound **10** in DMF respectively with 10 and 2 eq of pyridine and thionyl chloride at 20°C gave the best results and allowed the formation of compound **1** in 50% yield.

As our goal was to develop a short and efficient synthesis of tetraene **1** applicable to industrial scale, we applied these optimized conditions on a larger scale (30 g) and we manage to obtain the desired compound in 50% yield.

## 2.2. Mechanistic study

To our knowledge, no mechanism has been noticed in literature for elimination using  $\text{SOCl}_2$  and base process on corticosteroids. We will present a molecular modeling study to figure out the mechanism of the elimination of the two hydroxyl groups and to explain the formation of the compound **12**.

All computations were performed with GAUSSIAN 09 rev D03 [23] and the two-layer ONIOM [24, 25] method with mechanical embedding. For the "LOW" layer a classical mechanics force field level UFF [26] was applied with QEQ charges [27]. For the "HIGH" layer, the Density Functional Theory (DFT) [28,29] level with B3LYP [30-33] hybrid functional and 6-31G basis sets were applied. Energy minimizations were performed with the Quadmac option [34]. The thermodynamic corrections were finally applied. All energy values presented below are Gibbs free energy.

The results of the complete reaction path with the transition state (TS) were validated by the Intrinsic Reaction Coordinate (IRC). The initial and final complexes, named "IRC reactant" and "IRC product" respectively, were obtained by minimizing the forward and reverse IRC points. A frequency calculation was done to check the minima and the transition state. All energy values

The chemical system evolves according to chemical reaction. The common model contains one eq of compound **10**, at least one eq of  $\text{SOCl}_2$  and pyridine or pyridinium and 70 molecules of solvent (DMF).

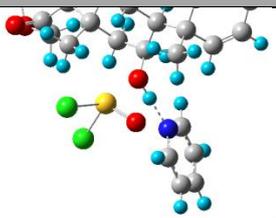
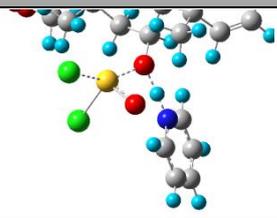
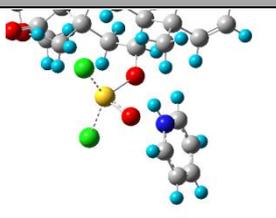
The HIGH layer contains all atoms of compound **10**,  $\text{SOCl}_2$  and pyridine. The LOW layer contains all solvent molecules. The solvent is neither involved directly nor as catalyst in the reaction, and is therefore excluded from the high layer. The solvent is necessary because it provides a constraint in the relative position of pyridine and steroid.

We studied the two-step pathway reaction, the first step consists in the addition of the hydroxyl group on  $\text{SOCl}_2$  and the second step in the elimination of the leaving group formed during the first step.

### 2.2.1. Mechanism of dehydration.

#### 2.2.1.1. Mechanism of addition reaction

Considering the chemical species present at the beginning of the reaction, the first chemical model studied consisted in using one eq of compound **10**, one of  $\text{SOCl}_2$  and one of pyridine, without pyridinium salt.

Position	IRC Reactant	TS	IRC Product
C11-OH			
	0.00	6.01	-0.62
C17-OH	0.00	1.99	3.92

**Table 3:** relative Gibbs Free energy profile in  $\text{Kcal.mol}^{-1}$ . For details see supporting Information Table S1 and S2. For reason of clarity, the solvent molecules are not displayed.

From this first result (table 3), we can conclude that the addition reaction of the hydroxyl group on 11 position on  $\text{SOCl}_2$  is slightly exothermic ( $-0.62 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) with a low activation energy of  $6.01 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ . The reaction is easy and adduct formed is accumulated. *A contrario*, as the energy of the product is higher than the energy of the TS, the addition on the hydroxyl group on 17 position couldn't occur. Considering these results, we can affirm that at the beginning of the reaction, the addition could occur on 11 position, but not on 17 position.

