



HAL
open science

Rôles et régulations des canaux ioniques ASIC1b dans la douleur

Clément Verkest

► **To cite this version:**

Clément Verkest. Rôles et régulations des canaux ioniques ASIC1b dans la douleur. Biologie moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT: 2019AZUR4039 . tel-03283372

HAL Id: tel-03283372

<https://theses.hal.science/tel-03283372>

Submitted on 10 Jul 2021

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

Rôles et régulations des canaux ioniques ASIC1b dans la douleur

Clément VERKEST

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la Vie de l'Université Côte d'Azur

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Dirigée par : Dr Eric LINGUEGLIA, Co-encadrée par : Dr Anne BARON

Soutenue le : 9 juillet 2019 à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Devant le jury, composé de :

Anne BARON	CRCN CNRS, IPMC, Valbonne	Co-directrice de thèse
Patrick DELMAS	DR1 CNRS, LNC, Marseille	Rapporteur
Alain ESCHALIER	PU-PH, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Xavier GASULL	Professeur, Université de Barcelone, Barcelone, Espagne	Examineur
Michel LANTERI-MINET	PH, CHU de Nice, Nice	Examineur
Eric LINGUEGLIA	DR2 INSERM, IPMC, Valbonne	Directeur de thèse



Résumé

Les canaux ASIC (Acid-Sensing Ion Channel) sont des canaux ioniques excitateurs activés par une acidification extracellulaire, un phénomène couramment rencontré lors de pathologies douloureuses. Différentes sous-unités, à savoir ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC3 vont s'associer pour former des canaux trimériques fonctionnels. Le canal ASIC1b se distingue par son expression confinée au sein des neurones sensoriels périphériques, responsables de la détection des stimuli nocifs. Mais, le rôle de ce canal dans la douleur est longtemps resté méconnu du fait de l'absence d'outils permettant son étude. Néanmoins, l'identification récente d'agents pharmacologiques, les mambalgines, des peptides extraits d'un venin de serpent et capables de bloquer ces canaux ont permis de démontrer pour la première fois l'implication d'ASIC1b dans la douleur aiguë, inflammatoire et neuropathique chez la souris.

Dans une première partie, j'ai pu démontrer dans un modèle de migraine aiguë et chronique chez le rat que le blocage des canaux ASIC1a et ASIC1b périphériques, *via* la mambalgine et un bloqueur des ASIC non-spécifique, l'amiloride, pouvait supprimer l'allodynie cutanée faciale et extra-faciale, un symptôme récurrent et invalidant rencontré par la plupart des patients migraineux. Ces effets se sont avérés aussi efficaces que les traitements de référence. Enfin, les effets anti-allodyniqes de la mambalgine sont conservés dans un modèle de migraine chronique chez des souris invalidés génétiquement pour ASIC1a, impliquant donc indirectement ASIC1b dans ces effets.

Dans un second temps, je me suis penché sur les propriétés biophysiques et pharmacologiques d'ASIC1b, et sur ses possibles régulations en lien avec son implication pathophysiologique dans la douleur. J'ai démontré que plusieurs voies de signalisation cellulaire pouvaient moduler positivement l'activité des canaux ASIC1b, notamment la voie C-Jun N-terminal Kinase (JNK). JNK potentialise les canaux recombinants ASIC1b, ASIC3 et les hétéromères contenant au moins l'une de ces deux sous-unités. Les courants ASIC obtenus dans des neurones sensoriels en culture sont très majoritairement potentialisés par JNK. De façon intéressante, JNK régule ASIC3 chez le rat mais pas chez la souris, faisant potentiellement d'ASIC1b la cible principale chez cette espèce.

Mon travail de thèse a ainsi permis d'étendre le panel de pathologies douloureuses où ASIC1b est impliqué. J'ai identifié une nouvelle régulation cellulaire *via* la voie JNK et ciblant les canaux ASIC, en particulier ASIC1b. Ces travaux fournissent une première explication au niveau moléculaire sur les mécanismes sous-tendant l'importante implication d'ASIC1b dans la douleur.

Mots-clés : ASIC1b, migraine, neurones sensoriels, douleur, régulations, voies de signalisation, électrophysiologie, comportement

Abstract

Acid-Sensing Ion Channels (ASIC) are trimeric excitatory ion channels activated by extracellular acidification, a phenomenon often encountered in painful pathological diseases. Several members of this family (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b and ASIC3) can form functional ion channels expressed mainly in the nervous system. Among them, ASIC1b is characterized by its restrained expression in peripheral sensory neurons, responsible for the detection of noxious stimuli. But the implication of ASIC1b in pain has remained elusive for a long time because of the lack of tools needed to study its role. However, the recent identification of mambalgins, a set of peptides extracted from a snake venom and able to block ASIC1a and ASIC1b, has contributed to show for the first time the implication of ASIC1b in acute, inflammatory and neuropathic pain in mice.

First, I studied the possible involvement of ASIC1b in migraine. I have shown that in an acute and chronic migraine model in rat, ASIC1a and ASIC1b blockade with mambalgin and amiloride, a non-specific blocker of ASIC channels, abolished the facial and extra-facial cutaneous allodynia, a very common and disabling migraine symptom. Those effects are as effective as the ones induced by the reference migraine treatments. Recurrent blockade of ASIC with mambalgin is able to limit the establishment of cutaneous allodynia related to chronic migraine. Those anti-allodynic effects are fully conserved in ASIC1a Knock-out mouse in a model of chronic migraine, thus indirectly showing a critical role of ASIC1b.

In a second part, I have looked into the possible cellular and molecular mechanisms targeting ASIC1b and explaining its potent implication in pathological pain. I have found that several intracellular signaling pathways are able to positively modulate ASIC1b. Among them, The C-Jun N-terminal Kinase (JNK) was the most promising. JNK potentiates ASIC1b, ASIC3 and heteromeric channels containing at least one of these subunits. ASIC currents obtained from primary culture of sensory neurons are also regulated. Interestingly, JNK regulates rat but not mouse ASIC3, thus making ASIC1b the potential sole target of this regulation in this specie.

Thus, my thesis work extends the repertoire of painful pathological diseases where ASIC1b is involved. I have identified the intracellular signaling pathway JNK as a new mechanism of regulation of ASIC and especially ASIC1b. This work provides the first explanation at the molecular level on the mechanisms governing the critical implication of ASIC1b in pain.

Key words: ASIC1b, migraine, sensory neurons, pain, regulations, signaling pathway, electrophysiology, pain behavior

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres du jury, le Pr Alain Eschalier et le Dr Patrick Delmas, ainsi que les Drs Xavier Gasull et Michel Lanteri-Minet pour avoir accepté de juger mon travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en participant à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement mes directeurs de thèse, les Drs Eric Lingueglia et Anne Baron. Eric, merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe durant 4 années et demie. Merci pour toutes les discussions et tous les conseils. Merci pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordé. Anne, merci également pour toutes les discussions, pour le soutien sans faille tout au long de cette période parfois délicate ! Merci d'avoir toujours été présente et à l'écoute. Merci pour avoir essayé de m'apporter votre rigueur dans la science, j'ai encore du chemin à faire ! J'ai beaucoup appris à vos côtés, j'ai grandement apprécié travailler avec vous durant ces années et je vous remercie encore tous les deux.

Merci à l'ensemble de l'équipe : aux Drs Emmanuel Deval et Jacques Noel pour les discussions scientifiques et extra-scientifiques ainsi que pour tous les conseils, au Dr Miguel Salinas, pour son enthousiasme et pour les trucs et astuces de biomol, au Dr Sylvie Diochot, pour sa gentillesse (et pour les nombreuses fois où je l'ai embêté pour obtenir des toxines !), à Valérie Friend (et à sa famille), pour sa gentillesse, ses conseils et sa générosité, au Dr Magda Chafai, collègue de bureau hors-paire et pour m'avoir supporté pendant toutes ces années, et enfin aux thésards de l'équipe : Thomas, Bonnie, Kévin et en particulier Séb pour tous les bons moments au sein du labo et en dehors et Ahmed, notamment pour les congrès et pour avoir ramé ensemble pendant la rédaction de la thèse.

Merci aux différentes personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'institut, pendant les TP à l'université ou lors des nombreux congrès auxquels j'ai eu la chance de participer (merci encore Eric !). Merci également aux collaborateurs : Emilie Piquet et Michel Lanteri-Minet pour le projet ASIC & migraine, Perrine Royal et Guillaume Sandoz pour m'avoir fait participer à cette belle histoire sur les canaux K2P.

Un immense merci à ma famille et à mes amis pour leurs soutiens durant cette période.

Finally, I want to thanks Denisa. Thank you for your support, for your kindness and your love. Thank you for all the moments we spent together in IPMC and outside and for the ones that will come.

Sommaire

Résumé	1
Abstract.....	2
Remerciements.....	3
Sommaire	4
Liste des illustrations et des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Préface.....	15
Introduction	20
Organisation du système somatosensoriel	21
I. Généralités et définitions	21
II. Détection et transmission du message sensoriel.....	21
1. Diversité et fonctionnalité des neurones sensoriels	21
a. Système nerveux périphérique	21
b. Caractérisation des neurones sensoriels.....	22
i. Anatomique	24
ii. Fonctionnelle	26
iii. Moléculaire.....	32
2. Rôle des cellules non-neurales.....	35
III. Généralités sur le message neuronal des afférences primaires	35
IV. Aspects moléculaires de la détection des stimuli externes	37
1. Thermique	37
2. Mécanique.....	39
3. Chimique.....	41
V. Intégration spinale et supra-spinale du message neuronal nociceptif	45
1. Organisation de la moelle épinière et modulation spinale	45
2. Projection spinale.....	47
3. Intégration supra-spinale du message neuronal douloureux	48
La migraine, une pathologie douloureuse complexe	50
I. Aspects généraux	50
1. Epidémiologie, impact sociétal, classification et diagnostic	50
2. Manifestations cliniques	51
3. Etiologie.....	54

a.	Facteurs environnementaux	54
b.	Facteurs génétiques	55
II.	Traitements pharmacologiques de la migraine.....	57
III.	Spécificités Anatomiques et physiopathologiques de la douleur migraineuse	60
1.	Anatomie du système trigéminal et trigémino-vasculaire	60
a.	Organisation des méninges	60
b.	Neurones sensoriels	62
c.	Projections centrales des afférences primaires trigéminées	63
2.	Mécanismes physiopathologiques de la migraine : focus sur la douleur migraineuse et l'allodynie cutanée	67
a.	Origines de la douleur migraineuse.....	67
b.	Migraine et allodynie.....	69
IV.	Modéliser la migraine chez l'animal.....	70
1.	Généralités sur les différents modèles animaux de migraine	70
2.	Les modèles de migraine utilisant les donneurs de NO	71
a.	Chez l'homme	71
b.	Chez l'animal	73
	Les Canaux ASIC.....	76
I.	Généralités	76
1.	Découverte des canaux ASIC	76
2.	Phylogénie des canaux ASIC	77
II.	Structures des canaux ASIC.....	79
1.	Gènes et sous-unités	79
2.	Structure et assemblage.....	81
3.	Mécanismes structuraux d'activation et d'inactivation des canaux ASIC.....	83
III.	Propriétés biophysiques des canaux ASIC.....	85
1.	Activation, inactivation et sensibilité aux protons	85
a.	Sensibilité aux protons	85
b.	Cinétiques.....	87
2.	Sélectivité et conductance	88
IV.	Pharmacologie des canaux ASIC	89
1.	Molécules synthétiques : amiloride	89
2.	Toxines peptidiques animales	90
a.	PcTx1.....	90
b.	APETx2.....	90

c.	MitTx.....	91
d.	Mambalgines	91
V.	Régulations des canaux ASIC.....	94
1.	Protéines partenaires	94
2.	Voies de signalisation intracellulaires	97
a.	PKC.....	97
b.	PKA.....	97
c.	PI3K/Akt.....	98
d.	Autres voies de signalisation d'intérêts	98
e.	Régulation de l'expression des canaux ASIC	99
VI.	Distribution des ASIC dans les voies de la douleur	99
1.	Distribution dans le SNP	100
2.	Distribution dans le SNC.....	103
VII.	Implication des canaux ASIC dans la douleur.....	105
1.	Chez l'homme.....	105
2.	Chez l'animal	106
a.	Au niveau périphérique	106
i.	ASIC1a.....	107
ii.	ASIC1b.....	109
iii.	ASIC2a et ASIC2b	110
iv.	ASIC3.....	111
b.	Au niveau central.....	113
c.	Cas de l'amiloride	114
	Objectifs de la thèse	118
	Résultats	119
	Partie I : Evaluation des effets analgésiques de la mambalgine dans un modèle d'allodynie cutanée migraineuse : implication des canaux ASIC1	120
I.	Contexte de l'étude.....	120
II.	Article: “Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine”	122
III.	Résultats complémentaires	139
	Partie II : Exploration des propriétés biophysiques, pharmacologiques et des régulations affectant les canaux ASIC1b.	143
I.	Contexte de l'étude.....	143

II. Article préliminaire: « C-Jun N-terminal kinase regulation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 1b and 3 »	146
III. Résultats complémentaires	176
1. Caractérisation biophysique et pharmacologique des canaux ASIC1b	176
2. Régulation d'ASIC1b par différents médiateurs liés à la physiopathologie de la douleur ..	181
3. Caractérisation des courants activés par les protons des neurones sensoriels.....	186
Partie III : Etude de l'implication d'ASIC1b dans la douleur aiguë	191
I. Contexte de l'étude.....	191
II. Résultats	194
1. Matériels et méthodes complémentaires.....	194
2. ASIC1b et détection d'un stimulus thermique	194
3. Implication des récepteurs aux opiacés dans les effets de la mambalgine sur la douleur thermique aiguë	196
<i>Discussion et Perspectives</i>	<i>199</i>
I. Canaux ASIC et migraine.....	200
1. Les canaux ASIC1 périphériques sont impliqués dans l'allodynie cutanée migraineuse	200
2. Les canaux ASIC dans la migraine, implications physiopathologiques et potentiel thérapeutique.....	202
II. Régulations des canaux ASIC1b	208
1. Propriétés fonctionnelles des canaux ASIC1b	208
2. Propriétés pharmacologiques des canaux ASIC1b	210
3. Propriétés des canaux ASIC1b humains	211
4. Caractérisation pharmacologique des courants et distribution des ASIC dans les neurones sensoriels chez les rongeurs.....	211
5. Régulation des canaux ASIC par JNK	214
6. Implication d'ASIC1b dans la perception thermique douloureuse basale : possible interaction avec le système opioïde endogène ?.....	219
<i>Annexes</i>	<i>223</i>
Annexe 1 : Etude du rôle du canal K2P TRESK dans la migraine	224
I. Contexte de l'étude et discussion.....	224
II. Article: Migraine-associated TRESK mutations increase neuronal excitability through alternative translation initiation and inhibition of TREK.....	227
Annexe 2 : Table détaillant les études précliniques utilisant les donneurs de NO comme modèle de migraine	264
Annexe3 : Notes supplémentaires sur la pharmacologie des canaux ASIC	276

1. Ions	276
a. Cations métalliques	276
b. Cations divalents : Calcium et Zinc	276
c. Anions	277
2. Molécules synthétiques.....	277
a. GMQ	277
b. AINS	277
c. Autres composés	278
3. Molécules endogènes.....	279
a. Amines et polyamines	279
b. Neuropeptides.....	280
c. NO et composés oxydants/réducteurs.....	280
d. Lipides.....	281
e. Lactate et ATP.....	282
f. Protéases	282
4. Autres toxines peptidiques.....	283
Annexe 4 : Communications orales et affichées.....	286
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>287</i>

Liste des illustrations et des tableaux

Figure 1 : Organisation du système nerveux périphérique	23
Table 1 : Caractéristiques des fibres sensorielles, motrices et végétatives du système nerveux périphérique	25
Table 2 : Caractéristiques des principaux récepteurs sensoriels cutanées, musculaires, articulaires et viscéraux	27
Figure 2 : Organisation et innervation sensorielle de deux tissus distincts, la peau glabre et poilue ainsi que la vessie	28
Table & Figure 3 : Diversité des nocicepteurs	31
Figure 4 : Taxonomie des neurones sensoriels	33
Figure 5 : Différents types de mécanismes de transduction du signal	36
Figure 6: Différentes contributions de canaux ioniques au potentiel d'action d'un neurone sensoriel	36
Table 4 : Présentation des principaux stimuli chimiques douloureux	43
Figure 7 : Exemples des voies de signalisation intracellulaires liées à la bradykinine (RCPG) et au TNF α (RAC)	44
Figure 8 : Organisation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière et de l'intégration des afférences primaires	47
Figure 9 : Structures cérébrales impliquées dans l'intégration et la modulation de la douleur	49
Table 5 : Critères de diagnostic de la migraine sans ou avec aura	51
Figure 10 : Déroulement schématique d'une crise de migraine et principaux signes cliniques	53
Table 6 : Traitements préventif et de la crise migraineuse	59
Figure 11 : Anatomie et innervation des méninges	61
Figure 12 : Anatomie des voies neuronales de la douleur migraineuse	66
Table 7 : Principales caractéristiques des modèles de migraine utilisant les donneurs de NO	75
Figure 13 : Représentation des premiers courants sodiques activés par les protons	76
Figure 14 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC	78
Figure 15 : La famille des canaux ASIC chez le rongeur	80
Figure 16 : Structure d'une sous-unité et d'un canal ASIC trimérique	82
Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes d'activation du canal ASIC1a	84
Figure 18 : Diversité des courants ASIC	86
Figure 19 : Caractéristiques biophysiques des courants ASIC	86
Table 8 : Propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux ASIC	88
Table 9 : Liste des principaux agents pharmacologiques modulant les canaux ASIC	93
Table 10 : Régulation des canaux ASIC par des interactions protéine-protéine	96
Table 11 : Distribution des différentes sous-unités ASIC dans les neurones sensoriels	101
Figure 20 : Distribution d'ASIC1 et ASIC2 dans le SNC	104
Figure 21 : Implications d'ASIC1a et ASIC1b dans la douleur <i>in vivo</i>	108
Figure 22: Implications des canaux ASIC dans les voies de la douleur	116
Figure 23 : Effets anti-allodyniques consécutifs à une injection centrale par <i>icv</i> de mambalgine dans les modèles de migraine aiguë et chronique	140
Table 12: Liste des 10 phosphorylations potentielles les plus probables obtenus avec GPS3.0 et de leur site en N-terminal d'ASIC1b (haut) et en C-terminal (bas)	145

Table 13: Interactions potentielles obtenues sur les segments N- et C-terminaux d'ASIC1b et ASIC3 avec ELM.....	145
Figure 24: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux ASIC1b.....	177
Figure 25: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux humain ASIC1b.....	180
Table 14: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux ASIC1b.....	181
Figure 26 : Régulations des canaux ASIC1b par différents modulateurs en lien avec la douleur	183
Figure 27 : Modulation des canaux ASIC1b humain par le NO et différentes voies de signalisations	184
Figure 28 : Caractéristiques des neurones sensoriels de souris.....	187
Figure 29 : Caractéristiques des neurones sensoriels de rat.....	189
Table 15 : Résumé des principales caractéristiques des neurones sensoriels de rat et de souris (deux conditions de culture)	189
Figure 30 : Effet de la température chaude nocive sur l'activation des canaux ASIC1b et TRPV1	195
Figure 31 : Effets de la mambalgine sur la douleur thermique aigue chez la souris et le rat	196
Figure 32 : Modulation de TREK1 par l'activité des MOR et influence d'ASIC1b.....	197
Figure 33 : Implication des canaux ASIC dans la physiopathologie de la migraine.....	207
Figure 34 : Régulations des canaux ASIC1b par des voies de signalisation intracellulaires	219

Liste des abréviations

5HT: Sérotonine	CSD: Cortical Spreading Depression
5HTxR: Récepteur 1-7 à la sérotonine	CSF: Cerebro Spinal Fluid
α 1-2: Récepteur alpha adrénérgique	Csfr2a: Colony Stimulating Factor Receptor
A1-2-3: Adenosine Receptor 1-2-3	CST: Corticospinal Tract
A : Ampère	CTR: Calcitonin Receptor
AA : Arachidonic Acid	CXCL5: C-X-C Chemokine Ligand
AC : Adénylate Cyclase	CXCRx: C-X-C Chemokine Receptor
ACC : Anterior Cingulate Cortex	CX3CL: C-X-3C Chemokine Ligand
ACH : Acétylcholine	CX3CR: C-X-3C Chemokine Receptor
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	CysLT: Cysteinyl Leukotriene Receptor
AKAP : A-kinase-anchoring Protein	DxR: Dopamine Receptor
AMPA: Récepteur AMPA	DA: Diminazene
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	DAG: DiAcylGlycérol
AMY 1: Amylin-1 Receptor	DC: Dendritic Cell
Ano1: Anoctamin1 (TMEM16)	DPx: Prostanoid receptor 1-2
ASIC: Acid-Sensing Ion Channel	DRG: Dorsal Root Ganglia
ADN: Acid DéoxyriboNucléique	DTT: Dithiothreitol
APETx: Anthopleura elegantissima Toxin 2	EC: Half-maximal excitatory concentration
ARN: Acide RiboNucléique	EGF: Epidermal Growth Factor
ATR: Angiotensin Receptor	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
β 1-2: Récepteur Beta adrénérgique	ENaC/DEG: Epithelial Sodium Channel/Degenerin
B1-2 : Récepteur B1-2 à la bradykinine	ENaC: Epithelial Sodium Channel
BASIC : Bile acid-sensitive ion channel	EPx: Prostaglandin Receptor
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor	ERK: Extracellular signal Regulated Kinase
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique	ETa-b: Endothelin Receptor
BK _{Ca} : Canal potassique calcium-sensible à large conductance	FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
BLT : Leukotriene Receptor B	FHM: Familial Hemiplegic Migraine
BNC1/2 : Brain Sodium Channel 1/2	FMRFamide : Phe-Met-Arg-Phe-NH ₂
CAMKII : Calcium/Calmodulin Protein Kinase II	FPR1: Formyl Peptide Receptor
Cav: Canal calcique voltage-dépendant	Fzd: Frizzled Receptor
CCI : Chronic Constriction Injury	G2A: G2 accumulation
CCLx: C-C Chemokine Ligand	GABA-A: Récepteur GABA A
CCRx: C-C Chemokine Receptor	GDNF: Glial cell line Derived Neurotrphic Factor
CFA: Complete Freund's adjuvant	GFR: GDNF Family Receptor
CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide	GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Cholécystokinine: CCK	GMQ: 2-guanidine-4-méthylquinazoline
CLR: Calcitonin-Like Receptor	GMPC: Guanosine monophosphate cyclique
COXx: Cyclo-Oxygénase1-2	
Cre: Cre Recombinase	
CRH: Corticotropin-Releasing Hormone	

GPR/OGR1: Proton-sensing G-coupled Receptor/ovarian cancer GPR1
 GTN: Glyceryl Trinitrate
 GWAS: Genome Wide Association Study
 HxR: Récepteur à l'histamine
 HCN: Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel
 Hi1a: *Hadronyche infensa* Toxin 1a
 Hm3a: *Heteroscodra maculata* toxin 3
 HT: High Threshold
 HTMR: High Threshold MechanoReceptor
 IASP: International Association for the Study of Pain
 IB4: Isolectin B4
 ICHD: International Classification of Headache Disorders
 IC: Half-maximal inhibitory concentration
 Icv: Intracérébroventriculaire
 ILx: Interleukine (1 β , 6, 17)
 Ilx-R : Interleukin Receptor
 ILC: Innate Lymphoid Cell
 INs : Interneurones
 iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase
 IP : Intra Péritonéale
 IP3 : Inositol triphosphate
 IP3R : Inositol triphosphate Receptor
 IPx : Prostacyclin Receptor
 Ipl: intraplantaire
 ISDN: Isosorbide dinitrate
 ISMN: Isosorbide mononitrate
 It: Intrathécale
 Iv: Intraveineuse
 JNK : c-Jun N-terminal Kinase
 JAK/STAT: Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins
 K2P : Canal potassique à deux domaines pore
 K_{ATP} : Canal potassique à rectification entrante sensible à l'ATP
 K_{ir} : Canal potassique à rectification entrante
 K_{Na} : Canal potassique sodium-sensible
 KainateR : Récepteur Kainate
 KO: Knock-Out
 Kv: Canal potassique voltage-dépendant
 LPAx :Lysophosphatidic Acid Receptor 1-3
 LPC: Lysophosphatidylcholine

LPS: LypoPolySaccharide
 LT: Low Threshold
 LTMR: Low Threshold MechanoReceptor
 mACh-R: Récepteur muscarinique à l'acétylcholine
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MAPKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
 MAPKKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
 MC: Mast Cell
 MDEG1/2 : Mammalian Degenerin 1/2
 mGluR: Récepteur métabotrope au glutamate
 miARN: MicroARN
 MitTx : *Micrurus tener* Toxin
 MLKL: Mixed lineage kinase domain like protein
 MR: MechanoReceptor
 Mrg : Mas-related genes
 nACh-R: Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
 NAD : Noradrénaline
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 Nav: canal sodique voltage-dépendant
 NFAT5: Nuclear Factor of Activated T cells 5
 NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NGF: Nerve Growth Factor
 NIK1: Histidine protein kinase 1
 NK1: récepteur Neurokinine 1
 NMDAR : Récepteur NMDA
 NO: Nitric Oxide
 nompC : no mechanoreceptor potencial C
 NTG: Nitroglycérine
 OPR: Opioid Receptor
 OSCA: Reduced Hyperosmolality induced Calcium increase (TMEM63)
 P2X: Purinergic receptor P2X
 P2Y: Purinergic G protein-coupled receptor P2Y
 PA : Potentiel d'Action
 PAC1: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor

PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
 PAF: Platelet Activated Factor
 PAFr: Platelet Activated Factor Receptor
 PAG: Substance grise périaqueducale
 PAR2: Protease Activated Receptor
 PBN: Noyau Parabrachial
 PcTx1 : *Psalmopeus cambridgei* Toxin 1
 PDZ : Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor and Zonula occludens-1 protein
 Penk :Préproenképhaline
 PFC: Prefrontal Cortex
 PhcTx1 : *Phymanthus crucifer* Toxin 1
 Pi3K : Phosphoinositide 3 kinase
 PICK1: Protein interacting with C kinase
 PLA2 : Phospholipase A2
 PLC : Phospholipase C
 PKA : Protéine Kinase A
 PKC : Protéine Kinase C
 PKG: Protéine Kinase G
 PNa⁺/K⁺/Ca⁺⁺: ratio de perméabilité sodium versus potassium/calcium
 PRRT2: Proline-Rich Transmembrane Protein 2
 PSD95 : Post Synaptic Density protein 95
 S : Siemens
 PSDC: Post Synaptic Dorsal Column
 RA : Rapidly Adapting
 RAC : Récepteur à Activité Catalytique
 RAMP : Receptor Activity Modifying Protein
 RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
 RET : Rearranged during transfection receptor
 RFK : Riboflavine Kinase
 RIP1 : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
 RNA : RiboNucleic Acid
 ROS: Reactive Oxygen Species
 RVM: Rostral Ventromedial Medulla
 S1PRx: Sphingosine 1 phosphate Receptor
 SA : Slowly Adapting
 scRNAseq : Single Cell RNA sequencing
 sGC: Soluble Guanylate Cyclase
 SK_{Ca} : Canal potassique calcium-sensible à faible conductance
 SNA : Système Nerveux Autonome

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
 SNC : Système Nerveux Central
 SNI: Spinal nerve Injury
 SNL: Spinal nerve ligation
 SNP : Système Nerveux Périphérique
 SNRI : Serotonin Noradrénalin Reuptake Inhibitor
 SP: Substance P
 Sp5-O/I/C: noyau spinal trigéminal (oralis, interpolaris, caudalis)
 SPG: Spheno-palantine Ganglion
 Src: Tyrosine Protein Kinase CSK
 SST: Somatostatine
 STOM: Stomatin
 STOML: Stomatin-like protein
 SUS: Superior Salivatory Nucleus
 TAK1: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
 TASK3: TWIK-related Acid-Sensitive potassium channel
 TDAG8: T-cell death-associated gene 8
 TG: Trigeminal Ganglia
 TLRx: Toll-like Receptor
 TMC: Transmembrane cochlear-expressed gene/transmembrane channel-like
 TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
 TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
 TRAAK: TWIK-related Arachidonic Acid stimulated potassium channel
 TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain
 TRAFx: *TNF* receptor-associated factor
 TREK: TWIK-related potassium channel
 TRESK: TWIK-related spinal cord potassium channel
 TrkA: Tropomyosin Receptor Kinase A
 TrkB: Tropomyosin Receptor Kinase B
 TrkC : Tropomyosin Receptor Kinase C
 TRP : Transient Receptor Potential
 TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrin
 TRPC : Transient Receptor Potential Canonical
 TRPM : Transient Receptor Potential Melastatin

TRPN : Transient Receptor Potential no
mechanoreceptor potencial C
TRPP : Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid
TP : Thromboxane Receptor
TTX: Tétrodotoxine
Ugr9-1 : *Urticina greblnyi* Toxin 9-1
V: Volt

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor
Receptor
VIP: Vasoactive Intestinal Peptide
VPAC: pituitary adenylate cyclase-activating
polypeptide type II
WDR: Wide Dynamic Range
Wnt: Wingless integration site

Préface

La compréhension des mécanismes de la douleur, ainsi que son traitement, a préoccupé l'homme depuis longtemps. Des millénaires avant Jésus-Christ, il subsiste des traces d'usage de diverses plantes, de prières ou d'interventions chirurgicales dans de nombreuses civilisations localisées dans les Andes, en Egypte ou encore en Asie. Les progrès effectués ont été grandement influencés par les avancées technologiques et surtout en ces temps anciens par la structure religieuse et sociétale des civilisations. Un premier essor notable pour comprendre ces mécanismes a eu lieu durant l'antiquité sous l'impulsion de célèbres scientifiques grecs (Hippocrate, Aristote ou Alcméon par exemple) et romains (Galien en particulier). A cette époque, le cœur fut placé au centre de l'intégration sensorielle. Le Moyen-âge verra la religion prendre une place prépondérante et ralentira les avancées en science et médecine. La Renaissance apportera un nouveau souffle à la compréhension des mécanismes de la douleur, notamment grâce aux avancées anatomiques faites par André Vésale et Ambroise Paré. Au XVII^{ème} siècle, René Descartes énoncera un concept important : un message (suite à un stimulus tactile ou thermique par exemple, en référence à la célèbre illustration accompagnant ce concept) est généré par des nerfs périphériques et acheminés jusqu'au cerveau où il produit une image de ce stimulus au sein de l'âme. Cette théorie va servir de point de départ à de nombreuses avancées réalisées par la suite, notamment au XIX^{ème} siècle ainsi qu'au début du XX^{ème} siècle. Le lecteur pourra se référer à diverses publications et ouvrages pour plus de détails sur cette période faste et fructueuse (Bonica, 1991; Dachez, 2012; Moayedid and Davis, 2013; Perl, 2007; Rey, 1993; Sabatowski et al., 2004).

Certaines avancées technologiques ont été cruciales dans la dissection des mécanismes de la douleur. Du fait de la place de l'électrophysiologie et des canaux ioniques dans cette thèse, et bien évidemment de leur rôle dans la douleur, il est logique de se pencher brièvement sur l'émergence de ces derniers. Cette émergence est indissociable de l'avancée de connaissances et de techniques dans différents domaines, en particulier de la physique (électricité) : on peut citer notamment les découvertes lors du XVIII-XIX^{ème} siècle de Volta (pile électrique), Coulomb (notion de charge électrique), Ampère (distingue tension électrique et courant électrique), Faraday (électromagnétisme et électrochimie), Galvani (nature électrique de l'activité nerveuse), Nernst (potentiel électrochimique) ou Boltzmann (cinétique des gaz). La première moitié du XX^{ème} siècle voit la mise au point de l'électrophysiologie, grâce aux travaux de Bernstein (« théorie membranaire »), Cole et Katz (amplificateur pour mesure en potentiel-imposé, potentiel d'action de l'axone de calmar) et surtout Hodgkin et Huxley (Prix Nobel de physiologie ou médecine 1963). Leurs travaux sur l'axone géant de calmar ont permis de montrer que le pic du potentiel d'action dépassait 0mV, en désaccord avec les travaux de Bernstein qui pensait que la membrane plasmique était perméable au potassium et que lors du potentiel d'action, le potentiel membranaire tendait vers 0mV. Ils postulent que cette

valeur positive est à mettre en relation avec le potentiel d'équilibre du sodium. Grâce à leurs enregistrements en potentiel imposé, ils identifient le courant entrant sodique et le courant sortant potassique. Ils vont émettre l'hypothèse de l'existence des canaux ioniques (Hodgkin and Huxley, 1939, 1952). Après ces travaux, différentes techniques d'enregistrement s'adaptant à de nombreux types de préparations biologiques vont être mises au point. Le point d'orgue étant la technique du patch-clamp et du premier enregistrement d'un seul canal ionique par Neher et Sakmann (Hamill et al., 1981; Neher and Sakmann, 1976), travaux récompensés par le prix Nobel en 1991. L'apport de nouvelles techniques de biologie moléculaire permettra ensuite le clonage de nombreux canaux ioniques: d'abord le récepteur nicotinique et ses différentes sous-unités par le groupe de Shosaku Numa au début des années 80 (Noda et al., 1982, 1983a, 1983b), sans oublier la première purification en 1970 par Changeux grâce à l' α -bungarotoxine (Changeux et al., 1970), et la contribution de Raftery au niveau de la structure et de l'organisation du récepteur nicotinique (Raftery et al., 1980). Viendront rapidement après ces travaux les premiers clonages des canaux voltage-dépendants sodiques (Noda et al., 1984, 1986), isolés grâce à la tétrodotoxine (TTX) (Agnew et al., 1978), des canaux calciques (Tanabe et al., 1987) et des canaux potassiques (Papazian et al., 1987). Une autre avancée majeure concernant l'étude des canaux ioniques est la détermination de la première structure haute résolution d'un canal ionique (potassique, provenant d'une bactérie) par cristallographie aux rayons X (Doyle et al., 1998). Ces travaux seront récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2003 (Agre et MacKinnon). La liste pourrait continuer encore au vue des avancées récentes (souris génétiquement modifiée, cryo-microscopie électronique (cryoEM) etc.). Certains de ces aspects seront discutés ultérieurement dans cette thèse.

L'impact qu'à la douleur chronique justifie qu'une intervention soit souvent nécessaire afin de la contrer, notamment lorsque celle-ci reste présente longtemps après la guérison d'une blessure et qu'elle a perdu complètement son rôle premier de signal d'alarme. A l'heure actuelle, nous disposons de diverses stratégies de traitements contre la douleur, à la fois médicamenteuses mais également physiques (neurostimulation, acupuncture etc.) ou psychiques (hypnose, relaxation etc.). L'arsenal médicamenteux contre la douleur est relativement ancien : morphine, aspirine et paracétamol datent du XIX^{ème} siècle, certains anti-inflammatoires, les antidépresseurs et antiépileptiques datent des années 50 et 60. Depuis, l'innovation médicamenteuse concernant les analgésiques s'est avérée décevante en dépit de l'explosion du nombre de cibles potentielles (avec les canaux ioniques par exemple), des connaissances sur les mécanismes de la douleur et des efforts considérables qui ont été mis en œuvre par les industries pharmaceutiques pour développer de nouveaux analgésiques (Borsook et al., 2014; Burgess and Williams, 2010; Woolf, 2010; Yekkirala et al., 2017). Quelques exceptions incluent néanmoins les triptans et les anticorps dirigés contre le

Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ou son récepteur, tous deux utilisés contre la douleur migraineuse (détaillés par la suite dans l'Introduction). Plusieurs raisons sont avancées pour expliquer ces échecs, notamment au niveau méthodologique (pertinence des modèles animaux, limites de la recherche clinique chez l'homme, essais cliniques et population ciblée etc.) et expérimental (difficulté à obtenir un médicament agissant spécifiquement sur certaines cibles, sécurité et effets indésirables, pertinence du mécanisme et de la cible etc.). Quelques exemples incluent les bloqueurs systémiques des canaux ioniques Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1), induisant une hyperthermie et ayant une efficacité limitée (Chizh et al., 2009; Gavva et al., 2008; Nilius and Szallasi, 2014), certaines molécules ciblant le canal sodique voltage-dépendant (Nav) Nav1.7, montrant des problèmes d'efficacité et de sélectivité (Rivara and Zuliani, 2016), ou encore les antagonistes du récepteur à la substance P (SP), le récepteur neurokinine 1 (NK1) (Diener and RPR100893 Study Group, 2003; Goadsby et al., 2017a). Il s'est avéré que dans ces trois cas, une connaissance beaucoup plus poussée des mécanismes propres à chaque cible aurait pu changer ces résultats. En effet, des analyses plus complètes de la distribution, du rôle physiologique ainsi que du mode d'activation de TRPV1 auraient pu alerter quant à l'apparition d'effets indésirables propres à ces antagonistes (Cavanaugh et al., 2011; Gavva et al., 2007; Nilius and Szallasi, 2014). Il en est de même pour Nav1.7, où une analyse structure-fonction détaillée a permis l'émergence de nouveaux bloqueurs sélectifs (McCormack et al., 2013). Malgré tout, les difficultés demeurent autour de cette cible (récemment commenté (Kingwell, 2019)). Enfin, une publication récente concernant le mode d'action de la substance P suggère que celle-ci peut aussi agir sur un autre récepteur, via un mécanisme indépendant de NK1 (Green et al., 2019). Cependant, NK1 pourrait bel et bien avoir un rôle important, comme le pointe une autre étude récente démontrant sa capacité à conserver une activité de signalisation au sein même des endosomes dans la cellule, compartiment non touché par les antagonistes initialement développés (Jensen et al., 2017). Ces exemples illustrent bien l'importance et la nécessité d'avoir une connaissance profonde sur de nombreux aspects afin de pouvoir proposer une cible et un médicament comme stratégie thérapeutique contre la douleur.

C'est dans ce cadre que se situe mon travail de thèse : l'identification récente dans l'équipe d'une toxine extraite d'un venin de serpent qui bloque différentes isoformes de canaux ioniques de la famille Acid-Sensing Ion Channel (ASIC), en particulier le canal Acid-Sensing Ion Channel 1b (ASIC1b), a permis de démontrer que ce canal ionique, dont le rôle dans la douleur était encore inconnu malgré son expression sélective dans les neurones sensoriels, était important dans des modèles murins de douleur aiguë, inflammatoire et neuropathique (Diochot et al., 2012, 2016). Les questions qui se sont alors posées ont porté sur les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-

jacents à ces effets, et sur l'implication de ce canal dans d'autres pathologies douloureuses, comme la très particulière douleur migraineuse. Ce sont ces deux aspects que j'ai traité pendant ma thèse.

Les éléments évoqués à travers ce prisme historique ont permis d'introduire brièvement les deux aspects principaux de cette thèse : les canaux ioniques et la douleur. Dans la première partie de l'introduction, le cheminement du message douloureux sera présenté. Une attention particulière sera portée sur l'organisation du système nerveux périphérique, la genèse du message électrique et en particulier la détection de stimuli nocifs. L'intégration au niveau spinal et supra-spinal sera brièvement décrite.

Dans le deuxième chapitre je présenterai la migraine, avec entre autres, son impact, son traitement et sa genèse. Je reprendrai ensuite les éléments précédemment évoqués en première partie et appliqués à la description des voies de la douleur migraineuse. Une présentation des modèles animaux d'étude de cette pathologie sera faite également, avec une attention particulière sur ceux utilisant les donneurs d'oxyde nitrique (NO).

La troisième et dernière partie se focalisera sur les canaux ASIC et plus spécifiquement sur leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques, ainsi que leur distribution tissulaire au niveau des voies nerveuses impliquées dans la douleur. Je présenterai enfin l'état des connaissances sur leur implication dans la douleur. Une attention particulière sera portée tout au long de cette partie sur les canaux ASIC1b, encore mal caractérisés et objets de cette thèse.

Introduction

Organisation du système somatosensoriel

I. Généralités et définitions

La détection et l'intégration d'informations sensorielles douloureuses ou non comprend cinq phases. La transduction, c'est-à-dire la transformation d'un stimulus mécanique, thermique ou chimique en un message nerveux, est réalisée par des neurones périphériques, également appelés afférences primaires, neurones de premier ordre ou neurones sensoriels. Ce sont des neurones de la racine dorsale ou des ganglions spinaux (Dorsal Root Ganglia, DRG) et ganglion vagal pour le corps et les viscères ainsi que des ganglions trigéminaux (Trigeminal Ganglia, TG, pour une partie de la tête). Ces neurones vont ensuite acheminer et transmettre le message neuronal, *via* d'autres neurones dans la moelle épinière ou le tronc cérébral, jusqu'à ceux des centres supra-spinaux où il sera intégré. En retour, l'information sensorielle pourra être modulée par des projections descendantes (Basbaum et al., 2009).

Concernant la douleur en particulier, les neurones sensoriels spécialisés dans sa détection sont appelés nocicepteurs. Comme évoqué lors de la préface, plusieurs types de douleur peuvent être distingués : aiguë (signal d'alarme, durant moins de trois mois), chronique (pathologique, persistant plus de trois mois) et procédurale (induite par des soins). La douleur chronique peut être subdivisée en trois sous-types : la douleur dite par excès de nociception (stimulation persistante et excessive des nocicepteurs), la douleur neuropathique (pathologie ou lésion affectant le système somatosensoriel) et la douleur nociplastique (dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur, sans lésion identifiée). Il convient de définir et de distinguer la nociception, étant la sensibilité physiologique en réponse à des stimuli nocifs évoqués (thermiques, mécaniques, chimiques), et la douleur, étant d'après l'International Association for the Study of Pain (IASP) une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire potentielle ou réelle, ou décrite comme telle. Dans ce manuscrit, par simplification, les réactions de sensibilité ou d'hypersensibilité provoquées par un stimulus expérimental chez l'animal et la sensation de douleur avec ses composantes (cognitives etc.) seront regroupées, bien que n'étant pas sur le même plan.