The difference of reactivity could be explained by the stabilization of the leaving chloride ion, less favorable on 17 than on 11 position (Supporting information: table S1, S2 and S3). We then added one eq of pyridinium salt, which can represent the situation at half of the reaction. After minimization, we obtained the product directly without going through a transition state (

Table 4). In this case, we observed an exothermic reaction. In both cases, the addition reaction is also easy (no TS) but more exothermic on 17 than on 11 position (Table 4).

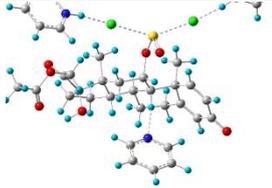
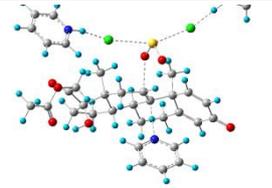
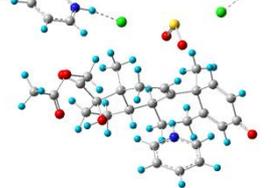
These results are compatible with the experimental results (Table 1) which show that the elimination at the 11 position is carried out first (presence of product **11**), while the elimination on 17 position takes place in a second time.

	Reactant	Minimized Product
C11-OH $\Delta G$ en Kcal.mol <sup>-1</sup>	0.00	-30.20
C17-OH $\Delta G$ en Kcal.mol <sup>-1</sup>	0.00	-71.69

**Table 4** : Gibbs free energy with one eq of pyridinium. The energy of the Reactant column is obtained with one system in which the leaving chloride does not interact with the pyridium.

#### 2.2.1.2. Mechanism of elimination reaction

For the second step, the chemical system is constituted with one eq of CLOS-O-C(11/17)-compound **10**, two eq of pyridinium, one eq of pyridine and one eq of chloride ion. The elimination step on both positions (11 or 17) was carried out with the presence of a free hydroxyl group on the other position.

Position	IRC Reactant	TS	IRC Product
C9-C11 elimination			
	0.00	16.30	-4.17
C16-C17 elimination	0.00	18.16	-6.15

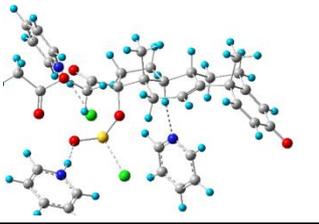
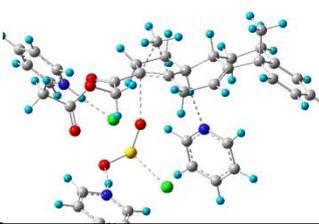
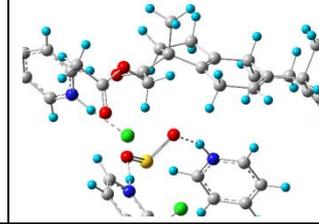
**Table 5**: Gibbs free energy profile of elimination reaction on C9-C11 and C16-C17 position.

The energy profiles (Table 5) of the elimination in both positions are very similar. The difference of the two activation energies between the two positions is low (1.8 Kcal.mol<sup>-1</sup>) but in favor of elimination on 9-11 position, whereas the elimination on 16-17 position product is slightly more stable (2 Kcal.mol<sup>-1</sup>). It can be noted that, in the absence of a second pyridinium eq, (Supporting information table S7) the elimination reaction in 16-17 position is endothermic (+7.6 Kcal.mol<sup>-1</sup>) and the energy of the TS is higher (by 9.8 Kcal. Mol<sup>-1</sup> (27.1 Kcal.mol<sup>-1</sup>).

The availability of counterion (pyridinium salt) seems to be determinant in the reactivity of the 17 position. We studied the mechanism in details, and we demonstrated that pyridinium is formed simultaneously with the leaving of chloride ion. Considering the geometry of the molecule, the counter ion formed can't stabilize the leaving chloride. We also showed that the stabilization of the leaving chloride by one eq of pyridinium chloride is necessary for the reaction to proceed. This means that two eqs of pyridinium chloride must be formed before the elimination reaction in position 16-17 could proceed.

### 2.2.2. Mechanism of Wagner Meerwein rearrangement

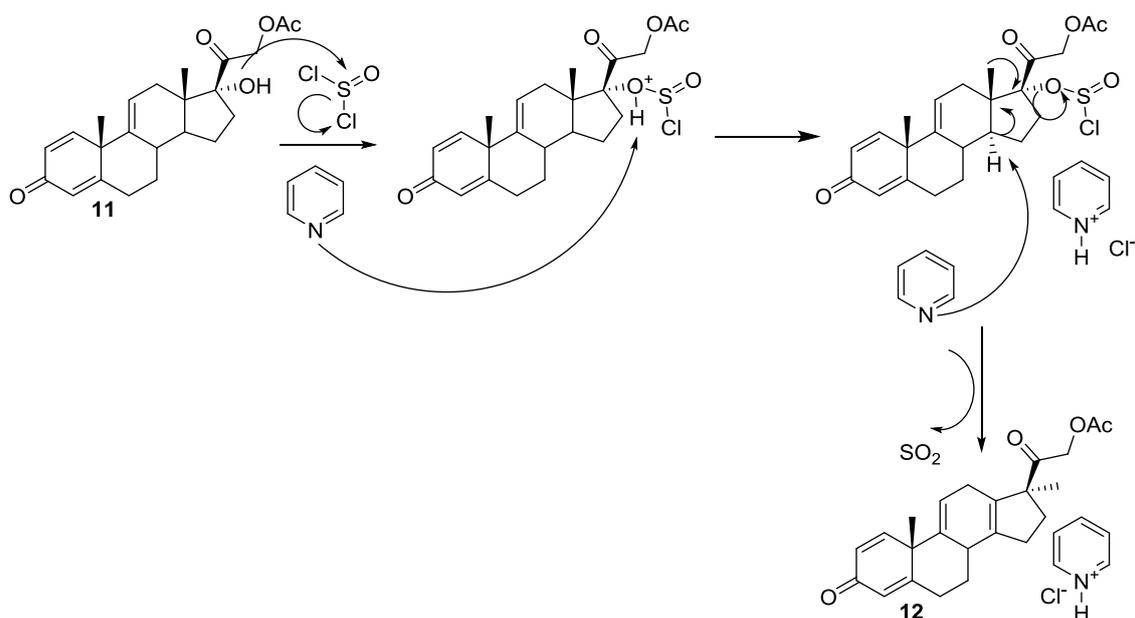
The Wagner-Meerwein rearrangement, only observed on 17 position, seems to be a competitive reaction. To study this rearrangement, we considered a model system with the "mono dehydrated" compound **11**, two eqs of pyridinium, one of pyridine and one eq of chloride ion.

Position	IRC Reactant	TS	IRC Product
C18-C17 transposition			
	0.00	33.84	-30.03

**Table 7** : Gibbs free energy profile of Wagner-Meerwein rearrangement

The results showed that the reaction is exothermic (Table 7,  $-30 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ), but needs a relatively high activation energy (30 Kcal). By comparing to the energy profiles of the two competing reactions, we can conclude that the elimination product is be the kinetic product (TS at 18.16 vs 33.84) and the rearrangement product is be the thermodynamic product ( $-30.03$  vs  $-6.15$ ). These results are consistent with the experimental results in Table 1 (entry 1, 3 and 6).

The proposed mechanism for the formation of the compound **12** is a Wagner Meerwein rearrangement on compound **11**.