II. Détection et transmission du message sensoriel

1. Diversité et fonctionnalité des neurones sensoriels

a. Système nerveux périphérique

Les neurones sensoriels appartiennent au système nerveux périphérique (SNP), plus précisément au système afférent et sont caractérisés par une morphologie particulière, dite

unipolaire (ou pseudo unipolaire), en « T », avec une seule projection axonale qui va rapidement bifurquer dès la sortie du ganglion vers la corne dorsale de la moelle épinière *via* la racine dorsale où ils feront synapse avec un neurone dit de second ordre, d'une part, et vers le territoire innervé, d'autre part. Ces bifurcations axonales seront fréquemment dénommées fibres sensorielles. Les axones de ces neurones projetant vers la périphérie sont regroupés dans des nerfs périphériques qui sont souvent mixtes car ils contiennent également les axones des motoneurones efférents innervant les muscles et provenant, *via* la racine ventrale, de la corne ventrale de la moelle épinière (Kandel and Schwartz, 2013) (Figure 1). Le système nerveux autonome (SNA) sympathique et parasympathique est aussi présent à ce niveau. Hormis quelques neurones afférents au niveau gastro-intestinal, la majeure partie des neurones du SNA sont efférents et vont avoir un rôle dans la réponse coordonnée de l'organisme face à une menace ou un changement de nature diverse. On parlera de fibres végétatives (Figure 1). Du fait de sa capacité à moduler des fonctions importantes comme le système immunitaire, il a été démontré que le SNA (sympathique en particulier) pouvait réguler la réponse douloureuse voire, dans certaines conditions pathologiques, être à l'origine de la douleur (Baron et al., 2002c; Jänig and Levine, 2013). Cette potentielle contribution du SNA sera évoquée et illustrée brièvement dans la seconde partie consacrée à la migraine, pathologie douloureuse impliquant en partie ce système (Miglis, 2018).

b. Caractérisation des neurones sensoriels

Il existe chez l'homme 29 paires de ganglions spinaux : 7 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés. A cela s'ajoute une paire de ganglions trigéminaux pour l'innervation de la face. Il existe également quelques spécificités et exceptions : pour certaines afférences viscérales, on retrouve des neurones sensoriels localisés spécifiquement au sein du plexus entérique et projetant localement vers d'autres neurones, aux fonctions motrices par exemple. Des neurones sensoriels innervant les viscères vont également être contenus au sein des ganglions vagues (nodose et jugulaire) (Kupari et al., 2019). Des afférences primaires proprioceptives innervant certains muscles et articulations de la face vont être contenues dans un ganglion différent du TG, le ganglion trigéminal mésencéphalique situé dans le tronc cérébral (Gibbins, 2013; Marani and Lakke, 2012). Cette organisation peut-être légèrement différente d'un organisme à l'autre : rats et souris ont par exemple 13 paires de ganglions thoraciques et le rat à 6 lombaires contre 5 chez la souris (Malin et al., 2007). Dans un ganglion, Les différents corps cellulaires sont séparés les uns des autres par une enveloppe de cellules gliales (cellules satellites). Il n'existe pas d'organisation particulière des corps cellulaires au sein des DRG, contrairement au TG (Devor, 1999; Waite and Ashwell, 2012). Les neurones de ces ganglions vont innerver les différentes parties du corps selon une organisation précise. Il existe néanmoins un certain chevauchement au niveau de la moelle épinière entre les

territoires innervés par un ganglion supérieur et inférieur (Sengul and Watson, 2012). On parlera de dermatomes pour le territoire cutané, de myotomes pour les muscles, sclérotomes pour les articulations et entérotome pour les viscères.

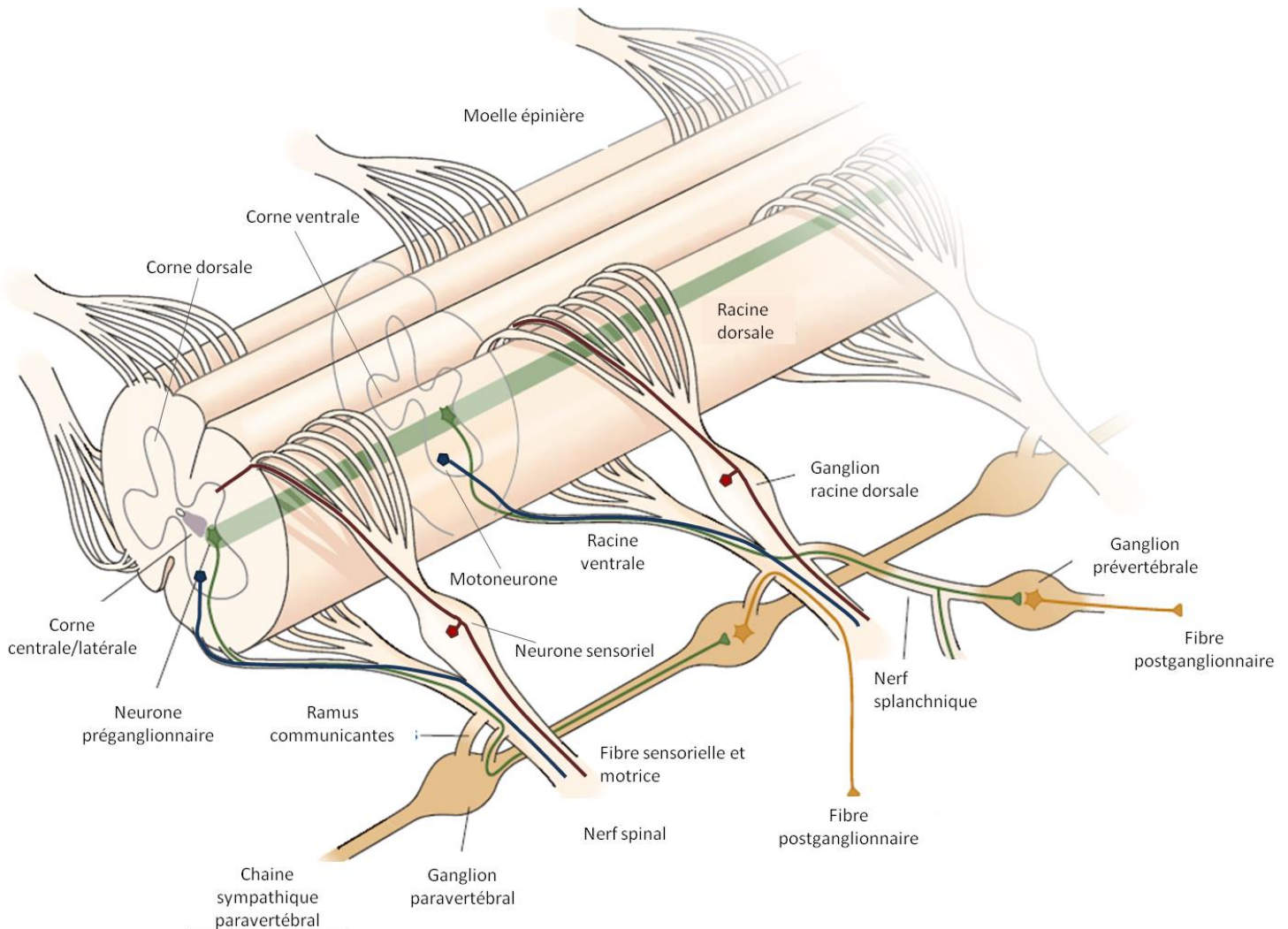


Figure 1 : Organisation du système nerveux périphérique

Schéma illustrant l'anatomie du système nerveux périphérique, en relation avec la moelle épinière. Les neurones sensoriels ont leur corps cellulaire localisé au niveau des ganglions de la racine dorsale, et vont faire synapse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, via les racines dorsales. Les motoneurones et les neurones préganglionnaires vont être localisés au niveau ventral et latéral de la moelle épinière. Leurs prolongements vont ensuite bifurquer entre nerfs spinaux pour les motoneurones et la chaîne sympathique paravertébrale pour les neurones du SNA. Ces derniers vont ensuite faire synapse avec des neurones postganglionnaires au niveau de différents ganglions para- ou prévertébraux. D'après Kandel and Schwartz, 2013.

Au sein des ganglions se trouvent plusieurs milliers de corps cellulaires de neurones sensoriels aux fonctions variées (Emery and Ernfors, 2018; Schmalbruch, 1987). Cette diversité fonctionnelle est primordiale pour les êtres vivants afin de percevoir les différents stimuli de leur environnement. La classification des neurones sensoriels a fait l'objet de nombreuses études au cours du XX^{ème} et XXI^{ème} siècle, en se basant sur des critères anatomiques (diamètre, neurone myélinisé *via* les cellules de Schwann ou non-myélinisé, type de terminaison périphérique et spinale), électrophysiologiques (vitesse de conduction, adaptation en réponse à un stimulus, caractéristiques du potentiel d'action ou d'un courant particulier), fonctionnelles (modalité et seuil d'activation) et moléculaires (marqueurs spécifiques). Récemment, un nouvel essor dans ce travail de classification a été permis par l'émergence des techniques de séquençages de l'ARN sur cellule unique (Single-Cell RNAseq, scRNAseq) et d'imagerie calcique *in-vivo*. Toutes ces approches ont des avantages et des inconvénients qu'il est nécessaire de prendre en compte. Seule la combinaison de ces techniques donnera le tableau le plus précis et le plus complet.

i. Anatomique

Historiquement, Gasser et Erlanger (prix Nobel de physiologie ou médecine 1944) ont été les premiers à proposer une classification basée sur la vitesse de conduction des neurones (Gasser, 1941; Perl, 2007). Cette classification fut par la suite agrémentée et affinée par plusieurs groupes. On retrouve parfois la classification de Lloyd pour les afférences musculaires et articulaires, notées I, II, III et IV (Lloyd, 1942, 1943a, 1943b, 1944). Les différentes fibres périphériques sensorielles, motrices et végétatives sont présentées dans la Table 1.

-Les fibres A α comprennent des afférences sensorielles proprioceptives (position des muscles et des tendons) et des fibres motrices (motoneurones permettant la contraction des muscles hors du fuseau musculaire).

-Les fibres A β sont des afférences participant principalement à la sensation tactile, mais une petite proportion de ces fibres a un rôle dans la perception de la douleur. D'autres fibres A β interviennent aussi dans la proprioception.

-Les fibres A γ sont des motoneurones permettant la contraction des muscles.

-Les fibres A δ peuvent être répertoriées en deux catégories, impliquées dans la perception nocive ou non-nocive.

-Les fibres B sont les fibres efférentes préganglionnaires du SNA.

-Les fibres C comportent des afférences sensorielles majoritairement impliquées dans la perception de la douleur mais aussi dans celui du toucher plaisant. Elles comprennent aussi des afférences postganglionnaires du SNA.

	Fibres	Myélinisation	Diamètre (μm)	Vitesse de conduction (m/s)	Fonctions
Sensorielles	Aα (I)	oui	12-20	72-120	Proprioception: musculaire et tendineuse
	Aβ (II)	oui	6-12	16-100	Tact, proprioception, douleur
	Aδ (III)	oui (légère)	1-6	4-36	Tact, douleur
	C (IV)	non	0,2-1,5	0,4-2	Tact, douleur
Motrices	Aα	oui	12-20	70-120	Contraction musculaire (hors du fuseau musculaire)
	Aγ	oui	6-12	36-72	Contraction musculaire (fuseau neuromusculaire)
Végétatives	B	oui (légère)	0,1-2	3-14	Neurone préganglionnaire
	C	non	0,4-1,2	3	Neurone post ganglionnaire

Table 1 : Caractéristiques des fibres sensorielles, motrices et végétatives du système nerveux périphérique

Présentation des différentes caractéristiques anatomiques (myélinisation et diamètre) et fonctionnelle (vitesse de conduction et rôles physiologique) des fibres sensorielles, motrices et végétatives du SNP. D'après Abaira and Ginty, 2013; Julius and Basbaum, 2001; Kandel and Schwartz, 2013; McGlone and Reilly, 2010; Moehring et al., 2018a.

Les fibres Aβ et Aδ sont donc purement sensorielles, au contraire des fibres C et Aα. De ce fait, seules les fibres afférentes sensorielles seront détaillées dans la suite de cette partie et la terminologie C et Aα réfèrera uniquement à ces fibres sensorielles. En complément de ces critères, l'anatomie des terminaisons périphériques des neurones sensoriels est couramment utilisée pour distinguer différents types de neurones. Si ces derniers sont capables de discriminer des variations de température de 0,1°C ou de détecter des vibrations, c'est notamment grâce à une organisation bien particulière au sein des organes et des tissus qu'ils innervent. La plus grande diversité sera rencontrée pour les mécanorécepteurs, avec une distinction entre peau glabre et peau poilue

expliquant la capacité de notre organisme à discriminer de nombreux stimuli tactiles (déflexion d'un poil, étirement de la peau etc.). Cette distinction pourra se poursuivre également au niveau des tissus profonds, notamment viscéraux, où une grande hétérogénéité d'organisation tissulaire et d'innervation sensorielle et autonome sera observée (Goyal and Hirano, 1996). La Table 2 résume les principaux récepteurs des terminaisons périphériques sensorielles et ils sont illustrés Figure 2 pour la peau et la vessie. Bien qu'il existe aussi des différences de structure entre les terminaisons centrales des fibres sensorielles (Abraira et al., 2017; Li and Baccej, 2017; Li et al., 2011a; Olson et al., 2017; Zhang et al., 2019), cet aspect ne sera pas détaillé.

ii. Fonctionnelle

A cette classification anatomique est souvent associée une classification fonctionnelle, basée sur la capacité des neurones sensoriels à détecter une ou plusieurs modalités (mécanique, thermique ou chimique) et d'intensité différente. Ce travail de classification fonctionnelle a largement tiré profit des approches électrophysiologiques comme le patch-clamp, les techniques *ex-vivo* comme le nerf-peau (Zimmermann et al., 2009), l'enregistrement unitaire de neurone sensoriel sur animal anesthésié (Bessou and Perl, 1969; Fang et al., 2005), la microneurographie chez l'homme (Schmelz and Schmidt, 2010; Vallbo and Hagbarth, 1968) et récemment l'imagerie calcique *in vivo* (Chen et al., 2013; Tian et al., 2009). Selon le critère d'intensité, on distingue généralement des fibres à bas seuils d'activation (Low Threshold, LT) et à hauts seuils (High Threshold, HT), ces dernières étant considérées comme nociceptives. Concernant la classification selon les stimuli chimiques, qui est peu étudiée du fait leur nature très variée, on peut néanmoins mentionner les stimuli pruritogènes, activant spécifiquement certaines sous-classes de fibres afférentes. Cette sensation bien particulière ne sera pas détaillée dans cette thèse. Le lecteur pourra se référer pour plus d'informations à d'excellentes revues (Bautista et al., 2014; Dong and Dong, 2018; LaMotte et al., 2014; Meixiong and Dong, 2017). En plus des deux critères évoqués ci-dessus (modalité et intensité), le type de décharge de potentiel d'action évoqués par le stimulus peut également être utilisé, en particulier pour les mécanorécepteurs (MR) : on parlera d'adaptation rapide (RA : Rapidly Adapting) s'il présente une décharge phasique au début et à la fin de la stimulation tout en restant silencieux pendant celle-ci et on parlera d'adaptation lente (SA : Slowly Adapting) s'il décharge pendant toute la stimulation. Un sous type supplémentaire pourra être distingué selon s'il décharge de façon irrégulière (type I) ou régulière (type II).

Localisation tissulaire	Types de récepteurs/terminaisons et fibres associées	Modalités
Peau glabre	Cellules de Merkel (épiderme), corpuscules de Ruffini, Pacini et de Meissner (derme) (A β), terminaisons nerveuses libres (A β , A δ et C)	Mécanoperception, thermosensation, nociception
Peau poilue	Cellules de Merkel autour des follicules des poils, terminaisons dites en lanceolées autour d'un follicule d'un poil (A β , A δ , C), terminaisons nerveuses libres (A β , A δ , C)	Mécanoperception, thermosensation, nociception
Muscles et tendons	Fuseau neuromusculaire (A α et A β), organes tendineux de Golgi (A α), terminaisons nerveuses libres (A β ?, A δ et C)	Proprioception, Mécanoperception, nociception
Articulations	Organes tendineux de Golgi (A α), récepteurs articulaires, corpuscule de Ruffini et Pacini (A β), terminaisons nerveuses libres (A δ et C)	Proprioception, Mécanoperception, nociception
Viscères - Colon	Corpuscules de Pacini (A β , rare), terminaisons nerveuses libres dites en varicosités, laminaires, en branches, simples ou complexes au sein des épithéliums, des muscles, des ganglions et des vaisseaux sanguins (A δ et C).	Mécanoperception, thermosensation, nociception
Viscères - Vessie	Terminaisons nerveuses libres dites simples dans l'urothélium, simples, en branches et complexes dans le muscle lisse (A δ et C)	Mécanoperception, thermosensation, nociception

Table 2 : Caractéristiques des principaux récepteurs sensoriels cutanés, musculaires, articulaires et viscéraux

Présentation de différents organes récepteurs associés aux neurones sensoriels dans différents tissus : peau (glabre et poilue), muscles et articulations et viscères (colon et vessie). D'après Abaira and Ginty, 2013; Bessou et al., 1981; Cervero, 1994; Delmas et al., 2011; Djouhri and Lawson, 2004; Gebhart and Bielefeldt, 2016; Grundy et al., 2018; Heppelmann et al., 1988; Hines et al., 1996; Hoheisel et al., 2005; Li et al., 2011; Messlinger et al., 1995; Spencer et al., 2014, 2018.

Du fait de son interaction permanente avec l'environnement extérieur, il est retrouvé au niveau de la peau une grande diversité de neurones sensoriels et de récepteurs associés impliqués dans la détection de stimuli mécaniques nocifs et non-nocifs (Abaira and Ginty, 2013; Delmas et al., 2011; Moehring et al., 2018a; Morrison et al., 2008; Schepers and Ringkamp, 2010). Les différents mécanorécepteurs pourront ressentir différentes modalités, comme illustré ci-dessous pour ceux de la peau glabre et poilue et qui sont relativement bien connus de nos jours. Les récepteurs musculaires, articulaires et viscéraux ne seront pas détaillés mais il convient de noter que des travaux similaires de caractérisation ont été réalisés (Brierley et al., 2004; Hoheisel et al., 2005).

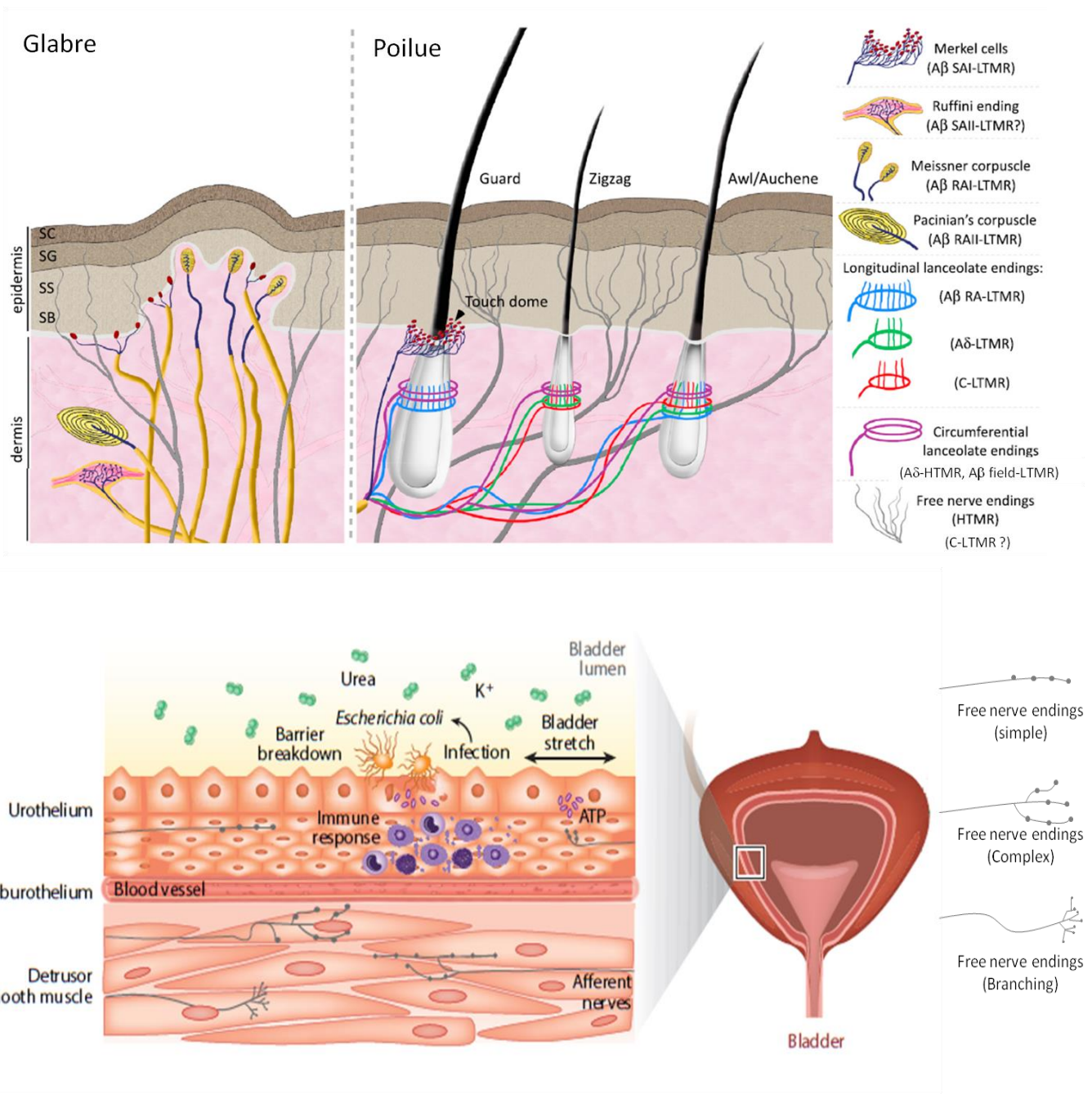


Figure 2 : Organisation et innervation sensorielle de deux tissus distincts, la peau glabre et poilue ainsi que la vessie

Illustration supérieure: Innervation de la peau glabre et poilue par différents récepteurs. 4 types de mécanorécepteurs sont présents dans la peau glabre, présentant différents niveau d'innervation du derme ou de l'épiderme, ainsi qu'une morphologie particulière. 3 grands types de poils vont être innervés de façon différente (terminaisons lancéolées longitudinales ou circonférentielles) et par plusieurs types de fibres. Les nocicepteurs et thermorécepteurs vont être retrouvés en majorités sous forme de terminaisons nerveuses libres. SC: Stratum Corneum, SG: Stratum Granulosum, SS: Stratum Spinosum, SB: Stratum Basale.

Illustration inférieure: Innervation de la paroi de la vessie. Différents types de morphologies de terminaisons libres (C et Aδ) vont être retrouvés au sein des différentes couches du tissu (urothélium et muscle lisse). D'après Abraira and Ginty, 2013; Bai et al., 2015; Ghitani et al., 2017; Grundy et al., 2018; Lou et al., 2013.

On distingue donc au niveau de la peau glabre :

-Les corpuscules de Meissner, avec un champ récepteur de petite taille et sensibles au toucher fin ainsi qu'aux vibrations de basse fréquence. Ils sont innervés par des fibres A β RA-I LTMR.

-Les corpuscules de Pacini, avec champ récepteur plus large et sensibles à la pression et aux vibrations intenses. Ils sont innervés par des fibres A β RA-II LTMR.

-Les cellules de Merkel, avec un champ récepteur fin et impliquées dans la détection des formes et de la texture, répondant à des stimulations de très faible intensité. Elles sont innervées par des fibres A β SA-I LTMR.

-Les corpuscules de Ruffini, sensibles à l'étirement de la peau et innervés par des fibres A β SA-II LTMR.

En plus des différentes structures décrites dans la Table 2, un niveau d'organisation en plus est observée au niveau de la peau poilue où différents types de poils peuvent être distingués, chacun ayant un rôle et une innervation particulière (circonférentielle et lancéolée) : Guard Hairs, Down Hairs ou Zigzag, Auchene et Tylotrichs (souvent associées aux Guard Hairs) (Figure 2).

Les fibres impliquées dans la thermosensation non-nocives ont des terminaisons libres, sont généralement unimodales, ont un seuil d'activation faible, des vitesses de conduction dans la gamme des fibres C et A δ et leurs terminaisons sont principalement localisées au niveau cutané et viscéral. Elles ont une activité spontanée aux températures cutanées normales (30-32°C) et s'adaptent aux changements de température en modifiant leur fréquence de décharge. Leur activité disparaît à partir d'une température trop haute (\approx 40°C pour les fibres sensibles au réchauffement) et trop basse (\approx 20°C pour les fibres sensibles au refroidissement). Il existe aussi des populations de fibres sensibles au froid sans activité basale et ne s'activant qu'en dessous d'un certain seuil (<27°C) (Schepers and Ringkamp, 2009; Vriens et al., 2014; Wang and Siemens, 2015). De plus il a été décrit que les fibres C-LTMR pouvaient aussi être activées par le refroidissement (François et al., 2015; Li et al., 2011a; Seal et al., 2009) (contesté par (Yarmolinsky et al., 2016)).

Pour tous les types de tissus évoqués précédemment (cutané et profond), les nocicepteurs, responsables de la détection de stimuli thermiques, mécaniques et chimiques nocifs à l'organisme, représentent la classe la plus diverse. Possédant très majoritairement des terminaisons nerveuses libres, ils ne sont activés que par des stimuli intenses et fréquemment une fibre pourra être activée par plusieurs modalités (on parle alors de nocicepteurs polymodaux). Les fibres de type A β /A δ transmettent principalement la douleur immédiate et bien localisée (primaire) tandis que les fibres C

véhiculent la douleur dite secondaire, lente et à la localisation diffuse. Les grands types de fibres nociceptives cutanées sont présentés dans la Table et la Figure 3. Cette caractérisation a largement bénéficié des expériences de nerf-peau (Zimmermann et al., 2009), d'enregistrement unitaire de neurone sensoriel sur animal anesthésié et d'imagerie calcique *in-vivo* (Chisholm et al., 2018; Wang et al., 2018a). Il est important de considérer les différences d'espèces dans cette classification fonctionnelle (rongeurs, chats, primates), ainsi que les variations de protocole entre plusieurs laboratoires : certaines fibres ont été retrouvées dans des proportions très différentes selon l'étude ou l'espèce, alimentant par exemple la récente controverse sur la polymodalité des fibres sensorielles (Chisholm et al., 2018; Emery et al., 2016; Ghitani et al., 2017; Kim et al., 2016; Smith-Edwards et al., 2016; Wang et al., 2018a). Il ressort néanmoins de ces différentes études qu'une partie importante des fibres sont effectivement polymodales (environ la moitié), la plus couramment retrouvée étant de type C-MH (C-fiber Mechano Heat). Les récents apports d'imagerie calcique *in vivo* ont permis de définir que les afférences primaires thermosensibles semblent coder de différentes façon les stimuli chaud et froid nocifs. Un stimulus chaud nocif est codé de façon graduelle : plus le stimulus est intense, plus le nombre de cellules activées va être important et les cellules recrutées vont répondre de plus en plus fort. Le froid nocif semble codé de façon combinatoire et donc dépendant seulement de différentes populations de neurones recrutées pour une température donnée (ex : une population pour 20°C, puis une différente pour 5°C etc.) (Wang et al., 2018a). Néanmoins il semblerait qu'une réponse graduelle au froid puisse aussi avoir lieu (Luiz et al., 2019; Yarmolinsky et al., 2016).

Il convient de noter qu'une particularité des afférences des tissus profonds par rapport à celles des tissus cutanés est qu'elles impliquent une proportion sensiblement moindre de neurones à bas seuil d'activation (Brierley et al., 2004; Hoheisel et al., 2005; Kellgren and Samuel, 1950; Mantyh, 2014). Cette différence d'organisation entre tissus profonds et cutanés aura de nombreuses conséquences : par exemple, il est maintenant bien connu que les afférences au niveau musculaire sont beaucoup plus à mêmes d'induire des phénomènes de sensibilisation, importants pour l'établissement de la douleur pathologique. La douleur viscérale se distingue par le fait qu'elle présente seulement une douleur secondaire (sourde, profonde et peu localisée) (Li and Baccei, 2017; McMahon and Wall, 1989; Wall and Woolf, 1984; Woolf and Wall, 1986).

Fibres	Types	Commentaires
A	A-Mechano Heat (A-MH)	Potentiellement chemosensible, hétérogénéité des seuils thermiques et mécaniques
A	A-Mechano (A-M)	Diversité de terminaisons périphériques (libres, autour de certains poils, lancéolées circonférentielles)
A	A-Mechano Cold (A-MC)	Hétérogénéité de seuil (28-10-0°C), diversité de terminaisons périphériques (libres, cellules de Merkel?)
A	A-Cold (A-C)	
A	A-Heat (A-H)	
A	A-Mechano Cold Heat (A-MCH)	Rare
C	C-Mechao Heat (C-MH)	Potentiellement chémosensible, abondante
C	C-Mechano (C-M)	Potentiellement chémosensible
C	C-Mechano Cold (C-MC)	Potentiellement chémosensible, hétérogénéité des seuils thermiques ($\approx 28^{\circ}\text{C}$ et $\approx 19^{\circ}\text{C}$)
C	C-Cold (C-C)	
C	C-Heat (C-H)	
C/A ?	C-Cold Heat (C-CH)	Rare
C	C-Mechano Cold Heat (C-MCH)	Rare, hétérogénéité de seuil à basse température
C	Silent	Sensibilisée en conditions pathologiques, mécanosensible et/ou thermosensible (froid uniquement) ?

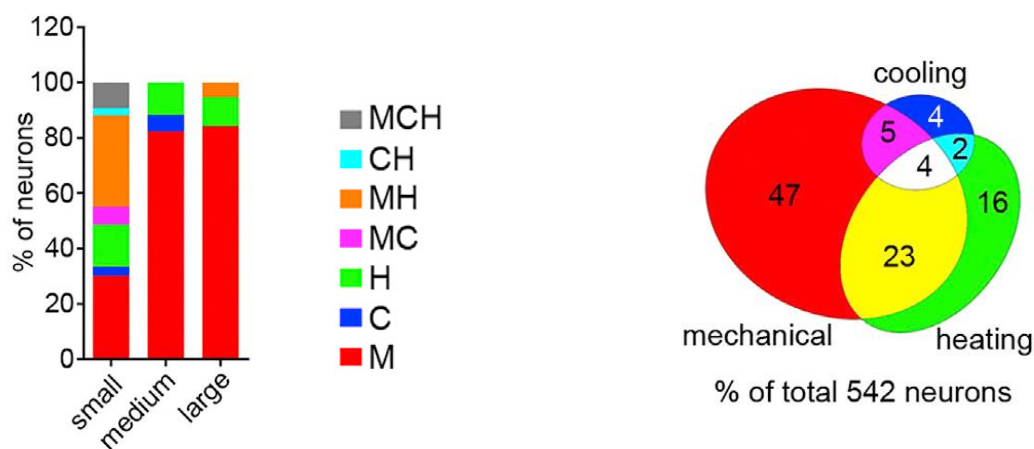


Table & Figure 3 : Diversité des nocicepteurs

Table 3: Classification des différentes fibres nociceptives caractérisées par des expériences de nerf-peau, de microneurographie ou d'imagerie calcique in vivo. La classification présentée ci-dessus se veut illustrative et non définitive, compte tenu de la variabilité inter-espèce et -laboratoire. (Campero et al., 2001; Chisholm et al., 2018; Dubner et al., 1975; Ghitani et al., 2017; Schepers and Ringkamp, 2009; Simone and Kajander, 1997; Yarmolinsky et al., 2016; Zimmermann et al., 2009)

Figure 3: Gauche: Proportion des différentes modalités des neurones sensoriels observées par imagerie calcique in vivo, classées selon leur taille et leur réponse à des stimuli thermiques ($38-50^{\circ}\text{C}$ / $20-6^{\circ}\text{C}$) et mécaniques (effleurement de la peau ou pincement). Droite: Diagramme de Venn montrant le chevauchement des différents types de fibres. Données extraites de Wang et al., 2018a.

iii. Moléculaire

Au vu de la complexité de la classification basée sur les vitesses de conduction, les seuils et modalités d'activation, d'autres méthodes ont été développées au cours des années. Cela inclut notamment divers marqueurs neurochimiques, avec par exemple certains récepteurs comme ceux de la famille Mas-related genes (Mrg) (Dong et al., 2001; Liu et al., 2009) ou ceux liant certains facteurs neutrophiques (McMahon et al., 1994), des canaux ioniques comme ceux de la famille des Transient Receptor Potential (TRP) (Julius, 2013), des molécules de surface ou du cytosquelette (certains neurofilaments, capacité du neurone à lier l'isolectin B4, IB4) (Escurat et al., 1990; Molliver et al., 1997), des neuropeptides comme le CGRP (McCoy et al., 2013; Wiesenfeld-Hallin et al., 1984) ou encore certains facteurs de transcription (Chen et al., 2006a; Lallemand and Ernfors, 2012). Ces aspects sont détaillés dans différentes revues récentes (Emery and Ernfors, 2018; Le Pichon and Chesler, 2014). Cette classification a grandement bénéficié des avancées produites grâce aux animaux knock-out (KO) pour un gène donné, aux progrès de la biologie du développement ainsi qu'à l'émergence des techniques de RNAseq (Stuart and Satija, 2019). Ces dernières ont été utilisées récemment par plusieurs groupes avec différents objectifs, principalement pour caractériser la grande hétérogénéité des neurones sensoriels dans leur ensemble (Li et al., 2016a; Usoskin et al., 2015; Zeisel et al., 2018) ou au sein de population neuronale particulière (Chiu et al., 2014; Goswami et al., 2014; Reynders et al., 2015; Sugino et al., 2019), dans des tissus particuliers (les DRG thoracolombaires étant très largement utilisés, ils sont souvent pris comme référence) avec le système intestinal ou la face (TG) (Hockley et al., 2018; Kogelman et al., 2017, 2018; Kupari et al., 2019; Lopes et al., 2017a; Muller et al., 2019; Nguyen et al., 2017), dans des modèles de douleur pathologique (neuropathie traumatique ou induite par des anticancéreux, migraine) (Athie et al., 2018; Bangash et al., 2018; Buonvicino et al., 2018; Cobos et al., 2018; Hirai et al., 2017; Hougaard Pedersen et al., 2016; Hu et al., 2016; Jeong et al., 2018; Li et al., 2015; Lopes et al., 2017b; Megat et al., 2018; Wang et al., 2016b) ou encore chez l'homme (Flegel et al., 2015; LaPaglia et al., 2017; Manteniotis et al., 2013; North et al., 2019; Ray et al., 2018).

Il est ainsi possible d'établir des classifications intégrant les différents critères anatomiques, fonctionnels et moléculaires/génétiques décrits dans cette partie. La Figure 4 propose une telle classification, en se basant sur les données publiées par les équipes de Patrik Ernfors et de Sten Linnarsson (Usoskin et al., 2015; Zeisel et al., 2018).

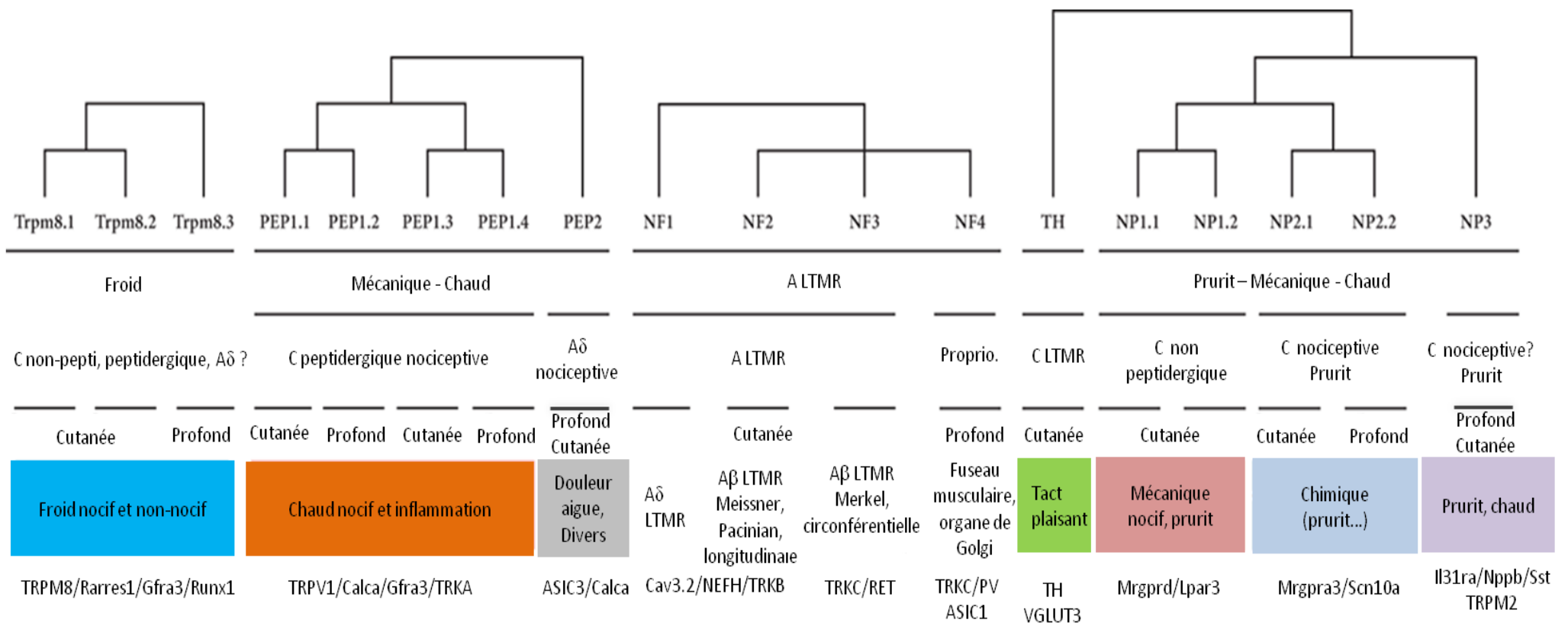


Figure 4 : Taxonomie des neurones sensoriels

Classification des neurones sensoriels chez la souris selon la modalité (mécanique, thermique, chimique), les fibres impliquées (Aβ, Aδ et C) et leur cible périphérique (cutanée ou profond, mécanorécepteur pour certains LTMR), le rôle physiologique potentiel, ainsi que différents marqueurs moléculaires (canaux ioniques, récepteurs, facteurs de transcriptions, neuropeptides, enzymes). Ce classement se base sur les populations de neurones myélinisés LTMR identifiées dans Usoskin et al., 2015, avec la fusion des populations de propriocepteurs NF4 et NF5, ainsi que sur les différentes populations de fibres C-LTMR, C peptidergiques et non-peptidergiques de Zeisel et al., 2018. Les données de Li et al., 2016a obtenus sur un échantillon restreint (197 cellules) se retrouvent incluses dans cette classification. PEP : peptidergique. NF : neurofilament. TH : Tyrosine Hydroxylase (C-LTMR). NP : non-peptidergique. D'après Emery and Ernfors, 2018.

Malgré les nombreuses informations apportées par ces travaux, il est indispensable de valider les marqueurs proposés surtout quant à leur niveau d'expression protéique associé et certaines incohérences peuvent être identifiées, comme des sous-représentations de certaines populations neuronales (voir par exemple (Nguyen et al., 2017)). Certains résultats de RNAseq remettent en cause par exemple la classification dichotomique des fibres C en « peptidergiques » et « non-peptidergiques » : les ARNm de certains neuropeptides dont le très utilisé CGRP sont retrouvés dans la plupart des populations, mais avec des variations d'expressions. De plus, de nombreuses sous-populations existent au sein d'un même cluster, comme dans le groupe « PEP2 » regroupant des fibres A δ nociceptives (Arcourt et al., 2017; Ghitani et al., 2017). L'utilisation d'un seul critère de classification conduit souvent à une interprétation partielle. Par exemple, la seule classification moléculaire est insuffisante pour distinguer différents types de neurones A-LTMRs, l'identification du mécanorécepteur périphérique étant alors indispensable. De plus, TrkC (récepteur neurotrophique liant la NT3, TROPOMYOSIN-RECEPTOR KINASE C), communément admis comme marqueur de fibres de types LTMRs, semble également marquer une sous population de nocicepteurs (McIlwrath et al., 2007). A l'inverse, cette classification moléculaire permet de distinguer le fait que les fibres C terminant à différents niveaux de l'épiderme et du derme représentent deux populations distinctes : Mrgprd+/IB4+ pour les fibres terminant proche de la surface au niveau de l'épiderme et impliquée dans la détection de stimuli mécaniques nocifs, et TRPV1+/CGRP+ pour celles ayant des terminaisons plus profondes (derme) et impliquées dans la détection de températures chaudes nocives. Le territoire innervé a donc également une importance : par exemple, le gène Tyrosine Hydroxylase (TH), utilisé fréquemment pour marquer les C-LTMRs, marque également une sous-population de neurones viscéraux n'ayant pas le phénotype LTMR des afférences cutanées mais qui correspondrait à l'inverse à une population de nocicepteurs (Hockley et al., 2018).

Ainsi, ce travail de classification à travers trois axes (anatomique, fonctionnel et moléculaire) illustre avant tout la grande diversité des neurones sensoriels. Il est important de souligner également que divers états pathologiques douloureux pourront considérablement influencer le phénotype des neurones sensoriels. Durant ma thèse, la cible que j'ai étudiée, ASIC1b, est principalement exprimée au sein des DRG et des TG. Cette classification sera reprise dans la partie de l'introduction traitant des canaux ASIC (Table11) afin de proposer une distribution d'ASIC1b avec les autres membres de cette famille de canaux ioniques principalement exprimée au sein des neurones des DRG et des TG, qui sont les sujets d'étude de ma thèse.

2. Rôle des cellules non-neuronales

Il est souvent considéré que le point de départ du message sensoriel est le neurone périphérique. En réalité, le stimulus va également agir sur les cellules voisines du neurone (seul certains neurones de la cornée font exception). Aussi, le type de tissu touché et son environnement vont pouvoir influencer la réponse neuronale. On peut citer par exemple les kératinocytes et les cellules de Merkel au niveau de la peau (Baumbauer et al., 2015; Hoffman et al., 2018; Radtke et al., 2010) ou encore l'ensemble complexe de cellules immunitaires et de vaisseaux sanguins au niveau des méninges et entourant les neurones (aspect détaillé par la suite dans la seconde partie) (Rua and McGavern, 2018). Certaines de ces cellules sont équipées des récepteurs moléculaires nécessaires à la transduction de ces stimuli. Il en résulte des effets autocrines et paracrines complexes capables de moduler la réponse neuronale à un stimulus donné (Makadia et al., 2018; Moehring et al., 2018b). Il est donc important de toujours considérer le tissu touché et l'environnement du neurone sensoriel.

III. Généralités sur le message neuronal des afférences primaires

Afin de s'adapter à son environnement, l'organisme doit être capable de détecter, transformer et intégrer les stimuli externes en réponse nerveuse. Plusieurs grandes familles de protéines vont être impliquées à différents niveaux dans ces phénomènes bioélectriques, en participant directement ou indirectement aux mouvements ioniques conduisant à la réponse neuronale. Cela inclut divers récepteurs ionotropiques (canaux ioniques, pompes et échangeurs) ainsi que des récepteurs métabotropiques appartenant à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs à activité catalytique (RAC) (Figure 5).

L'activité des neurones sensoriels résulte en particulier de la mise en jeu de multiples types de canaux ioniques. Un aperçu global et non exhaustif des canaux ioniques impliqués dans le PA des neurones sensoriels est présenté Figure 6. Généralement, on peut distinguer les canaux impliqués dans la détection d'un stimulus externe et ceux participant au PA lui-même. Ces derniers appartiennent majoritairement à la famille des canaux voltage-dépendants et la dépolarisation du PA est majoritairement due à l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav) (Cummins et al., 2018). Les canaux potassiques vont principalement participer à l'établissement du potentiel de repos du neurone et à la phase de repolarisation du PA. Les types de canaux potassiques impliqués dans les neurones sensoriels sont très variés : voltage-dépendants (Kv), calcium-activés (BK_{Ca}/SK_{Ca}), sodium-activés (K_{Na}), de fuite à deux domaines pores (K2P), activés par une hyperpolarisation (HCN) ou à rectification entrante (K_{ir} de type K_{ATP}). Les canaux calciques voltage-dépendants (Cav) vont eux contribuer à certaines phases particulières du PA (Blair and Bean, 2002), mais ils sont surtout connus pour leur rôle dans la sécrétion de vésicules contenant les neurotransmetteurs ou les neuropeptides.

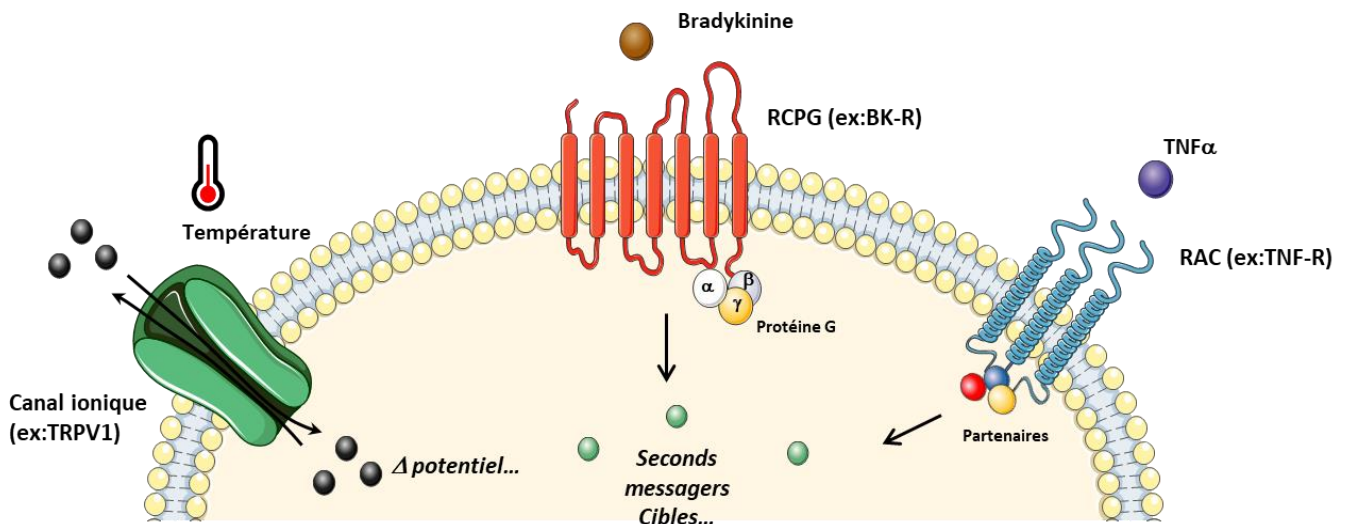


Figure 5 : Différents types de mécanismes de transduction du signal

Trois grands types de récepteurs sont à l'œuvre afin de permettre l'intégration du message. Des protéines aux fonctions ionotropiques (canaux ioniques, mais aussi pompes et échangeurs, non détaillés dans ce travail) vont permettre le mouvement des ions de part et d'autre de la membrane, entraînant principalement (mais pas seulement) des différences de potentiel membranaire. Des récepteurs métabotropiques de type RCPG et RAC vont agir via de multiples partenaires et effecteurs sur de nombreuses cibles, permettant une modulation fine du message neuronale.

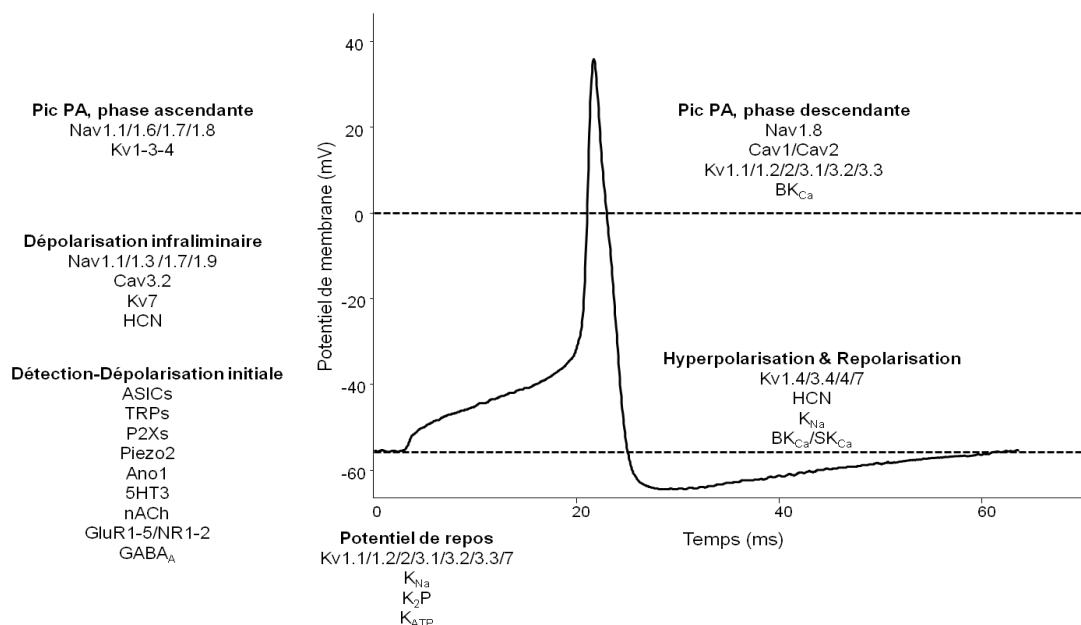


Figure 6: Différentes contributions de canaux ioniques au potentiel d'action d'un neurone sensoriel

Le déclenchement d'un potentiel d'action requiert la mise en jeu séquentielle d'un vaste panel de canaux ioniques. Différents types de canaux sensibles aux stimuli thermiques, mécaniques et chimiques vont participer à la dépolarisation initiale permettant le recrutement de canaux voltage-dépendants, amplifiant cette réponse et permettant le déclenchement du PA (pic PA). D'autres canaux interviennent alors pour repolariser le neurone afin qu'il puisse de nouveau produire un PA. Dans certaines conditions, pathologiques notamment, le neurone peut déclencher spontanément des PAs. Le répertoire de canaux exprimés varie sensiblement d'une région du neurone à l'autre (terminaison, nœud de Ranvier etc...) et d'une sous-population neuronale à l'autre, permettant la grande diversité fonctionnelle évoquée précédemment.

Durant ce travail de thèse, je me suis principalement intéressé à une famille de canaux ioniques ayant un potentiel rôle de « détecteur ». De ce fait, seul les membres de cette famille seront brièvement détaillés par la suite. Suite à ce parti pris, le lecteur pourra se référer à diverses revues récentes concernant les différentes familles de canaux voltage-dépendants impliqués dans la douleur, sodiques (Bennett et al., 2019; Cummins et al., 2018), potassiques (Busserolles et al., 2016; Emery et al., 2012; Feliciangeli et al., 2015; Tsantoulas and McMahon, 2014) et calciques (Bourinet et al., 2014; Zamponi et al., 2015, 2018).

IV. Aspects moléculaires de la détection des stimuli externes

De nombreux stimuli nocifs et de natures variées, rencontrés dans diverses pathologies, vont être capables d'activer et de sensibiliser les neurones sensoriels, souvent associés à une altération du tissu, parfois même du neurone sensoriel directement. De nombreux facteurs sont alors produits par le tissu touché ou les cellules immunitaires recrutées, et capables d'activer ou de sensibiliser les afférences primaires (détection chimique). Cette sensibilisation pourra également en retour moduler la réponse à des stimuli physiques externes (thermiques et mécaniques). Les paragraphes suivants détailleront les acteurs moléculaires de ces phénomènes, en particulier les canaux ioniques responsables de la détection thermique et mécanique. La détection chimique mettant également en jeu des RCPG et RAC, des exemples seront choisis pour illustrer leur rôle potentiel.

1. Thermique

La compréhension des mécanismes moléculaires de la thermosensation a connu un tournant majeur suite à l'identification du canal TRPV1 en 1997 (Caterina et al., 1997). Ce dernier a été identifié comme senseur de température avec un seuil d'activation proche de 43°C, température considérée comme nocive. En plus d'une activation par la chaleur, ce canal ionique est également activable par un vaste panel de médiateurs chimiques de nature variée, comme certaines molécules de la famille des vanilloïdes (capsaïcine, resiniferatoxine...), une acidose extracellulaire importante (pH<6), certains lipides et certaines voies de signalisation intracellulaire (Bhave et al., 2003; Julius, 2013; Nilius and Szallasi, 2014; Smart et al., 2000; Tominaga et al., 1998; Vellani et al., 2001). Les études des animaux TRPV1 KO ont ensuite démontré sa contribution *in vivo*, relativement faible chez des animaux sains dans la détection d'un stimulus chaud nocif mais importante en conditions pathologiques, notamment inflammatoire (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). En revanche, les fibres afférentes exprimant ce canal sont indispensables pour cette modalité thermique chaude nocive, laissant penser à une coopération de TRPV1 avec d'autres canaux détecteurs (Cavanaugh et

al., 2009). Ces travaux ont été le début d'une série de découvertes concernant les canaux TRP et la thermosensation. Au cours de cette période, plusieurs canaux TRP ont été identifiés et proposés comme senseurs thermiques. Cela inclut TRPV2 (Caterina et al., 1999), TRPV3 (Peier et al., 2002a; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002), TRPV4 (Güler et al., 2002; Strotmann et al., 2000), TRPM2 (Tan and McNaughton, 2016), TRPM3 (Lee et al., 2003; Vriens et al., 2011) et TRPA1 comme senseur des températures chaudes (Moparthy et al., 2016; Story et al., 2003). Ce dernier présente la particularité d'être également proposé comme senseur des températures froides, avec TRPM8 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b) et TRPC5 (Okada et al., 1998; Zimmermann et al., 2011). Ces canaux cationiques principalement perméables au sodium (Na^+) et au calcium (Ca^{++}) vont induire des courants entrants conduisant à une dépolarisation neuronale en réponse à des changements de température, cette dernière agissant probablement *via* la modification de la sensibilité des TRP au potentiel de membrane (Voets et al., 2004). En dépit de ces observations *in vitro*, les expériences conduites sur les animaux KO pour ces différents canaux se sont avérées dans un premier temps quelque peu décevantes (Moqrich et al., 2005; Park et al., 2011; Suzuki et al., 2003; Vriens et al., 2011, 2014; Zimmermann et al., 2011), hormis pour TRPM8 dont le rôle de senseur de température froide non-nocive et légèrement nocive est bien établi (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Certains travaux sont même parfois contradictoires, notamment pour le rôle de TRPA1 dans la perception thermique froide douloureuse (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006). Il s'avère pour ce dernier que le mécanisme d'activation est probablement indirect et dépendant de son statut redox et de molécules comme le peroxyde d'hydrogène potentiellement produites lors de changement de température, TRPA1 étant très sensible à cela du fait de sa structure et des segments ankyrines intracellulaires (Hinman et al., 2006; Luo et al., 2017; Macpherson et al., 2007; Moparthy et al., 2016). Une avancée significative a été réalisée récemment par le groupe de Thomas Voets grâce à l'utilisation d'animaux triple KO TRPV1-TRPA1-TRPM3 : ces animaux ont totalement perdu la capacité à détecter des températures chaudes nocives (Vandewauw et al., 2018).

A ces canaux TRP s'ajoutent le canal chlore calcium-activé Anoctamin1 (Ano1), pouvant servir d'amplificateur de l'activité de TRPV1 (Cho et al., 2012; Takayama et al., 2015). Les canaux potassiques vont également intervenir, ayant un rôle de frein au niveau de l'activité neuronale induite par ces changements de température. On peut citer certains K2P comme TREK1, TREK2, TRAAK ou encore TASK3 (Kang et al., 2005; Maingret et al., 2000; Morenilla-Palao et al., 2014; Pereira et al., 2014; Schneider et al., 2014). En effet ces canaux, comme TREK1, vont voir leur activité augmenter lorsque la température atteint des valeurs autour de 35-40°C, limitant ainsi la dépolarisation produite par les TRP (Noël et al., 2009). A l'inverse, un mécanisme de levée d'inhibition neuronale par le blocage de ces canaux potassiques est proposé pour expliquer une partie de l'activation des neurones sensoriels par le froid ainsi que par le chaud (>42°C), ne se

reposant donc pas principalement sur l'activité de canaux excitateurs (Vetter et al., 2013; Viana et al., 2002). De plus, certains canaux voltage-dépendants (Kv et Nav) sont également sensibles aux changements de température et nécessaires à la génération de PA lorsque les neurones sont soumis à des températures nocives (Lolignier et al., 2015, 2016; Luiz et al., 2019; Minett et al., 2012; Viana and Voets, 2018; Viana et al., 2002; Zimmermann et al., 2007). A ces mécanismes de détection directs, il est possible d'inclure un rôle des cellules environnantes comme les kératinocytes. Ces derniers vont intervenir dans la modulation du message thermique, via l'activation de canaux thermosensibles et le relargage de divers médiateurs par ces cellules non-neuronales (Lumpkin and Caterina, 2007). Des données récentes et préliminaires suggèrent que les kératinocytes peuvent relarguer de l'ATP suite à des stimulations thermiques chaudes ou froides, activant secondairement les canaux neuronaux P2X4 et modulant ainsi le comportement chez l'animal en réponse à ces stimulations (Moehring et al., 2018c).

2. Mécanique

Si les aspects moléculaires de la thermosensation commencent à être bien détaillés, l'état des connaissances concernant la détection des stimuli mécaniques est beaucoup plus pauvre, notamment à cause des difficultés à identifier des candidats potentiels, ainsi qu'aux différents mécanismes d'activation possibles (directement *via* la tension membranaire ou grâce à des échafaudages protéiques plus complexes) (Chalfie, 2009; Hamill and Martinac, 2001; Ranade et al., 2015). Les premières avancées ont été obtenus chez des organismes « simples » comme les bactéries *Escherichia Coli* (Sukharev et al., 1994), le nématode *Caenorhabditis elegans* (O'Hagan et al., 2005) et la mouche *Drosophila melanogaster* (Walker et al., 2000). Le premier canal ionique mécanosensible à être identifié chez les mammifères fut TREK1 (Patel et al., 1998). Ces travaux précurseurs ont permis de proposer différents canaux candidats : des membres de la famille Epithelial Sodium Chanel/Degenerin/ASIC (ENaC/DEG/ASIC) comme les ASIC et les protéines de type Stomatine (STOM) et apparentées (discuté dans la troisième partie), des homologues de TRPN ou no mechanoreceptor potential C (nompC), et des canaux TRP comme TRPA1 et TRPV4 (tous deux détaillés par la suite), TRPC1-3-6 et TRPP1-2 (Gottlieb et al., 2008; Maroto et al., 2005; Quick et al., 2012; Sharif-Naeini et al., 2009), ou encore des membres de la famille transmembrane cochlear-expressed gene/transmembrane channel-like (TMC) et les protéines associées, impliqués dans l'audition (Kawashima et al., 2011; Kurima et al., 2002). Concernant ces derniers, la preuve formelle de leur mécanosensibilité fut apportée il y a peu (Pan et al., 2018), mais ces canaux ne seront pas plus détaillés du fait de leur absence de rôle dans la douleur.

L'implication comme mécanosenseur de différents membres de la famille des ASIC et ENaC (voir partie trois de l'Introduction) et des TRP est controversée, notamment TRPV4, considéré plus comme un osmorécepteur (Lechner et al., 2011; Servin-Vences et al., 2017; Strotmann et al., 2000; Suzuki et al., 2003). TRPA1 a un rôle dans l'hypersensibilité mécanique pathologique bien établi mais son implication dans la sensibilité mécanique physiologique est plus controversée. Il semble que TRPA1 soit indirectement stimulé (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006, 2009; Zappia et al., 2016, 2017). L'identification des canaux PIEZO a permis un nouvel élan dans ce domaine (Coste et al., 2010, 2012). Deux membres, PIEZO1 et PIEZO2, ont été identifiés à ce jour et seul PIEZO2 a été impliqué dans les sensations tactiles puis dans la douleur mécanique. Il est exprimé dans des populations variées de neurones sensoriels nociceptifs et non-nociceptifs (Coste et al., 2010; Ranade et al., 2014; Szczot et al., 2017), ainsi que dans des organes mécanorécepteurs comme les cellules de Merkel (Woo et al., 2014). Son ablation génétique (KO et Knock-down) réduit fortement les courants mécanosensibles s'inactivant rapidement et présents dans les neurones non-nociceptifs. Initialement, PIEZO2 a ainsi été décrit comme étant le principal acteur responsable des sensations tactiles non douloureuses et proprioceptives chez la souris et chez l'homme (Chesler et al., 2016; Florez-Paz et al., 2016; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015). Néanmoins, sa distribution dans différentes sous-populations de nocicepteurs laissait présager un rôle plus large, en particulier dans la douleur. En effet, plusieurs études récentes ont démontré qu'il pouvait avoir cette fonction : PIEZO2 est positivement régulé par plusieurs voies de signalisation recrutés par des stimuli nociceptifs (comme la bradykinine et la voie PKA et PKC, voir partie suivante) (Dubin et al., 2012; Eijkelkamp et al., 2013; Prato et al., 2017). Il est impliqué en partie dans la réponse de certains nocicepteurs à haut seuil d'activation mécanique (Murthy et al., 2018a) et est impliqué dans différentes conditions pathologiques (Eijkelkamp et al., 2013; Murthy et al., 2018a; Szczot et al., 2018; Wetzel et al., 2016). Ainsi, grâce à de nouvelles études utilisant des modèles génétiques (souris Advilin-Cre versus HoxB8-Cre, permettant une couverture plus large des différentes sous-populations de neurones sensoriels par rapport aux premières études), un rôle de PIEZO2 dans la détection de stimuli mécaniques nocifs a pu être établi. De façon intéressante, ces études ainsi que d'autres montrent aussi les limites de l'utilisation des souris Advilin-Cre, très largement utilisées et souvent considérées à tort comme étant capable de cibler l'intégralité des neurones sensoriels (Kucharczyk et al., 2018).

Récemment, deux nouveaux canaux ioniques candidats ont été proposés :

-TACAN/TMEM120A, activé par des stimulations mécaniques fortes, présent largement au sein des neurones non-peptidergiques, et en grande partie responsable du courant mécano-activé à inactivation très lente (s'opposant à certaines études montrant que TRPA1 pourrait avoir ce rôle) et

impliqué dans l'hypersensibilité mécanique suite à une inflammation articulaire (Beaulieu-Laroche et al., 2018).

-OSCA/TMEM63A-B-C, identifié initialement chez les plantes et activé par des étirements membranaires (Murthy et al., 2018b). Son rôle dans les neurones sensoriels reste à définir mais il semblerait qu'il soit distribué dans de nombreuses sous-populations.

En plus de ces canaux excitateurs, plusieurs canaux potassiques mécanosensibles participent à la réponse globale des neurones sensoriels. L'activation des canaux TREK1, TREK2 et TRAAK, sensibles à l'étirement membranaire va contrebalancer l'effet des canaux excitateurs (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014). De façon similaire, les canaux Kv1.1 vont également avoir un tel rôle de frein de l'excitabilité neuronale (Hao et al., 2013). Les souris KO pour ces gènes sont hypersensibles en réponse à des stimulations mécaniques.

Là encore, les cellules non-neuronales vont également avoir un rôle important dans la réponse à un stimulus mécanique (Moehring et al., 2018a) : kératinocytes et cellules de Merkel sont maintenant bien connues pour détecter des stimuli mécaniques directement et exercer en retour des effets paracrines complexes, permettant une modulation fine de la réponse des neurones sensoriels (Baumbauer et al., 2015; Hoffman et al., 2018; Radtke et al., 2010).

3. Chimique

Comparé aux deux modalités décrites précédemment, la détection des stimuli chimiques nocifs va mettre en jeu un nombre considérable de canaux ioniques, de récepteurs et de voies de signalisation. L'implication de ces acteurs pourra varier d'une pathologie à l'autre (neuropathie, ischémie, tumeur, infection, arthrite etc.). Ces différentes conditions vont très souvent être associées à des dommages tissulaires et à une activation de cellules immunitaires (McMahon et al., 2015). L'origine de ces médiateurs chimiques sera elle aussi variée : cellules environnantes lésées, cellules immunitaires nouvellement recrutées (neutrophiles, lymphocytes T, Natural Killer) ou résidentes (macrophages, mastocytes, cellules dendritiques), neurones sensoriels etc. Un aperçu global et non exhaustif de différents médiateurs chimiques ainsi que de leurs mécanismes d'action est présenté Table 4 (ne sont pas inclus la plupart des médiateurs impliqués spécifiquement dans le prurit ou certains ayant des effets analgésiques ; les mécanismes d'actions sont grandement simplifiés également). Ce tableau met également en valeur deux caractéristiques particulières du système nociceptif, convergence et redondance : plusieurs médiateurs vont entraîner l'activation d'une même cible (ex : Protéine kinase A, PKA, ou Protéine kinase C, PKC) et un récepteur (ex : TRPV1) sera capable d'intégrer plusieurs signaux nociceptifs.

Types de médiateurs	Médiateurs chimiques	Origines	Récepteurs	Mécanismes d'action
Acide	Acide	Cellules lésées, granules/vésicules sécrétées, activité métabolique etc.	ASIC-TRPV1-K2P, RCPG (GPR1-4, TDAG8, G2A), modulation de nombreuses cibles (Nav1.7, NMDA...)	Influx de cations, blocage efflux de K ⁺ , activation PKA/PKC
ATP et dérivés	ATP	cellules lésées, cellules immunitaires, plaquettes	P2X-P2Y, modulations d'autres cibles	Influx de cations (P2X), activation PKC (P2Y)
	Adénosine	Cellules endothéliales, immunitaires, fibroblastes	A1-2-3	Activation PKA
Amines	Glutamate	Cellules immunitaires, gliales, neuronales et plaquettes (5HT)	AMPA, NMDAR, KainateR, mGluR	Influx de cations (AMPA-NMDA-Kainate), activation PKC (mGluR)
	Sérotonine		5HT1-2-3-4-5-6-7R, modulation d'autres cibles (ASIC...)	Influx de cations (5HT3R), activation PKA/PKC, inhibition PKA (5HT1-5R)
	Noradrénaline		α 1, β 1-2	Activation PKA-PKC
	Histamine		H1-2-4R	Activation PKC
	Acétylcholine		nAch-R3-6-7 (α), mAch-Rs	Influx de cations (nAch-R), Activation PKC, inhibition PKA
Cytokines	Interleukine-1 β	Cellules immunitaires, gliales et neuronales	IL1R1-2	Activation MAPK (p38-JNK)
	Interleukine-6		IL6R (gp130)	Activation JAK/STAT, Pi3K, MAPK (ERK)
	Interleukine-17		IL17Rc	Activation Pi3K, MAPK (ERK)
	GM-CSF		Csf2ra	Activation JAK/STAT
	TNF α		TNFR1-2	Activation MAPK (p38-JNK), Pi3K, NF-kB
Neurotrophines	NGF	Cellules neuronales principalement, cellules immunitaires <i>de novo</i> , autres	TrkA et associés (p75...)	Activation MAPK (ERK, p38, JNK), Pi3K, NF-kB, PKC
	BDNF		TrkB	Activation MAPK (ERK), PKC, CAMKII, Pi3K
	GDNF, artemine, neurturine		GFR α 1-3 et RET	Activation MAPK, Pi3K, Src
Chimiokines	CCL2-3-4-5	Cellules neuronales, immunitaires, Schwann	CCR2 (neurones) CCR1-5 (immunitaires)	Activation MAPK, PKC, Pi3K
	CXCL5		CXCR2 (cellules immunitaires principalement, neurones)	
	CX3CL1		CX3CR (cellules immunitaires)	
Peptides/Protéines	CGRP	Neurones	CLR-RAMP	Activation PKA-PKC
	SP	Neurones	NK1R	Activation PKA-PKC
	Bradykinine	Plasma sanguin	B1-2	Activation PKA-PKC
	VIP	Neurones	VPAC1-2	Activation PKA
	PACAP	Neurones	PAC1	Activation PKA-PKC
	EGF	Nombreux types cellulaires (épithéliums etc.), tumeurs	EGFR	Activation PKC, MAPK, Src, Pi3K
	VEGF	Nombreux types cellulaires (épithéliums etc.), tumeurs	VEGFR1	Activation PKC, Src, Pi3K
	Endothéline	Cellules endothéliales, immunitaires, neuronales	ETA-b	Activation PKA-PKC
	Prokinéticine	Macrophages et neutrophiles	PKR1-2	Activation PKA-PKC
Wnt	Nombreux types cellulaires	Fzd	Activation PKC, Src, CamKII, MAPK (JNK)	
Lipides et dérivés	Acide Arachidonique	Membrane plasmique, métabolisme, via action d'enzymes (PLA2, COXs, Autotaxine, sphingosine kinase etc.)	Précurseur métabolique, modulation nombreuses cibles	Modification activité des cibles (ASIC, TRP, K2P...)
	Lysophospholipides		LPA1-3, modulation nombreuses cibles	Activation PKA-PKC-MAPK, modification activité des cibles (ASIC, TRPV1, K2P...)
	Prostaglandines		EP1-2-3-4, DP1-2, IP, TP	Activation PKA-PKC
	Leucotriènes		BLT1, CysLT1-2	Activation PKA-PKC
	PAF		PAF _r	Activation PKA, PKC
	Sphingolipides et céramides		S1PR3	Activation PKC
Radicaux oxygénés	NO	Neurones, cellules immunitaires, endothéliales	Guanylate cyclase, nombreuses autres cibles	Activation GMPC-PKG, modification activité des cibles (nitrosylation)
	ROS	Nombreux types cellulaires (neuronal, immunitaire, cellules lésées etc.)	nombreuses autres cibles	Modifications activité des cibles
ARN	miARN	Neurones, autres types cellulaires	TLR7, TRPA1	Influx de cations (TRPA1), blocage efflux de K ⁺ , activation MAPK, NF-kB
Protéases	Trypsines, Tryptases, certaines enzymes de la coagulation, elastase, cathepsin S	Mastocytes, neutrophiles	PAR2	Activation PKA-PKC
Irritants	Molécules avec groupements réactifs (oxygène, soufre): polluants, formaldéhyde, acroléine etc.	Cellules lésées, cellules immunitaires, environnement externe	TRPA1	Influx de cations
Pathogènes	Streptolysine, LPS, zymosane, flagelline etc.	Paroi bactérienne, molécules sécrétées etc.	TLR4-5, FPR1, TRPA1	Influx de cations (TRPA1), activation MAPK (JNK, p38), NF-kB, PKC

Table 4 : Présentation des principaux stimuli chimiques douloureux

De multiples médiateurs sont capables d'activer et/ou moduler l'activité des neurones sensoriels via différents mécanismes. Ces médiateurs pourront être retrouvés dans diverses pathologies douloureuses. Il convient de noter que l'effet proalgique de certains médiateurs est sujet à controverse (ex : GDNF et BDNF, NO, lipides, acétylcholine et mAChR etc.). D'après Amaya et al., 2013; Baral et al., 2019; Bautista et al., 2006; Bree and Levy, 2016; Chiu et al., 2013; Chiurchiù et al., 2018, 2018; Constantin et al., 2008; Cook et al., 2018; Denk et al., 2017; Dennis and Norris, 2015; Ferrari et al., 2016; Han et al., 2018; Hill et al., 2018; Jimenez-Vargas et al., 2018; Kwiatkowski and Mika, 2018; Martin et al., 2017; Miyamoto et al., 2009; Nencini et al., 2018; Park et al., 2014; Petho and Reeh, 2012; Ren and Torres, 2009; Selvaraj et al., 2015; Seo et al., 2011; Simonetti et al., 2014; Steen and Reeh, 1993a; Vellani et al., 2006; Vicuña et al., 2015; Zeitz et al., 2002; Zhang et al., 2018, 2013b; Zhou et al., 1996; Zimmermann et al., 2002. Certaines données ont également été obtenues sur le site de l'IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) (<http://www.guidetopharmacology.org/>) et celui du KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, PATHWAY database) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Il serait réducteur de ne présenter les mécanismes d'action évoqués dans la Table 4 que sous forme d'activation de protéines kinases. La réalité est en effet bien plus complexe : un RCPG et un RAC vont très souvent interagir avec différentes protéines partenaires. Ces échafaudages complexes permettent une spécificité d'interaction avec certaines protéines cibles, d'activation de voies de signalisation particulière ou de modification de l'adressage membranaire du récepteur, et tout ceci de façon dynamique (Ranjan et al., 2017). Du fait de la redondance de certains récepteurs et de leur activation par plusieurs ligands, des phénomènes de biais de signalisation pourront être observés (ex : récepteur p75 et neurotrophines, hétérodimères de RCPG). En condition pathologique douloureuse, ces régulations pourront être modifiées, incluant des changements de voies de signalisation activées par un même récepteur (ex : prostaglandine E2 et activation *de novo* de la PKC en condition pathologique), des synergies d'effets entre deux médiateurs profitant de l'activation de certaines voies de signalisation par l'un avant l'activation de l'autre (ex : la sérotonine potentialisant l'effet de la bradykinine), des réorganisations des complexes récepteurs/partenaires (signalisation β -arrestine dépendante, signalisation endosomale comme pour les récepteurs PAR2 et les protéases ou CLR-RAMP et CGRP, expression de récepteurs inductibles comme le récepteur B1 à la bradykinine) Jimenez-Vargas et al., 2018; Petho and Reeh, 2012; Yarwood et al., 2017). Les voies de signalisation de deux médiateurs, la bradykinine et le TNF α , couramment rencontrés dans différents contextes pathologiques douloureux, sont présentées à titre d'exemples Figure 7.

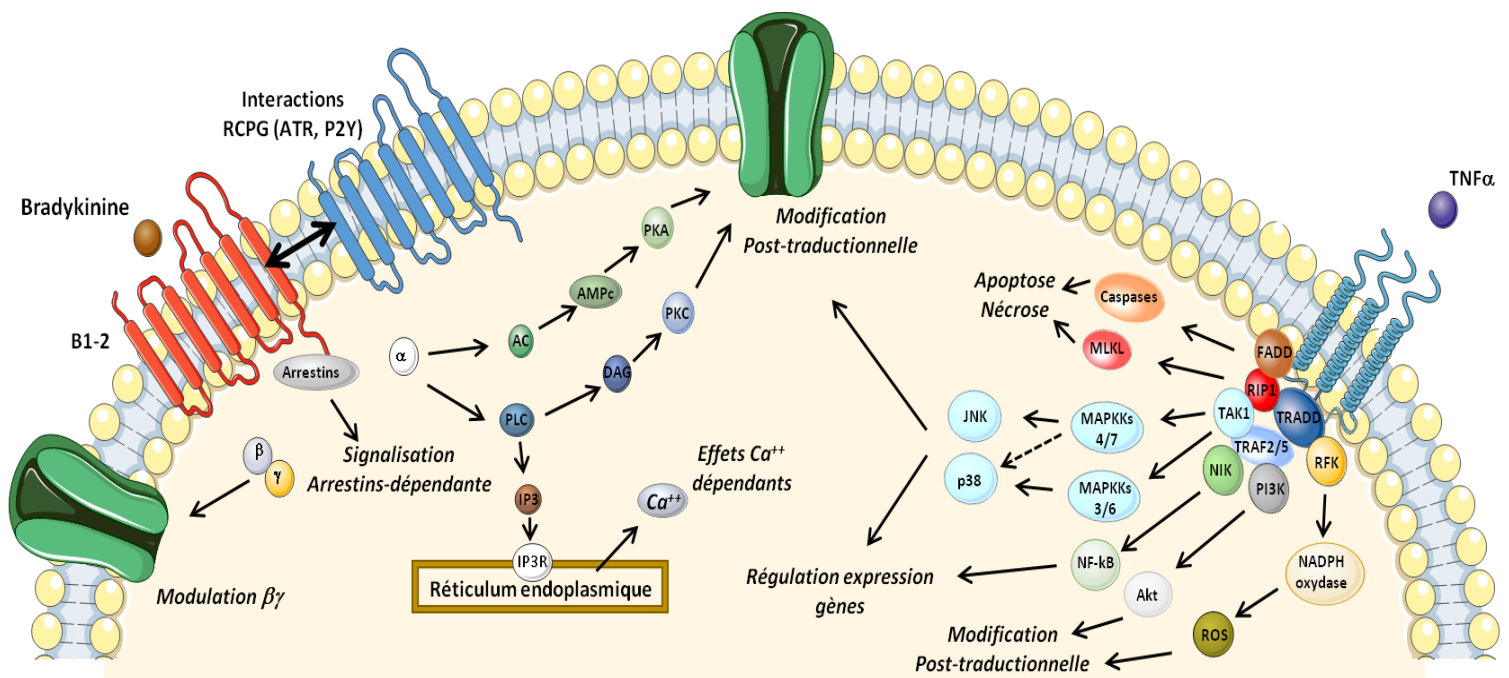


Figure 7 : Exemples des voies de signalisation intracellulaires liées à la bradykinine (RCPG) et au TNF α (RAC)

L'activation des récepteurs B1 ou B2 par la bradykinine entraîne la dissociation des sous-unités de la protéine G : α , selon son type, pourra activer l'adénylate cyclase (AC) ou la phospholipase C, conduisant in fine à l'activation de la PKA et de la PKC, respectivement, ainsi que la mobilisation de Ca^{++} intracellulaire (activation d'enzymes, régulation de gènes etc.); $\beta\gamma$ pourra directement interagir et moduler plusieurs cibles (ex : canaux calciques voltage-dépendants). Suite à cela, des protéines de la famille des arrestines pourront se fixer sur le récepteur et, en plus de leurs rôles dans l'internalisation des récepteurs, initier de nombreuses autres voies de signalisation (MAPK, activation Phospholipase A2 (PLA2) ou nitric oxide synthase (NOS) etc.). Les récepteurs B2 peuvent aussi s'associer avec les récepteurs ATR1 à l'angiotensine ou les P2Y2, modifiant leur activité respective. D'après De Waard et al., 1997; Kuhr et al., 2010; Peterson and Luttrell, 2017; Petho and Reeh, 2012; Wilson et al., 2013; Yashima et al., 2015.

L'activation des récepteurs TNFR1 ou 2 par le TNF α peut entraîner l'activation de multiples voies de signalisation : voies de mort cellulaire via RIP1-MLKL (nécrose) et FADD-caspases (apoptose), activation des MAPKs via TAK1 (MAPKKK) puis des MAPKKs respectives, activation du facteur de transcription NF- κ B via NIK, de la voie Pi3K-Akt et production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) grâce au complexe RFK-NADPH oxydase. Tous ces effets sont donc grandement dépendants de l'association du récepteur avec de multiples protéines partenaires, TRADD et TRAF2/5 étant centrales. Ces associations sont très variables et dépendantes du type ainsi que du contexte cellulaire. D'après Blaser et al., 2016; Liu et al., 1996; Micheau and Tschopp, 2003; Natoli et al., 1997; Siegmund et al., 2018; Song et al., 1997.

Les effets observés au niveau des neurones sensoriels seront donc très nombreux. Ils se traduiront principalement soit par une activation directe du neurone ainsi qu'à une augmentation de l'excitabilité de ces derniers, ou encore une diminution du seuil d'activation pour une modalité. On peut citer comme exemple la réduction du seuil d'activation par la chaleur de TRPV1 suite à

l'activation des TNFR2 et l'activation de la voie p38 (Constantin et al., 2008), l'augmentation de la réponse liée à ce dernier, grâce à l'augmentation à la fois du nombre de canaux à la membrane plasmique ainsi que de leur activité intrinsèque, ceci du à l'action combinée de la PKA et de la PKC (Zhang et al., 2008).

Bien que le neurone sensoriel soit l'un des principaux éléments d'intérêts dans ces travaux de thèse, il est indispensable d'évoquer brièvement la suite du cheminement du message somatosensoriel, à savoir son intégration au niveau spinal et supra-spinal.

V. Intégration spinale et supra-spinale du message neuronal nociceptif

1. Organisation de la moelle épinière et modulation spinale

Si la classification des neurones sensoriels peut sembler difficile à saisir au premier abord, un tout autre niveau de complexité est rencontré dans la moelle épinière. Cette classification est historiquement basée sur les travaux de Rexed, distinguant différentes couches appelées laminae et numérotées de I à X en partant de la corne dorsale vers la corne ventrale (Rexed, 1952). Les afférences primaires pénètrent dans les différentes laminae *via* la racine dorsale. La moelle épinière représente un lieu de transition de l'information douloureuse ainsi qu'un premier système de filtration et de codage de ce message (voir de deuxième niveau, si l'on considère des travaux montrant déjà une modulation au sein même du DRG (Devor, 1999; Du et al., 2017)). L'innervation de la moelle épinière va alors suivre un schéma d'organisation précis selon les modalités des neurones sensoriels (Basbaum et al., 2009):

-Les fibres C et A δ impliquées dans la nociception vont faire synapse au niveau des laminae I, II externe et V

-Les fibres C, A δ et A β impliqués dans la détection d'information non-nocive (ex : tact) vont se terminer dans les laminae II interne, III, IV et V. Un embranchement axonal de certaines de ces fibres va également se projeter au niveau du tronc cérébral.

-Les fibres A α et A β impliqués dans la proprioception vont rentrer au niveau des laminae VII et VIII. Ces fibres peuvent également faire un embranchement axonal jusqu'au tronc cérébral.

Bien qu'il existe un chevauchement au niveau des projections venant de neurones sensoriels répondant à des stimulations différentes (faible versus forte intensité), il y a également une certaine ségrégation fonctionnelle, notamment au niveau des couches superficielles. A cette organisation simplifiée on peut ajouter :

-Une différence d'organisation spatiale (plan médio-latéral et raustro-caudal) selon l'origine des neurones sensoriels et des territoires innervés (ex : peau versus viscère), et ce parfois même au sein d'une population homogène d'afférences primaires (ex : mécanocicepteur Mrgprd+ innervant la surface plantaire de la patte versus ceux innervant la jambe). Les afférences viscérales ont la caractéristique de souvent converger vers un neurone recevant d'autres types d'informations et/ou de territoires différents (phénomène de convergence), à l'origine des particularités de la douleur viscérale évoquées précédemment. Les neurones appelés wide-dynamic range (WDR), reçoivent des informations nocives et non-nocives et sont principalement localisés dans la lamina V. (Abraira et al., 2017; McMahon and Koltzenburg, 2013; Olson et al., 2017).

-Des différences morphologiques des neurones ciblés au sein de la moelle : 4 grands types ont été identifiés (Radial, vertical, Central et Islet). Une cartographie a été récemment élaboré pour les LTMR et leur connexions (Abraira et al., 2017; McMahon and Koltzenburg, 2013; Todd, 2010; Zhang et al., 2019).

-Des différences fonctionnelles et moléculaires, pouvant se baser sur plusieurs critères : rôle du neurone (projection, interneurone), types de décharges de potentiel d'action, types de neurotransmetteurs (excitateurs versus inhibiteurs) ou encore selon le profil de marqueurs neurochimiques (Gatto et al., 2019; Todd, 2017; Todd and Wang, 2018).

L'information venant des neurones sensoriels va donc subir un filtrage et un codage à ce niveau, résultant de la connectivité extrêmement élaborée entre les afférences primaires, différents interneurones et des projections descendantes (Prescott et al., 2014) (Figure 8). La compréhension de ces aspects a également pu bénéficier des avancées techniques récentes : virus et visualisation anatomique précise (Cai et al., 2019; Ciabatti et al., 2017; François et al., 2017; Qi et al., 2019; Zhang et al., 2015), imagerie calcique (Liu et al., 2018a; Ran et al., 2016), souris KO (Abraira et al., 2017; Duan et al., 2014) et RNAseq (Chamessian et al., 2018; Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018; Zeisel et al., 2018), aboutissant à l'identification de plusieurs circuits importants dans la perception sensorielle douloureuse ou non (Abraira et al., 2017; Duan et al., 2014; Sun et al., 2017a), ainsi que des changements associés à des conditions pathologiques (Cheng et al., 2017; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2015). En effet, la corne dorsale de la moelle épinière est le siège de nombreux changements de nature diverses lors de pathologies douloureuses (activation microglie et astrocyte, plasticité synaptique, réorganisation de circuits etc.). Ces aspects ne seront pas plus détaillés, le lecteur pourra se référer à différentes revues récentes couvrant ce sujet (Bardoni et al., 2013; Braz et al., 2014; Chen et al., 2018; Gatto et al., 2019; Koch et al., 2017; Luo et al., 2014; Moehring et al., 2018a; Peirs and Seal, 2016; Sandkühler, 2009; Zeilhofer et al., 2012).

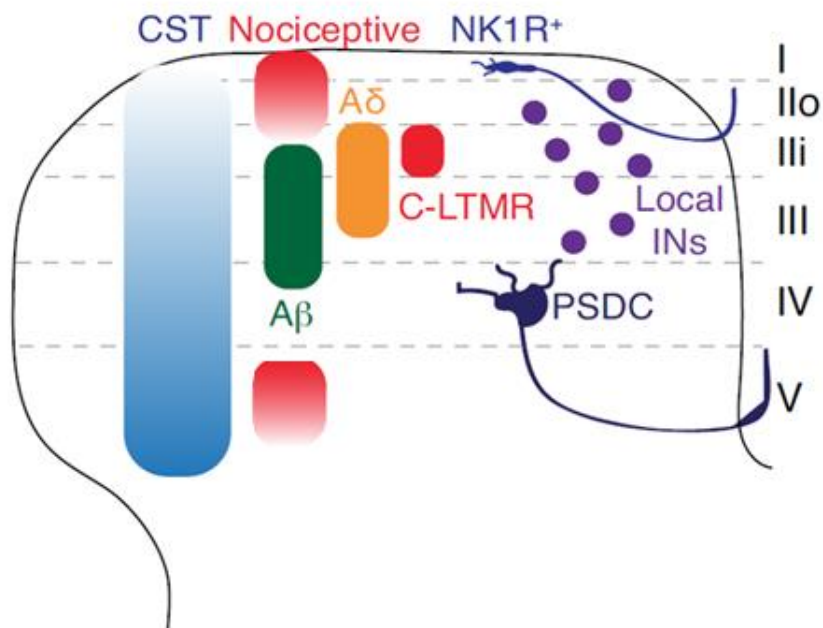


Figure 8 : Organisation schématique de la cornue dorsale de la moelle épinière et de l'intégration des afférences primaires

Les différents types de neurones sensoriels vont se projeter au sein de la cornue dorsale de la moelle épinière en suivant une organisation particulière. Les nocicepteurs se projettent principalement dans les laminae I, Ilo (outer) et V, tandis que les LTMR dans les laminae Ili (inner), III, IV voir V. Plusieurs types de neurones de projections vont transmettre l'information neuronale nociceptive (exprimant NK1R) ou tactile (ciblant la colonne dorsale, Post Synaptic Dorsal Column). Un réseau complexe d'interneurones (INs) excitateurs/inhibiteurs, ainsi que de projections descendantes (notamment corticales pour les LTMR, Corticospinal tract, CST), permettra une modulation fine du message sensoriel. D'après Gatto et al., 2019.