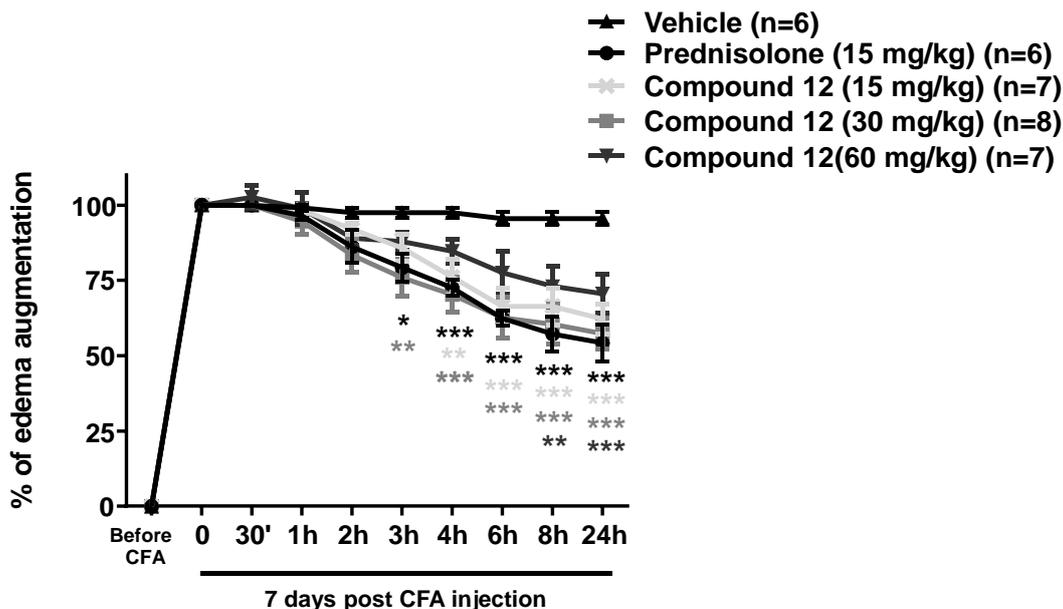


**Scheme 6:** Mechanism for the formation of compound **12**

### 2.3. Anti-inflammatory activity

We investigated the anti-inflammatory effect of compound **12** in a mice model of inflammation. For this purpose, intraperitoneal administration of vehicle, prednisolone (15 mg/kg) or compound **12** (15, 30 or 60 mg/kg) was evaluated on paw edema induced by CFA-treated mice.

In all groups, a significant increase in the paw size is observed 7 days after intraplantar CFA injection. At day 7, while intraperitoneal injection of vehicle did not modify paw volume, the administration of prednisolone or compound **12** induced a significant reduction of edema (Figure 4). This effect is maintained up to 24 hours.



**Figure 4.** Anti-inflammatory effect on CFA-induced edema. Percentage of edema augmentation after intraperitoneal drug administration. Tests were performed on C57BL6/J mice 7 days after CFA injection. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to vehicle groups.

### 3. Experiment

#### 3.1. Chemistry

Thin layer chromatography was performed on TLC glass backed silica Duracil UV<sub>254</sub> (Macherey Nagel). Solvents of elution depend on compounds and are indicated in each case. Spots were visualised using UV light (254 nm) before using an ethanolic solution of *para*-anisaldehyde (heating). Purification by column chromatography was carried out on silica gel Kieselgel 60 (0.073-0.230 nm). Flash chromatography was performed with ARMEN Spot using the following column : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel. Purity was controlled by HPLC (Agilent 1100 Series) and >95%. Melting points were determined using a Buchi® and are given uncorrected.

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR, spectra were recorded on a Bruker Advanced spectrometer at 400 and 101 MHz. Chemical shifts  $\delta$  are reported in ppm relative to residual solvent. The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz). The abbreviations used for signal descriptions are as: s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet.

High Resolution Electro-Spray Ionisation Mass Spectra (HR-ESI-MS) were obtained from the 'Centre Régional de Mesures Physiques de l'Université Clermont Auvergne (UCA)).

### 3.2. General procedure for the synthesis of compound **1**

To a solution of prednisolone acetate **10** in anhydrous DMF (10 volume) at various temperature were added anhydrous pyridine (1 eq) then SOCl<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred till consuming of starting material, then water and ethyl acetate were added. Layers were separated and organic layer was washed with 1N HCl. Organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give an orange solid. The crude was purified by flash chromatography (6/4 cyclohexane/ ethyl acetate) to furnish a white solid