2. Projection spinale

Les neurones de projection vont ensuite envoyer le message neuronal vers différentes zones cérébrales et plusieurs voies ascendantes pourront être distinguées. Ces neurones de projection, parfois caractérisés par le récepteur à la substance P NK1R, sont concentrés principalement dans la lamina I (majoritairement pour les informations thermiques et douloureuses) et dans une moindre mesure dans les laminae III à V. Un neurone de projection pourra très souvent innerver plusieurs centres supra-spinaux. De plus, il a été décrit pour ces neurones des bifurcations axonales au sein de la moelle épinière. De façon intéressante, il a été démontré chez le rat que la part de chaque centre supra-spinal innervé par ces neurones de projection pourra varier selon la localisation somatotypique : par exemple, 95% de ces neurones de projection du segment lombaire L4 vont innerver le noyau parabrachial latéral (PB), un tiers la substance grise périaqueducule (PAG), un quart le noyau du tractus solitaire et seulement 5% le thalamus ; ces proportions seront nettement différentes chez le primate. A l'inverse, au niveau des segments cervicaux, la proportion de

projection thalamique va augmenter. On distingue donc des projections axonales directes des LTMR ciblant des neurones dans le tronc cérébral, recevant aussi des projections indirectes de ces LTMR *via* un neurone de projection (situé lamina III-V). Cet ensemble va constituer la colonne dorsale, dont les neurones vont se projeter ensuite vers le thalamus. A cela s'ajoute d'autres types de projections, comme le tractus spinothalamique, spinomésencéphalique, spinoréticulaire, spinoparabrachial, spinothalamique et spinocerebellum, ciblant différentes structures cérébrales. Il convient de noter que plusieurs classifications de ces projections ont été proposées, avec par exemple, une simple dichotomie entre tractus spinothalamique (composante sensori-discriminative de la douleur) et tractus spinoparabrachial (composante affective/émotionnelle) (Abraira and Ginty, 2013; Basbaum et al., 2009; Braz et al., 2014; Kandel and Schwartz, 2013; Kuner and Flor, 2016). Une présentation anatomique précise de ces tractus ascendants et descendants dans la moelle est détaillée par Sengul and Watson, 2012.

3. Intégration supra-spinale du message neuronal douloureux

L'expérience douloureuse dans son ensemble (sensorielle, émotionnelle, cognitive) va donc résulter de l'activation et de l'interaction de multiples régions cérébrales : thalamus, cortex somatosensoriel (S1 et S2), insula, cortex cingulaire antérieur (ACC), amygdale, cortex préfrontal, noyau parabrachial, ganglions de la base etc. (Kuner and Flor, 2016) (Figure 9). Les progrès de l'imagerie ont permis de visualiser l'activation et les modifications de ces nombreuses régions chez l'homme, et ce dans différentes conditions (notamment pathologiques) (Bushnell et al., 2013). Cet ensemble de régions cérébrales recrutées lors d'expériences douloureuses est parfois appelé matrice de la douleur (« Pain matrix ») (Wager et al., 2013). Ce concept a été raffiné, en la subdivisant en trois sous-matrices. La première est dite nociceptive et résulte d'une activation précoce de différentes régions (principalement thalamus, insula et cortex cingulaire et somatosensoriel) suite à un stimulus douloureux. La destruction de certaines zones recrutées dans cette matrice nociceptive peut aboutir à des déficits dans l'intégration de la douleur, ce qui n'est pas le cas des régions des deux autres matrices. Cette première matrice est cependant retrouvée active chez des patients pendant leur sommeil ou en étant dans le coma, nécessitant donc la définition d'autres matrices pour illustrer un état conscient de la douleur. La deuxième matrice mettra en jeu d'autres régions de l'insula et du cortex cingulaire, et préfrontal. Cette deuxième matrice permet la modulation de réactions végétatives et la perception consciente de la douleur (classification, mémorisation, évaluation etc.). La troisième matrice mettra en jeu plusieurs régions diffuses (cortex orbitofrontal, préfrontal, régions liés au système limbique etc.).

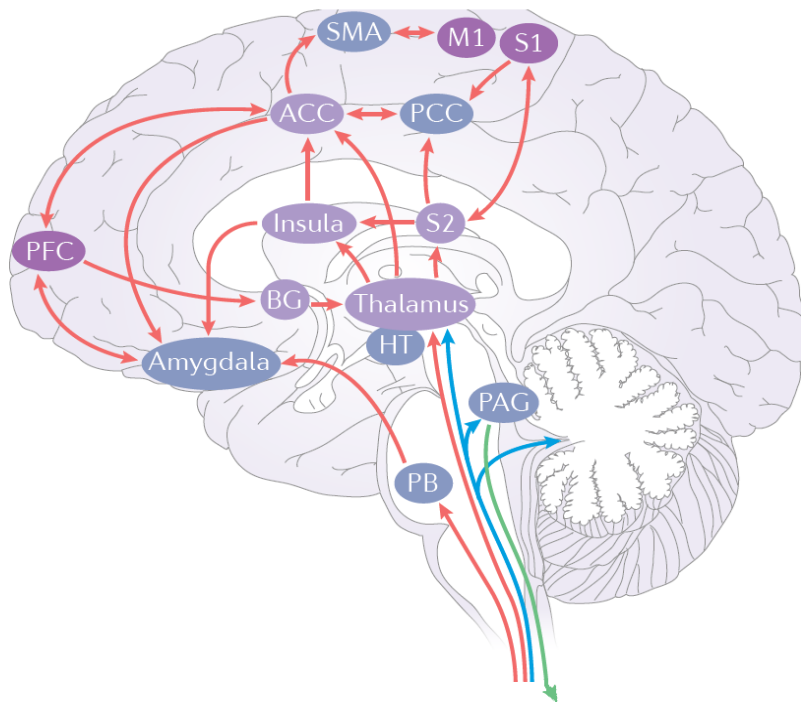


Figure 9 : Structures cérébrales impliquées dans l'intégration et la modulation de la douleur

Divers faisceaux ascendants (rouge et bleu) vont venir activer un ensemble complexe de régions cérébrales impliqués dans les diverses composantes de la douleur : sensorielle, émotionnelle et cognitive. De multiples interconnexions existent entre différentes régions, participant à l'élaboration complexe de l'expérience douloureuse. Différents noyaux seront capables de moduler l'information neuronale ascendante via des contrôles descendants au niveau spinal (vert). PB : Noyau Parabrachial, PAG : Substance Grise Periaqueducale, HT : Hypothalamus, BG : Ganglions de la Base, S1-S2 : Cortex Somatosensoriel 1 et 2, M1 : Cortex moteur, SMA : Zone Motrice Complémentaire, ACC : Cortex Cingulaire Antérieur, PCC : Cortex Cingulaire Postérieur, PFC : Cortex Préfrontal. D'après (Kuner and Flor, 2016).

Cette matrice est liée notamment aux effets placebo, au self-control vis-à-vis de la douleur, aux croyances ou à notre état émotionnel face à un stimulus douloureux (Garcia-Larrea and Peyron, 2013). Certaines de ces régions évoquées sont connectées à différents noyaux importants dans les contrôles descendants de la douleur (PAG, Rostral Ventromedial Medulla (RVM), locus coeruleus, amygdale, ainsi que certaines zones corticales). Ces projections pourront inhiber ou au contraire faciliter le message douloureux, *via* l'action de différents neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine, noradrénaline, enképhaline etc.) (Chen and Heinricher, 2019; Millan, 2002; Ossipov et al., 2010). L'ensemble des structures (matrices, contrôles descendants) pourront être touchées en conditions pathologiques (Baliki and Apkarian, 2015; Bushnell et al., 2013).

Ces différents aspects concernant les bases anatomiques et moléculaires de la douleur vont être repris et appliqués dans la partie suivante consacrée à la migraine, une pathologie douloureuse particulière.

La migraine, une pathologie douloureuse complexe

I. Aspects généraux

1. Epidémiologie, impact sociétal, classification et diagnostic

La migraine est une des pathologies les plus communes, avec une prévalence sur un an oscillant entre 15 et 20% de la population totale et touchant majoritairement les femmes (ratio 3:1). Son impact économique et plus généralement sur la qualité de vie des patients, est également considérable, étant l'une des pathologies les plus invalidantes. Le coût sociétal de cette maladie dans certains pays développés se chiffre en milliards (Burch et al., 2015; GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019; Steiner et al., 2014).

La migraine fait partie des céphalées (ou plus familièrement maux de têtes) dites primaires (sans lésion, contrairement aux céphalées liées par exemple à un trauma crânien ou à une infection), au même titre que les céphalées dites de tension, les plus fréquentes au sein de la population (Fumal and Schoenen, 2008), celles liées à l'algie vasculaire de la face (Hoffmann et al., 2017) ainsi que d'autres moins bien répertoriées (dues par exemple à la toux ou à un exercice physique). La classification ainsi que le diagnostic de la migraine est basé sur les critères de l'International Classification for Headache Disorders (ICHD), version 3 β (Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS), 2013). Ces critères sont listés dans la Table 5 et sont subdivisés en deux catégories : migraine avec ou sans aura (expliqué par la suite).

Pour une proportion non négligeable de patients migraineux (environ 2,5% par an), une transition vers un état chronique est observée. Cet état dit de migraine chronique est défini par au moins 15 jours avec une céphalée sur un mois, dont au moins 8 remplissent les critères de diagnostic de la migraine. Dans la plupart des cas, un abus médicamenteux est à l'origine du développement d'un tel état, le sevrage devenant alors l'indication thérapeutique de choix (Bigal and Lipton, 2008; Carlsen et al., 2017; Natoli et al., 2010; Pijpers et al., 2019). Son impact sur le patient est en revanche extrêmement important : un nombre important de comorbidités est retrouvé chez les migraineux chroniques et son traitement est plus difficile (Adams et al., 2015; D'Amico et al., 2018).

Critères migraine sans aura	Critères migraine avec aura
Au moins 5 crises remplissant les critères suivants	Au moins 2 crises remplissant les critères suivants
Maux de têtes durant 4 à 72h (non-traités ou traités sans succès)	Apparition d'au moins un ou plusieurs des symptômes suivants liés à l'aura et entièrement réversibles: 1) manifestations visuelles, 2) sensorielles, 3) touchant l'élocution/le langage, 4) motrices, 5) touchant le tronc cérébral, 6) la rétine
Maux de têtes ayant au moins deux des caractéristiques suivantes: 1) localisation unilatérale, 2) douleur pulsatile, 3) douleur modérée ou sévère, 4) aggravés par / causant l'évitement d'activité physique quotidienne (marche etc.)	Au moins deux des quatre caractéristiques suivantes: 1) au moins un symptôme d'aura s'étalant graduellement sur au moins 5 minutes, et/ou deux ou plus symptômes de l'aura occurant successivement, 2) chaque symptôme de l'aura dure entre 5 et 60 minutes, 3) au moins un symptôme de l'aura est unilatéral, 4) l'aura est accompagnée ou suivie dans les 60 minutes par une céphalée
Apparition d'au moins un des symptômes suivant pendant la céphalée: 1) nausée et/ou vomissement, 2) photophobie et phonophobie	

Table 5 : Critères de diagnostic de la migraine sans ou avec aura

Ces critères sont basés sur ceux de l'ICHD-3. Il convient de noter que certains symptômes parfois associés à la migraine ne sont pas listés, comme l'osmophobie, car considérés comme n'étant pas centraux au diagnostic.

2. Manifestations cliniques

La migraine est une pathologie complexe, accompagnée de nombreux symptômes de nature variée, dont la douleur. La migraine est subdivisée en quatre phases qui, bien que parfois décrites de façon linéaire d'un point de vue temporel, peuvent se chevaucher. L'ensemble de ces phases est représentée Figure 10. On distingue donc :

-La phase dite prémonitoire, ou prodrome. Celle-ci se caractérise par l'apparition de symptômes tels qu'un état de fatigue, des changements d'humeur, des difficultés de concentration, diverses hypersensibilités sensorielles, des variations hormonales ou encore des symptômes liés à une activation du SNA au niveau facial (larmoiement, rougeur, transpiration etc.) (Giffin et al., 2003; Schoonman et al., 2006). La prévalence de ces signes est très variable d'une étude à l'autre, allant de moins de 10% à presque 90% des patients (Karsan and Goadsby, 2018). Ces symptômes prémonitoires pourront être retrouvés tout au long de la crise de migraine. Ils peuvent apparaître quelques heures avant la céphalée, voir dans certains cas plusieurs jours avant.

-La phase dite d'aura. Celle-ci affecte environ un tiers des patients migraineux. Elle est marquée par l'apparition de symptômes neurologiques transitoires : principalement des manifestations visuelles (environ 90% des cas) mais également motrices (voir Table 5). Cette phase est bien connue comme pouvant parfois se chevaucher avec celle de la céphalée. Le mécanisme sous-jacent serait une vague de dépolarisation neuronale corticale, la dépression corticale

envahissante (Cortical Spreading Depression, CSD) (Leao, 1944). La phase de l'aura est décrite comme durant généralement moins d'une heure, bien qu'environ un quart des patients puissent la ressentir au delà de cette marque.

-La phase de céphalée. La douleur associée à celle-ci est bien spécifique : unilatérale, pulsative, d'intensité modérée à forte et aggravée par l'effort physique. A cette phase s'ajoute de nombreux autres symptômes : photophobie, nausée, vomissement etc. Cette douleur migraineuse est fréquemment accompagnée d'une allodynie tactile (sensation douloureuse en réponse à un stimulus qui n'est pas douloureux en condition non pathologique). Les estimations concernant sa prévalence sont d'environ 70% des patients migraineux, et encore plus pour les migraineux chroniques (Bigal et al., 2008; Mathew et al., 2016). L'allodynie sera rencontrée au niveau facial, mais également dans une moindre mesure au niveau extra-facial (bras, torse etc.) (Burstein et al., 2000; Güven et al., 2013; Lipton et al., 2008). Ce symptôme est également utilisé comme marqueur prédictif : les patients migraineux allodyniques auront une plus forte probabilité de développer un état de migraine chronique (Benatto et al., 2017; Lipton et al., 2017; Louter et al., 2013). Cette phase de céphalée pourra durer quelques heures jusqu'à un ou deux jours.

-La phase dite de postdrome. C'est la moins bien caractérisée, du fait du flou entourant les symptômes rencontrés, relativement variables d'un patient à l'autre. Ce stade n'est pas mentionné dans la classification ICHD, et est de ce fait souvent négligé (Dodick, 2018a). Les symptômes rencontrés ressemblent à ceux de la phase prémonitoire (fatigue, difficulté de concentration, maux de têtes résiduels etc.) (Bose et al., 2018). Cette phase dure jusqu'à ce que le patient revienne à un état normal. Le terme interictal est employé pour qualifier la période entre deux crises de migraine, ictal désignant la période de crise. Certains patients migraineux chroniques sévères n'ont plus de période interictale discernable.

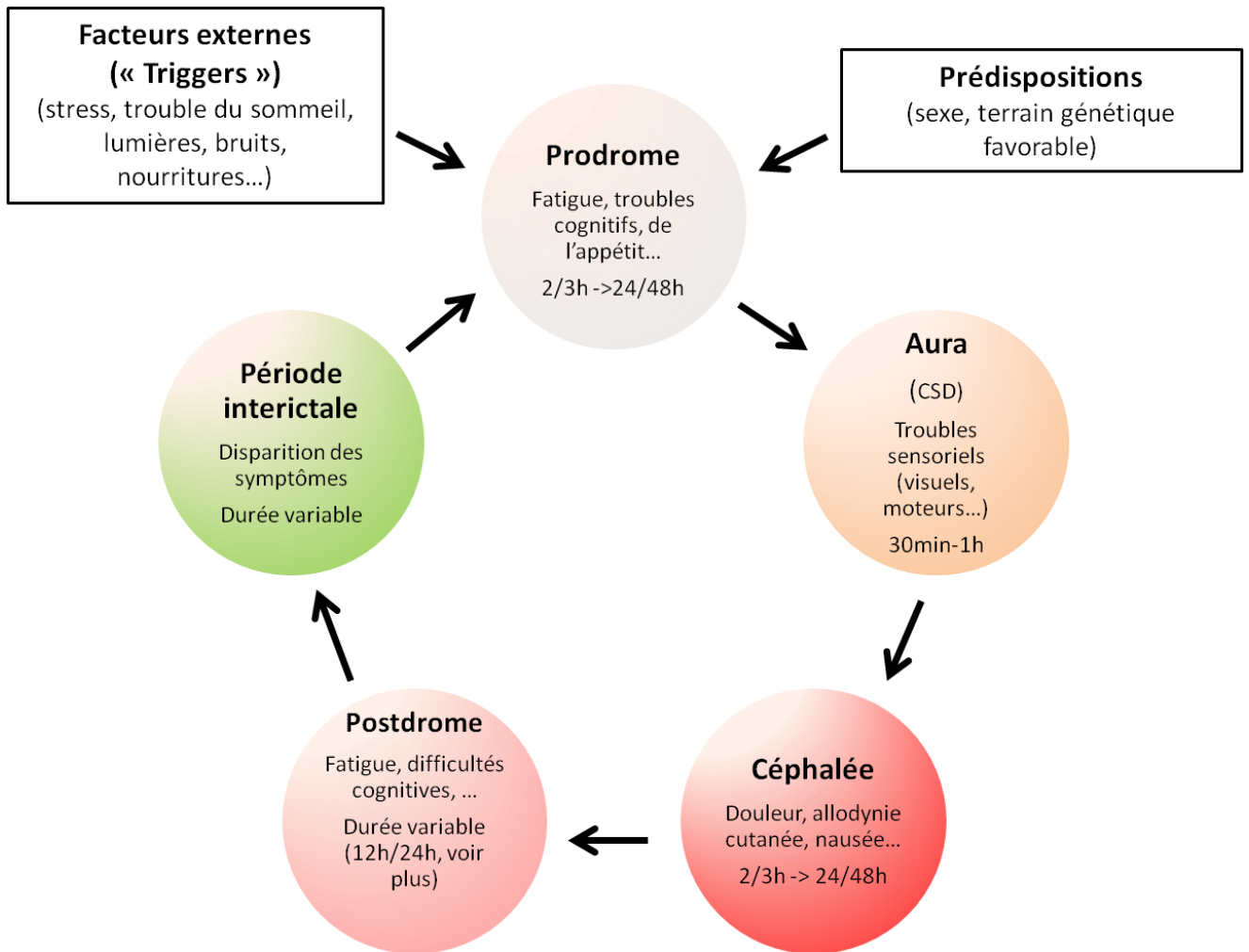


Figure 10 : Déroulement schématisé d'une crise de migraine et principaux signes cliniques

Une combinaison de facteurs externes et de prédispositions sont à l'origine du déclenchement de la crise migraineuse. Les différentes phases de celle-ci (en rouge) auront des durées variables et sont caractérisées par de nombreux symptômes, parfois chevauchant. La période interictale (en vert) correspond à la fin des symptômes liés à la crise. La durée de cette période interictale sera variable et dépendante de nombreux facteurs : exposition plus ou moins longue aux facteurs déclencheurs, abus médicamenteux ou à l'inverse absence de traitement, facteurs génétiques etc. En cas de migraine chronique, cette période peut potentiellement disparaître.

3. Etiologie

a. Facteurs environnementaux

La caractérisation de facteurs externes pouvant induire une crise de migraine (« triggers » en anglais, facteurs déclencheurs) a fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, la compréhension des mécanismes et des événements neuronaux initiant la crise de migraine en réponse à ces facteurs déclencheurs reste imparfaite. Il est parfois même admis que ces crises puissent apparaître spontanément, et même suivre une certaine rythmicité. Il existe donc un biais au niveau de l'interprétation, de l'identification et du discernement d'un potentiel trigger, à la fois par le patient mais aussi parfois par le clinicien. Par exemple, la crise de migraine commence bien avant l'apparition des maux de têtes, parfois 1 à 2 jours avant, un fait qui n'est pas toujours ressenti et/ou exprimé par le malade. La mise en contact d'un patient avec un trigger qu'il a identifié au préalable comme potentiel déclencheur de crise de migraine se montre faiblement prédictive (Hougaard et al., 2013). Il semblerait donc que la réalité soit plus complexe et que plusieurs facteurs soient potentiellement nécessaires (Turner and Houle, 2017) ou que les fluctuations d'excitabilités neuronales observées fréquemment puissent aussi influencer sur les résultats (Marciszewski et al., 2018; Stankewitz and May, 2009). Du fait de la nature des symptômes rencontrés et grâce à des études cliniques d'imagerie cérébrale pendant la phase prémonitoire, l'hypothalamus ainsi que certains noyaux du tronc cérébral sont souvent proposés comme des acteurs centraux de cette phase, et potentiellement de la génération de la phase de céphalées (Denuelle et al., 2007; Maniyar et al., 2014; Schulte and May, 2016; Weiller et al., 1995). Ces structures, notamment l'hypothalamus, sont impliquées dans de nombreux processus neuroendocriniens et autonomiques. Les principaux triggers recensés sont donc le stress (environ 60% des patients), des troubles du sommeil (environ 40%), le climat (température, pression, 30%), certains stimuli visuels (30%), des changements hormonaux (30%), l'activité physique (20%), certains comportements alimentaires (saut d'un repas par exemple) voir certains aliments directement ou certaines odeurs (environ 20-30%) (Pellegrino et al., 2017). La migraine peut donc être vue comme une réponse inappropriée/dérégulée face à divers stimuli, traduisant la difficulté de l'organisme (ou plus précisément du cerveau) à maintenir un état de stabilité physiologique en réponse à ces stimuli. La migraine a été récemment décrite comme étant une pathologie de l'allostasie (désignant les processus ramenant un organisme à un équilibre physiologique interne) (Borsook et al., 2012).

Couramment utilisé en recherche clinique et préclinique, de nombreuses molécules sont capables d'induire des crises expérimentales chez des patients migraineux, voire chez certains volontaires sains au-delà d'une certaine dose, et remplissant les critères de diagnostic en vigueur (Ashina et al., 2013, 2017; Olesen and Ashina, 2015). Ces migraines induites sont dans l'immense

majorité sans aura, même chez des patients développant de telle crise. La plupart de ces composés ont des propriétés vasodilatatrices comme le NO, le PACAP, le CGRP (détaillé par la suite) et certains d'entre eux ont été retrouvés en quantité élevés dans le sang de patients subissant une crise de migraine (Ashina et al., 2017). Néanmoins, il est bien établi maintenant que les effets vasodilatateurs de ces molécules ne sont pas associés à leur capacité d'induction de crises de migraine. Il semblerait donc qu'une partie de leur action se fasse au niveau du SNC. Si un tel mode d'action est concevable pour le NO, hautement diffusible dans les tissus cérébraux du fait de sa nature chimique (Moncada et al., 1991), la question reste ouverte pour le CGRP, un peptide supposé incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Goadsby et al., 2017a).

b. Facteurs génétiques

La part des facteurs génétiques dans la migraine est importante. Plusieurs études sur des cohortes de familles ont pu démontrer l'existence d'une part d'héritabilité. Il est estimé qu'environ 50% des patients ont un parent proche également atteint. Ces proportions sont d'autant plus importantes si le patient développe des crises de migraine avec aura (Russell and Olesen, 1995; Stewart et al., 1997). La composante génétique de la migraine résulte principalement de la combinaison de plusieurs gènes (Gormley et al., 2018; Nyholt et al., 2017). Néanmoins, les premières avancées sur ces aspects de génétique de la migraine ont été obtenues par l'étude de patients souffrant de migraine familiale hémiplegique (Familial Hemiplegic Migraine, FHM), liée à une mutation d'un gène (bien qu'il existe aussi des formes de migraine hémiplegique non liées à une seule mutation). Ces formes sont très rares, associées à des symptômes sévères dont certains ne sont pas retrouvés systématiquement dans les formes de migraines plus courantes (ex : aphasie, coma, retard mental etc.). Chez les patients atteints de cette forme de migraine, il est impossible d'induire une crise de migraine expérimentale *via* les triggers classiques que sont les infusions de NO ou de CGRP. Trois types de FHM ont été formellement identifiés à ce jour (FHM1-3), auxquels on peut rajouter d'autres potentielles formes de migraine monogéniques :

-FHM1, touchant la sous-unité alpha du canal calcique voltage-dépendant Cav2.1 au niveau neuronal (Ophoff et al., 1996). Les mutations identifiées sur ce gène produisent des gains de fonction du canal résultant en une augmentation de la neurotransmission. Deux modèles transgéniques de souris Knock-in portant des mutations sur ce gène ont également permis de mieux caractériser le phénotype associé à cette forme de migraine (Langford et al., 2010; van den Maagdenberg et al., 2004; Tottene et al., 2005).

-FHM2, ciblant la sous-unité alpha 2 de la pompe Na⁺/K⁺ ATP-dépendante et induisant une perte de fonction de cette dernière (De Fusco et al., 2003). Localisée notamment dans les astrocytes,

la conséquence de cette mutation sera une augmentation de la concentration en potassium (K^+) extracellulaire dans la fente synaptique conduisant à une hyperexcitabilité neuronale.

-FHM3, touchant la sous-unité apha du canal sodique voltage-dépendant Nav1.1 (Dichgans et al., 2005). Ce canal est exprimé principalement au niveau d'interneurones inhibiteurs dans le SNC et les mutations identifiées induisent une perte de fonction du canal (aussi associées à des formes d'épilepsie) (Cestèle et al., 2013), bien que des mutations gains de fonction soient aussi décrites (Dhifallah et al., 2018).

Ces mutations touchent des protéines impliquées dans le transport d'ions, modulant *in fine* l'excitabilité neuronale. Il est parfois ajouté à cette liste de FHM d'autres cibles responsables de migraine monogénique : Proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2), une protéine membranaire potentiellement impliquée dans la fusion de vésicules de neurotransmetteurs (Riant et al., 2012; Valente et al., 2016) et Caséine Kinase 1 δ (CK1 δ), une enzyme ayant de multiples rôles dans la signalisation cellulaire et notamment dans la transmission glutamatergique (Chergui et al., 2005; Knippschild et al., 2005). Une mutation entraînant une diminution de l'activité enzymatique de CK1 δ a été associée à un phénotype migraineux (Brennan et al., 2013). Il convient de noter que les deux mutations précédemment évoquées ont également été associées à d'autres pathologies : des dyskinésies, des épilepsies et des convulsions pour PRRT2, et des troubles du sommeil pour CK1 δ . Enfin, une mutation entraînant une perte de fonction sur le canal TRESK appartenant à la famille des canaux potassiques à deux domaines pores a été récemment identifiée (Lafrenière et al., 2010). Le mécanisme passerait par un effet dominant-négatif du canal muté, affectant l'excitabilité neuronale du fait du rôle bien décrit des K2P dans l'établissement du potentiel de repos. Cependant, des études sur d'autres mutations de TRESK ont montré que l'une d'entre elles conservait cet effet de dominant-négatif mais était retrouvée à la fois chez des patients sains et migraineux (Andres-Enguix et al., 2012; Guo et al., 2014; Liu et al., 2013). Durant ma thèse j'ai pu participer à une étude en collaboration avec l'équipe du Dr Guillaume Sandoz (Institut de Biologie Valrose, Nice) réconciliant et expliquant ces différences apparentes entre les différents mutants TRESK et la migraine (voir Annexe 1) (Royal et al., 2018).

Ces formes monogéniques ne représentent néanmoins qu'une faible proportion des patients migraineux (1 sur 10000 environ). Dans la plupart des cas de migraines avec ou sans aura, il s'agira d'un effet combiné de plusieurs gènes, de facteurs environnementaux et de leur l'interaction. L'identification de plusieurs gènes candidats a été rendu possible grâce aux études à grande échelle, notamment celles d'association pangénomiques (Genome Wide Association Studies, GWAS). Les premières études dites *a priori* (un ou plusieurs gènes suspects sélectionnés et explorés dans des cohortes de patients et de population contrôle) ont été quelque peu décevantes : par exemple, une étude portant sur un panel de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport d'ions

n'a pu démontrer d'association avec la migraine (Nyholt et al., 2008). Ces études sont détaillées dans plusieurs revues (Ducros, 2013; Schürks, 2012; de Vries et al., 2016). Par la suite, plusieurs GWAS ont permis d'établir des listes de gènes impliqués (plus de 40 gènes actuellement, entre 70 et 100 à venir avec la dernière étude GWAS en cours) : de façon intéressante, il ressort de l'ensemble de ces études des gènes impliqués dans des fonctions vasculaires et dans une moindre mesure, neuronales, remettant donc potentiellement sur le devant de la scène la contribution des vaisseaux sanguins dans la migraine (discutée par la suite) (Finucane et al., 2018; Gormley et al., 2016; Gupta et al., 2017). Enfin, basée sur le fait que plusieurs comorbidités neuronales (dépression, anxiété etc.) sont retrouvées chez les patients migraineux, une étude récente a quantifié le lien potentiel entre la migraine et ces différentes maladies neurologiques et psychiatriques. Il s'avère qu'il existe un lien génétique entre la migraine et la dépression notamment (Brainstorm Consortium et al., 2018), ainsi que, dans une moindre mesure, avec l'épilepsie et l'accident vasculaire cérébral (non significatif pour les deux, supposé significatif si l'étude avait porté sur un échantillon plus ample). Ces aspects ont été revus en détails par plusieurs auteurs récemment (de Boer et al., 2019; van den Maagdenberg et al., 2019; Nyholt et al., 2017).

II. Traitements pharmacologiques de la migraine

Le traitement de la migraine peut mettre en jeu plusieurs stratégies, à la fois médicamenteuses mais également comportementales (stratégies pour éviter le contact avec les triggers supposés, isolement sensoriel, actions dirigées contre certains symptômes associés etc.) (Brown et al., 2012) ou physiques, avec la neurostimulation par exemple (Dodick, 2018b). Ne seront décrits cette partie que les traitements pharmacologiques. Ces derniers vont avoir pour but de prévenir l'apparition des crises de migraine et/ou d'atténuer les symptômes associés à ces dernières, en particulier la douleur. Bien que l'on puisse retrouver des traitements communs à d'autres pathologies douloureuses, notamment en première intention (paracétamol et anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)), la douleur migraineuse nécessite souvent une intervention spécifique, avec les molécules de référence actuelle que sont les triptans (Ferrari et al., 2002). Malgré une efficacité certaine, les triptans ne permettent de soulager qu'une partie des patients (environ 50%), ils sont à l'origine d'effets indésirables (augmentation de la pression artérielle, vertiges etc.) et une consommation abusive de ces médicaments peut entraîner une aggravation des symptômes et une augmentation de la fréquence des crises. Il devrait s'ajouter sous peu à ces derniers les antagonistes du récepteur au CGRP (un temps écartés pour des effets hépatiques, aux effets assez faible mais ayant un potentiel intérêt en terme de tolérance) ainsi que des agonistes 5HT_{1D}/5HT_{1F} (les « ditans » avec le lasmiditan par exemple, ayant moins d'effet vasculaire que les triptans mais n'étant

pas totalement dénués d'effets indésirables : somnolence ou vertiges par exemple) (Do et al., 2019; Holland and Goadsby, 2018; Kuca et al., 2018; Lupi et al., 2019; Marcus et al., 2014). Concernant les traitements préventifs, les bêta-bloquants (propranolol) et les antiépileptiques (valproate, topiramate) sont les plus utilisés. Les bêta-bloquants sont assez bien tolérés mais sont légèrement moins efficaces que les anti-épileptiques. Ces derniers ont des effets indésirables pouvant limiter sensiblement leur utilisation, conduisant parfois à l'arrêt du traitement (fatigue, nausées, troubles de la concentration et de la mémoire etc.). Par exemple, pour le topiramate, environ 30 à 50% des patients arrêtent le traitement (Parikh and Silberstein, 2019; Stovner et al., 2009). Les anti-CGRP nouvellement commercialisés sont vus avec beaucoup d'intérêts : ils sont bien tolérés (jusqu'à présent ; des études à long terme étant encore nécessaires), malgré les doutes logiques à ce sujet (Favoni et al., 2019; MaassenVanDenBrink et al., 2016) et ils sont efficaces contre la migraine épisodique et chronique, notamment chez des patients réfractaires à d'autres traitements (Edvinsson et al., 2018; Goadsby et al., 2017b; Reuter et al., 2018; Silberstein et al., 2017). Malgré ces avancées, il demeure une proportion non-négligeable de patients qui ne répondent pas à ces traitements : environ 50% pour le sumatriptan et entre 30 et 40% pour les anti-CGRP (Ashina et al., 2019; Stovner et al., 2009). Les différents traitements actuels, avec leurs cibles et mécanismes d'action, sont présentés dans la Table 6. Certains traitements comme la caféine ou les œstrogènes ne sont pas inclus. Des molécules sont également sujettes à controverse concernant leur efficacité, comme la gabapentine ou la venlafaxine. De nombreux autres traitements ont été développés sans succès par le passé (par exemple les antagonistes NK1R) ou sont encore en cours de développement. De plus, d'autres molécules sont parfois utilisées en dehors de leur indication première, ces aspects sont détaillés ailleurs (Diener et al., 2015, 2015; Dodick, 2018b; Goadsby et al., 2017b; Rau and Dodick, 2019) ou ultérieurement (amiloride, ASIC et migraine).

Traitement préventif	Cibles	Mécanisme d'action
Béta-Bloquants (Propranolol)	Antagonistes récepteurs β 1-2	Réduction stress, modulation fonctions neuronales (contrôles descendants), effets vasculaires ?
Antiépileptiques (Valproate, Topiramate, Levetiracetam, Flunarizine, Gabapentine)	Valproate: antagoniste Nav	Réduction excitabilité neuronale
	Topiramate: bloqueur Nav, Cav et anhydrase carbonique, modulateur GABA-A et kainateR	Réduction excitabilité neuronale
	Levetiracetam: bloqueur SV2A (protéine vésiculaire), Cav	Réduction excitabilité neuronale, modulation neurotransmission
	Flunarizine: bloqueur calmodulin, antagoniste H1R, 5HT _R et D2R	Réduction excitabilité neuronale, modulation fonctions neuronales ?
	Gabapentine: antagoniste Cav (α 2 δ)	Réduction excitabilité neuronale
Antidépresseurs (tricyclique: Amitriptyline, SNRI: Venlafaxine)	Amitriptyline: blocage recapture monoamines, multiples cibles secondaires (5HT _R , H1-2R, α 1R, Cav, Nav, Kv etc.)	Multiples: Réduction excitabilité neuronale, modulation fonctions neuronales ?
	Venlafaxine: blocage recapture monoamines	Modulation fonctions neuronales ?
Antagonistes 5HT _R (Pizotifen, Methysergide)	Antagonistes 5HT _{2R}	Modulation fonctions neuronales ?
Toxine Botulique	Exocytose vésicules neurotransmetteurs (protéase ciblant SNAREs)	Multiples: Contraction musculaire, Modulation fonctions neuronales (trafficking TRP, transmission synaptique SNC) ?
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion / Angiotensine (Lisinopril, Candesartan)	Lisinopril: bloqueur de l'enzyme de conversion (diminution production angiotensine II)	Multiples: modulation fonctions neuronales (autonomiques et sensorielles), effets vasculaires ?
	Candesartan: antagoniste des récepteurs AT1R à l'angiotensine II	
Anti-CGRP (Erenumab, Fremanezumab)	Erenumab: Anticorps dirigé contre le récepteur CGRP (CLR-RAMP/CTR-RAMP (AMY1)?)	Modulation fonctions neuronales (neurotransmission), autres cellules (immunitaires, vasculaires)
	Fremanezumab: Anticorps dirigé contre le CGRP	
Traitement crise	Cibles	Mécanisme d'action
Analgésiques simple (Paracétamol, AINS)	Paracétamol: multiples ? (modulation Kv7, TRPV1, Cav3.2, COXs...)	Modulation fonctions neuronales SNC (contrôles descendants...) ?
	AINS: inhibition COXs	Blocage production molécules inflammatoires (prostaglandines etc.)
Triptans (Sumatriptan)	Agonistes 5HT _{1B} /5HT _{1D}	Modulation fonctions neuronales (réduction neurotransmission au niveau spinal et sécrétion au niveau périphérique), autres cellules (vasculaires et 5HT _{1B}) ?
Dérivés de l'ergot de seigle (Dihydroergotamine)	Agonistes 5HT _{1B} /5HT _{1D} (moins sélectifs que Triptans)	Comme Triptans, possible action SNC en plus
Antagonistes CGRP (Rimegepant, Ubrogepant)	Antagonistes récepteurs CGRP	Modulation fonctions neuronales (neurotransmission), autres cellules (immunitaires, vasculaires)
Ditans (Lasmiditan)	Agonistes 5HT _{1F} /5HT _{1D}	Modulation fonctions neuronales (réduction neurotransmission au niveau spinal et sécrétion au niveau périphérique)

Table 6 : Traitements préventifs et de la crise migraineuse

Différentes classes médicamenteuses sont employées pour le traitement prophylactique (préventif) ou de la crise migraineuse. Les traitements préventifs vont principalement agir sur le SNC, alors que certains traitements contre la crise vont également cibler les neurones sensoriels. D'après Banzi et al., 2015; Burch, 2019; Diener et al., 2015; Dodick, 2018b; Ferrari et al., 2002; Goadsby et al., 2002, 2017a; Holland and Goadsby, 2018; Jackson et al., 2019; Kuca et al., 2018; Lupi et al., 2019; Marcus et al., 2014; McMahon and Koltzenburg, 2013; Melo-Carrillo et al., 2017a; Pirazzini et al., 2017; Rau and Dodick, 2019; Schrader et al., 2001; Silberstein et al., 2017; Stubberud et al., 2019; Tronvik et al., 2003.

III. Spécificités Anatomiques et physiopathologiques de la douleur migraineuse

La pathologie migraineuse met en jeu de nombreuses régions anatomiques particulières, allant des territoires innervés par les neurones sensoriels, en l'occurrence les méninges, les terminaisons médullaires de ces derniers ou encore les régions du SNC recrutées avant et pendant la céphalée.

1. Anatomie du système trigéminal et trigémino-vasculaire

a. Organisation des méninges

La localisation anatomique de la douleur migraineuse restât inconnue pendant longtemps, bien que sa description par les patients suggérait une localisation intracrânienne. Plusieurs études dans les années 30 et 40 ont permis d'apporter une première réponse. Elles sont basées sur des interventions chirurgicales cérébrales sur des patients éveillés pouvant rapporter la présence ou non de douleur, son intensité, sa nature et sa localisation. Ces études ont identifié les artères cérébrales localisées au sein de la dure-mère ainsi que leur innervation par des neurones provenant du nerf trijumeau comme étant les responsables de la douleur migraineuse (Penfield and McNaughton, 1940; Ray and Wolff, 1940; Wirth and Van Buren, 1971). Longtemps considérées comme étant les seules structures sensibles au sein des méninges, une étude récente a permis de montrer que non seulement la dure-mère, mais aussi la pie-mère, ainsi que de petits vaisseaux sanguins cérébraux sont également sensibles, et que leur stimulation mécanique produit une sensation de douleur (Fontaine et al., 2018). De nos jours, il est donc bien établi que la douleur migraineuse provient des méninges, un ensemble de plusieurs membranes protégeant le SNC (Figure 11) (Khan et al., 2019a; Olesen et al., 2009):

-La dure-mère, adjacente au crâne. Elle est intensément innervée, vascularisée et contient aussi des vaisseaux lymphatiques et de nombreuses cellules immunitaires.

-L'arachnoïde, suivit d'un espace subarachnoïdien où circule le liquide céphalo-rachidien (Cerebro Spinal Fluid, CSF). Cette couche sépare la dure-mère du reste du SNC et opère une première régulation du transport de molécules au sein du SNC, en plus de la BHE.

-La pie-mère, adhérente du SNC et notamment en contact avec des astrocytes. Elle est semi-perméable au CSF. L'ensemble arachnoïde/pie-mère forme les leptoméninges.

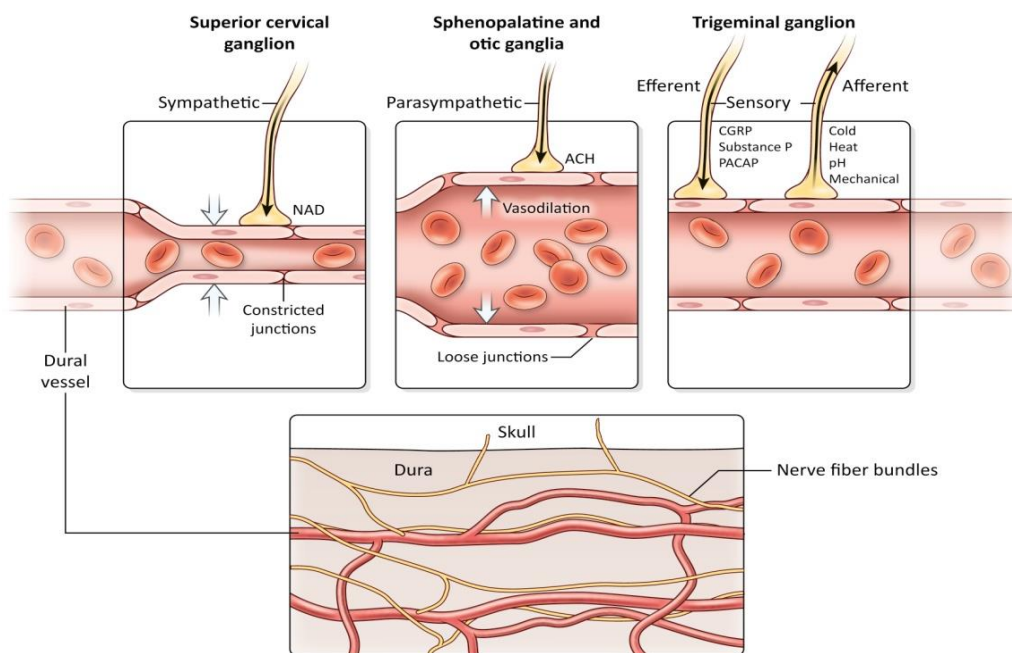
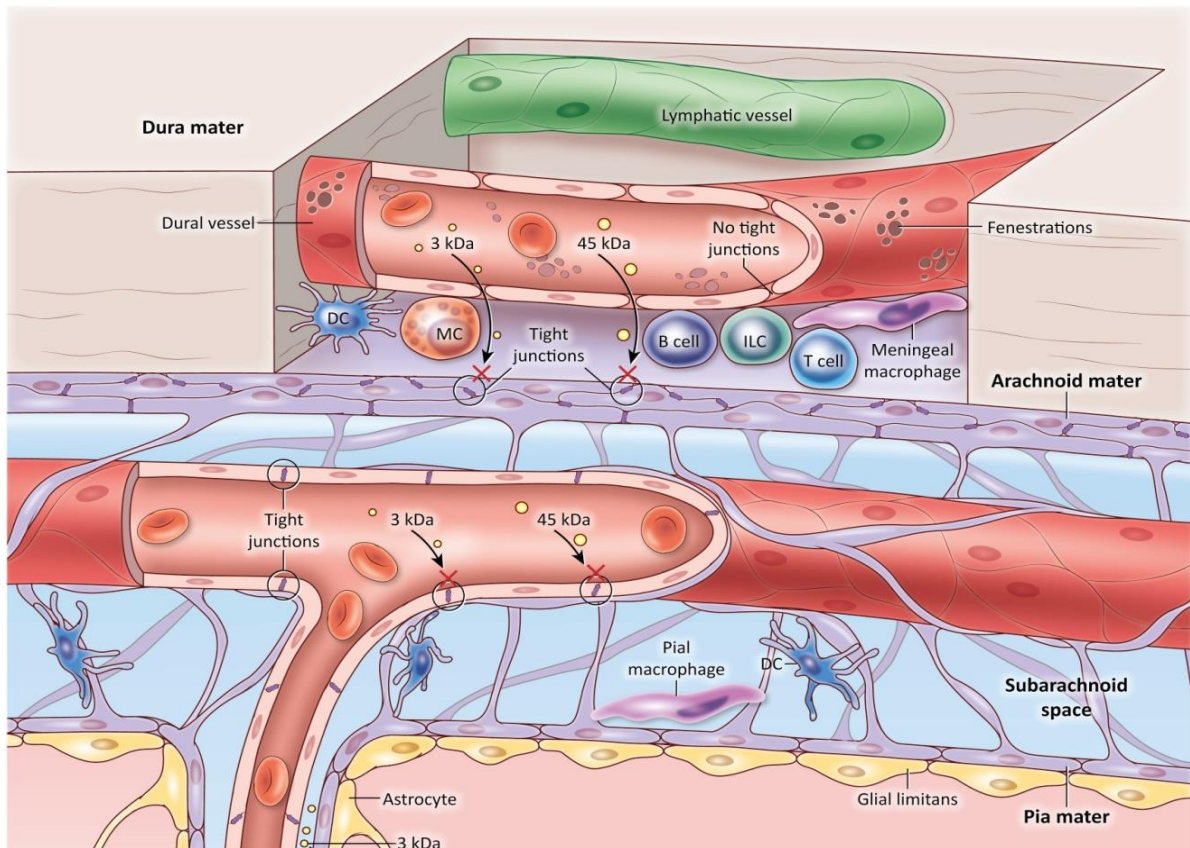


Figure 11 : Anatomie et innervation des méninges

Les méninges sont organisées en 3 couches (dure-mère, arachnoïde et pie-mère). Un réseau complexe de vaisseaux sanguins, mais aussi lymphatiques, permet la bonne irrigation du cerveau. Les méninges, en association avec la BHE (constituée notamment des jonctions serrées des cellules endothéliales et des astrocytes), joueront un rôle de barrière préliminaire. Différentes populations de cellules immunitaires pourront influencer certains processus neurologiques. L'innervation des méninges dépend de trois types de neurones provenant de différents ganglions (sympathiques, parasympathiques et sensoriels) ciblant principalement mais pas exclusivement, les vaisseaux sanguins. Ces 3 types de neurones peuvent libérer de nombreux neuropeptides, modulant ces

vaisseaux mais également les cellules immunitaires. Certaines afférences primaires méningées peuvent aussi innerver certaines régions crâniennes via des bifurcations axonales. DC: Dendritic Cell, MC: Mast Cell, ILC: Innate Lymphoid Cell. NAD: Noradrénaline, ACH: Acétylcholine. D'après Rua and McGavern, 2018.

Les méninges sont également densément innervées par des terminaisons sensorielles (ganglions trigéminaux et certains cervicaux) et du SNA. A cela s'ajoute une population importante de cellules immunitaires et de fibroblastes. Cette concentration de cellules immunitaires à ce niveau, explicable par le rôle de barrière des méninges (Coles et al., 2017; Levy, 2009; Rua and McGavern, 2018; Wei et al., 2014), peut potentiellement fournir une explication rationnelle à l'origine de la douleur migraineuse par la présence d'une inflammation stérile à ce niveau (théorie détaillée par la suite). Cette diversité de cellules immunitaires a été récemment évaluée par des approches de scRNAseq : 13 sous-populations de cellules immunitaires (les macrophages représentent la famille la plus nombreuse, cellules dendritiques etc.) ont été identifiées dans la dure-mère, alors que 9 sont distinguées dans les leptoméninges, enrichies en cellules microgliales non retrouvées dans la dure-mère ainsi qu'en macrophages, avec un phénotype différent de ceux évoqués précédemment (Dani et al., 2019; Hove et al., 2019).

b. Neurones sensoriels

L'innervation sensorielle au sein des méninges est donc singulière, de part l'organisation et l'interaction des fibres nerveuses avec les vaisseaux sanguins et les cellules immunitaires (Figure 11), mais aussi du fait des caractéristiques de ces afférences primaires. Ces dernières proviennent en grande majorité des ganglions trigéminaux et dans une moindre mesure de quelques ganglions cervicaux. Trois branches (V1-3) partent du ganglion trigéminal (TG), innervant différentes régions de la face : V1 pour la branche ophtalmique et contribuant majoritairement à l'innervation des méninges, V2 pour la branche maxillaire et V3 pour la branche mandibulaire. Les neurones sensoriels méningés comportent principalement des terminaisons nerveuses libres, bien que des structures ressemblant à des corpuscules de Ruffini aient été décrites (Andres et al., 1987). Plusieurs études *in-vivo* enregistrant l'activité des neurones trigéminaux ayant un champ récepteur au sein des méninges ont permis leur caractérisation fonctionnelle : principalement des fibres C et A δ nociceptives et dans une moindre mesure A β (Strassman et al., 2004). Elles répondent en majorité à plusieurs modalités : mécanique, thermique et surtout chimique (Bove and Moskowitz, 1997; Burstein et al., 1998; Dostrovsky et al., 1991; Levy and Strassman, 2002; Strassman et al., 1996). En effet, l'application de médiateurs chimiques (« soupe inflammatoire », capsaïcine ou solution acide

par exemple) est capable d'activer une grande majorité de ces neurones sensoriels méningés ainsi que de les sensibiliser (augmentation de la taille du champ récepteur, diminution du seuil d'activation, augmentation de la réponse à une stimulation donnée, activité spontanée). L'une des particularités de ces neurones méningés est que la plupart ayant des vitesses de conduction élevées ont aussi des seuils d'activation mécanique élevés (tendance inverse pour ceux des territoires cutanés). Cette singularité semble néanmoins commune aux afférences des tissus profonds viscéraux (Strassman and Levy, 2006). De nombreuses études utilisant différentes approches (immuno-marquages, enregistrements électrophysiologiques ou études comportementales) ont également permis de mettre en évidence au niveau des neurones sensoriels des méninges la présence de nombreux acteurs impliqués dans la douleur: canaux ioniques, avec des TRPs (TRPV1, TRPV4, TRPA1, TRPM8) (Bove and Moskowitz, 1997; Edelmayer et al., 2012; Huang et al., 2012; Wei et al., 2011), ASICs (Yan et al., 2011), P2Xs (Staikopoulos et al., 2007), 5HT3R (Kilinc et al., 2017), PIEZO2 (Mikhailov et al., 2019), Nav (Harriott and Gold, 2009; Nakamura and Jang, 2018), des récepteurs (5HT1D, IL6R, TNF1-2R, Trkb, PAR2 etc.) (Burgos-Vega et al., 2016; Hassler et al., 2018; Yan et al., 2012; Zhang et al., 2012, 2011b) ou encore des neuropeptides (CGRP, SP, PACAP...) (Frederiksen et al., 2018; Miller et al., 2016; Sampaolo et al., 2017). Un tel enrichissement de ces différents éléments coïncident bien avec les données fonctionnelles, sous-tendant une grande sensibilité chimique de ces afférences nociceptives (Burstein et al., 1998; Harriott and Gold, 2009; Nakamura and Jang, 2018). Au niveau du transcriptome, il semblerait qu'il y ait peu de différences entre neurones des DRG et des TG en terme de population globale (Nguyen et al., 2017), bien que certains gènes soient enrichis dans un ganglion comparé à l'autre (ex : TRPM8 enrichis au niveau TG) (Flegel et al., 2015; Lopes et al., 2017a). Il est possible que des différences significatives apparaissent en étudiant spécifiquement les neurones des méninges, comme illustré récemment au niveau intestinal (Hockley et al., 2018) (de telles études au niveau des méninges sont en cours de réalisation par l'équipe de Gregory Dussor). Des différences d'expression de plusieurs marqueurs dans des neurones innervant certaines régions des méninges ont été observées et soutiennent cette hypothèse (Rice et al., 2016).

c. Projections centrales des afférences primaires trigéminées

Ces fibres vont se projeter au niveau du tronc cérébral dans les noyaux spinaux trigéminés, suivant une organisation bien particulière. Ces noyaux sont situés dans la continuité de la moelle épinière (du segment spinal C2 jusqu'au pont, 6cm de long environ chez l'homme adulte). On retrouvera dans une certaine mesure des similitudes anatomiques et fonctionnelles à celles décrites pour les afférences du corps. L'ensemble vaisseaux sanguins/neurone sensoriel méningé/neurone

spinal est souvent appelé système trigémino-vasculaire. Quatre noyaux spinaux trigéminés participent à l'intégration des messages sensoriels :

-Le noyau principal (Pr5), recevant des afférences mécanosensibles de type LTMR. Ce noyau contient beaucoup de neurones de projections ciblant le thalamus, mais également des interneurones.

-Le noyau spinal trigéminé oralis (Sp5O), recevant en particulier des afférences de la cavité orale, mais également provenant de la peau. Une part importante des projections neuronales du Sp5O vont cibler des neurones aux fonctions motrices.

-Le noyau spinal trigéminé interpolaris (Sp5I), intégrant des afférences de type LTMR et nociceptives, d'origines atomiques diverses. Les projections partant du Sp5I vont cibler notamment le thalamus et d'autres noyaux du tronc cérébral.

-Le noyau spinal trigéminé caudalis (Sp5C, ou TNC, Trigeminal Nucleus Caudalis). Il est subdivisé en plusieurs laminae (I-V, voir VI), comme dans les segments inférieurs de la moelle épinière. Les neurones sensoriels innervant le Sp5C sont principalement des fibres C ou A δ mais également A β . De nombreux neuropeptides vont être retrouvés à ce niveau (en pré- ou post-synaptique) : CGRP, SP, CCK (cholecystokinine), somatostatine (SST) etc. De nombreuses modalités provenant de différentes régions vont être intégrées à ce niveau, suivant le schéma d'organisation évoqué précédemment (lamina I, douleur et thermosensation ; lamina III-IV, mécanosensation ; lamina V multiples modalités et présence de neurones WDR). Le Sp5C est généralement considéré comme le site principal d'intégration des informations nociceptives venant de la face. Les projections à partir de ce noyau vont être variées : thalamus, hypothalamus, noyau parabrachial etc.

Ces neurones vont également recevoir une innervation de neurones sensoriels venant de différentes régions de la face, d'autres nerfs crâniens ainsi que d'afférences cervicales. Il en résulte une convergence très importante, caractéristique des noyaux spinaux trigéminés par rapport à la moelle épinière (Sessle, 2000; Sessle et al., 1986). Des réseaux d'interneurones ainsi que des connections entre ces différents noyaux spinaux trigéminés existent, permettant une régulation fine et complexes des informations sensorielles. Ces neurones spinaux vont aussi recevoir de multiples projections descendantes provenant de nombreuses régions du tronc cérébral (PAG, RVM etc.), du diencephale (hypothalamus etc.) ou encore du cortex (S1, insula) (Akerman et al., 2011; Goadsby et al., 2017a; Villanueva and Nosedá, 2013). Il convient d'évoquer que certains neurones sensoriels provenant du TG se projettent dans des zones différentes des noyaux spinaux trigéminés classiques : noyaux péri- et para-trigeminal, proches de ceux évoqués précédemment (Sp5O et Sp5I). Mais surtout, il a récemment été démontré qu'il existait, au moins chez la souris, une connexion directe entre afférences primaires et noyau parabrachial latéral (Rodriguez et al., 2017). Du fait de l'importance de ce noyau dans les aspects émotionnels de la douleur, cette découverte pourrait

expliquer la part émotionnelle plus forte et plus désagréable des douleurs faciales comparées à celles du reste du corps.

En plus des zones cérébrales classiquement impliquées dans l'intégration de la douleur (Figure 9 et 12), les neurones de ces noyaux spinaux peuvent également se projeter directement vers un noyau du SNA, le noyau supérieur salivaire (SUS, Superior Salivatory Nucleus) dont les neurones, via un relais dans le ganglion sphéno-palatin (SPG, Spheno-palantine Ganglion), permettent une innervation par le SNA de différentes régions de la face, notamment des méninges (Waite and Ashwell, 2012). Ce circuit et cette activation du SNA pourrait expliquer certains symptômes rencontrés par des patients migraineux (larmoiements etc.) ainsi que la contribution de ces neurones au niveau méningé dans les mécanismes de la douleur migraineuse (Shelukhina et al., 2017). Ces aspects de transmission, de modulation et d'intégration du message sensoriel au niveau du SNC, bien qu'étant fondamentaux dans la douleur migraineuse, ne seront pas plus détaillés. L'ensemble des structures anatomiques impliquées dans la douleur migraineuse est schématisé dans la Figure 12.

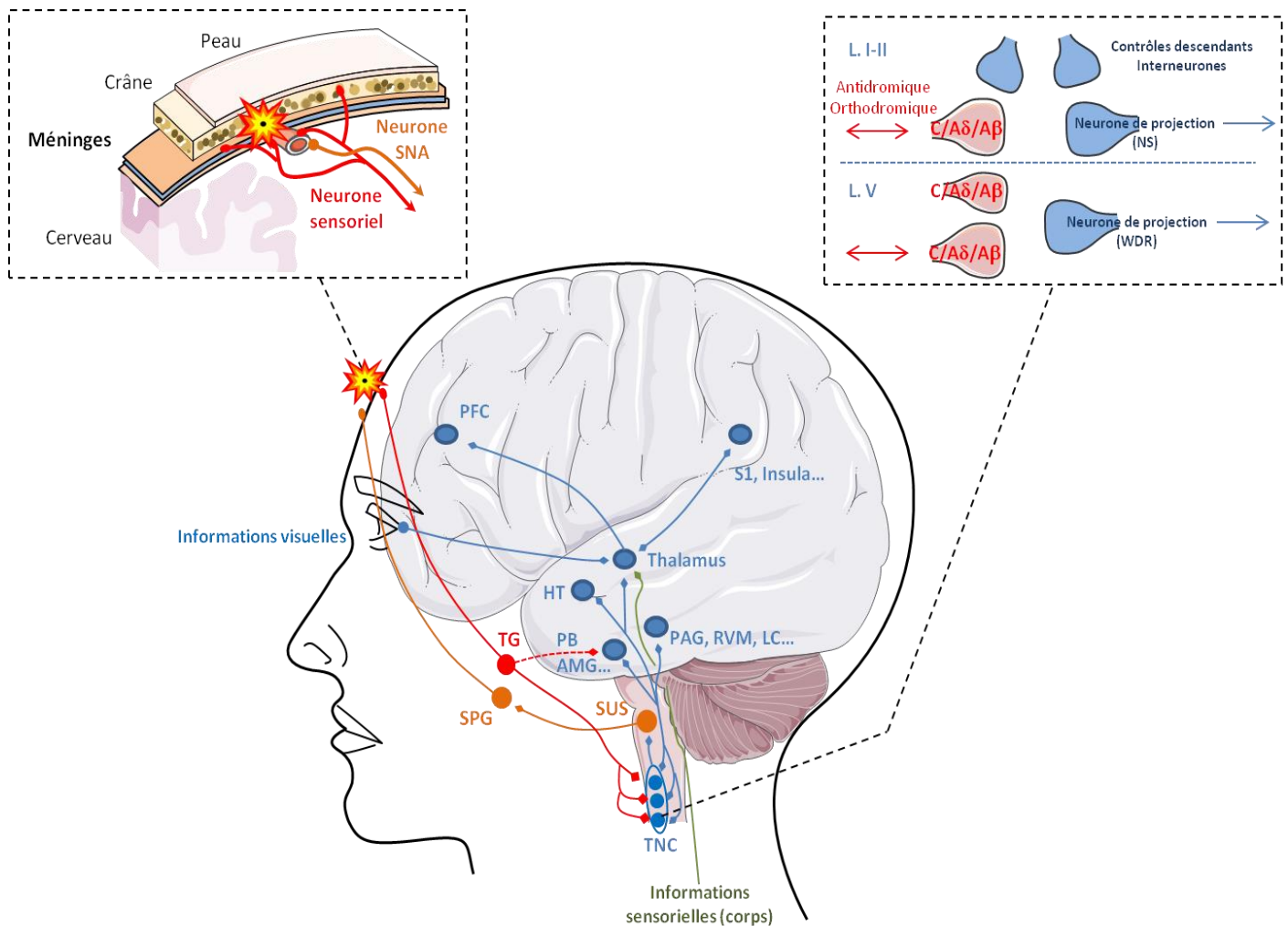


Figure 12 : Anatomie des voies neuronales de la douleur migraineuse

La douleur migraineuse a pour origine les neurones sensoriels contenus dans les ganglions trigéminaux (TG) et innervant principalement les vaisseaux sanguins des méninges (encadré gauche). Cette activation pourrait être due à une inflammation stérile. L'intégration du message douloureux au niveau du SNC se fait dans les noyaux spinaux trigéminaux, en particulier dans le noyau caudalis (TNC, Trigeminal Nucleus Caudalis) et également via une connexion directe avec le noyau PB. Suivant une organisation laminaire comme au niveau de la moelle épinière, l'information périphérique sera transmise via des neurones de projection de type Nociceptif Specific (NS), principalement situé dans la lamina I-II, ou WDR, enrichi dans les couches profondes (V) (encadré droit). Un réseau complexe de projections descendantes (inhibitrices ou facilitatrices) provenant du tronc cérébral (PAG, RVM, LC...) de l'hypothalamus (HT) et du cortex (S1, insula) régulera le message douloureux et pourra potentiellement directement activer les neurones sensoriels (activation antidromique). Un ensemble d'interneurones, pourra également moduler l'information douloureuse. Les neurones centraux ciblés par ces neurones de projection vont être localisés dans divers noyaux : une connexion permettra une activation des neurones du SNA localisés dans le SUS puis dans le SPG (symptômes autonomes et modulation du message sensoriel). Les autres régions ciblées seront similaires à celles de la « matrice de la douleur ». Le thalamus représente un point de convergence important, intégrant informations sensorielles faciales (tactiles, visuelles etc.) mais également extra-faciales. La sensibilisation des voies périphériques sera responsable notamment du caractère pulsatile de la douleur ; celle au niveau des voies centrales sera responsable de l'allodynie faciale (TNC) et extra-faciale (thalamus).

2. Mécanismes physiopathologiques de la migraine : focus sur la douleur migraineuse et l'allodynie cutanée

a. Origines de la douleur migraineuse

Bien que les principales régions anatomiques impliquées dans la migraine et dans la douleur qui la caractérise commencent à être connues, de nombreuses zones d'ombres demeurent, en particulier sur les mécanismes d'initiation de la crise migraineuse et du déclenchement des céphalées. Historiquement, une « théorie vasculaire » a été proposée, reposant sur les chirurgies et les observations de Wolff dans les années 40 sur la sensibilité des vaisseaux sanguins méningés ainsi que sur la capacité de certaines molécules vasodilatatrices (NO par exemple) à déclencher des crises de migraine. Néanmoins, d'autres molécules vasodilatatrices comme le Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ne permettent pas de déclencher une crise (Akerman and Goadsby, 2015; Rahmann et al., 2008). L'identification du mode d'action des triptans (site neuronal versus vasculaire (Levy et al., 2004)) et certaines études d'imagerie ont invalidé cette théorie (Goadsby, 2009; Schoonman et al., 2008). Des études récentes ont permis d'affiner le rôle de ces vaisseaux sanguins, les neurones sensoriels les innervant étant très probablement à l'origine de la douleur migraineuse (Fontaine et al., 2018; Jacobs and Dussor, 2016; Khan et al., 2019a).

L'une des questions importantes concerne également le stimulus ou l'évènement qui cause l'activation de ces neurones sensoriels. Il a été postulé dans les années 80 qu'une inflammation stérile au niveau des méninges se produirait pendant une céphalée migraineuse. Concernant ce point, des données conflictuelles ont été obtenues par différents groupes. Les arguments en faveur d'un tel phénomène sont les suivants :

-Augmentation de certains marqueurs (cytokines, facteurs neurotrophiques etc.) au niveau plasmatique (Blandini et al., 2006; Martami et al., 2018; Oliveira et al., 2017; Ren et al., 2018a; Sarchielli et al., 2006) (revue par (Ferroni et al., 2018)) et dans le CSF (Martins et al., 2015) (revue en détail par (van Dongen et al., 2017)). Modification de l'expression de certains gènes liés à l'inflammation au niveau extracrânial chez des patients migraineux chroniques (Perry et al., 2016).

-Effets thérapeutiques des AINS (Jakubowski et al., 2005; Kirthi et al., 2013; Rabbie et al., 2013) et des anti-inflammatoires stéroïdiens (Tfelt-Hansen et al., 2009).

-Capacité du composé 48/80 induisant la dégranulation des mastocytes à déclencher spécifiquement des céphalées chez l'homme (Sicuteri, 1963; Sicuteri et al., 1956) et chez l'animal (Levy et al., 2012) après une injection systémique, et ce malgré le fait que la majorité des mastocytes d'un individu soit localisé au niveau de la peau (Gupta and Harvima, 2018).

A ces arguments s'opposent plusieurs études démontrant qu'un tel phénomène est peu probable, voir impossible. Cela inclut : la proportion non-négligeable de patients ne répondant pas

aux anti-inflammatoires, l'échec de certaines molécules ciblant ce mécanisme (antagonistes NK1, bien qu'il soit probable que ces derniers ne soient pas les plus pertinents concernant la substance P et NK1 (Green et al., 2019)) ainsi que l'absence de preuve directe chez l'homme d'un tel mécanisme, notamment *via* les techniques d'imageries (Khan et al., 2019b). Il est supposé que si un tel phénomène ait lieu, ces inflammations répétées des méninges devraient conduire à des séquelles mais jusqu'à ce jour, une telle démonstration n'a pu être apportée (Palm-Meinders et al., 2012). La balance des arguments penche cependant en faveur de l'existence d'une composante inflammatoire mais cette dernière pourra être variable d'un patient à l'autre.

Concernant la migraine avec aura, il est suggéré depuis plusieurs années que la CSD serait à l'origine de l'activation et de la sensibilisation des nocicepteurs méningés (Bolay et al., 2002; Karatas et al., 2013; Schain et al., 2018; Zhang et al., 2010, 2011a), malgré quelques rares études ayant contesté ce point (Akcali et al., 2010; Fioravanti et al., 2011). La CSD a également été proposée comme initiateur des céphalées chez les patients migraineux sans aura. Cependant ces patients devraient avoir les mêmes signes de changements corticaux liés à la CSD que les patients migraineux avec aura, mais sans les symptômes associés (aura silencieuse). Du fait des difficultés à enregistrer ce phénomène de CSD chez l'homme, cette hypothèse, bien que séduisante et unificatrice, reste à démontrer (Charles and Baca, 2013). Ainsi, à l'heure actuelle, le phénomène causant l'activation des nocicepteurs méningés lors d'une crise de migraine n'est toujours pas établi. D'autres hypothèses impliqueraient une origine centrale. Les études d'imagerie ont clairement démontré une activation de l'hypothalamus ainsi que divers régions du tronc cérébral (PAG, RVM, LC etc. mais pas du TNC) avant le début de la céphalée (Maniyar et al., 2014; May, 2017; Schulte and May, 2016). Du fait de leur rôle dans l'homéostasie de l'organisme, il est postulé que la migraine résulterait d'une dysfonction de ces régions en réponse à des stimuli externes. Ajouté aux faits que les patients migraineux soient parfois décrits comme hyperexcitables en réponse à de nombreux stimuli (visuels, douloureux etc.) en dehors des crises (Bernstein et al., 2019; Nahman-Averbuch et al., 2018; Russo et al., 2018; Wray et al., 1995) et que ces régions cérébrales ont des projections descendantes vers les noyaux spinaux trigéminés, ces différentes structures sont parfois considérés comme les générateurs de la migraine. Des altérations dans les contrôles descendants chez le patient migraineux pourraient potentiellement induire une activation antidromique des afférences primaires méningées, ou alors entraîner une absence de filtrage de certains messages neuronaux, à l'origine de la douleur migraineuse (Akerman et al., 2011; Sorkin et al., 2018). De plus, le stress étant le plus courant des facteurs déclencheurs, il a été montré qu'un tel stimulus chez l'animal pouvait induire une dégranulation des mastocytes méningés via l'action de corticotropin-releasing hormone (CRH) (Theoharides et al., 1995). Le stress chronique peut également induire une hyperactivation de contrôles descendants inhibiteurs toniques provenant du RVM et inhibant une population spinale

d'interneurones inhibiteurs enképhalinerigiques, et régulant *in fine* les neurones sensoriels, notamment mécanosensibles. Ces neurones particuliers du RVM reçoivent des afférences venant de l'hypothalamus, du noyau PB, de la PAG (modulation sensorielle, réponse au stress) ou encore du LDTg (modulation de l'attention) la perte de contrôles descendants inhibiteurs toniques et régulant les neurones sensoriels, notamment mécanosensibles (François et al., 2017). Ces résultats peuvent proposer un hypothétique circuit modulé par le stress et d'autres régions cérébrales potentiellement affectées par des triggers de la migraine, potentialisant ces neurones du RVM et entraînant *in fine* une levée d'inhibition spinale des afférences primaires. On peut donc envisager que chez un patient migraineux hyperexcitable le stress entraîne une perte significative de cette inhibition spinale et, combinée aux effets du stress sur les mastocytes, puisse générer une douleur qui serait réprimée chez un patient sain. Evidemment, l'ensemble de ces hypothèses restent à explorer en détail (Brennan and Pietrobon, 2018).

b. Migraine et allodynie

L'allodynie cutanée est un symptôme récurrent dans la migraine, touchant principalement la région faciale mais également extra-faciale. L'origine de ces symptômes est bien établie. L'allodynie cutanée migraineuse impliquerait des phénomènes de sensibilisation centrale (Burstein, 2001; Burstein et al., 2000). Des phénomènes de sensibilisation périphérique sont également présents au niveau des neurones sensoriels méningés, à l'origine de la douleur pulsatile caractéristique de la migraine, ainsi que de l'aggravation de la douleur par les mouvements de la tête. En cas d'inflammation des méninges, les nombreux médiateurs chimiques pourront participer à cette sensibilisation périphérique et initier celle au niveau central (Oshinsky and Gomonchareonsiri, 2007; Strassman et al., 1996). L'activité soutenue des afférences primaires pourra sensibiliser ensuite les neurones des noyaux spinaux (Burstein et al., 1998). Des mécanismes de plasticité synaptique seront à l'œuvre (Jones et al., 2001; Pradier et al., 2018). Il convient également de rappeler l'importante convergence des afférences primaires provenant de différentes régions de la face (méninges, peau, muscle etc.) au niveau de ces neurones centraux, ainsi que l'existence de réseaux complexes d'interneurones (Melin et al., 2013, 2016; Miraucourt et al., 2007, 2009) et de projections descendantes inhibitrices (Boyer et al., 2014; Nation et al., 2019; Okada-Ogawa et al., 2009) et facilitatrices (Edelmayer et al., 2009); l'ensemble de ces phénomènes pouvant contribuer à la sensibilisation de ces neurones de second-ordre et conduisant à l'allodynie faciale (Burstein et al., 2011).

L'allodynie extra-faciale, quant à elle, résulterait d'un phénomène de sensibilisation centrale au niveau des neurones du thalamus qui sont capables d'intégrer des informations sensorielles venant du corps et de la face (Burstein et al., 2010; Wang et al., 2015a). Ces neurones thalamiques

sensibilisés vont avoir une fréquence de décharge supérieure ainsi qu'un seuil d'activation réduit ; de ce fait un simple effleurement de la peau de la main/patte entraîne une réponse similaire à un pincement. La modulation de ces neurones thalamiques par d'autres neurones venant de différentes régions faciales est également modifiée chez les patients migraineux présentant une allodynie. De façon intéressante, il existe des différences au niveau de la localisation de ces neurones thalamiques capables d'intégrer des informations faciales et extra-faciales. Lors des premières observations chez le chat, ces neurones étaient supposés être confinés dans le noyau pré-optique (Po) mais pas dans le noyau ventral postéro-médial (VPM) (Zagami and Lambert, 1990). Chez le rat, de tels neurones sont retrouvés dans le noyau Po mais aussi dans le VPM et dans d'autres régions, ceci pouvant expliquer une potentielle facilitation chez certaines espèces à développer une allodynie sur l'ensemble du corps. De tels mécanismes de convergence au niveau thalamique ont également été proposés pour expliquer l'aggravation des céphalées migraineuses par la lumière, bien que d'autres processus soient également à l'oeuvre (Nosedá et al., 2010, 2018). L'allodynie est également corrélée positivement avec la fréquence des crises migraineuses. Les patients migraineux chroniques sont donc plus touchés par ces phénomènes de sensibilisation centrale, expliquant potentiellement une récupération moins importante entre deux crises et certains symptômes associés (Schulte et al., 2018).

IV. Modéliser la migraine chez l'animal

1. Généralités sur les différents modèles animaux de migraine

La modélisation d'une pathologie aussi complexe que la migraine en recherche préclinique s'avère délicate. Notamment, la question de la capacité des animaux à développer spontanément des crises de migraines reste ouverte, la migraine est souvent considérée comme étant spécifique à l'homme. Ainsi, de part cette complexité, les modèles actuels n'arrivent à répliquer que certains aspects de la migraine, mais pas le spectre entier de symptômes. L'exception notable serait les modèles murins portant une mutation humaine et mimant les formes rares et monogéniques de FHM. Les différentes approches incluent:

-Les modèles transgéniques murins (FHM, CGRP, PACAP ou CK1 δ par exemple (Brennan et al., 2013; Ferrari et al., 2015; Markovics et al., 2012; Russo et al., 2009). On peut également ajouter un modèle de rats Sprague Dawley développant des allodynies faciales spontanées et réversibles (Oshinsky et al., 2012).

-La stimulation électrique de certains nerfs crâniens ou de vaisseaux sanguins méningés. Ces modèles sont généralement couplés à de l'électrophysiologie *in vivo* ou à de l'imagerie fonctionnelle.

-L'utilisation d'une « fenêtre crânienne », consistant en une réduction de l'épaisseur osseuse crânienne afin de pouvoir visualiser par microscopie les vaisseaux sanguins méningés.

-Les modèles de CSD, utilisant des approches *in vitro* (électrophysiologie sur tranches de cerveau par exemple) ou *in vivo* (électrophysiologie, évaluation du comportement après déclenchement d'une CSD) (Ayata et al., 2006; Charles and Baca, 2013; Pietrobon and Moskowitz, 2014).

-L'injection de substances algogènes dans les méninges via une canule afin de mimer l'inflammation méningée et la douleur migraineuse (Oshinsky and Gomonchareonsiri, 2007).

-L'injection systémique ou locale (méninges) de molécules pouvant déclencher des crises de migraine chez l'homme (NO, CGRP, PACAP), ou les injections répétées de sumatriptan afin de mimer les céphalées induites par abus médicamenteux (De Felice et al., 2010; Mason et al., 2017; Tassorelli and Joseph, 1995a).

-Le développement récent de certains modèles comportementaux, notamment utilisant différents paradigmes stressant les animaux (Kaufmann and Brennan, 2018)

Plusieurs revues discutent les avantages et inconvénients de ces modèles (Andreou and Oshinsky, 2015; Chen et al., 2016b; Demartini et al., 2019; Eikermann-Haerter and Moskowitz, 2008; Gupta and Villalón, 2010; Jansen-Olesen et al., 2013; Pietrobon and Moskowitz, 2014).

2. Les modèles de migraine utilisant les donneurs de NO

a. Chez l'homme

Ce modèle a été initialement développé chez l'homme en partant des observations anciennes datant du XIXème et du début du XXème concernant les personnes développant des céphalées au contact des donneurs de NO comme la nitroglycérine (NTG, parfois GTN pour Glyceryl Trinitrate), ainsi que de l'utilisation des donneurs de NO dans les pathologies cardiovasculaires (Bagdy et al., 2010; Daiber and Münzel, 2015). Cela a conduit aux premières études cliniques chez l'homme testant ces donneurs de NO pour leur potentiel effet sur la migraine et son induction (Iversen et al., 1989; Sicuteri et al., 1987). Ils induisent dans un premier temps (quelques minutes après l'injection intraveineuse) une céphalée transitoire liée à l'action vasculaire du NO, puis, pour 50 à 80/90% des patients migraineux, une céphalée dite retardée et remplissant les critères de diagnostic de la migraine. Le délai d'apparition de cette céphalée migraineuse expérimentale est variable, allant de 30 minutes post-injection jusqu'à 6 heures (Akerman et al., 2019; Ashina et al., 2013; Schytz et al., 2010). Les effets observés seraient liés au NO et à l'augmentation de GMPc : l'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiesterase 5, bloquant la dégradation du GMPc, conduit à des effets similaires à ceux des donneurs de NO (Kruuse et al., 2002, 2003). Lors de ces deux études,

aucun effet vasculaire ne fut observé pendant la crise retardée de migraine, renforçant l'hypothèse d'un effet neuronal. De ce fait, les donneurs de NO de la famille de l'isosorbide dinitrate (ISDN) et isosorbide mononitrate (ISMN) se sont révélés particulièrement efficaces (Bellantonio et al., 1997; Castellano et al., 1998; Hansen and Olesen, 2016; Martelletti et al., 1994, 1997; Massari et al., 1994). Ces derniers ont la particularité de produire du NO de façon prolongée, *via* un mécanisme inconnu à ce jour (Daiber and Münzel, 2015).

Une injection de donneurs de NO n'induit généralement pas de crise migraineuse retardée chez des volontaires sains (environ 10% de répondeurs dans la plupart des études). Cependant, cette vision a été complétée récemment par plusieurs études qui ont pu mettre en évidence que certains volontaires sains pouvaient développer une crise de migraine expérimentale avec une forte dose de donneur de NO, notamment en utilisant des protocoles de perfusion prolongée ou encore certains donneurs de NO comme l'ISMN ayant une longue durée d'action (ce qui n'est pas le cas de la NTG) (Iversen et al., 1992, 1993; Olesen and Ashina, 2015). Ces études cliniques montrent donc que les donneurs de NO ont la capacité d'induire préférentiellement des crises de migraines chez des patients ayant un historique avec cette pathologie, mais que parfois, quand une dose importante de donneurs de NO est utilisée, les volontaires sains peuvent être affectés. Ces résultats suggèrent l'hypothèse suivante : des facteurs génétiques pourraient déterminer un « seuil de migraine », les patients migraineux étant beaucoup plus sensibles aux donneurs de NO que les volontaires sains. De façon étonnante, les patients ayant une FHM ne sont pas répondeurs aux donneurs de NO ainsi qu'au CGRP (Hansen et al., 2008a, 2008b, 2008c).

La crise de migraine expérimentale présente également des similitudes avec une crise spontanée: les céphalées décrites sont d'intensités moyennes/sévères, parfois unilatérales, pulsatiles et accompagnées de nausées par exemple. Des symptômes prémonitoires ont également été reportés (Afridi et al., 2004; Maniyar et al., 2014). A l'inverse, les patients développent très rarement des auras, même ceux ayant des antécédents d'un tel phénomène. L'allodynie cutanée est également présente dans ces migraines expérimentales (Afridi et al., 2005; Akerman et al., 2019; Di Clemente et al., 2009; Thomsen et al., 1996; de Tommaso et al., 2004). Certains changements biochimiques, comme l'élévation de la concentration sanguine en CGRP, sont retrouvés dans certaines études (Juhasz et al., 2003; Martelletti et al., 1997) mais pas dans d'autres (Ashina et al., 2001). Enfin, ces crises expérimentales répondent aux traitements classiques, notamment le sumatriptan (Akerman et al., 2019; Iversen and Olesen, 1996; Martelletti et al., 1997). L'ensemble de ces données montre bien la robustesse de ce modèle de migraine expérimentale chez l'homme.

b. Chez l'animal

L'utilisation des donneurs de NO dans des modèles précliniques a commencé dans le milieu des années 90 dans le groupe de Cristina Tassorelli, avec un objectif de translation inverse du modèle humain nouvellement développé. Les donneurs de NO sont principalement injectés par voie systémique, principalement par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, et plus rarement par voie intraveineuse (*iv*) avec une perfusion prolongée. Cette dernière permet de mimer avec fidélité le modèle humain et de réduire l'écart de dose en donneur de NO entre homme et rongeur nécessaire au déclenchement des potentiels effets migraineux (dose beaucoup plus forte chez le rongeur). Cet aspect est souvent pointé comme étant l'une des principales limitations à ce modèle, du fait des potentiels effets cardiaques et vasculaires causée par une forte dose de donneur de NO. Une diminution de la pression sanguine est effectivement observée (Greco et al., 2011; Markovics et al., 2012). Cependant ces réserves peuvent être nuancées par le fait que les rongeurs ont un tonus sympathique dominant, expliquant des effets vasculaires acceptables malgré les fortes doses (Bates et al., 2010; Tassorelli et al., 2005a). Des différences dans la métabolisation des donneurs de NO ainsi que dans l'organisation de la dure-mère pourraient aussi expliquer ce besoin d'une forte dose chez l'animal (Mecheri et al., 2018; Sokołowska et al., 2004; Vidrio and Fernández, 2001).

Les premières expériences se sont principalement intéressées à l'activation des neurones du SNC suite à l'injection de NTG, en utilisant des techniques de marquage de *c-fos* (un facteur de transcription rapidement recruté suite à l'activation d'un neurone) (Tassorelli and Joseph, 1995b, 1995a; Tassorelli et al., 1999). Depuis, de nombreux autres paramètres ont été étudiés dans ce modèle: les variations de certains médiateurs (CGRP, NO etc.) dans différents fluides (plasma, CSF etc.), les changements au niveau vasculaire, notamment méningé, les changements d'expression de certains marqueurs dans des régions clés du système trigémino-vasculaire (*c-fos* mais aussi *nNOS*, *pERK* etc.), les enregistrements électrophysiologiques de différents neurones (TG, TNC etc.) et les tests comportementaux (douleur, photophobie...) (Vuralli et al., 2019). La Table 7 résume les principales caractéristiques associées à ce modèle de migraine. Une Table exhaustive (122 études au 30/04/2019) décrivant les caractéristiques de chaque étude utilisant ce modèle est présentée en Annexe 2.

Les nombreux effets observés suite à l'injection systémique des donneurs de NO posent la question de son mode et de son site d'action. Du fait des propriétés chimiques lipophiles de ces donneurs de NO, plusieurs sites peuvent être envisagés : vasculaires bien évidemment (même si l'effet vasodilatateur du NO n'est pas impliqué principalement dans l'établissement des symptômes migraineux chez l'homme et l'animal), mais aussi au niveau du SNC et du SNP, du fait de cette particularité chimique (Olesen, 2008). Concernant son mode d'action, des effets impliquant l'activation de la guanylate cyclase soluble (*sGC*, soluble Guanylate Cyclase) par le NO suivie d'une

augmentation de GMPc et d'une activation de la protéine kinase G (PKG) ont été proposés, avec un site d'action dans le SNC (Ben Aissa et al., 2017; Kruuse et al., 2002, 2003). Néanmoins d'autres études ont également proposé un site d'action périphérique, en particulier pour les aspects douleur et allodynie produits par les donneurs de NO : ainsi, il a été proposé un mécanisme d'action local, directement dans la patte de l'animal/localement chez l'homme (Ferrari et al., 2016; Holthusen and Arndt, 1994), et un autre mécanisme ciblant localement le TG, impliquant la production de NO et de ses dérivés oxygénés et dépendant des canaux ioniques neuronaux TRPA1 (Marone et al., 2018).

Cependant, certains aspects ne sont toujours pas élucidés et d'autres études contredisent ce mécanisme d'action. Il est très probable que plusieurs mécanismes et sites d'action existent et se superposent, permettant d'aboutir à l'ensemble complexe d'effets induits par ces donneurs de NO.

Donneur de NO utilisé et injections	Paramètres étudiés, méthodes employées	Effets observés
NTG (majorité des études), SNP, ISDN, SNG, SNAP 0,1-10mg/kg, injection intrapéritonéale ou sous-cutanée, perfusion intraveineuse prolongée, application locale 1 injection majoritairement, plusieurs injections parfois (migraine chronique, différents protocoles: 1 injection/jour, ou tous les 2-3 jours)	Changements vasculaires (mesure pression sanguine, imagerie vasculaire)	Augmentation du flux sanguin, vasodilatation (artères cérébrales, méningées)
	Changements métaboliques (dosage sanguin, qPCR et Western-Blot)	Augmentation des concentrations sanguines en CGRP, NO et métabolites et parfois de certaines cytokines. De tels changements, notamment pour les cytokines, sont retrouvés dans les méninges
	Variations d'expressions de marqueurs neuronaux (qPCR, Western-Blot, immunohistochimie...)	Augmentation de l'expression de c-fos, nNOS, CGRP et d'autres cibles (protéines/cytokines en lien avec l'inflammation et la sensibilisation comme CamKII, ERK etc.) dans le TNC. Augmentation de c-fos dans de nombreuses aires cérébrales (noyaux hypothalamiques, PAG, RVM, etc.)
	Activité neuronale (électrophysiologie <i>in vivo</i>)	Sensibilisation des neurones TG et TNC. Diverses sous-populations peuvent être inhibées ou ne pas répondre
	Comportements (évaluation douleur spontanée ou évoquée, photophobie, anxiété etc.)	Douleur spontanée (score de douleur faciale, comportements associés). Hypersensibilité thermique (tail-flick, Hargreaves, acétone), mécanique (von Frey) et chimique (Formaline) faciale et extra-faciale. Photophobie, anxiété

Table 7 : Principales caractéristiques des modèles de migraine utilisant les donneurs de NO

La grande majorité des études utilisent une seule injection systémique de NTG chez des rats mâles. Les donneurs de NO à libération spontanée (SNAP, SNG, SNP) ou à libération lente (de type isosorbide di/mononitrate) sont moins utilisés mais tout autant efficaces. Les effets de ce modèle sont divers et peuvent être évalués de façon très variée. L'augmentation d'expression de c-fos au niveau du TNC, l'augmentation plasmatique des concentrations de CGRP ainsi que le développement d'une allodynie mécanique sont les critères les plus étudiés et les plus fiables à ce jour pour ce modèle. SNG : S-Nitrosoglutathione, SNAP : S-Nitro-N-acétylpénicillamine, SNP : Sodium Nitroprusside. L'ensemble des études et les références associées sont détaillées dans l'Annexe 2.

Il ressort donc de l'ensemble de ces études que les donneurs de NO produisent de nombreux d'effets chez l'animal, la grande majorité étant corrélée avec ceux observés chez l'homme dans la pathologie migraineuse. Ce modèle représente à l'heure actuelle une solution simple et efficace pour mimer autant que possible au niveau préclinique la migraine (Ashina et al., 2017; Demartini et al., 2019).