#### 3.2.1.2--((10*S*,13*S*)-10,13-dimethyl-3-oxo-6,7,8,10,12,13,14,15-octahydro-3*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl)-2-oxoethyl acetate **1**

m.p. : 171-172°C . <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H-1), 6.74 (dd, 1H, *J* = 3.2, 1.9 Hz, H-16), 6.24 (dd, 1H, *J* = 10.0, 1.8 Hz, H-2), 6.03 (m, 1H, H-4), 5.53 (m, 1H, H-11), 5.00 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H-21), 4.87 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H-21), 2.70 – 2.49 (m, 2H, H-6 + H-12), 2.47 – 2.37 (m, 2H, H-15 + H-7), 2.19 – 2.03 (m, 7H, H-23 + H-12+ H-6+ H-15+ H-8), 1.48 (m, 1H, H-14), 1.39 (s, 3H, H-19), 1.26 – 1.12 (m, 1H, H-7), 0.88 (s, 3H, H-18). EI-MS (M+H) : *m/z* calculated : 367.1865 ; *m/z* found : 367.1775.

#### 3.2.2.2--(10*S*,13*S*)-17-hydroxy-10,13-dimethyl-3-oxo-6,7,8,10,12,13,14,15,16,17-decahydro-3*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl)-2-oxoethyl acetate **11**

m.p.: 220-222°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-1), 6.25 (dd, *J* = 10.0, 1.9 Hz, 1H, H-2), 6.03 (m, 1H, H-4), 5.55 (m, 1H, H-11), 5.03 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, H-21), 4.84 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, H-21), 2.98 – 2.83 (m, 1H, OH), 2.73 (m, 1H, H-16), 2.69 – 2.59 (m, 2H, H-6 + H-12), 2.44 – 2.35 (m, 1H, H-6), 2.34 – 2.24 (m, 1H, H-8), 2.20 – 2.12 (m, 4H, H-23 + H-7), 1.98 – 1.77 (m, 3H, H-15 + H-12 + H14), 1.59 (m, H-16), 1.48 – 1.40 (m, 1H, H-15), 1.38 (s, 3H, H-19), 1.19 (qd, *J* = 12.8, 4.4 Hz, 1H, H-7), 0.64 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 205.5 (C-20), 186.5 (C-3), 170.7 (C-22), 167.5 (C-5), 155.4 (C-1), 142.5 (C-9), 127.1 (C-2), 123.9 (C-4), 121.1 (C-11), 89.8 (C-17), 68.2 (C-21), 48.4 (C-14), 46.9 (C-10), 46.1

(C-13), 37.1 (C-8), 35.2 (C-16 or C-7), 34.9 (C-16 or C-7), 32.5 (C-6 or C-12), 32.3 (C-6 or C-12), 26.9 (C-19), 24.8 (C-15), 20.8 (C-23), 14.5 (C-18). EI-MS (M+H) :  $m/z$  calculated : 385.1970 ;  $m/z$  found : 385.2001.

*3.2.3.2-((10S)-10,17-dimethyl-3-oxo-6,7,8,10,12,15,16,17-octahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)-2-oxoethyl acetate 12*

m.p. : 54-56°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.10 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, H-1), 6.26 (d,  $J = 10.0$ , 1H; H-2), 6.00 (s, 1H, H-4), 5.53 (m, 1H, H-11), 4.74 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, H-21), 4.50 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, H-21), 3.19 (m, 1H, H-8), 2.75 – 2.66 (m, 1H, H-6), 2.66 – 2.54 (m, 2H, H-15 or H-16 + H-12), 2.48 – 2.24 (m, 5H, H-6 + H-7 + H-12 + H-15 + H-16), 2.08 (s, 3H, H-23), 1.77 (m, 1H, H-16), 1.42 (s, 3H, H-19), 1.32 – 1.23 (m, 1H, H-7), 1.19 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  205.7 (C-20), 186.2 (C-3), 170.3 (C-22), 166.0 (C-5), 154.7 (C-1), 140.7 (C-9), 139.4 (C-13), 133.3 (C-14), 127.6 (C-2), 123.9 (C-4), 118.2, (C-11), 65.2 (C-21), 60.9 (C-10), 46.4 (C-17), 35.5 (C-8), 34.9 (C-7 or C-16), 34.5 (C-7 or C-16), 32.5 (C-6 or C-12), 32.3 (C-6 or C-12), 25.0 (C-15), 24.8 (C-23), 20.6 (C-18 or C-19), 20.4 (C-18 or C-19). EI-MS (M+H) :  $m/z$  calculated : 367.1865 ;  $m/z$  found : 367.1801.

*3.2.4.((10S,10'S,13S,13'S)-(sulfinylbis(oxy))bis(10,13-dimethyl-3-oxo-6,7,8,10,12,13,14,15,16,17-decahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthrene-17,17-diyl))bis(2-oxoethane-2,1-diyl) diacetate 13*

Brown oil.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.17 (dd,  $J = 10.0, 6.4$  Hz, 2H, H-1 + H-1'), 6.27 (m, 2H, H-2 + H-2'), 6.09 (d,  $J = 1.0$  Hz, 2H, H-4 + H-4'), 5.56 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H, H-11 + H-11'), 5.09 (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, H-21 or H-21'), 4.97 (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, H-21 or H-21'), 4.93 (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, H-21 or H-21'), 4.85 (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, H-21 or H-21'), 2.93 – 2.84 (m, 2H, H-16 + H-16'), 2.72 – 2.61 (m, 3H, H-6 + H-6' + H-12 or H-12'), 2.49 – 2.41 (m, 3H, H-6 + H-6' + H-7 or H-7'), 2.39 – 2.21 (m, 5H, H-8 + H-8' + H-16 + H-16' + H-15 or H-15'), 2.19 – 2.06 (m, 9H, H-23 + H-23' + H-15 or H-15' + H-12 or H-12' + H-7 or H-7'), 1.99 – 1.94 (m, 2H, H-12 + H-12'), 1.83 – 1.68 (m, 2H, H-14 + H-14'), 1.57 – 1.47 (m, 2H, H-15 + H-15'), 1.41 (s, 3H,

H-19 or H-19'), 1.40 (s, 3H, H-19 or H-19'), 1.26 – 1.16 (m, 2H, H-7 + H-7'), 0.71 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.70 (s, 3H, H-18 or H-18'). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.1 (C-20 or C-20'), 198.9 (C-20 or C-20'), 186.4 (C-3 or C-3'), 186.3 (C-3 or C-3'), 170.7 (C-22 or C-22'), 170.4 (C-22 or C-22'), 166.3 (C-5 or C-5'), 166.1 (C-5 or C-5'), 154.4 (C-1 or C-1'), 154.2 (C-1 or C-1'), 142.5 (C-9 or C-9'), 142.4 (C-9 or C-9'), 127.5 (C-2 or C-2'), 127.4 (C-2 or C-2'), 124.0 (C-4 or C-4'), 123.9 (C-4 or C-4'), 119.8 (C-11 or C-11'), 119.7 (C-11 or C-11'), 99.4 (C-17 or C-17'), 99.0 (C-17 or C-17'), 67.8 (C-21 or C-21'), 67.7 (C-21 or C-21'), 48.7 (C-14 or C-14'), 48.6 (C-14 or C-14'), 48.4 (C-10 or C-10'), 48.3 (C-10 or C-10'), 45.8 (C-13 or C-13'), 45.7 (C-13 or C-13'), 37.0 (C-8 or C-8'), 34.9 (C-7 or C-7' or C-16 or C-16'), 34.8 (C-7 or C-7' or C-16 or C-16'), 34.7 (C-7 or C-7' or C-16 or C-16'), 34.6 (C-7 or C-7' or C-16 or C-16'), 32.1 (C-6 or C-6' or C-12 or C-12'), 32.0 (C-6 or C-6' or C-12 or C-12'), 31.9 (C-6 or C-6' or C-12 or C-12'), 31.8 (C-6 or C-6' or C-12 or C-12'), 26.7 (C-23 or C-23'), 26.6 (C-23 or C-23'), 24.3 (C-15 or C-15'), 24.2 (C-15 or C-15'), 20.4 (C-19 or C-19'), 20.3 (C-19 or C-19'), 13.7 (C-18 or C-18'), 13.5 (C-18 or C-18'). EI-MS (M+H) : *m/z* calculated : 815.3420 ; *m/z* found : 815.3441.