Les Canaux ASIC

I. Généralités

1. Découverte des canaux ASIC

L'identification fonctionnelle des canaux sodiques activés par les protons remonte au début des années 80. Voulant réaliser une expérience de routine en patch-clamp sur des cellules de neuroblastomes (une dose-réponse avec de la sérotonine), Krishtal et Pidoplichko identifièrent un courant inconnu. Il s'avéra que leur solution n'était pas correctement tamponnée et était acide (Krishtal and Pidoplichko, 1980). L'expérience fut répétée, notamment à partir de culture primaire de neurones sensoriels de DRG et de TG de rat (Krishtal and Pidoplichko, 1980, 1981a, 1981b, 1981c). Les premières hypothèses concernant une possible fonction physiologique de ces « récepteurs aux protons » se tournèrent vers la douleur, le phénomène d'acidification tissulaire lié à la douleur étant déjà suspecté (Lindahl, 1974). Les mêmes auteurs ont également mis en évidence la présence de ces courants dans les neurones du SNC chez le rat et proposèrent déjà sur un hypothétique rôle dans la transmission synaptique (Krishtal et al., 1987; Vrublevskii et al., 1985).

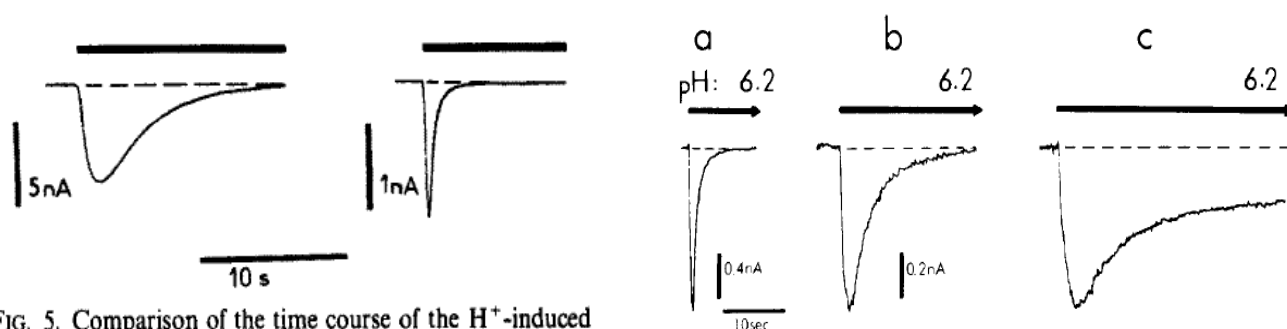


FIG. 5. Comparison of the time course of the H⁺-induced inward current in the neuroblastoma cell (left curve) and in the neurone from the spinal ganglion (right curve). pH was shifted from 7.4 to 6.2. Holding potential—100 mV.

Figure 13 : Représentation des premiers courants sodiques activés par les protons

Gauche : Enregistrements obtenus par patch-clamp (configuration voltage clamp (potentiel imposé), -100mV) sur une cellule de neuroblastome (gauche) et d'un neurone sensoriel de DRG de rat issu d'une culture primaire (droite) en réponse à un changement rapide de pH extracellulaire (7,4 à 6,2).

Droite : Enregistrements dans des conditions similaires sur trois neurones sensoriels différents (a, b et c) de TG de rat en réponse à une perfusion de pH acide. Des différences de cinétiques dans ces réponses au pH acide sont clairement identifiables, suggérant différents types de canaux ioniques impliqués. D'après Krishtal and Pidoplichko, 1980, 1981c.

L'identité des canaux ioniques responsables de ce courant pH-activé resta énigmatique jusqu'à la deuxième partie des années 90. Des travaux réalisés par le groupe de Michel Lazdunski permirent l'identification moléculaire de ces canaux. Différents canaux sodiques neuronaux de la famille ENaC/DEG furent identifiés par le groupe durant cette période : notamment l'un des membres fondateurs de la famille, le canal sodium épithélial ENaC, et un canal neuronal chez le mollusque, activé par le peptide FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) et nommé FaNaC (FMRFamide-gated Sodium Channel) (Lingueglia et al., 1995), ainsi qu'un autre identifié chez le rat et l'homme et appelé Brain Sodium Channel 1 (BNC1) ou Mammalian Degenerin (MDEG), découvert conjointement par les groupes de Michel Lazdunski et Michael Welsh (Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996), mais sans pouvoir identifier son activateur physiologique. La recherche de cet activateur sur un canal homologue récemment cloné a abouti, par sérendipité (un composé testé dissous dans une solution acide) à l'identification de l'activation de ces canaux par les protons extracellulaires. Un courant ayant des caractéristiques cinétiques semblables à celles décrites initialement par Krishtal et coll. fut observé. Ces expériences aboutirent ainsi à l'identification moléculaire de la famille des canaux ioniques Acid-Sensing Ion Channels, ASIC1a étant le premier membre rapidement suivi par l'identification d'autres membres de cette famille dont BNC1/MDEG, identifié un an plus tôt qui s'avéra aussi activable par l'acidité et qui fut renommé ASIC2a (Waldmann et al., 1999).

2. Phylogénie des canaux ASIC

Les canaux ASIC appartiennent à la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC (Figure 14), ayant comme caractéristiques d'être principalement perméables au sodium, d'être inhibés par l'amiloride et d'avoir la même topologie de leurs sous-unités : segments amino- et carboxy-terminaux (N-terminal et C-terminal) intracellulaires avec deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire. Cependant, les rôles physiologiques ainsi que les modes d'activation de ces canaux ioniques seront très différents : chez les mammifères, les canaux ASIC neuronaux sont activés par une acidification extracellulaire et sont impliqués entre autres dans la douleur tandis que le canal sodium épithélial ENaC est lui constitutivement actif et est important pour l'homéostasie sodique au niveau du rein, du poumon et du colon. L'homologie des séquences au sein des ASIC chez les mammifères varie de 45 à 60%. Les différences entre sous-unité de rat et d'homme sont faibles, approchant les 100% d'homologie pour ASIC1a ou ASIC2a et autour de 85% pour ASIC1b et ASIC3.

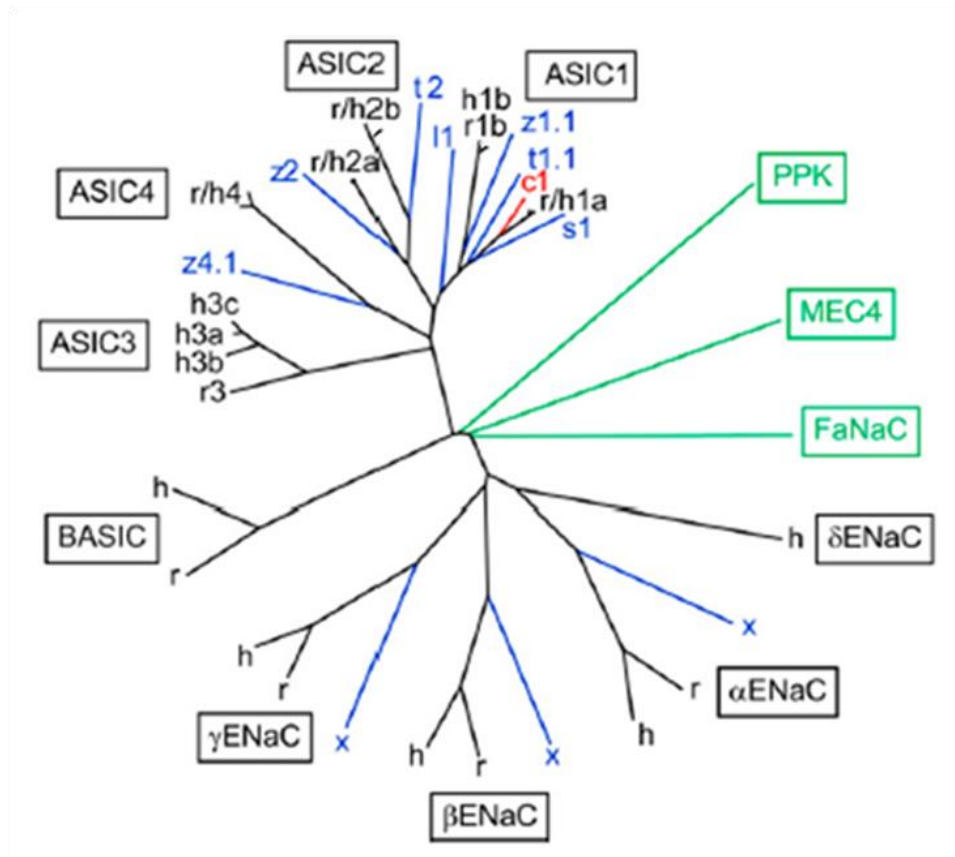


Figure 14 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC

Les différents membres de cette superfamille peuvent être associés en sous-groupes. D'une part, en vert, un membre est représenté de façon illustrative pour la drosophile avec Pickpocket (PPK), de même pour MEC4 (mechano electrical transduction channel 4), une dégénérine de *C. Elegans* et FaNaC du mollusque *Helix Aspera*. A cela s'ajoute les canaux sodiques épithéliaux (ENaC, α , β , γ , δ), le Bile acid-sensitive ion channel (BASIC, parfois appelé ASIC5, initialement dénommé BLINaC chez les rongeurs, brain-liver-intestine amiloride-sensitive sodium channel ou hiNaC, human intestine sodium channel) et enfin les différents membres de la famille des canaux ASIC (ASIC1-4). Sont représentés en noir les canaux ioniques de mammifères, en bleu ceux venant d'autres espèces et en rouge celui de poulet, utilisé pour les études cristallographiques. C : poulet (chicken), h : humain, r : rat, l : lamproie, s : requin (shark), t : crapaud (toad), f : poisson (fish), x : xénope, z : poisson zèbre (zebra fish). D'après Kellenberger and Schild, 2015.

Il a été proposé que les membres de la famille des canaux ASIC aient acquis la sensibilité aux protons il y a environ 420 millions d'années au niveau de la divergence entre poisson osseux et cartilagineux (Coric et al., 2005). Ce résultat a été affiné récemment et il semblerait que cette sensibilité aux protons ait émergé avant. Des analogues des canaux ASIC sensibles à une acidification ont été identifiés dans des membres de la famille des Chordés (tuniciers), apparaissant il y a 600 millions d'années (Lynagh et al., 2018).

II. Structures des canaux ASIC

1. Gènes et sous-unités

Les canaux ASIC fonctionnels résultent de l'assemblage de 3 sous-unités ASIC codées par quatre gènes : ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4 (Figure 15). ASIC5, codant pour BASIC, est phylogéniquement éloigné et n'est pas sensible aux protons. Il n'est pas considéré à proprement parler comme un canal ASIC. Les gènes correspondants sont dénommés Accn1-4 (Amiloride-sensitive cation channel neuronal 1-4), avec Accn1 codant pour ASIC2 et Accn2 pour ASIC1, du fait de la chronologie de leur découverte. Certains de ces gènes pourront subir des épissages alternatifs, conduisant à l'expression de différentes sous-unités. De ce fait, la famille des canaux ASIC est vaste et cela se traduira notamment par une grande diversité fonctionnelle des homotrimères ou hétérotrimères formés. On retrouve donc chez les rongeurs :

-Deux sous-unités codées par ASIC1 : ASIC1a, anciennement ASIC α ou BNaC2 α (García-Añoveros et al., 1997; Waldmann et al., 1997a) et ASIC1b, auparavant nommé ASIC β ou BNaC2 β (Bässler et al., 2001; Chen et al., 1998). Les différences entre les deux sous-unités se situent au niveau du domaine intracellulaire N-terminal, du premier segment transmembranaire et d'une portion de la boucle extracellulaire, représentant environ le premier tiers de la protéine. Comparé à ASIC1a, ASIC1b dispose donc d'un domaine N-terminal deux fois plus long : chez le rat on retrouve 90 acides aminés et 559 pour la sous-unité entière versus 45 et 526 pour ASIC1a. Initialement, une sous-unité plus courte fut décrite (ASIC β , 513 acides aminés) (Chen et al., 1998), avant qu'une deuxième étude affine ces résultats et propose qu'ASIC1b compterait 559 acides aminés. Cette longue sous-unité est vraisemblablement celle retrouvée dans les tissus natifs. Un variant d'épissage d'ASIC1b fut également caractérisé et nommé ASIC β 2. Il diffère d'ASIC1b aussi au niveau du segment N-terminal et transmembranaire. Ce variant est beaucoup plus court que les autres sous-unités ASIC décrites et ne forme pas de canal fonctionnel par lui-même mais peut s'associer sous formes d'hétéromères avec d'autres sous-unités ASIC (399 acides aminés contre environ 540 pour les autres ASIC) (Ugawa et al., 2001).

-Deux sous-unités codées par ASIC2 : ASIC2a, anciennement MDEG1 ou BNaC1 α (Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996) et ASIC2b (MDEG2 et BNaC1 β), différant également au niveau du segment N-terminal, du premier segment transmembranaire et d'une portion de la boucle extracellulaire. ASIC2b ne forme pas de canal fonctionnel s'il est exprimé seul, étant a priori séquestré dans le réticulum endoplasmique, mais il est capable de s'associer à d'autres sous-unités exprimées dans la même cellule pour former des hétéromères fonctionnels (Lingueglia et al., 1997).

-Une sous-unité codée par ASIC3 : ASIC3 (anciennement DRASIC, Dorsal Root ASIC) (Waldmann et al., 1997b).

-Une sous-unité codée par ASIC4 : ASIC4 (anciennement SPASIC, Spinal Cord ASIC). Jusqu'à présent, cette sous-unité n'est pas fonctionnelle seule (Lynagh et al., 2018) et reste peu étudiée. Elle ne présente que 45% d'homologie vis-à-vis des autres sous-unités (Akopian et al., 2000; Gründer et al., 2000). Il a été suggéré qu'elle pourrait s'associer aux autres sous-unités pour les réguler, et certains motifs intracellulaires d'ASIC4 pourraient jouer sur le trafficking, la dégradation et la localisation au sein des organelles dans la cellule de cette sous-unité (Donier et al., 2008; Schwartz et al., 2015).

Cet ensemble est légèrement différent chez l'homme : en plus des deux variants retrouvés pour ASIC1 (García-Añoveros et al., 1997; Hoagland et al., 2010) et ASIC2 (García-Añoveros et al., 1997), trois variants d'épissage ont été identifiés pour ASIC3, à savoir ASIC3a, ASIC3b et ASIC3c (différences au niveau du C-terminus) (Babinski et al., 1999; Ishibashi and Marumo, 1998; de Weille et al., 1998) ainsi que deux variants pour ASIC4 (différant par la boucle extracellulaire).

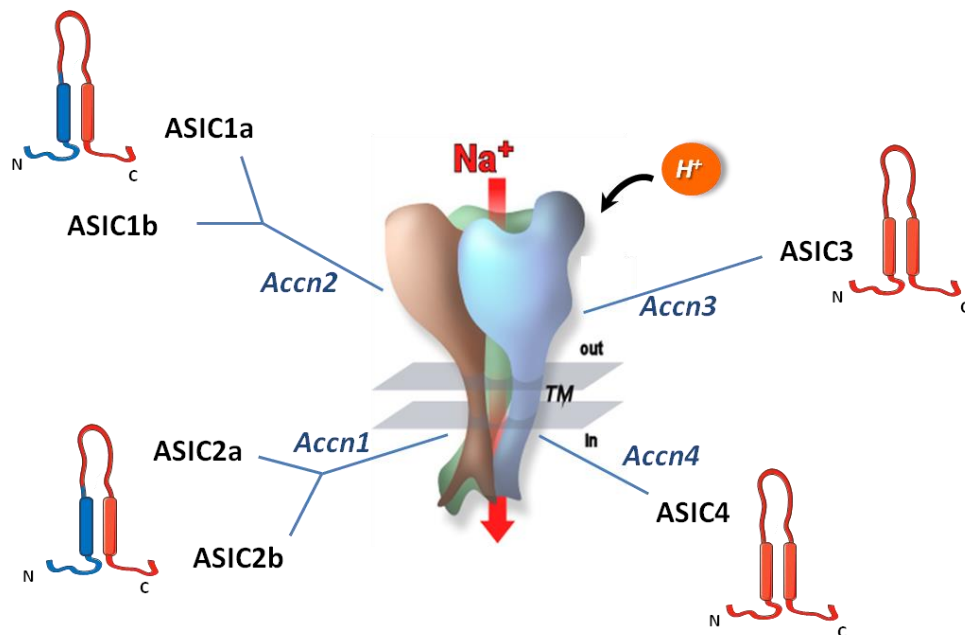


Figure 15 : La famille des canaux ASIC chez le rongeur

Quatre gènes (*Accn1-4*) codent les différentes sous-unités ASIC capables de s'associer sous forme d'homo- ou d'hétérotrimères fonctionnels. Les différentes sous-unités ont la même topologie : domaine N-terminal et C-terminal intracellulaires, deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire. Les variants d'épissage ASIC1b et ASIC2b ont le premier tiers de leur sous-unité (en bleu) différent par rapport à ASIC1a et ASIC2a. Les nombreuses possibilités d'assemblages confèrent à ces canaux homotrimériques et hétérotrimériques des propriétés différentes telles que des sensibilités particulières aux protons, des cinétiques et des perméabilités ioniques spécifiques. TM : Transmembrane, In : Inside, Out : Outside, N : N-ter, C : C-ter.

2. Structure et assemblage

La première étude par cristallographie (diffraction rayons X) fut conduite par le groupe d'Eric Gouaux sur le canal ASIC1 de poulet (Jasti et al., 2007). Elle apporta la preuve d'un assemblage trimérique du canal, confirmé plus tard par d'autres approches (Bartoi et al., 2014; Carnally et al., 2008). La boucle extracellulaire d'une sous-unité est constituée par 7 hélices α et 12 feuillets β , reliée aux domaines transmembranaires (une hélice α chacun). La forme finale du canal ASIC trimérique est parfois comparée à un calice ou à une main tenant une balle et les différents domaines de la boucle extracellulaire ont été nommés selon cette analogie (Figure 16) : la poche acide, située à l'interface entre deux sous-unités au niveau des domaines pouce, le doigt et la β balle interagissent avec le domaine paume de la seconde sous-unité. Les vestibules sont également importants : supérieur, sur le haut de la boucle extracellulaire ; central, au niveau des domaines paume et pouce ; et surtout le vestibule extracellulaire, à l'interface entre les domaines poignet et le bas des domaines pouce et paume (Gonzales et al., 2009). Lors de l'activation du canal, c'est par ce vestibule que les ions sodiums vont pénétrer, et non pas par le haut du canal.

Ces études ont également décrit la conformation du pore et du filtre de sélectivité des canaux ASIC. Celui-ci est formé au niveau du segment transmembranaire 2 avec un motif dit GAS, formé par les acides aminés Glycine-Alanine-Sérine et retrouvé chez tous les ASIC (Baconguis and Gouaux, 2012). Les domaines intracellulaires sont de taille variable entre les différentes sous-unités. Par exemple, ASIC1b et ASIC2b ont des segments N-ter beaucoup plus long qu'ASIC1a et ASIC2a. Ces segments N-terminaux et C-terminaux sont importants pour la régulation des canaux ASIC par des signaux intracellulaires et pour l'interaction avec d'autres protéines. Il est intéressant de noter que ces segments N-terminaux d'ASIC1b et ASIC2b et une partie du segment C-terminal d'ASIC3 correspondent à des domaines dits intrinsèquement désordonnées, caractérisés par un enrichissement d'acides aminés de type Glutamine, Sérine, Glutamate, Lysine, Glycine, Alanine et Proline (résidus chargés, polaires et favorisant l'instabilité et la mobilité des segments). Une telle conformation aura des conséquences importantes sur la structure et la fonction de la protéine, favorisant certaines régulations comme les phosphorylations ainsi que les interactions protéine-protéine (Gsoner and Madan Babu, 2009; Iakoucheva et al., 2004). Les segments cytoplasmiques proches de la membrane auront aussi une influence, notamment sur la sélectivité du canal en participant à la continuité du pore (Carattino and Vecchia, 2012; Coscoy et al., 1999; Lynagh et al., 2017).

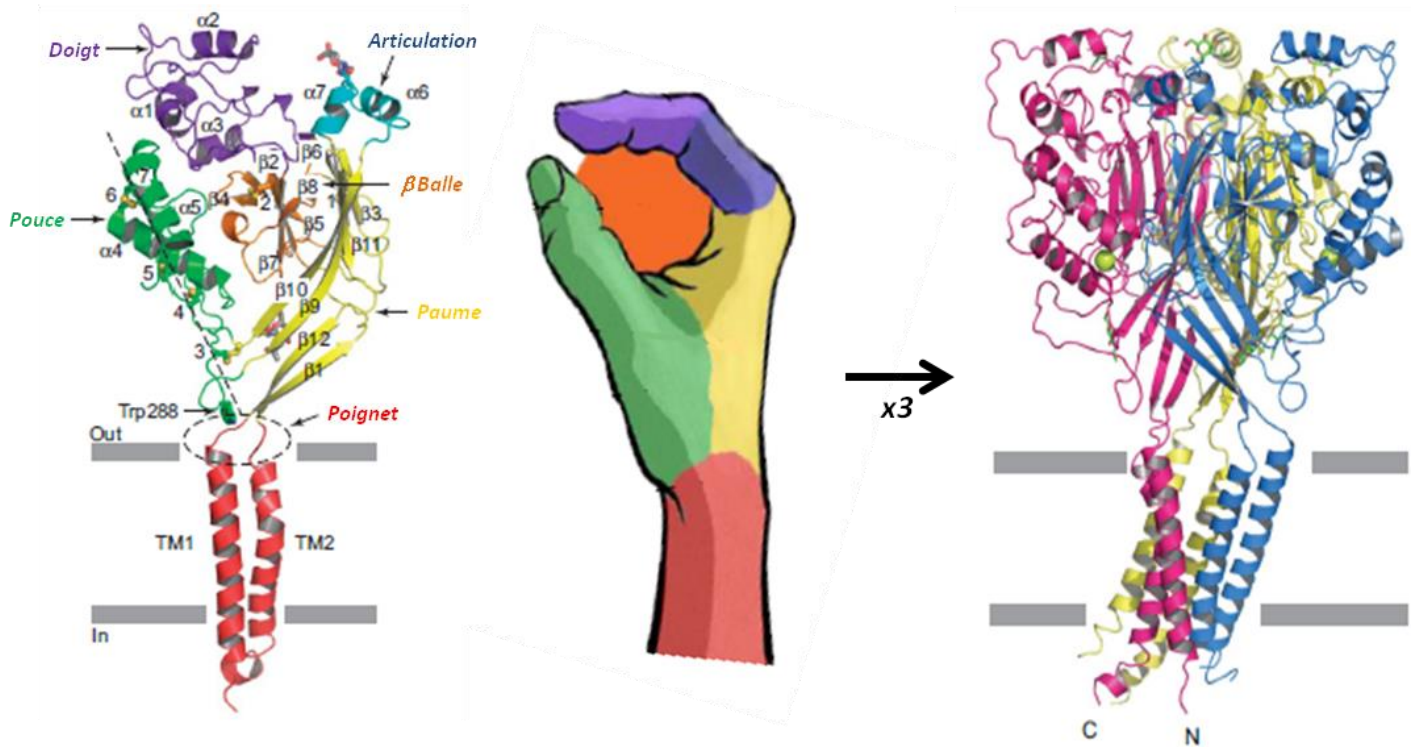


Figure 16 : Structure d'une sous-unité et d'un canal ASIC trimérique

Gauche: Représentation d'une sous-unité ASIC1 de poulet. Les différents domaines de la boucle extracellulaire sont constitués de plusieurs hélices α (notées $\alpha 1-7$) et de feuillettes β (notés $\beta 1-12$), stabilisés par des ponts disulfures présents en particulier au niveau du pouce (notés 1-7). Ces domaines, représentés de différentes couleurs, ont été nommés de par leur ressemblance à une main serrant une balle. Les segments transmembranaires (TM1 et TM2) sont représentés en rouge. Le domaine pouce interagit avec les TM1 et TM2 au niveau du résidu Tryptophane 288 (Trp288). Les domaines intracellulaires N-terminal et C-terminal ne sont pas entièrement représentés. Out : Outside. In : Inside.

Droite : L'association de trois sous-unités ASIC (rose, jaune et bleu) forme un canal fonctionnel. D'après (Jasti et al., 2007).

Il est relativement rare d'observer l'expression d'une seule sous-unité ASIC au sein d'un type cellulaire et de nombreuses études fonctionnelles enregistrant l'activité des canaux ASIC dans des tissus natifs tendent à montrer la présence préférentielle d'hétéromères (expliqués et détaillés par la suite). Néanmoins, les règles d'association des différentes sous-unités au sein des hétéromères ASIC restent floues. Les quelques études adressant cette question ont permis de mettre en avant certains concepts :

-Il existe des différences d'adressage à la membrane entre les sous-unités ASIC : ASIC1b par exemple est dépendant de la glycosylation de certains de ses résidus au niveau de la boucle extracellulaire, affectant le nombre de canaux exprimés à la membrane (Jing et al., 2012; Kadurin et

al., 2008). Des différences d'expression fonctionnelles entre ASIC β (N-terminal court) et ASIC1b (N-terminal long) ont également été observées, suggérant d'autres mécanismes affectant l'adressage d'ASIC1b à la membrane et dépendant de cette région N-terminale. ASIC4 est restreint au sein d'endosomes du fait d'un motif localisé aussi au niveau N-terminal (Donier et al., 2008; Schwartz et al., 2015). ASIC2b semble aussi confiné au sein du réticulum endoplasmique à cause de motifs dans le segment N-terminal. Son association avec d'autres sous-unités (pour moduler leurs propriétés et/ou leurs régulations) permet son adressage à la membrane : ASIC2b est donc exclusivement dépendant de la formation d'hétéromères (Kweon et al., 2016; Wu et al., 2016).

-L'association entre les différentes sous-unités ASIC semble se faire de façon non-préférentielle, au moins pour ASIC1a et ASIC2a. L'abondance de certains hétéromères et/ou homomères dépendrait donc principalement des niveaux d'expressions de chaque sous-unités au sein de la cellule, comme certains travaux l'ont suggérés (Baron et al., 2008; Hesselager et al., 2004). Une étude utilisant les ovocytes de xénope injectés avec des quantités équivalentes d'ARN codant pour ASIC1a et ASIC2a couplés à des techniques d'imageries a révélé une association aléatoire entre les sous-unités, aboutissant à des ratios équivalents d'hétérotrimères de type 2:1/1:2 (2 ASIC1a+1ASIC2a / 1ASIC1a+2ASIC2a en l'occurrence) (Bartoi et al., 2014). En utilisant une approche différente mais sur des tissus natifs (cerveau de souris), un autre groupe est arrivé à des conclusions similaires : association aléatoire entre sous-unités et prépondérance d'homomère et de certains hétéromères selon les niveaux d'expression (Wu et al., 2016).

3. Mécanismes structuraux d'activation et d'inactivation des canaux ASIC

L'étude des mécanismes d'activation des canaux ASIC par les protons extracellulaires a fait l'objet de nombreux travaux. Ces derniers sont principalement basés sur des études de mutagenèse et d'électrophysiologie ainsi que sur les différentes structures cristallographiques. Le passage de l'état fermé à ouvert du canal ASIC s'accompagnerait d'un effondrement de la poche acide, permettant un contact entre les domaines pouce et doigt. Cela entraînerait des mouvements de la boucle extracellulaire et aboutirait à une expansion du domaine poignet, à l'élargissement du vestibule extracellulaire et *in fine* à l'ouverture du pore (Bacongus et al., 2014; Yoder et al., 2018) (Figure 17). Ce mécanisme résulterait de la protonation de plusieurs résidus (Histidine, Aspartate et Glutamate par exemple) situés à différents niveaux du canal : dans la poche acide, mais également au sein de l'interface du domaine poignet et des segments transmembranaires (Baron et al., 2001; Paukert et al., 2008) ainsi qu'au niveau du domaine paume. Il convient de mentionner brièvement le cas particulier d'ASIC3 : en effet, il a été décrit pour ce dernier l'existence d'un site d'activation et de

modulation proton-indépendant différent de la poche acide : le site de liaison « non proton dépendant » ou proton-indépendant et sur lequel peuvent agir différents composés synthétiques ou naturels (Yu et al., 2010).

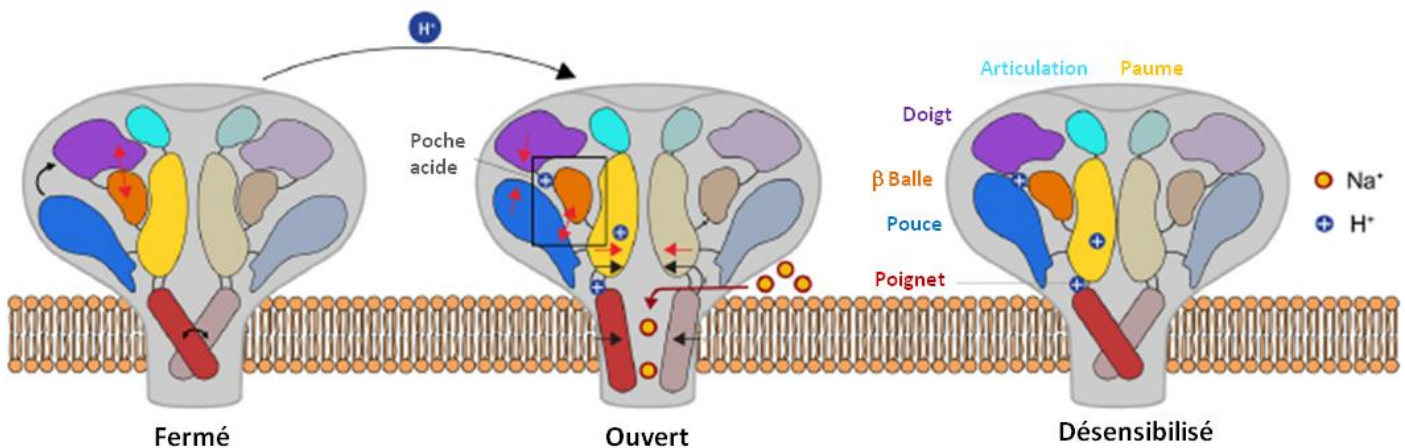


Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes d'activation du canal ASIC1a

Les canaux ASIC peuvent se trouver dans trois états : fermé, ouvert et désensibilisé. A l'état fermé, le domaine pouce est éloigné des domaines doigt et β balle de par l'état de la poche acide. La protonation de plusieurs résidus situés à différents niveaux du canal (cercle bleu) va permettre l'ouverture du canal, via les changements de conformations des domaines de la boucle extracellulaire. L'entrée de sodium se fait via les fenestrations situées vers le domaine poignet. Le passage de l'état ouvert à désensibilisé s'accompagne d'une réorganisation de la poche acide ainsi que des domaines paume et des segments transmembranaires, conduisant à la fermeture du pore. Les flèches noires (modèle basé sur la cristallographie) et rouges (patch-clamp, mutagenèse) représentent les possibles mouvements des domaines entre les différents états du canal. D'après Vullo and Kellenberger, 2019.

Si les canaux ASIC sont exposés à une acidose extracellulaire prolongée, ils vont rapidement se désensibiliser. Cela se traduit par une réorganisation du domaine paume, permettant le relâchement des segments transmembranaires et la fermeture du canal, sous une forme insensible aux protons. Le retour à un état activable se ferait par un effet électrostatique répulsif, venant de la déprotonation des différents résidus suite à l'exposition à un pH 7,4 par exemple et conduisant à l'expansion de la poche acide (Baconguis and Gouaux, 2012; Baconguis et al., 2014; Dawson et al., 2012; Yoder et al., 2018). D'autres études fonctionnelles ont également proposé des changements au niveau de la poche acide (Vullo et al., 2017).

III. Propriétés biophysiques des canaux ASIC

1. Activation, inactivation et sensibilité aux protons

Les propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux ASIC ont été intensément étudiées, principalement par patch-clamp dans des systèmes d'expression hétérologues (ovocytes de Xénope et lignées cellulaires).

a. Sensibilité aux protons

Les différents canaux ASIC, homo- ou hétérotrimériques, diffèrent dans leur sensibilité aux protons. Les canaux homomériques ASIC1a et ASIC3 sont les plus sensibles, avec un seuil d'activation autour de pH7,0-6,8 (Waldmann et al., 1997a) et 7,2-7,0, (Waldmann et al., 1997b) respectivement. Le canal ASIC3 humain peut aussi être activé par une alcalinisation (Delaunay et al., 2012). Les homomères ASIC1b et ASIC2a auront des seuils plus acides, autour de 6,6-6,4 pour ASIC1b (Bässler et al., 2001) et 6,0-5,5 pour ASIC2a (Lingueglia, 2007; Schuhmacher et al., 2015). Les multiples combinaisons d'hétéromères ont des valeurs seuils comprises dans cet ordre de grandeur : ASIC3+2b est autant sensible qu'ASIC3 par exemple, alors qu'inversement ASIC3+1b est plus proche d'ASIC1b (Hesselager et al., 2004; Sutherland et al., 2001) (Figure 18). Cela permet aux canaux ASIC de détecter des changements de pH compris dans une large gamme (pH7,2 – 4,0). Les courbes de type « dose-réponse » d'activation en fonction du pH permettent de déterminer les pH de demi-activation ($pH_{act0.5}$) (Figure 19). Ceux-ci sont variables également, allant d'environ 6,8-6,6 (ASIC3) à 4,5-4,0 (ASIC2a).

L'une des particularités des canaux ASIC est d'être désensibilisés par une acidose prolongée. De façon intéressante, une diminution lente du pH n'entraînera pas d'activation des canaux ASIC, ou tout au plus une activation incomplète : ce phénomène est dû au fait que l'état inactivé du canal a une affinité plus importante pour les protons que l'état ouvert. Les pH de demi-inactivation ($pH_{inact0.5}$) varient de 7,3 pour ASIC1a jusqu'à 6,5-6,0 pour ASIC2a, des valeurs moins acides que celles produisant la demi-activation. Ainsi, afin d'observer une activation complète des canaux ASIC d'une cellule en patch-clamp, il est nécessaire que le changement de pH se fasse rapidement afin d'avoir l'activation synchronisée des canaux (voir paragraphe suivant) (Grunder and Pusch, 2015). Ces gammes de valeurs reportées, bien que relativement proches, pourront légèrement varier d'une étude à l'autre, notamment à cause des conditions expérimentales.

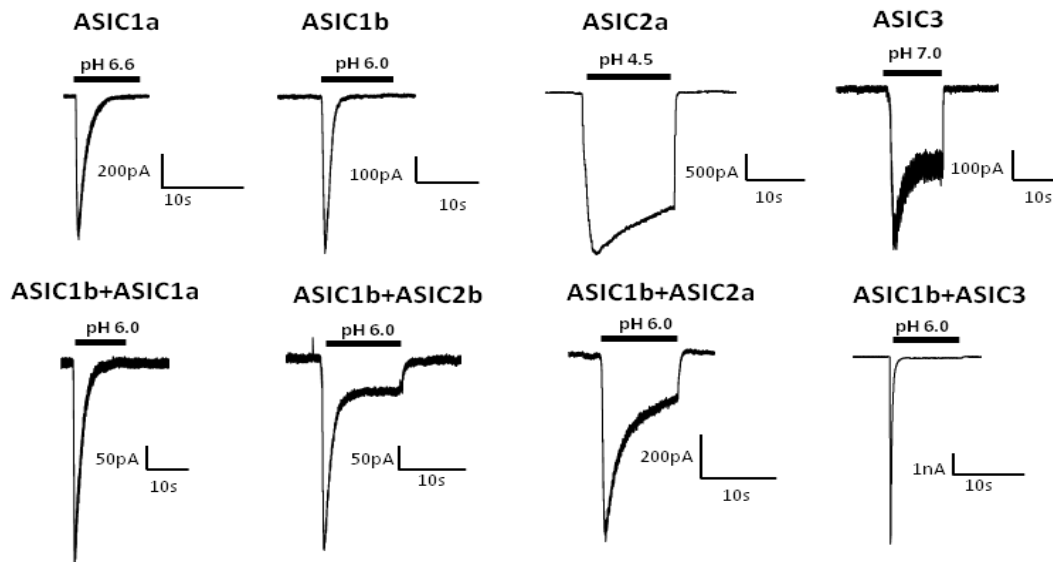


Figure 18 : Diversité des courants ASIC

La perfusion de pH acide à partir d'un pH 7,4 sur des cellules exprimant différentes sous-unités ASIC induit un courant transitoire qui s'inactive plus ou moins rapidement (homomères, en haut ; hétéromères, ratio 1:1 pour chaque sous-unité, en bas). Une grande hétérogénéité est observée au sein de la famille des canaux ASIC quant aux pH d'activation et d'inactivation et aux cinétiques des courants.

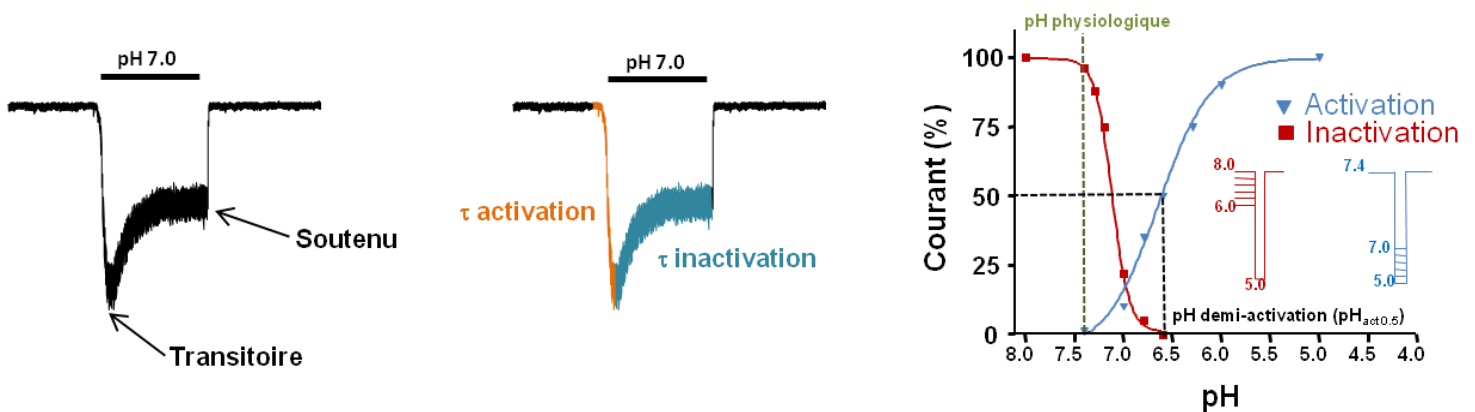


Figure 19 : Caractéristiques biophysiques des courants ASIC

Gauche : Représentation d'un courant ASIC bi phasique, caractérisé par un courant transitoire puis soutenu.

Milieu : Cinétique d'activation (orange) et d'inactivation (bleu) d'un courant ASIC. Les taux d'activation et d'inactivation (τ activation et τ inactivation, constante de temps) varient d'un canal ASIC à l'autre, surtout pour les τ inactivation.

Droite : Courbes de pH-dépendance de l'activation (bleu) et de l'inactivation (rouge) d'un canal ASIC type. La courbe d'activation est déterminée en comparant l'amplitude du courant ASIC activé à différents pH donnés à partir d'un pH de repos de 7,4 versus l'amplitude maximale du courant activé par un pH référence (ici pH 5,0, 100% courant). La courbe d'inactivation est déterminée en comparant l'amplitude maximale du courant activé par un pH de référence (pH 5,0 généralement) après un conditionnement à différents pH donnés avant l'activation (ici, une amplitude de 100% du courant est induite à partir d'un pH de conditionnement de 8,0).

b. Cinétiques

Un changement rapide du pH extracellulaire entraîne une activation des canaux ASIC, se traduisant par un courant rapide et transitoire qui va s'inactiver au cours du temps si le pH reste acide, et plus ou moins rapidement selon la composition du canal ASIC. Cette inactivation pourra également être plus ou moins complète : le résultat d'une inactivation incomplète est la présence d'un courant dit soutenu, perdurant aussi longtemps que dure l'acidification extracellulaire (Figure 18-19). Ce courant soutenu peut être dû à deux mécanismes potentiels : l'un associé à une forte acidose serait dû à des modifications particulières au niveau structural (Salinas et al., 2009; Wu et al., 2019) et l'autre est dû à un courant dit de fenêtre, conséquence du chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation (Deval et al., 2008, 2010). Ces courants soutenus sont principalement, mais pas exclusivement, liés à la présence d'ASIC3 et parfois d'ASIC2b. ASIC2a peut parfois être considéré comme potentiel médiateur d'un tel courant soutenu, son inactivation étant extrêmement lente, voir incomplète (Zhang and Canessa, 2002).

L'activation des canaux ASIC est rapide : les constantes de temps d'activation décrites dans la littérature vont de 15ms à moins de 5ms, une caractéristique qui reste relativement homogène dans la famille des canaux ASIC (Bässler et al., 2001; Sutherland et al., 2001). A l'inverse, les constantes d'inactivation sont plus lentes et plus variables d'un canal à l'autre (Figure 18-19). Les valeurs vont de plusieurs dizaines de millisecondes pour les canaux les plus rapides (ASIC3 et certains hétéromères contenant ASIC3) jusqu'à plusieurs secondes (1 à 4s) pour ASIC1a et ASIC2a. Cette vitesse d'inactivation est dépendante du pH pour certains canaux ASIC (Hesselager et al., 2004). Ces différences de cinétiques entre activation et inactivation peuvent poser certains problèmes expérimentaux : en effet, dans le cas d'un canal ayant une inactivation très rapide (autour de 100ms), les deux phénomènes activation-inactivation seront relativement proches et l'activation sera partiellement masquée du fait de l'affinité plus grande pour les protons de l'état inactivé du canal. Le résultat sera une sous-estimation de l'amplitude maximale du courant car une fraction des canaux de la cellule seront dans un état inactivé. Il sera donc nécessaire d'avoir un saut de pH acide très rapide et uniforme sur toute la cellule, afin de limiter au maximum la proportion de canaux passant dans un état désensibilisé, en particulier si le pH acide utilisé n'active qu'une fraction des canaux. Cette limitation technique pourrait en partie expliquer les variations entre laboratoires des valeurs enregistrées des paramètres biophysiques des ASIC (Grunder and Pusch, 2015).

Enfin, les canaux désensibilisés devront repasser dans un état fermé pour être de nouveau activables. Il est possible de déterminer le temps moyen nécessaire à cette récupération (appelé réactivation). Ce phénomène de réactivation est dépendant du pH et sa cinétique sera variable d'un canal ASIC à l'autre : une exposition à un pH 7.4 sera plus efficace pour effectuer cette transition qu'une perfusion à un pH plus acide. Les différences sont importantes entre les canaux ASIC : ASIC1a

à un temps moyen de demi-réactivation (τ réactivation) de plus de 10 secondes, contre moins d'une demi-seconde pour ASIC3 (Baron et al., 2008; Benson et al., 2002). Ce phénomène serait aussi dépendant de la concentration en calcium extracellulaire (Immke and McCleskey, 2003).