### 3.2.5. Scale-up of the synthesis of compound **1**

To a solution of prednisolone acetate **10** (30 g, 74.5 mmol) in anhydrous DMF (300 ml) at 40°C were added anhydrous pyridine (59 ml, 731 mmol, 9.8 eq) then SOCl<sub>2</sub> (10.8 ml, 149 mmol, 2 éq). The reaction mixture was stirred for 15 min, then water (300 ml) and ethyl acetate (1000 mL) were added. Layers were separated and organic layer was washed with 1N HCl (2\*200 mL). Organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give an orange solid (32 g, 87.4 mmol). The crude was purified by flash chromatography (6/4 cyclohexane/ ethyl acetate) to furnish a white solid (13.6 g, 37.25 mmol, 50 %).

## 4. Conclusion

We described herein an efficient and quick method to prepare the key intermediate tetraene **1** in 50% yield starting from commercially available prednisolone acetate **10**. We confirmed this result on big scale for a subsequent industrial application. We also identify a new compound, the steroid **12**

obtained from compound **11** *via* a Wagner Meerwein rearrangement. This compound showed anti-inflammatory effect in a mice model of inflammation. To complete our study, we proposed mechanisms for the formation of compound **1** and **12** supported with molecular modeling.

## References

- [1] R. E. Schaub, G. R. Allen, M. J. Weiss, Studies in the Synthesis of Triamcinolone. The Ethoxalylolation of 4,9(11),16-Fregnatriene-3,20-dione and 11-Hydroxy-4,16-pregnadiene-3,20-dione, *J. Am. Chem. Soc.* 81 (18) (1959) 4962–4968.
- [2] H. Hofmeister, H. Laurent, G.-A. Hoyer, R. Wiechert, Synthese von 20-Oxo-pregnenen durch Eliminierung der 17-Nitrooxygruppe, *Chem. Ber* 107 (1974) 1235–1244.
- [3] H. Hofmeister, H. Laurent, K. Prezewowsky, R. Wiechert, , Verfahren Zur Herstellung Von 16,17 ungesättigten Steroiden. DE2207420 (A1), August 16, 1973.
- [4] H. Mendelsohn, L. L. Smith, V. E. Origoni, Pregnatetraenes and method of preparing the same. US2864834 (A), December 16, 1958.
- [5] H. Hofmeister, H. Laurent, K. Prezewowsky, R. Wiechert, Verfahren Zur Herstellung Von 16,17 ungesättigten Steroiden. DE2207420 (A1), August 16, 1973.
- [6] D. G. Hulcoop, P. D. P. Shapland, Expedient synthesis of 17 $\alpha$ ,21-dihydroxy-9 $\beta$ ,11 $\beta$ -epoxy-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4-diene-3,20-dione 21-acetate from prednisolone utilising a novel Mattox rearrangement, *Steroids* 78 (2013) 1281–1287.
- [7] W. S. Allen, S. Bernstein, Steroidal Cyclic Ketals. XI. The Preparation of Steroids, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1028–1032.
- [8] S. A. Szpilfogel, V. Gerris, Dehydration of 17 $\beta$ -hydroxy-20-ketopregnanes, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 74 (1955) 1462–1466.
- [9] K. Annen, H. Hofmeister, H. Laurent, R. Wiechert, , Verfahren zur Überführung von 11 $\beta$ ,17 $\beta$ ,21-Trihydroxy-20-oxo-Steroiden in die 21-Chlor-20-oxo- $\Delta^9(11),16$ - Derivative, *Liebigs Ann. Chem.* 5 (1982) 966–972.
- [10] K. Annen, H.; Laurent, H. Hofmeister,, DELTA 9(11) - And DELTA 16-21-chloro-20-keto steroids of the pregnane and D-homopregnane series, their preparation and use as intermediates for the synthesis of highly effective corticoids. US4404141 (A), September 13, 1983.
- [11] V. R. Mattox, Steroids Derived from Bile Acids. XV. The Formation of a Glyoxal Side Chain at C-17 from Steroids with Dihydroxyacetone and Ketol Side Chains, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 4340–4347.
- [12] M. Li, B. Chen, M. Lin, T.-M. Chan, X. Fu, A. Rustum, A variation of Mattox rearrangement mechanism under alkaline condition, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 3901–3905.