2. Sélectivité et conductance

Les canaux ASIC, comme les membres de la superfamille ENaC/DEG/ASIC, sont principalement perméables au sodium. Les ratios de perméabilité entre sodium et potassium (P_{Na^+}/P_{K^+}) sont proches de 10 pour l'ensemble des canaux ASIC homomériques (ASIC1a : 13, ASIC1b : 14, ASIC2a : 10 et ASIC3 : 11,5) (Basilana et al., 1997; Bässler et al., 2001; Waldmann et al., 1997a, 1997b), nettement inférieur à celui des ENaC, où ce ratio est supérieur à 100 (Palmer, 1987). Certains canaux, comme ASIC1a et ASIC1a+ASIC2b, peuvent avoir aussi une certaine perméabilité au calcium : $P_{Na^+}/P_{Ca^{++}}$ ASIC1a : 2,5 et ASIC1a+ASIC2b : 4,1 contre 25 pour ASIC1a+ASIC2a (Sherwood et al., 2011; Waldmann et al., 1997a). Les valeurs de perméabilité au calcium d'ASIC1a sont parfois très variables d'une étude à l'autre (Bässler et al., 2001; Chen and Gründer, 2007; Yermolaieva et al., 2004; Zhang and Canessa, 2002). Il est aussi intéressant de noter que l'augmentation du calcium intracellulaire liée à l'activation des canaux ASIC1a dans les neurones (qui a été associée à certains effets pathophysiologiques de l'activation de ces canaux dans le SNC) semble en partie indirecte (Boillat et al., 2014; Gonzalez Bosc et al., 2016; Xiong et al., 2004; Yermolaieva et al., 2004). Les conductances unitaires des différents canaux ASIC ont également été déterminées expérimentalement. Les valeurs obtenues oscillent entre 10pS et légèrement plus de 20pS (exemple : ASIC1a : 14,3-23pS, ASIC2a : 10,4-22,5pS, ASIC1+ASIC2a : 10pS, ASIC1b : 14,8pS, ASIC3 : 12,6-18,5pS) (Basilana et al., 1997; Waldmann et al., 1997a, 1997b; Zhang and Canessa, 2002). L'ensemble de ces paramètres biophysiques est résumé dans la Table 8.

Isoforme (rat)	pH seuil d'activation	pH demi-activation	pH demi-inactivation	τ inactivation à $pH_{act0,5}$	τ réactivation pH 7,4	P_{Na^+}/P_{K^+}	Conductance unitaire
ASIC1a	7,0 - 6,8	6,6 - 6,2	7,3 - 7,2	≈ 1200 ms	11 - 13 s	13	14,3 - 23 pS
ASIC1b	6,6 - 6,4	6,2 - 5,8	6,8 - 6,5	≈ 800 ms	3 - 6,1 s	14	14,8 pS
ASIC2a	6,0 - 5,8	4,0 - 5,0	6,3 - 6,1	≈ 4500 ms	0,9 s	10	10,4 - 22,5 pS
ASIC3	7,2 - 7,0	6,7 - 6,2	7,2 - 7,1	≈ 250 ms	0,4 - 0,6 s	11,5	12,6 - 18,5 pS

Table 8 : Propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux ASIC

Les principales caractéristiques sont données pour les isoformes homomériques de rat. D'après Baron et al., 2008; Benson et al., 2002; Chen et al., 2006b; Grunder and Pusch, 2015; Hesselager et al., 2004; Kellenberger and Schild, 2015; Lingueglia, 2007; Schuhmacher et al., 2015; Sutherland et al., 2001; Waldmann et al., 1999; Zhang and Canessa, 2002. (Les données de conductance unitaire d'ASIC1b ont été déterminées lors d'expériences très préliminaires dans cette thèse, n'étant pas connues auparavant).

IV. Pharmacologie des canaux ASIC

Les canaux ASIC sont régulés par un nombre important de modulateurs à l'affinité et à la sélectivité variable. Ces composés sont d'origines diverses : ions, toxines, petites molécules synthétiques ou endogènes, lipides, enzymes, protéines partenaires et voies de signalisation (Baron and Lingueglia, 2015; Boscardin et al., 2016). Ces deux derniers éléments seront traités dans la partie suivante (Régulation des canaux ASIC). Un aperçu global mais non exhaustif des principaux agents pharmacologiques ciblant les canaux ASIC est présenté dans la Table 9. Il ne sera détaillé dans la partie à venir que certains agents pharmacologiques, notamment ceux que j'ai utilisés durant ma thèse, à savoir l'amiloride ainsi que quatre toxines. Le lecteur pourra se référer aux notes supplémentaires (Annexe 3) détaillant chaque composé évoqué dans la Table 9, en particulier les nombreuses molécules endogènes produites lors de conditions pathologiques douloureuses et capables de moduler certains canaux ASIC.

1. Molécules synthétiques : amiloride

Un nombre important de molécules synthétiques ayant un effet sur les canaux ASIC ont été décrites. Cela inclut des molécules aux indications variées : AINS, anesthésiques locaux, antidépresseurs, antiparasitaires etc. L'affinité de ces composés sera généralement de l'ordre du micro- et du millimolaire. Il ne sera décrit dans cette partie que l'amiloride. D'autres molécules dont le GMQ, les AINS, quelques petites molécules et un anticorps ayant été produits pour cibler les ASIC sont détaillées dans l'Annexe 3.

L'amiloride est un diurétique épargneur de potassium utilisé dans l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque (Frelin et al., 1988; George et al., 1973). C'est un bloqueur connu des canaux ioniques de la superfamille ENaC/DEG/ASIC et le premier bloqueur des canaux ASIC qui a été décrit (Korkushko and Kryshthal, 1984; Waldmann et al., 1997a). Il est capable de bloquer toutes les isoformes de canaux ASIC avec une IC_{50} de 5 à 100 μ M. L'effet de l'amiloride passerait majoritairement par un blocage du pore (Bacongus et al., 2014). L'amiloride peut aussi exercer un effet potentioteur paradoxal à plus forte concentration (>500 μ M) notamment sur les canaux ASIC3 et ASIC3+ASIC1b (Li et al., 2011b). Cet effet serait dû à la présence d'un domaine spécifique au canal ASIC3, le site de liaison proton-indépendant déjà mentionné précédemment (Yu et al., 2010). D'autres sites potentiels pourraient exister au niveau de la poche acide et être à l'origine d'une modulation plus complexe se traduisant par des changements dans les courbes d'activation et d'inactivation (Bacongus et al., 2014; Besson et al., 2017). L'amiloride a un nombre important de cibles autres que les canaux ASIC : les canaux ENaC, des échangeurs et transporteurs sodiques (par exemple l'échangeur sodium/proton), les récepteurs GABA-A, les RCPG de classe A, les récepteurs

nicotiniques ou encore les canaux calciques Cav de type T (Fisher, 2002; Frelin et al., 1988; Gao and Ijzerman, 2000; Katritch et al., 2014; Santos-Torres et al., 2011; Tang et al., 1988) . Le benzamil, une molécule apparentée à l'amiloride, bloque également les canaux ASIC (Smith et al., 2011; Waldmann et al., 1997a).

2. Toxines peptidiques animales

Les toxines peptidiques extraites de venins d'animaux représentent à ce jour probablement les meilleurs outils pharmacologiques pour l'étude des canaux ASIC, grâce à leur affinité et leur sélectivité supérieure (Baron et al., 2013).

a. PcTx1

La toxine PcTx1, extraite du venin d'une mygale d'Amérique du Sud, *Psalmopeus cambridgei*, fut la première toxine identifiée comme bloqueur des canaux ASIC (Escoubas et al., 2000). Il s'agit d'un peptide de 40 acides aminés, bloquant les canaux ASIC1a (IC₅₀ 0,5-3nM), ASIC1a+ASIC2b (IC₅₀ 3nM) (Sherwood et al., 2011), dans certaines conditions ASIC1a+ASIC2a (IC₅₀ 3nM, inhibition de 40% à 80% du courant au maximum, selon la configuration de l'hétéromère ; EC₅₀ 56nM) (Joeres et al., 2016; Liu et al., 2018b). PcTx1 peut aussi potentialiser ASIC1b (EC₅₀ 25nM-150nM) (Chen et al., 2006b; Cristofori-Armstrong et al., 2019). La toxine se fixe au niveau de la poche acide du canal (Baconguis and Gouaux, 2012; Dawson et al., 2012; Salinas et al., 2006). PcTx1 modifie l'affinité du canal pour les protons : ASIC1a sera ainsi déjà dans un état désensibilisé à pH7,4 (décalage de la courbe d'inactivation vers des pH plus basiques). L'effet observé sur ASIC1a+ASIC2a et ASIC1b est plus complexe : PcTx1 pourra aussi décaler la courbe d'inactivation de ces deux canaux vers des pH plus basiques (faible effet pour ASIC1b, nécessitant des concentrations supérieures à 100nM) induisant un blocage des canaux si le pH de conditionnement est légèrement acide (autour de pH7.0 pour les deux). Un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus basiques est aussi observé, résultant en une potentialisation des courants ASIC1a+ASIC2a et ASIC1b, un effet dépendant du pH de stimulation. L'injection de PcTx1 au niveau du SNC (intrathécale, *it*, ou intracérébroventriculaire, *icv*) induit des effets analgésiques chez l'animal dans différents modèles de douleur (chimique, inflammatoire, neuropathique, discutées par la suite) (Duan et al., 2007; Fu et al., 2016; Mazzuca et al., 2007).

b. APETx2

La deuxième toxine identifiée fut APETx2, extraite de l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Diochot et al., 2004). C'est un peptide de 42 acides aminés qui bloque les canaux ASIC3 (IC₅₀ 37-63nM), ASIC3+ASIC1a (IC₅₀ 2μM), ASIC3+ASIC1b (IC₅₀ 900nM) et ASIC3+ASIC2b (IC₅₀

117nM) mais pas ASIC3+ASIC2a (jusqu'à 3 μ M). Il a récemment été montré qu'APETx2 à forte concentration (10 μ M) pouvait potentialiser les courants ASIC1b et ASIC2a et modifier leurs propriétés cinétiques (diminution du τ de demi-activation pour ASIC2a et augmentation du τ de demi-inactivation pour ASIC1b avec augmentation *in fine* du temps passé à l'état ouvert). Les mécanismes et le site de fixation de la toxine restent méconnus à ce jour. Un site potentiel a été proposé basé sur des expériences *in silico* (Rahman and Smith, 2014). De plus, d'autres canaux ioniques ont été identifiés comme cible d'APETx2 : des canaux Nav, dont Nav1.8 (Blanchard et al., 2012; Peigneur et al., 2012) ainsi que le canal potassique hERG (Kv11.1) (Jensen et al., 2014). L'injection d'APETx2 chez l'animal dans différents modèles de douleur induit des effets analgésiques : inflammation (Andreev et al., 2018; Deval et al., 2008; Gilbert et al., 2016; Karczewski et al., 2010; Lee et al., 2017; Wang et al., 2014), douleur chimique (Martínez-Rojas et al., 2014), migraine (Yan et al., 2013), douleur articulaire (Izumi et al., 2012; Sugimura et al., 2015), douleur oculaire (Callejo et al., 2015), musculaire (Chen et al., 2014; Deval et al., 2011; Gregory et al., 2016) et osseuse (Hanaka et al., 2018; Hiasa et al., 2017; Kanaya et al., 2015).

c. MitTx

La MitTx fut isolée à partir du venin du serpent corail *Micrurus tener tener*, dont la morsure était connue auparavant pour être particulièrement douloureuse. La MitTx est constituée d'une sous-unité α (60 acides aminés) et β (120 acides aminés). Cette toxine active directement et durablement les canaux ASIC1a (EC50 9nM), ASIC1b (EC50 23nM), ASIC3 (EC50 830nM) ainsi que les hétéromères ASIC1a+ASIC2a et ASIC1a+ASIC3 (testés à 75nM). Son effet est particulièrement long à laver. Elle potentialise fortement l'activation des canaux ASIC2a par le pH (75nM). Elle a été co-cristallisée avec le canal ASIC1 de poulet, permettant de déterminer son site de liaison (domaine poignet et pouce, jusqu'au domaine articulation) et par la même occasion la structure de la configuration ouverte du canal ASIC1, la toxine bloquant le canal dans cette configuration (Baconguis et al., 2014). Son injection intraplantaire *in vivo* chez la souris induit une douleur spontanée qui est diminuée chez les souris KO ASIC3 et abolie chez les KO ASIC1a. L'injection *it* d'une forte dose de capsaïcine, un agoniste de TRPV1 et permettant la destruction des neurones sensoriels exprimant ce canal, abolit également l'effet de la MitTx (Bohlen et al., 2011).

d. Mambalgines

Les mambalgines (1, 2 et 3) furent identifiées à partir du venin des serpents mamba, *Dendroaspis polylepis* (mamba noir, mambalgine 1, 2 et 3) et *Dendroaspis angusticeps* (mamba vert, mambalgine 3) (Baron et al., 2013; Diochot et al., 2012). Ce sont des peptides de 57 acides aminés, appartenant à la famille des toxines à trois doigts, ne différant entre eux que par un seul acide aminé

et possédant les mêmes propriétés. On parlera désormais de la mambalgine. La mambalgine bloque les canaux ASIC1a (IC50 11-55nM), ASIC1b (IC50 44-192nM) ainsi que les hétéromères ASIC1a+ASIC1b, ASIC1a+2a et ASIC1a+2b (IC50 72nM, 246nM et 61nM, respectivement). Elle n'a pas d'effet sur les canaux ASIC2a et ASIC3 (test jusqu'à 2µM) (Baron et al., 2013). Elle est capable de bloquer tous les courants ASIC du SNC (moelle dorsale, hippocampe) ainsi qu'une partie de ceux des neurones sensoriels. Plusieurs études ont essayé de déterminer le site d'action de la mambalgine sur le canal : il a été proposé que le peptide puisse pénétrer au niveau de la poche acide du canal ASIC1a de rat (Salinas et al., 2014; Schroeder et al., 2014), de façon similaire à PcTx1 et un raffinement de ce modèle fut ensuite proposé (Mourier et al., 2015). Récemment, la structure par Cryo-EM du canal ASIC1 de poulet associé à la mambalgine-1 a été publiée, proposant un site différent et localisé au sein du domaine pouce mais sans pénétration du peptide dans la poche acide, ressemblant au site de la MitTx (Sun et al., 2018). Des différences de structure et d'activation entre les canaux de poulet (utilisés pour la Cryo-EM) et ceux de rat (utilisés pour les approches fonctionnelles et de modélisation) pourraient expliquer ces différences. Les mambalgines sont capables d'induire des effets analgésiques *in vivo* dans différents modèles de douleur : nociceptive (Diochot et al., 2012), inflammatoire (modèle carragénine) (Diochot et al., 2012, 2016) et neuropathique (modèle CCI) (Diochot et al., 2016).

Type de modulateurs		Concentration	Canaux ASIC
Ions	Cations métalliques	IC50 1,5µM - 1mM	Tous
	Calcium	IC50 1-10mM	Tous
	Zinc	IC50 10nM -60µM / EC50 120 µM	Bloque ASIC1a (10nM), ASIC1b, ASIC3 / Potentialise hétéromère ASIC2a
	Chlore	IC50 10-150mM	ASIC1a
Molécules synthétiques	Amiloride-Benzamil	IC50 5-100µM	Tous
	GMQ	EC50 1mM	Tous (ASIC3 particulièrement, activation)
	AINS (aspirine, ibuprofène)	IC50 90-350µM	ASIC1a, ASIC3, ASIC2a
	A-317567	IC50 2-30µM	Tous
	CHF5074	IC50 50nM	ASIC natifs SNC
	NS383	IC50 600nM-2µM	ASIC1a, ASIC3 et ASIC1a+2a, ASIC1a+3, ASIC2a+3
	Diminazène	IC50 200nM-3µM	Tous
Molécules endogènes	Anticorps	IC50 85nM	ASIC1a
	Polyamines (spermine)	EC50 500µM	ASIC1a, ASIC1b
	Polyamines (agmatine)	EC50 1-10mM	ASIC3 et ASIC3+1b
	Sérotonine	EC50 40µM	ASIC3 et ASIC3+1a, ASIC3+1b
	Histamine	EC50 200µM-1mM	ASIC1a
	FMRFamide (NPFF)	EC50 50µM	ASIC1a, ASIC1b et ASIC3
	Dynorphine	EC50 50-100µM	ASIC1a, ASIC1b
	Endomorphine	EC50 25-50µM	ASIC3
	NO	EC50 10-100µM	Tous
	Oxydant (H2O2)	EC50 ?/ IC50 ? 20mM	Tous
	Réducteur (DTT)	EC 1mM	Tous ? Uniquement ASIC1a ?
	Lipides (AA, LPC)	EC 1-10µM	ASIC1a, ASIC2a, ASIC3 (activation)
	Lactate	EC 15mM	Tous
	ATP	EC 1-100µM via P2X5 / IC 1-100µM via P2X3	ASIC3, ASIC1a / ASIC3, ASIC1a, ASIC2a
Toxines	Protéases (trypsine)	IC 1,5-7µM	ASIC1a principalement, ASIC1b
	PcTx1	IC50 0,4-4nM-100nM / EC50 25-150nM	ASIC1a, ASIC1a+2a, ASIC1a+2b, ASIC1a+3 / ASIC1b, ASIC1a+2a
	APETx2	IC50 37nM-2µM / EC 10µM	ASIC3, ASIC3+1a, ASIC3+1b, ASIC3+2b / ASIC1b, ASIC2a
	MitTx	EC50 9-830nM	ASIC1a, ASIC1b, ASIC3, ASIC1a+3, ASIC1a+2a (activation), ASIC2a (potentialisation)
	Mambalgine	IC50 11-250nM	ASIC1a, ASIC1b, ASIC1a+1b, ASIC1a+2a, ASIC1a+2b
	Hi1a	IC50 0,4nM / EC50 1µM	ASIC1a / ASIC1b

Table 9 : Liste des principaux agents pharmacologiques modulant les canaux ASIC

Quatre grandes classes de molécules régulant les canaux ASIC peuvent être distinguées. Les concentrations effectives de ces molécules vont du dixième de nanomolaire (toxines PcTx1 et Hi1a) au millimolaire. Seul les lipides, la MitTx et le GMQ sont capables d'activer sans acidification certains ASIC.

V. Régulations des canaux ASIC

La présente partie se focalisera cette-fois sur les régulations des canaux ASIC et en particulier celles au niveau intracellulaire. Cela inclut les interactions des ASIC avec d'autres protéines ainsi que leur régulation par des voies de signalisation intracellulaire.

1. Protéines partenaires

Plusieurs études ont identifiées diverses protéines capables de s'associer aux canaux ASIC, régulant ainsi leur fonction (Zha, 2013). Ces interactions peuvent aboutir à de nombreux effets : maturation de la protéine, dégradation, localisation cellulaire et adressage membranaire, exocytose, endocytose et formation de complexes multi protéiques permettant une interaction avec d'autres acteurs qui n'interagissent pas ensemble directement (enzymes, canaux ioniques...) (Fischer and McNaughton, 2014). Les différentes protéines identifiées comme interagissant avec les canaux ASIC sont répertoriées dans la Table 10. Un criblage par la technique du double hybride dans la levure a également été réalisé par l'équipe de John Wood ; allongeant la liste de potentiels partenaires (Donier et al., 2008).

La majorité des protéines interagissant directement avec les canaux ASIC sont des protéines partenaires ou accessoires, ayant des domaines PDZ comme CIPP (Anzai et al., 2002), Lin-7b, MAGI-1b, PIST (Hruska-Hageman et al., 2004), NHERF1 (Deval et al., 2006), PSD-95 (Eshcol et al., 2008; Hruska-Hageman et al., 2004; Zha et al., 2009a), PICK1 (Baron et al., 2002a; Deval et al., 2004; Duggan et al., 2002; Herbert et al., 2015; Hruska-Hageman et al., 2002; Jin et al., 2010; Leonard et al., 2003) et AKAP150 (Chai et al., 2007). Ces interactions intracellulaires impliquent le domaine d'interaction avec les protéines à domaines PDZ situé dans la partie C-terminale des canaux ASIC. Il existe plusieurs types de domaines d'interaction avec les protéines à domaines PDZ : ASIC1 et ASIC2 ont un domaine identique alors que celui d'ASIC3 est différent, expliquant certaines disparités dans la régulation des sous-unités ASIC par ces protéines. L'hétéromérisation des canaux ASIC, en plus d'apporter des différences biophysiques et pharmacologiques, aura donc également un rôle très important pour la régulation des canaux : par exemple, ASIC3 seul n'est pas capable d'interagir avec PICK1. Mais un hétéromère ASIC3+ASIC2b, retrouvé dans les neurones sensoriels, pourra interagir avec PICK1 *via* la sous-unité ASIC2b, conférant ainsi à ces canaux une sensibilité à la PKC (Deval et al., 2004). Il en va de même pour ASIC1a et PSD-95 au niveau des neurones du SNC. PSD-95 est une protéine importante dans l'organisation et le fonctionnement des synapses (interaction avec la nNOS, récepteur NMDA etc.). C'est sous forme d'hétéromère ASIC1a+ASIC2 qu'ASIC1a pourra interagir et être régulé par PSD-95 (Zha et al., 2009a).

Des protéines membranaires comme celles de la famille des stomatines, ainsi que des protéines du cytosquelette interagissent aussi avec les canaux ASIC. Les premières sont particulièrement intéressantes concernant le rôle potentiel des ASIC dans la mécanosensation (Omerbašić et al., 2015). Cela inclut la stomatine (STOM) (Price et al., 2004) et les stomain-like1 et 3 (STOML1-3) (Brand et al., 2012; Kozlenkov et al., 2014; Lapatsina et al., 2012; Wetzel et al., 2007). Ces protéines bloquent l'activité des canaux ASIC1a, ASIC2a et ASIC3 *in vitro*. Les effets les plus spectaculaires sont retrouvés dans des expériences *ex vivo* de nerf-peau chez des souris double mutants d'ASIC3/STOML3 ainsi que d'ASIC2/STOM où les fibres A δ nociceptives sont fortement touchées (diminution de la sensibilité, augmentation du nombre de fibres insensibles) (Moshourab et al., 2013). Les protéines du cytosquelette peuvent aussi être considérées comme de potentiels candidats pouvant contribuer au rôle potentiel des ASIC dans la mécanosensation, mais aussi à leur régulation (Chen and Wong, 2013). Par exemple, l'annexine II participe à l'augmentation du nombre de canaux ASIC1a à la membrane (Donier et al., 2005). Un tel rôle a également été décrit pour Nav1.8, 5HT1B (cible du sumatriptan) et TASK1 (un canal potassique sensible au pH). La délétion de l'annexine II dans les nocicepteurs permet une réduction subtile de certains phénotypes douloureux (réponse des souris à un pincement nocif, réduction de l'allodynie mécanique dans un modèle neuropathique) (Foulkes et al., 2006).

Quelques travaux ont également suggéré une interaction possible entre les canaux ASIC et d'autres canaux ioniques : GABA-A (Zhao et al., 2014), 5HT3-R (Su et al., 2017), ENaC (Trac et al., 2017), les P2X (Birdsong et al., 2010; Stephan et al., 2018) et certains canaux potassiques comme les BK_{Ca} (Petroff et al., 2012, 2008). Ces études, même si d'autres approches seraient parfois nécessaires pour confirmer les interactions proposées, sont très intéressantes dans le fait qu'elles suggèrent des interactions fonctionnelles (*via* association directe ou indirecte) entre les canaux ASIC et d'autres canaux ioniques (et possiblement des récepteurs comme une des hypothèses proposée dans cette thèse, voir partie 3 des Résultats).

Protéines partenaires	ASIC impliqués	Sites	Rôles protéines	Effets sur ASIC
α-actinine	ASIC1a (ASIC1b)	C ter	Lie ASIC au cytosquelette d'actine	↗ sensibilité au pH
				↘ courant
				accélère la réactivation
AP2	ASIC1a (ASIC1b)	C ter	Protéine adaptatrice endocytose (clathrine, dynamine)	Blocage endocytose ↗ courant
Annexine II p11.1	ASIC1a	N ter	Trafficking protéines membranaires (TRPs, Nav1,8...)	↗ expression membranaire
				↗ courant
GABA-A	ASIC1a	?	Canal chlore inhibiteur	↘ courant ASIC, change cinétique GABA-A
5HT3-R	ASIC3	?	Canal ionique sérotoninergique	Potentialisation des effets de chaque canaux <i>in vivo</i> (allodynie mécanique)
P2X3	ASIC1a, ASIC3	?	Canal ionique purinergique	Réduction courant ASIC et P2X, changement sélectivité
ENaCa	ASIC1a	Hétéromère ?	Canal sodique épithélial	↗ conductance unitaire, ↘ pNa+/K+
BKCa/Kv1.3	Tous	Boucle extracellulaire	Canal potassique	ASIC inhibe BKCa à pH7,4, inhibition de BK levé par acide et ASIC, BK modifie cinétique ASIC
CIPP	ASIC3	C ter (PDZ)	Protéine membranaire accessoire, Trafficking	↗ expression membranaire
				↗ courant
Hsc70	ASIC2a, ASIC2b	C ter ?	Protéine accessoire cytosolique	Empêche trafficking ASIC2 à la membrane
Lin-7b	ASIC1a, ASIC3	C ter ASIC3, inconnu pour ASIC1a	Protéine accessoire, distribution et recyclage membranaire	↗ expression membranaire
				↗ courant
MAGI-1b	ASIC3	C ter	Protéine accessoire membranaire	↗ courant
NHERF1	ASIC3	C ter	Protéine accessoire membrane-cytosquelette	↗ expression membranaire
				↗ courant
				↗ courant soutenu
PIST	ASIC3	C ter	Protéine accessoire membrane-Golgi, trafficking et dégradation	↗ courant
AKAP150	ASIC1a (ASIC1b), ASIC2a (ASIC2b)	C ter	Protéine accessoire cytosolique (protéines kinases...)	↗ courant, permet l'action de la PKA et de la calcineurine
PSD-95	ASIC2a (ASIC2b), ASIC3	C ter	Protéine accessoire membranaire	↘ expression membranaire
				↘ courant
PICK1	ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b	C ter	Protéine accessoire cytosolique	↗ expression membranaire ASIC1a Permet l'action de la PKC sur ASIC2a et ASIC2b
Parkin	ASIC2a (ASIC2b)	C ter	E3 ubiquitin ligase (via PICK1)	Empêche ↗ courant par PICK1/PKC
Stomatine	ASIC1a, ASIC2a, ASIC3	C ter (ASIC3)	Protéine membranaire, homologue de MEC-2	Pas d'effet apparent sur ASIC1a, accélère inactivation ASIC2a
				↘ courant ASIC3
STOML1	ASIC1a, ASIC3	N ter (ASIC1a)?	Protéine membranaire	Inhibition courant ASIC1a, pas d'effets sur ASIC1b et ASIC1a, ↗ inactivation ASIC3, masque courant acide dans les DRG
STOML3	Tous	?	Protéine membranaire, homologue de MEC-2, liaison vésicule/microtubule	↘ courant ASIC2a et ASIC3 (<i>in vitro</i>), déficits pour différentes populations de fibres mécanosensibles (<i>ex vivo</i>)

Table 10 : Régulation des canaux ASIC par des interactions protéine-protéine

Les canaux ASIC interagissent avec un nombre important de protéines ; majoritairement des protéines accessoires/chaperons, mais aussi d'autres protéines membranaires (stomatine et apparentées, canaux ioniques...) et des composants du cytosquelette. Ces interactions permettent un niveau de régulation supplémentaire de l'activité des canaux ASIC. Du fait des séquences en C-terminal identiques pour ASIC1a et ASIC1b, et pour ASIC2a et ASIC2b, certaines régulations peuvent théoriquement s'appliquer aux deux variants même si les études n'ont pas exploré leur rôle (notés entre parenthèses).

2. Voies de signalisation intracellulaires

Plusieurs voies de signalisation intracellulaires ciblant les canaux ASIC ont été identifiées. Dans le chapitre précédent nous avons déjà vu que l'un des rôles des interactions protéine-protéine pouvait être de permettre le recrutement d'une protéine kinase pour réguler un canal ASIC.

a. PKC

Il est maintenant bien établi que la voie de la PKC, *via* PICK1 et potentiellement AKAP, régule positivement les canaux ASIC en induisant une augmentation de la probabilité d'ouverture ou un décalage des courbes d'activation vers des pH plus basiques. La phosphorylation implique des résidus situés en N-ter et C-ter d'ASIC1a et ASIC2a (et donc par homologie, potentiellement d'ASIC1b et ASIC2b pour les résidus en C-terminal qui sont identiques) (Baron et al., 2002a; Deval et al., 2004; Duggan et al., 2002). Son activation dans les neurones sensoriels et centraux se traduit par une augmentation de l'amplitude des courants ASIC natifs (Deval et al., 2004; Hu et al., 2010). Il existe plusieurs isoformes de la PKC, certaines ont même été décrites comme ayant un effet antagoniste sur ASIC1a (PKC β ; le variant α étant celui qui potentialise ASIC) (Berdiev et al., 2002). La PKC peut être recrutée par l'activation d'un nombre important de récepteurs au niveau des neurones sensoriels et impliqués dans la douleur (Figure 7, Table 4) et de nombreuses études ont montré une augmentation des courants ASIC natifs suite à l'activation de récepteurs couplés à la voie de la PKC : 5HT et 5HT2R (Qiu et al., 2012b), prokinéticine et PKR1-2 (Lattanzi et al., 2015; Qiu et al., 2012a), prolactine et son récepteur (PRL) (Liu et al., 2016c), bradykinine (Stucky et al., 1998), UTP et récepteurs P2Y (Kwon et al., 2014; Ren et al., 2016), les récepteurs mGluR (Gan et al., 2016) et les protéases avec PAR2 (activation de la PKA également) (Wu et al., 2017).

b. PKA

La voie de la PKA a également été décrite comme régulant les canaux ASIC. Cette voie est intimement liée au développement de l'hypersensibilité douloureuse (Hucho and Levine, 2007). Cette régulation par la PKA dépendrait en partie de la protéine partenaire AKAP150 et de son interaction avec ASIC1a et ASIC2a (Chai et al., 2007). La PKA cible principalement des résidus situés en C-ter d'ASIC1a (et potentiellement d'ASIC1b), mais n'affecterait pas ASIC2a ou ASIC3, bien que d'autres études le suggèrent. Son effet passerait en partie par une augmentation de la sensibilité du canal pour les protons (décalage de la courbe d'activation vers des pH plus basiques), potentialisant *in fine* l'activité des canaux ASIC en réponse à des acidifications modestes. Cette régulation fut observée à la fois dans les neurones sensoriels et centraux (Cai et al., 2014; Leonard et al., 2003; Liu et al., 2012b). De façon intéressante, la phosphorylation de certains résidus par la PKA pourrait empêcher la liaison de PICK1 avec les ASIC, modifiant la localisation cellulaire de ces derniers.

Il a également été montré que la calcineurine, une protéine phosphatase, pouvait interagir avec les canaux ASIC *via* AKAP150 ou PICK1. Le blocage de cette interaction et donc de l'action de cette enzyme mime les effets de la PKA et de la PKC (Chai et al., 2007; Herbert et al., 2015; Mari et al., 2015).

c. PI3K/Akt

La voie PI3k/Akt (phosphoinositide 3-kinase/Akt, ou protéine kinase B, PKB) a été identifiée au sein des neurones de la moelle épinière dorsale comme pouvant réguler les canaux ASIC1a et ASIC2a/ASIC2b mais pas ASIC1b et ASIC3 (un résidu situé en N-ter d'ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b est indispensable). L'activation de cette voie par TrkB et le BDNF permet une augmentation rapide (en moins de 5 minutes) des courants ASIC *via* une action sur l'adressage des canaux à la membrane (Duan et al., 2012; Zuo et al., 2019). L'allodynie consécutive à une injection *it* de BDNF est réduite chez les souris KO ASIC1a et l'injection d'un peptide mimant la séquence N-ter d'ASIC1a réduit l'effet allodymique du BDNF ainsi que l'hyperalgésie consécutive à une injection intraplantaire de capsaïcine.

d. Autres voies de signalisation d'intérêts

D'autres voies de signalisation ont été décrites comme ayant un effet sur les canaux ASIC. On peut citer la kinase SGK1.1 (Serum Glucocorticoid Kinase, variant 1), ciblant ASIC1a et réduisant son expression à la membrane (Arteaga et al., 2008). Cette enzyme est retrouvée au niveau des neurones du SNC. Récemment, une étude dans un modèle de monoarthrite chez le rat a observé une diminution de cette kinase dans l'amygdale, une région importante dans l'aspect émotionnel de la douleur et riche en canaux ASIC1a, ainsi qu'une augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt et de l'expression de PICK1 et du BDNF. L'injection locale de PcTx1 dans cette région améliore sensiblement les symptômes observés dans ce modèle (hyperalgésie, anxiété) (Aissouni et al., 2017).

L'une des premières voies de signalisation identifiées comme modulant les ASIC fut celle de la CAMKII (protéine kinase Ca⁺⁺/calmoduline-dépendante II). De nombreuses études ont pu démontrer une action de CAMKII sur ASIC1a au niveau des neurones centraux (Gao et al., 2005; Sun et al., 2013). CAMKII agit sur deux résidus situés en C-ter du canal et augmente l'amplitude des courants ASIC (mécanisme inconnu). Une interdépendance entre CAMKII et ASIC1a existe : il est suggéré que l'influx calcique par ASIC1a active CAMKII et un couplage fonctionnel entre les deux existeraient (Yu et al., 2018; Zha et al., 2006). Cette régulation pourrait être importante dans les mécanismes de sensibilisation, notamment au niveau trigéminal (Wang et al., 2018d).

Enfin, ERK (extracellular signal-regulated kinase) peut aussi réguler positivement les courants ASIC des neurones sensoriels, par augmentation de leur amplitude et de leur sensibilité aux protons

(Qu et al., 2015). ERK serait également régulée par l'activité des canaux ASIC, en aval de CAMKII : les souris KO pour ASIC1a ont en effet une diminution des niveaux de CAMKII et ERK activées au niveau des neurones du striatum (Yu et al., 2018; Zha et al., 2006). D'autres voies de signalisation ont également été proposées comme pouvant être modulées, voire activées, par un influx calcique ASIC1a-dépendant (Chen et al., 2016a; Li et al., 2017). Ces effets restent néanmoins peu établis, mais pourraient avoir une grande importance dans certains mécanismes liés à la douleur (Bray et al., 2013; Li et al., 2019a).

e. Régulation de l'expression des canaux ASIC

Un nombre conséquent de stimuli et de médiateurs sont capables d'augmenter l'expression des ARNm des canaux ASIC, en particulier au niveau des DRG : cela inclut de nombreux médiateurs inflammatoires comme la 5HT, les interleukines (IL1 β , IL6 et TNF α), la bradykinine, le NGF (Mamet et al., 2002; Nagae et al., 2006; Voilley et al., 2001; Zhou et al., 2015, 2017) et les autres neurotrophines comme le GDNF et le BDNF/NT4 (ASIC2), le NT3 (ASIC1, ASIC2 et ASIC3), l'artémisine (ASIC1, ASIC2, ASIC3 : diminution chez les femelles) (Albers et al., 2006; Cuesta et al., 2015; Elitt et al., 2006; Lechner et al., 2009; McIlwrath et al., 2005, 2007) ou encore l'oestradiol (Ren et al., 2018b). Ainsi, dans plusieurs modèles de douleur, une augmentation de l'expression des ASIC au niveau des neurones des DRG ou des TG est observée (Fu et al., 2016; Matricon et al., 2013; Nagae et al., 2007; Qiu et al., 2014a; Voilley et al., 2001), ainsi qu'au niveau des neurones du SNC, notamment dans la moelle épinière (Duan et al., 2007; Wu et al., 2004). Il faut noter que ces médiateurs vont souvent réguler en parallèle la fonction des canaux ASIC grâce aux voies de transduction vues plus haut.

VI. Distribution des ASIC dans les voies de la douleur

Les canaux ASIC sont exprimés dans de nombreux tissus, pas uniquement nerveux (voir (Deval and Lingueglia, 2015; Lin et al., 2015) pour une liste exhaustive, ainsi que différentes bases de données comme GTEx (Genotype-Tissue Expression): <https://www.gtexportal.org/home/>). Cette partie se focalisera uniquement sur leur expression neuronale dans les voies de la douleur. Néanmoins, depuis leur découverte à la fin des années 90, les canaux ASIC ont été impliqués aussi dans plusieurs processus physiopathologiques autres que la douleur, incluant des pathologies neurologiques comme l'ischémie cérébrale (Xiong et al., 2004), la sclérose en plaque (Friese et al., 2007; Vergo et al., 2011), l'épilepsie (Ziemann et al., 2008) ou encore certains mécanismes de plasticité neuronale en lien avec la peur, l'addiction, la dépression ou encore la mémoire et l'apprentissage (Coryell et al., 2007, 2009; Du et al., 2014a; Gutman et al., 2018; Kreple et al., 2014; Wemmie et al., 2002; Yu et al., 2018) (revue par (Wemmie et al., 2013)). Des rôles au sein de cellules non-neuronales ont également émergé, notamment du fait de l'expression des canaux ASIC dans

certaines tumeurs (Berdiev et al., 2003) et des cellules immunitaires (Kong et al., 2013). Il conviendra donc de garder aussi à l'esprit le rôle des cellules non nerveuses dans la douleur et l'expression diffuse des canaux ASIC pour interpréter les observations faites *in vivo*.

1. Distribution dans le SNP

Hormis ASIC4, l'ensemble des ARNm des sous-unités ASIC ont été détectées dans les différents ganglions contenant les neurones sensoriels: DRG (Chen et al., 2002; Hattori et al., 2009; Price et al., 2001), TG (Fu et al., 2016; Nakamura and Jang, 2014), nodose et jugulaire (Dusenкова et al., 2014; Kupari et al., 2019; Lu et al., 2009), à l'exception du noyau trigéminal mésencéphalique, n'exprimant qu'ASIC1b, ASIC2a et ASIC3 (Nakamura and Jang, 2014; Wu et al., 2010).

La Table 11 résume l'état actuel des connaissances sur la distribution des différentes sous-unités ASIC dans les DRG. Cette table reprend les éléments de classification évoqués dans la première partie de l'Introduction : type de terminaisons périphériques et tissus ciblés, fibres, distribution globale de la sous-unité au sein de l'ensemble des neurones sensoriels, classification selon celle proposée Figure 4 par Emery et Ernfors, marqueurs moléculaires et données fonctionnelles venant d'expériences de patch-clamp et d'électrophysiologie *ex vivo*. Il ressort de l'ensemble de ces études différentes tendances :

-L'identification des canaux ASIC dans les terminaisons périphériques a été limitée par la qualité des anticorps disponibles. C'est par exemple le cas pour ASIC1a et ASIC1b, où il n'existe pratiquement pas d'études sur leur distribution au niveau des terminaisons nerveuses cutanées (Calavia et al., 2010), contrairement à ASIC2 et ASIC3 (Cabo et al., 2012, 2015; García-Añoveros et al., 2001; Price et al., 2000, 2001). De ce fait, la preuve de la présence d'ASIC1a et d'ASIC1b dans les terminaisons périphériques a principalement été apportée par des approches pharmacologiques (mambalgine et MitTx *in vivo*, PcTx1 en patch-clamp sur neurones marqués) et/ou fonctionnelles (expériences *ex vivo*). Plusieurs informations indiquées dans la Table 11 découlent de ce type d'arguments indirects. L'ensemble des données montrent que les ASIC sont distribués dans les neurones innervant les grands territoires de notre corps (peau, muscles et articulations, viscères et autres tissus profonds). Les expériences de patch-clamp sur des neurones de DRG en culture primaire sélectionnés par marquage rétrograde d'un tissu donné ont notamment participé à établir ce constat (Chakrabarti et al., 2018; Deval et al., 2008, 2011; Gautam and Benson, 2013; Molliver et al., 2005; Rau et al., 2014; da Silva Serra et al., 2016; Yan et al., 2011, 2013).

Sous-unité ASIC	Terminaisons périphériques	Tissus cibles	Fibres	Proportion neurones ASIC+ (DRG entier)	Sous population (d'après Emery et Ernfors 2018) et niveau d'expression	Marqueurs moléculaires principaux	Données fonctionnelles
ASIC1a	Terminaisons libres (cutanée, muscle, articulation, viscère)	Peau glabre et poilue	C majoritairement	15-45%	TRPM8 (?) / PEP1 / PEP2 (?) / NF2-3 (?) / NF4 (?) / TH (?)	TRPV1, CGRP, autres (TH, TRPM8, Pvalb...)?	Patch-clamp (rétromarquage peau, muscle, viscère, méninges)
	Corpuscule de Pacini ? Autres ?	Articulations, Muscles	Faible Aδ/Aβ ?				KO ASIC1a: ↗réponses afférences viscérales
	Fuseau neuromusculaire, Organe tendineux de Golgi ?	Viscères, Méninges ?	A- LTMR ? Propriocepteurs ? C LTMR ?				
ASIC1b	Terminaisons libres (cutanée, muscle, articulation, viscère)	Peau glabre et poilue	C, Aδ, Aβ	10-35%	TRPM8 (?) / PEP1 / PEP2 (?) / NF2-3 (?) / NF4 / TH (?)	Pvalb, TrkC, CGRP, TRPV1, peripherin autres (TH, TRPM8...)?	Patch-clamp
	Corpuscule de Pacini ? Autres ?	Articulations, Muscles	Propriocepteurs				KO ASIC1b: déficit proprioception ?
	Fuseau neuromusculaire, Organe tendineux de Golgi	Viscères, Méninges ?	A- LTMR ? C LTMR ?				
ASIC2a	Terminaisons libres (cutanée, muscle, articulation, viscère), Corpuscule de Pacini, Meissner, Ruffini, cellules de Merkel, Follicule pileux (lancéolées longitudinales et circonférentielles)	Peau glabre et poilue, Articulations, Muscles, Viscères	C / Aδ et Aβ majoritairement	≈20-60% (ASIC2a)	TRPM8 / PEP1 / PEP2 / NF / TH / NP (Toutes ?)	NEFH, TrkB, TrkC, RET (ASIC2a), IB4, autres (CGRP...)?	Patch-clamp (rétromarquage muscle, viscère). KO ASIC2: ↘/↗réponses afférences viscérales, ↘ sensibilité RA LTMR ?
≈50-80% (ASIC2a+ASIC2b)							
20-60% (ASIC2b)							
ASIC2b							
ASIC3	Terminaisons libres (cutanée, muscle, articulation, viscère), Corpuscules de Meissner et Ruffini, Cellules de Merkel, Follicule pileux (Guard hairs, lancéolées longitudinales et circonférentielles), Fuseau neuromusculaire, Organe tendineux de Golgi	Peau glabre et poilue	C, Aδ, Aβ	25-50%	TRPM8 / PEP1 / PEP2 / NF1 / NF2-3 / NF4 / NP (?)	TRPV1, CGRP, NEFH, Pvalb, TrkA, TrkC, IB4?	Patch-clamp (rétromarquage peau, muscle, articulation, viscère, méninges)
		Articulation, Muscle	Principalement: C peptidergiques, A-RAI LTMR, Aδ HTMR, propriocepteurs, prurit ?				KO ASIC3: ↘ sensibilité Aδ HTMR, ↗ sensibilité et firing RA LTMR, ↘ réponses afférences viscérales, déficit proprioception
		Viscère, Méninges					

Table 11 : Distribution des différentes sous-unités ASIC dans les neurones sensoriels

Caractérisation des différentes sous-unités ASIC selon le type de terminaisons périphériques, les tissus innervés, les fibres impliquées, la proportion de neurones exprimant la sous-unité ASIC par rapport à l'ensemble des neurones d'un DRG, l'expression parmi les sous-populations décrites Figure 4 et proposés par Emery et Ernfors (niveau d'expression selon les données obtenues sur mousebrain.org), les principaux marqueurs moléculaires ainsi que les données fonctionnelles de patch-clamp et d'électrophysiologie ex vivo (nerf-peau, nerf-colon). Plusieurs informations indiquées dans le tableau proviennent de déductions d'autres expériences et non d'observations directes (exemples : expérience de comportement suite à l'injection intraplantaire de MitTx et localisation des canaux ASIC1a au niveau cutané).