- [13] B. Chen, M. Li, M. Lin, G. Tumambac, A. Rustum, A comparative study of enol aldehyde formation from betamethasone, dexamethasone, beclomethasone and related compounds under acidic and alkaline conditions, *Steroids* 74 (2009) 30–41.
- [14] H. Bi, R. Massé, G. Just, Studies on anabolic steroids. 9. Tertiary sulfates of anabolic 17 methyl steroids: synthesis and rearrangement, *Steroids* 57 (1992) 306–312.
- [15] I. Vincze, M. Lökös, T. Bakos, A. Dancsi, M. Mák, *Steroids* 49. Investigations on the dehydration of 17-ethynyl-17-hydroxysteroids, *Steroids* 58 (1993) 220–224.
- [16] V. I. D. Brabandere, L. M. Thienpont, D. Stöckl, A. P. D. Leenheer,  $^{13}\text{C}$ -NMR and mass spectral data of steroids with a 17,17-dialkyl-18-nor-13(14)-ene substructure, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 780–789.
- [17] R. W. Draper, M. S. Puar, E. J. Vater, A. T. McPhail, An unusual dienone-phenol rearrangement product formed during the synthesis of mometasone furoate (Sch 32088), *Steroids* 63 (1998) 135–140.
- [18] A. Segaloff, R. Bruce Gabbard, Anti-androgenic activity of 17,17-dimethyl-18-norandrost-13-enes, *Steroids* 4 (1964) 433–443.
- [19] M. S. Puar, P. A. Thompson, M. Ruggeri, D. Beiner, A. T. McPhail, An unusual rearrangement product formed during production of mometasone furoate (Sch 32088), *Steroids* 60 (1995) 612–614.
- [20] H. L. Herzog, O. Gnoj, L. Mandell, G. Nathansohn, A. Vigevani, Wagner-Meerwein Rearrangements. IV. Some reassignments of Structure, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 2906–2910.
- [21] J. Fried, J. E. Herz, Synthesis of steroids. US2895954 (A), July 21, 1959.
- [22] F. H. Lincoln, W. P. Schneider, 9,11-epoxy-6-fluoro-delta<sup>4</sup>,16-pregnadienes and products produced therefrom. US3210341 (A), October 5, 1965.
- [23] [http://www.gaussian.com/g\\_tech/g\\_ur/m\\_citation.htm](http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/m_citation.htm)
- [24] S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma, M. J. Frisch, A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 462 (1999) 1-21.
- [25] T. Vreven, K. S. Byun, I. Komáromi, S. Dapprich, Jr J. A. Montgomery, K. Morokuma, M. J. Frisch, Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM, *J. Chem. Theory and Comput.* 2 (2006) 815-826.
- [26] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, W. M. Skiff, UFF, A Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10024–10035.
- [27] A. K. Rappe, W. Goddard, A., Charge Equilibration for Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3358–3363.
- [28] P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev.*, **1964**, 136, B864-B71.
- [29] W. Kohn, L.J. Sham, Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev.* 140 (1965) A1133-A38.

- [30] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648-5652.
- [31] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density *Phys. Rev.* 37 (1988) B785-B789.
- [32] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200-1211.
- [33] P. J. Stephens, F. J. Devlin, M. J. Frisch, C. F. Chabalowski, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623-11627.
- [34] T. Vreven, M. J. Frisch, K. N. Kudin, H. B. Schlegel, K. Morokuma, *Mol. Phys.*, 104 (2006) 701-704.
- [35] C. Kilkenny, W. Browne, I.C. Cuthill, M. D.G. Emerson, D.G. Altman, Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines, *J. Gene Med.* 12 (2010) 561-563.
- [36] J.C. McGrath, G.B. Drummond, E.M. McLachlan, C. Kilkenny, C.L. Wainwright Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 573-1576.
- [37] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals *Pain* 16 (1983) 109-110.

---

## Annexe 2

---