-La proportion de courant ASIC dans des cultures de neurones sensoriels peut varier énormément d'une étude à l'autre, notamment chez la souris (de 10-20% à plus de 70% de neurones répondeurs) (Benson et al., 2002; Smith et al., 2011). Ce n'est pas le cas chez le rat (60% environ, proportion consistante d'une étude à l'autre et au sein de différents laboratoires) (Deval et al., 2008; Leffler et al., 2006; Liu and Simon, 2000; Petruska et al., 2000, 2002; Poirot et al., 2006; Smith et al., 2007).

-Il est possible qu'il existe des différences dans la localisation des ASIC au sein du neurone sensoriel : un enrichissement au sein des terminaisons par rapport au corps cellulaire (sur lequel sont réalisées les expériences de patch-clamp) a été récemment démontré (Clark et al., 2018). La proportion relative de chaque ARNm au sein d'un DRG est généralement de type : ASIC3>ASIC1a≥ASIC1b≥ASIC2 (Deval and Lingueglia, 2015; Poirot et al., 2006). Les proportions varient également d'un segment spinal à l'autre et d'un tissu à l'autre : par exemple on retrouvera plus d'ASIC2 au niveau des ganglions thoraciques que lombaires (Hughes et al., 2007), et plusieurs études démontrent un enrichissement des ASIC et en particulier ASIC3 dans les tissus classifiés de « profonds » (muscles et viscères par exemple) (Adelman et al., 2019), un constat supporté en plus par des données *in vivo* dans différents modèles de douleur (Deval et al., 2011; Hughes et al., 2007; Ikeuchi et al., 2008; Jones et al., 2005; Molliver et al., 2005; Sluka et al., 2003; Yan et al., 2011, 2013).

-Le schéma de distribution des sous-unités ASIC chez les rongeurs est donc le suivant : ASIC1a est exprimé très majoritairement dans des fibres C peptidergiques et exprimant largement TRPV1 (Bohlen et al., 2011; Boillat et al., 2014; Chen et al., 1998; Olson et al., 1998; Ugawa et al., 2005; Voilley et al., 2001; Waldmann et al., 1997a). ASIC1b est exprimé principalement dans des fibres myélinisées (≈70%) et dans une moindre mesure non-myélinisées et ne liant pas l'IB4 (≈30%) (Boillat et al., 2014; Chen et al., 1998; Ugawa et al., 2001). Une part des fibres myélinisées exprimant ASIC1b appartient à la famille des propriocepteurs (Chen and Chen, 2018; Lin et al., 2016; Nakamura and Jang, 2014; Sugino et al., 2019) et les fibres non-myélinisées appartiennent vraisemblablement à une population de fibres C peptidergiques (Boillat et al., 2014; Diochot et al., 2012). Plusieurs études ont montré qu'ASIC1a et ASIC1b étaient distribués dans des populations distinctes (Chen et al., 1998; Sugino et al., 2019; Ugawa et al., 2005), de ce fait il est vraisemblable qu'ASIC1b soit exprimé en plus dans les populations NF2 et NF3 (A-LTMR) voir PEP2 (Aδ nocicepteur) (Table 11). La distribution précise d'ASIC1b dans les sous-populations de fibres C reste à établir (TRPM8 ? C-LTMR ?). ASIC2a et ASIC2b sont distribués dans un vaste panel de neurones (Alvarez de la Rosa et al., 2002; García-Añoveros et al., 2001; Lingueglia et al., 1997; McIlwrath et al., 2005; Price et al., 2000; Usoskin et al., 2015; Zeisel et al., 2018). Ils semblent que les deux sous-unités soient particulièrement enrichies dans les neurones myélinisés ainsi que dans les neurones non-peptidergiques (IB4+ et Ret+) (Frank

et al., 2011). Quelques études ont suggérées qu'ASIC2b était exprimé en plus grande quantité comparé à ASIC2a, voir potentiellement qu'ASIC2a était absent au niveau des DRG (Price et al., 2000; Waldmann and Lazdunski, 1998). La distribution précise des deux sous-unités dans différentes sous-populations reste cependant à préciser. Enfin, ASIC3 est exprimé dans un panel varié de sous-populations de neurones sensoriels: principalement des neurones de type PEP2 (A δ nocicepteur) , des fibres C peptidergiques (Molliver et al., 2005) et certaines contenant TRPM8, différentes populations de fibres A-LTMR (Price et al., 2001), des propriocepteurs (Lin et al., 2016) et potentiellement des populations impliquées dans certaines formes de prurit (Peng et al., 2015).

-La localisation et l'expression des canaux ASIC au sein des terminaisons spinales des neurones sensoriels est sujette à controverse. La destruction des fibres exprimant TRPV1 réduit fortement le marquage ASIC1 (ASIC1a+ASIC1b) au niveau de la moelle épinière (Olson et al., 1998) et l'application de gastrodine, un bloqueur non spécifique des canaux ASIC, réduit la transmission synaptique à ce niveau *via* un blocage présynaptique au niveau des neurones sensoriels (Xiao et al., 2016). Cependant, une étude a démontré qu'ASIC2a n'était pas transporté à ce niveau (García-Añoveros et al., 2001) et une absence de co-localisation entre ASIC1a et des marqueurs de neurones sensoriels au niveau de la moelle fut reportée par d'autres (Duan et al., 2007). La question de la présence des ASIC à ce niveau reste donc ouverte.

2. Distribution dans le SNC

Les ASIC sont très largement exprimés dans le SNC, dans les neurones mais également dans les oligodendrocytes. Les principales sous-unités exprimées sont ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b. ASIC3 a été détecté dans quelques régions comme l'hypothalamus ou le noyau suprachiasmatique (Chen et al., 2009; Meng et al., 2009). Une étude a démontré la présence d'ARNm d'ASIC1b dans l'hypophyse. Cependant, chez les animaux KO ASIC1a, aucun courant ASIC ne fut observé (Du et al., 2014b). Il est donc admis à l'heure actuelle qu'ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b représentent la majeure partie des sous-unités ASIC au niveau du SNC.

Les canaux ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont exprimés dans l'ensemble de la moelle épinière, au niveau de la corne dorsale et ventrale (Figure 20). Plusieurs études ont caractérisé les courants ASIC des neurones de la moelle dorsale par patch-clamp sur tranches (Duan et al., 2007; Wu et al., 2004) ou sur neurones en culture (Baron et al., 2008; Mazzuca et al., 2007), démontrant la présence d'un mélange de courants de type ASIC1a homomérique et des hétéromères ASIC1a+ASIC2, un léger enrichissement d'ASIC1a au niveau des couches superficielles et une augmentation des niveaux d'expression d'ASIC1a et ASIC2a après inflammation (CFA). Cette distribution relativement étendue dans la moelle rend difficile l'interprétation des données *in vivo* sur l'implication des canaux ASIC. Les

avancées récentes obtenues par les études de scRNAseq confirment la présence d'ASIC1 et ASIC2 dans la plupart des populations des neurones de la moelle épinière (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018; Zeisel et al., 2018).

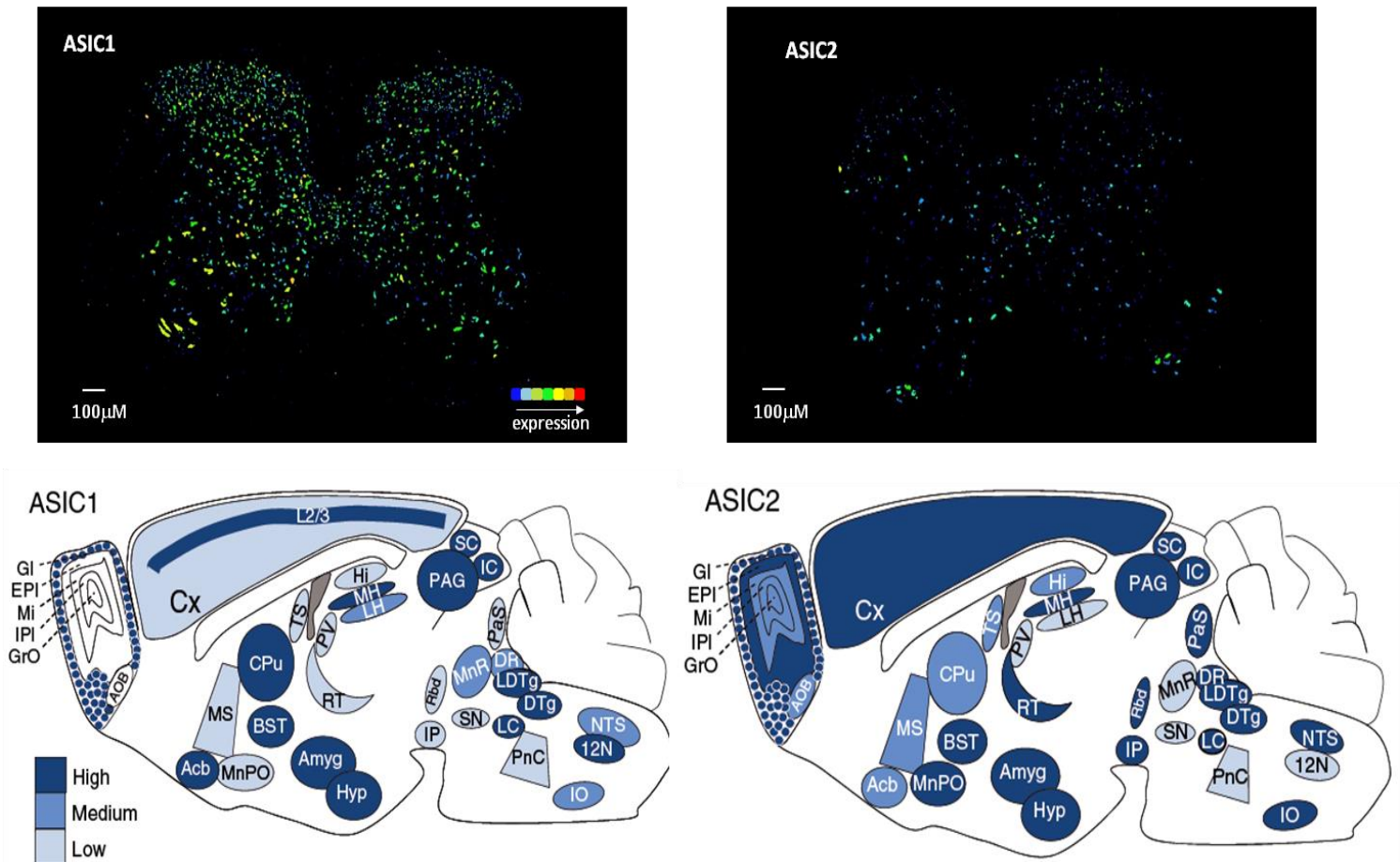


Figure 20 : Distribution d'ASIC1 et ASIC2 dans le SNC

Haut : Expression et distribution des ARNm d'ASIC1 (gauche) et d'ASIC2 (droite) dans la moelle épinière de souris (mâles, 8 semaines, segment lombaire) par hybridation in situ. Images extraites du Mouse Spinal Cord Atlas de l'Allen Brain Institute (Lein et al., 2007).

Bas : Expression et distribution d'ASIC1 (gauche) et ASIC2 (droite) dans différentes régions du cerveau de souris (coupe parasagittale, expériences d'immunohistochimie sur cerveau de souris mâles âgées de 8 à 16 semaines). 12N, hypoglossal nucleus; Acb, accumbens nucleus; Amyg, Amygdala, AOB, accessory olfactory Bulb; BST, bed nucleus of the stria terminalis; CPu, caudate–putamen; Cx, cortex; DR, dorsal raphe nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus, pericentral part; EPI, external plexiform layer; Gl, glomerular layer; GrO, granule layer; Hi, hippocampus; Hyp, hypothalamus; IC, inferior colliculus; IO, inferior olive; IP, interpeduncular nucleus; IPI, internal plexiform layer; L2/3Cx, layer 2/3 in cortex; LC, locus coeruleus; LDTg, lateral dorsal tegmental nucleus; LH, lateral habenula; MH, medial habenula; Mi, mitral layer; MnPO, median preoptic nucleus; MnR, median raphe nucleus; MS, Medial septal nucleus; NTS, nucleus of the solitary tract; PAG, periaqueductal gray; PaS, parasubiculum nucleus; PnC: Pontine reticular nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; Rbd:

Rhabdoid nucleus; RT, reticular thalamic nucleus; SN, substantia nigra; SC, superior colliculus; TS, Triangular segment. D'après Price et al., 2014.

Malgré ces avancées, aucun profil d'expression spécifique au sein de sous-populations ne semble se dessiner pour ASIC1a, hormis une expression légèrement plus importante dans une sous-population d'interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (Petitjean et al., 2015). En revanche, il semblerait qu'ASIC2 soit clairement enrichi dans une population d'interneurones glutamatergiques importante pour la transmission de la douleur mécanique et caractérisée par l'expression de la somatostatine (Sst) (Chamessian et al., 2018; Duan et al., 2014; Häring et al., 2018). La distinction ASIC2a/ASIC2b reste à établir.

L'expression des sous-unités ASIC au sein du cerveau est importante (Figure 20). Plusieurs régions impliquées dans le traitement de l'information douloureuse expriment fortement ASIC1 et/ou ASIC2, comme la PAG, l'ACC ou l'amygdale. Cette dernière est particulièrement d'intérêt : elle est cruciale pour la composante émotionnelle de la douleur (Corder et al., 2019). Les niveaux d'expression des ASIC sont très importants au sein des différentes régions qui la composent (amygdale basolatérale notamment) et ils interviennent dans la transmission et la plasticité synaptique à ce niveau (Chiang et al., 2015; Coryell et al., 2009; Du et al., 2014a; Ziemann et al., 2009). Le blocage des ASIC dans ce noyau est bénéfique pour certaines comorbidités associées à la douleur (Aissouni et al., 2017).

VII. Implication des canaux ASIC dans la douleur

1. Chez l'homme

L'implication des ASIC chez l'homme a été principalement évaluée chez des volontaires sains dans quelques études cliniques: l'injection d'une solution acide au niveau cutané produit une douleur proportionnelle à l'acidité de celle-ci (Jones et al., 2004; Ugawa et al., 2002), elle peut être potentialisée par des médiateurs inflammatoires comme le NO, les prostaglandines ou la bradykinine (Cadiou et al., 2007; Steen et al., 1996a), elle induit une sensibilisation aux stimuli mécaniques et thermiques selon le type de fibre stimulé (Frey Law et al., 2008; Namer et al., 2015; Steen and Reeh, 1993b) et elle peut être atténuée par des agents pharmacologiques comme l'amiloride, les AINS (antagonistes non-sélectifs des ASIC) et la capsazepine pour des pH très acides (antagoniste TRPV1) (Jones et al., 2004; Steen et al., 1995, 1996b; Ugawa et al., 2002).

Plusieurs études de patch-clamp sur des neurones sensoriels humains en culture ont également évalué le rôle des canaux ASIC. Deux études sur culture primaire ont démontré que la totalité des neurones enregistrés génèrent un courant transitoire de type ASIC (Baumann et al., 1996, 2004). Dans une autre réalisée sur des neurones sensoriels dérivés de cellules souches pluripotentes, les toxines PcTx1, APETx2 et mambalgine ont permis de bloquer les courants ASIC (efficacité : mambalgine>APETx2>PcTx1) (Young et al., 2014). Récemment, une étude combinant transcriptomique (RNAseq) et électrophysiologie sur des neurones sensoriels de patients neuropathiques a permis de démontrer un dimorphisme sexuel : ASIC1 et ASIC3 sont plus exprimés chez les patients douloureux masculins que féminins (North et al., 2019).

Ces différentes études indiquent que les canaux ASIC participent à la détection des stimuli acide chez l'homme et que les sous-unités ASIC1 et ASIC3 des neurones sensoriels sont principalement impliquées (Flegel et al., 2015; LaPaglia et al., 2017; Manteniotes et al., 2013; Ray et al., 2018). Malgré sa facilité d'accès et d'utilisation, il existe très peu d'étude sur l'utilisation de l'amiloride dans des situations cliniques douloureuses. Néanmoins, l'amiloride a été utilisé dans une petite étude clinique ouverte chez des patients migraineux avec aura et réfractaires à certains traitements : quatre patients sur sept ont vu leurs symptômes diminués (maux de têtes et aura) (Holland et al., 2012). La récente caractérisation de la LPC comme activateur endogène d'ASIC3 et ses quantités importantes dosées dans des exsudats inflammatoires articulaires de patients douloureux supporte un rôle des ASIC dans la douleur articulaire chez l'homme (Marra et al., 2016). Le possible rôle des ASIC centraux dans la douleur chez l'homme n'a pas encore été exploré.

2. Chez l'animal

a. Au niveau périphérique

Dès les premières études de caractérisation sur des neurones sensoriels par Oleg Krishtal, un rôle dans la nociception et la mécanosensation a été proposé pour les canaux ASIC. Les premières expériences évaluant leur possible implication des ASIC dans la douleur utilisèrent des souris invalidées génétiquement pour les différentes sous-unités ASIC. Ces expériences se sont avérées quelque peu décevantes, les phénotypes observés étant parfois difficilement interprétables, surtout au niveau cutané. Les différents agents pharmacologiques ciblant les ASIC se sont donc avérés capitaux pour tester l'implication des canaux ASIC dans la douleur. La combinaison de ces outils pharmacologiques et génétiques a ainsi pu apporter les preuves les plus robustes sur le rôle de ces canaux dans la douleur.

i. ASIC1a

Du fait de son expression concentrée dans les nocicepteurs peptidergiques, de sa présence fonctionnelle dans des neurones innervant de nombreux tissus (Table 11 : peau, muscles, viscères etc.) (Deval et al., 2008, 2011; Matricon et al., 2013; Sugiura et al., 2005) et de certaines propriétés biophysiques (légère perméabilité calcique, forte sensibilité au pH), ASIC1a apparaît comme un candidat idéal. Les souris KO ASIC1a ont des seuils de douleur cutanée mécanique et thermique similaires aux souris sauvages et les expériences de nerf-peau n'ont pas révélé d'altérations dans les fibres sensorielles. En revanche, cette ablation augmente la sensibilité mécanique des fibres viscérales (colon, estomac-œsophage) (Page et al., 2004, 2005). Le blocage pharmacologique *via* PcTx1 d'ASIC1a n'a pas démontré d'efficacité dans des modèles de douleurs au niveau cutané (inflammatoire : CFA/carragénine, post-opératoire et formaline) et ce malgré une augmentation d'expression dans les neurones sensoriels, notamment *de novo* dans une population de neurones à gros diamètre (Deval et al., 2011; Diochot et al., 2012; Duan et al., 2007; Mazzuca et al., 2007; Voilley et al., 2001). En revanche, les souris KO ASIC1a ne développent pas d'hypersensibilité dite primaire dans les tissus musculaires (cuisse) ou articulaires (genou) suite à une inflammation. Mais elles développent quand même une hypersensibilité dite secondaire, touchant un territoire non-lésé et observée dans ce cas au niveau de la surface plantaire (Ikeuchi et al., 2008; Walder et al., 2010). Dans un modèle mimant une fatigue musculaire, l'injection de PcTx1 empêche le développement d'une hyperalgésie mécanique, un effet non reproduit chez les souris KO ASIC1a (Gregory et al., 2018). Au niveau viscéral, dans un modèle d'hypersensibilité colique chez le rat, des augmentations significatives d'expression d'ASIC1a et ASIC1b furent observées au niveau des DRG des segments sacrés et thoraciques (Matricon et al., 2013). Les souris KO ASIC1a ne présentent pas d'hyperactivité pulmonaire en réponse à une inflammation de ce tissu dans un modèle d'asthme (Reznikov et al., 2016). Le rôle physiopathologique de la sous-unité ASIC1a pourrait ainsi être différent entre tissus cutanés et profonds.

Deux études ont récemment démontré une possible implication des canaux ASIC1a au niveau cutané. L'injection intraplantaire de la MitTx, ciblant préférentiellement ASIC1a et ASIC1b, induit un comportement douloureux qui est absent chez les souris KO ASIC1a ou chez celles ayant reçu une injection intrathécale de capsaïcine (ablation des fibres C exprimant TRPV1) (Figure 21). Néanmoins, l'activation non-physiologique des ASIC produite par cette toxine (ouverture constitutive du canal) peut limiter l'interprétation de ces résultats (Bohlen et al., 2011). Au niveau orofacial, le blocage avec PcTx1 réduit le comportement douloureux suite à une injection sous-cutanée de formaline (Fu et al., 2016). Cette différence pourrait être due à une expression plus forte d'ASIC1a au niveau des TG que des DRG (Lopes et al., 2017a). L'ensemble de ces résultats montrent qu'ASIC1a

joue un rôle important dans différents modèles de douleur, en particulier au niveau des tissus profonds. Au niveau cutané, bien qu'étant présent, ASIC1a semble avoir un rôle plus secondaire (hormis au niveau orofacial).

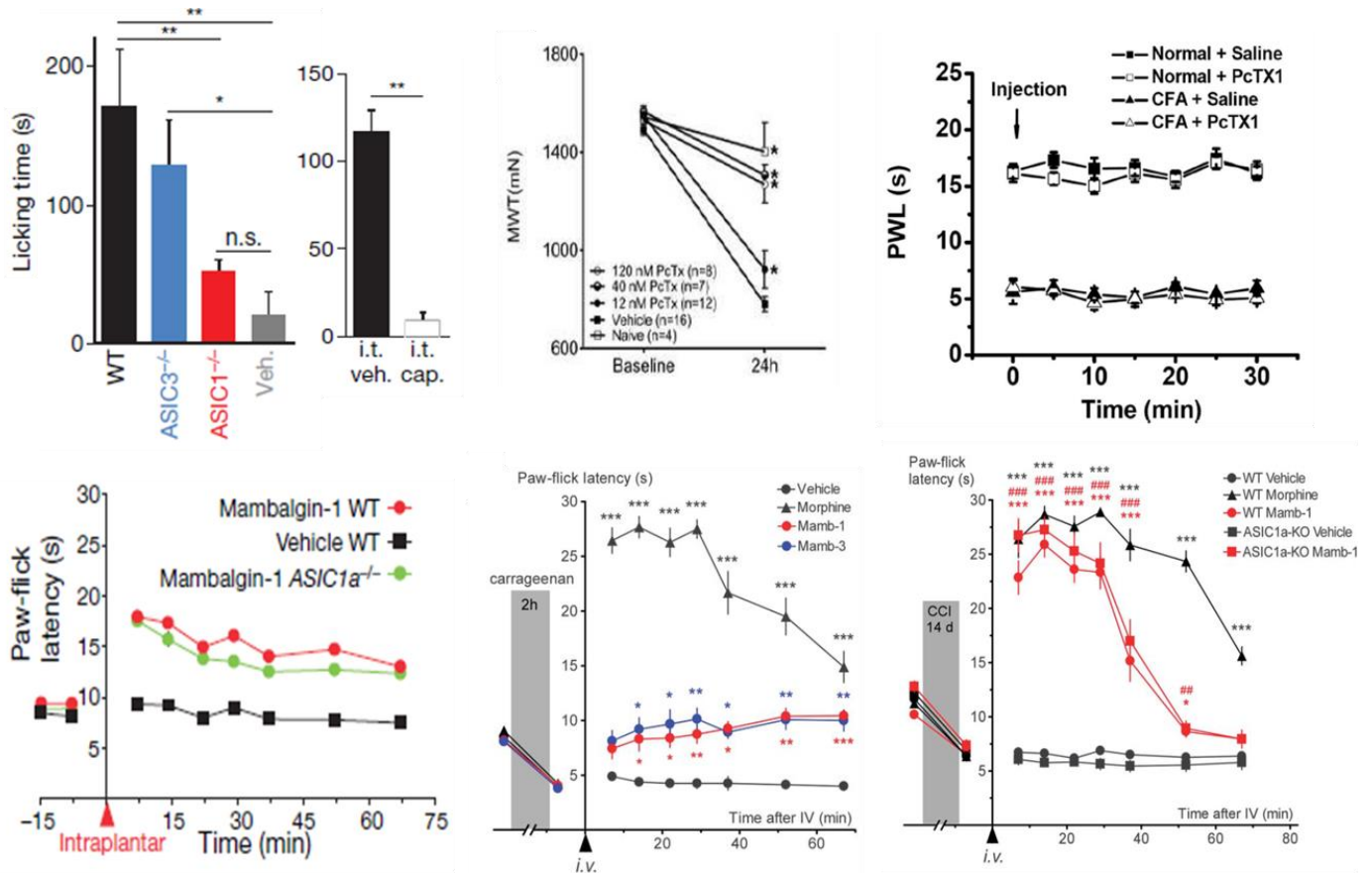


Figure 21 : Implications d'ASIC1a et ASIC1b dans la douleur *in vivo*

Haut, gauche : Effets d'une injection intraplantaire de MitTx ($5\mu\text{M}$) ou de solution véhicule (veh.) chez des souris sauvages (Wild Type, WT), KO ASIC3 ou KO ASIC1a sur le comportement douloureux spontané (léchage de la patte). L'injection intrathécale de capsaïcine chez des souris sauvages abolit l'effet pronociceptif de la MitTx (droite). D'après Bohlen et al., 2011.

Haut, milieu : Effets du blocage d'ASIC1a par des doses croissantes de PcTx1 sur le seuil mécanique de retrait de la cuisse chez la souris avant et 24h après un effort musculaire intense. D'après Gregory et al., 2018.

Haut, droite : Effets d'une injection intraplantaire de PcTx1 sur le seuil thermique (test Hargreaves) chez des rats ayant reçu une injection de CFA (inflammation) ou de véhicule. D'après Duan et al., 2007.

Bas, gauche : Effets d'une injection intraplantaire de mambalgine-1 ($34\mu\text{M}$) ou de véhicule sur la latence de retrait de la patte en réponse à une stimulation thermique (test Paw-Flick, 46°C) chez des souris sauvages (WT) ou KO ASIC1a. D'après Diochot et al., 2012.

Bas, milieu : Effets d'une injection intraveineuse de mambalgine-1 ou-3 ($1,7\mu\text{M}$), de véhicule ou de morphine ($1,5\text{mM}$) sur la sensibilité thermique de la patte (Paw-Flick) de souris ayant reçu une injection intraplantaire de carragénine (inflammation).

Bas, droite : Effets d'une injection intraveineuse de mambalgine-1 (1,7 μ M), de véhicule ou de morphine (1,5mM) sur la sensibilité thermique (Paw-Flick) de souris sauvages ou KO ASIC1a ayant subi une ligature du nerf sciatique (modèle CCI, neuropathie). D'après Diochot et al., 2016.

ii. ASIC1b

La mise en évidence d'un rôle d'ASIC1b dans la douleur ne vint que tardivement. Plusieurs éléments expliquent ce constat : l'absence d'outils pharmacologiques et génétiques spécifiques (Lin et al., 2015), plusieurs études suggérant une absence de ce canal au niveau génomique, protéique ou fonctionnelle, notamment dans les souris KO ASIC1a et triple KO ASIC1a/ASIC2/ASIC3 (Gautam and Benson, 2013; Kang et al., 2012; Page et al., 2004), l'absence de caractéristiques électrophysiologiques singulières et surtout l'absence de phénotype particulier observé dans une étude chez des souris double KO ASIC1a et ASIC1b (Staniland and McMahon, 2009). Dans ces souris KO ASIC1 (qui ne sont malheureusement plus disponibles), aucune modification des seuils de douleur thermiques et mécaniques n'a été observée et les réponses des animaux dans des modèles d'inflammation (CFA, formaline) étaient identiques aux souris sauvages.

L'identification des mambalgines, capables de bloquer ASIC1a mais aussi ASIC1b, a permis d'apporter les premiers éléments montrant une expression dans les neurones sensoriels et une implication d'ASIC1b dans la douleur (Diochot et al., 2012). En combinaison avec PcTx1 (bloquant seulement ASIC1a), il a été démontré dans des cultures de neurones sensoriels de rat l'existence de courants ASIC sensibles à la mambalgine mais résistant à PcTx1. Du fait des différences de profil pharmacologique entre les deux toxines, un tel courant a été imputé à des canaux contenant ASIC1b, démontrant pour la première fois l'expression fonctionnelle de canaux ASIC1b dans les neurones sensoriels. Un courant ASIC natif et formellement imputable à ASIC1b fut par la suite enregistré par le groupe taiwanais de Chih-Cheng Chen dans des neurones sensoriels exprimant la parvalbumine et provenant de souris KO ASIC3 (Lin et al., 2016). L'injection intraplantaire ou intraveineuse de la mambalgine s'est révélée efficace contre la douleur chez des animaux naïfs et dans différents modèles de douleur (Figure 21) :

-Elle augmente la latence de retrait de la patte injectée en réponse à une stimulation thermique chaude douloureuse chez des animaux naïfs suite à une injection locale ou systémique *iv*. Cet effet est retrouvé lors d'injection chez des souris KO ASIC1a. En complément, l'inactivation génétique transitoire d'ASIC1b par des siRNA (Small Interfering RNA) mime les effets de la mambalgine-1 dans cette condition. (Diochot et al., 2012, 2016).

-La mambalgine-1 reverse l'hypersensibilité thermique et mécanique inflammatoire (modèle carragénine) après injection locale dans la patte ou systémique par voie *iv*. L'inactivation génétique transitoire d'ASIC1b empêche le développement de cette hypersensibilité inflammatoire. Les effets de la mambalgine-1 sont conservés dans les souris KO ASIC1a, avec cependant une légère diminution de son efficacité lorsqu'elle est injectée par voie *iv* chez ces animaux. Aucune différence n'est observée chez les souris KO ASIC2.

-Elle agit de façon transitoire sur l'hypersensibilité thermique et mécanique dans un modèle de douleur neuropathique (modèle CCI) après injection *iv* ou intraplantaire (effets plus durables par cette voie). Ces effets sont conservés chez les souris KO ASIC1a. De façon étonnante, les effets de la mambalgine-1 dans ce modèle induisent une augmentation considérable des seuils de retrait (proche des valeurs maximales du test de sensibilité), contrairement aux autres conditions évoquées précédemment (Figure 21). Cette observation peut paraître d'autant plus surprenante compte tenu du fait que plusieurs études chez le rongeur dans des modèles de neuropathie traumatique (ligature du nerf sciatique) ont démontré une diminution d'expression des ARNm des sous-unités ASIC (Berta et al., 2017; Cobos et al., 2018; Vicuña et al., 2015), corrélée à une diminution fonctionnelle évaluée par patch-clamp (Poirot et al., 2006). De tels changements ne sont pas retrouvés dans tous les modèles de douleur neuropathique cependant (exemple : diabète de type 1, chimiothérapie par paclitaxel) (Megat et al., 2018; Radu et al., 2014).

En dehors de ces études avec la mambalgine, il existe peu d'évidences additionnelles supportant une implication d'ASIC1b dans la douleur, les souris KO pour ASIC1b développées très récemment n'étant pas encore disponibles. Il convient néanmoins de mentionner des études démontrant une augmentation d'expression d'ASIC1b dans des modèles de douleur cancéreuse osseuse (Nagae et al., 2007) et, comme évoqué précédemment, viscérale (Matricon et al., 2013).

iii. ASIC2a et ASIC2b

Les premières études concernant ASIC2 furent influencées par son homologie avec les dégénérines de nématode (canaux ioniques MEC) formant des canaux mécanosensibles et un rôle dans la mécanosensation fut exploré : les souris KO ASIC2a et ASIC2b auraient des fibres cutanées RA-LTMR nettement moins sensibles que les souris sauvages (Price et al., 2000). Ce résultat ne fut cependant pas reproduit par une autre étude utilisant des souris KO ASIC2 différentes (Roza et al., 2004). Les afférences viscérales n'exprimant pas ASIC2 sont différemment affectées, certaines devenant moins sensibles ou alors plus sensibles (Page et al., 2005, 2007). Ces souris ASIC2 KO n'ont pas de déficit particuliers au niveau de leur sensibilité mécanique et thermique (Staniland and McMahon, 2009).

Du fait de certaines de leurs propriétés, à savoir une distribution vaste, une faible sensibilité aux protons sous forme homomérique, mais la capacité à conférer de nouvelles régulations (protéines partenaires et voies de signalisation par exemple) et à moduler les propriétés biophysiques (inactivation, courant soutenu) par le biais d'association en hétéromères avec d'autres sous-unités, ASIC2a et ASIC2b sont donc vues principalement comme des sous-unités régulatrices. En effet, les souris KO ASIC2 ont la même proportion de neurones sensoriels ayant un courant de type ASIC que les souris sauvages, et ce malgré un pattern d'expression légèrement différent comparé aux autres sous-unités (exemple : expression d'ASIC2 dans les neurones non-peptidergiques) (Benson et al., 2002; Deval et al., 2004; Drew et al., 2004; Gautam and Benson, 2013; Hattori et al., 2009; Sutherland et al., 2001). La gamme de pH d'activation (pH5,0-4,0) des canaux homomériques ASIC2a ou hétéromériques ASIC2a+ASIC2b est également compatible avec un rôle pathophysiologique de ces canaux, sauf situation très particulière (implication supposée au niveau gastrique ou osseux).

iv. ASIC3

Les canaux ASIC3 ont été étudiés extensivement. Leur rôle dans la douleur est bien établi et une littérature conséquente appuie une implication importante de cette sous-unité dans de nombreux modèles de douleur. ASIC3 est largement exprimé dans les neurones sensoriels (Table 11) et plusieurs de ses propriétés biophysiques et structurales uniques (sensibilité au pH, courant soutenu, capacité à détecter de multiples médiateurs de la douleur) en font un candidat idéal pour la détection de stimuli douloureux (Deval and Lingueglia, 2015). Cette capacité à détecter de nombreux stimuli est conservée en particulier pour les hétéromères ASIC3+ASIC1 (5HT, polyamines, lipides etc.), canaux constituant probablement une partie importante des courants ASIC des neurones sensoriels. L'injection de ces médiateurs chez l'animal peut induire une douleur spontanée qui est réduite chez des souris KO ASIC3 (Birdsong et al., 2010; Deval et al., 2008; Li et al., 2010; Marra et al., 2016; Wang et al., 2013; Yu et al., 2010).

La première démonstration d'un rôle d'ASIC3 dans la douleur fut apportée par plusieurs études portant sur l'ischémie cardiaque. Il est maintenant bien établi que des canaux ASIC3 et ASIC3+ASIC2 génèrent le courant ASIC des neurones sensoriels innervant le cœur : ces mêmes neurones chez des souris double KO ASIC3/ASIC2 ne répondent plus au pH acide (Benson et al., 1999; Hattori et al., 2009; Immke and McCleskey, 2001; Sutherland et al., 2001; Yagi et al., 2006). Comme pour les autres KO ASIC évoqués précédemment, les données obtenues chez les souris KO ASIC3 prêtes cependant à confusion : diminution de la sensibilité des fibres A-HTMR et C-MH mais augmentation de la sensibilité des RA LTMR (Moshourab et al., 2013; Price et al., 2001). De plus, ces

souris KO ASIC3 ont des seuils de douleur thermiques et mécaniques plus faibles pour des stimulations de forte intensité. Elles ne présentent pas d'altération dans le développement d'une hypersensibilité inflammatoire cutanée quelques heures après injection mais une réduction de celle-ci est observée quelques jours après l'initiation de celle-ci (Chen et al., 2002; Price et al., 2001; Staniland and McMahon, 2009; Yen et al., 2009). Grâce à l'utilisation de la toxine APETx2 et de siRNA dirigés contre ASIC3, il a été possible de démontrer l'implication de ce canal dans douleur acide et inflammatoire cutanée (Deval et al., 2008; Karczewski et al., 2010; Lee et al., 2017; Martínez-Rojas et al., 2014; Osmakov et al., 2013).

Le rôle des canaux ASIC3 fut également évalué dans un modèle de douleur migraineuse. Les neurones sensoriels des méninges, comme évoqué en seconde partie, sont extrêmement sensibles au pH (Nakamura and Jang, 2018; Yan et al., 2011). L'application de médiateurs inflammatoires en solution acide sur des méninges chez le rat induit une allodynie mécanique faciale et extra-faciale qui peut être supprimée par APETx2 (Yan et al., 2013). Les canaux contenant ASIC3 et sensibles à APETx2 pourraient aussi être impliqués dans la sécrétion de CGRP via un mécanisme sodium-dépendant (Durham and Masterson, 2013). ASIC3 est également largement exprimé au niveau viscéral où il participerait à la détection des distensions et à la sensibilisation des fibres gastriques, colorectales et de la vessie (Jones et al., 2005; Montalbetti et al., 2018; Page et al., 2005, 2007; Wultsch et al., 2008). En revanche, son implication possible dans la douleur neuropathique reste peu détaillée : les souris KO ASIC3 n'ont pas de déficits particuliers comparés aux sauvages (García et al., 2019). En revanche, il existe quelques études suggérant un rôle de ce canal dans les neuropathies diabétiques (García et al., 2019; Radu et al., 2014; Rahman et al., 2016).

L'implication la plus évidente d'ASIC3 est dans différents modèles de douleur musculaire et articulaire (Sluka and Gregory, 2015). Une double injection intramusculaire d'une solution acide peut induire une hypersensibilité de la patte injectée et une sensibilisation diffuse sur la patte contralatérale (Sluka et al., 2001). Ce phénomène est absent chez les souris KO ASIC3, notamment à cause de l'absence d'expansion des champs récepteurs des neurones WDR de la moelle épinière (Sluka et al., 2003). De même, contrairement aux souris KO ASIC1a, les souris KO ASIC3 développent l'hyperlagésie primaire mais ne développent pas d'hyperalgésie secondaire après une inflammation musculaire ou articulaire (Hsieh et al., 2017; Ikeuchi et al., 2008; Sluka et al., 2007, 2013; Walder et al., 2010). Par ailleurs, le blocage des canaux contenant ASIC3 s'avère efficace dans des modèles de douleur postopératoire (Deval et al., 2011; Dubé et al., 2005), d'ischémie musculaire (Farrag et al., 2017; Queme et al., 2016, 2019; Ross et al., 2014, 2016; Seo et al., 2010), de fibromyalgie (Taguchi et al., 2015) ou de douleurs osseuses (Hanaka et al., 2018; Hiasa et al., 2017; Kanaya et al., 2015).

b. Au niveau central

Un rôle des canaux ASIC centraux dans la douleur a été proposé après une première étude caractérisant les courants ASIC dans la moelle dorsale. Suite à une inflammation de la patte (modèle CFA), une augmentation des niveaux d'expression d'ASIC1a et ASIC2a fut observée (Wu et al., 2004). L'utilisation de la toxine PcTx1 ainsi que des approches de *Knock down* dirigées contre ASIC1a ont permis d'apporter les premières preuves de son implication *in vivo* dans le SNC : l'injection *it* ou *icv* de PcTx1 chez la souris induit des effets analgésiques sur la douleur nociceptive thermique et mécanique, elle supprime l'hypersensibilité inflammatoire (formaline) et neuropathique (modèle CCI et chimiothérapie par vincristine) (Mazzuca et al., 2007). Une injection locale de PcTx1 ou le knock-down par shRNA dans l'ACC réduit l'hypersensibilité inflammatoire et neuropathique, sans effet cependant sur la composante émotionnelle/affective de la douleur (Li et al., 2019a). Chez le rat, un effet relativement comparable fut observé dans le modèle CFA après injection de siRNA contre ASIC1a et de PcTx1 (mais avec le venin entier de *Psalmopeus Cambridgei*) (Duan et al., 2007), ainsi que dans un modèle de monoarthrite après une injection ciblée de PcTx1 dans l'amygdale (Aissouni et al., 2017). De façon intéressante, cette analgésie est dépendante du système opiacé endogène : les effets centraux de PcTx1 sont bloqués par la naloxone (antagoniste non spécifique des récepteurs aux opioïdes) ou des antagonistes des récepteurs opioïdes (OPR) mu et delta mais pas kappa, ils sont perdus dans des souris KO pour le gène codant le précurseur des enképhalines (préproenképhaline, Penk) mais pas dans les souris KO pour les précurseurs des autres opiacés endogènes (dynorphine, endorphine et tachikinine) et enfin, l'injection de PcTx1 ou le Knock down d'ASIC1a augmente la concentration de met-enképhaline dans le CSF (Mazzuca et al., 2007). Le mécanisme permettant le recrutement du système opiacé endogène par le blocage des canaux ASIC1a reste inconnu à ce jour.

L'utilisation de la mambalgine-1 a confirmé l'implication des ASIC centraux dans la douleur. Bloquant l'intégralité des canaux exprimés à ce niveau, l'injection centrale *it* ou *icv* de la mambalgine-1 produit des effets analgésiques dans différentes conditions : douleur aiguë, inflammatoire (carragénine dans la peau et CFA dans l'articulation) et neuropathique (CCI) (Aissouni et al., 2017; Diochot et al., 2012, 2016). De façon quelque peu surprenante, les effets *in vivo* de la mambalgine-1 et de PcTx1 diffèrent concernant la participation des opiacés. Pour la douleur aiguë et inflammatoire, l'effet analgésique consécutif à une injection de mambalgine-1 dans le SNC est largement résistant à la naloxone et conservé dans les souris KO Penk, mais il est partiellement dépendant aux opiacés dans la douleur neuropathique, soulignant une implication différente des ASIC centraux selon la situation physiopathologique (Diochot et al., 2016). Ces différences apparentes d'effets ont conduit à envisager une contribution respective d'ASIC2a et ASIC2b. Les hétéromères ASIC1a+ASIC2 sont bloqués de façon robuste par la mambalgine-1 alors que les hétéromères ASIC1a+ASIC2a ne sont pas

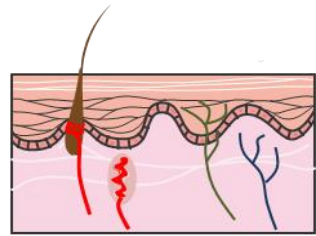
sensibles à PcTx1 dans les mêmes conditions, impliquant des mécanismes d'action différents pour les deux toxines (Joeres et al., 2016; Liu et al., 2018b). L'utilisation de siRNA dirigés contre ASIC2a+ASIC2b produit une analgésie partiellement naloxone-dépendante alors que l'inactivation de seulement ASIC2a induit une analgésie naloxone-résistante. ASIC1a et ASIC2b seraient donc impliqués dans l'analgésie opioïde dépendante, à l'inverse d'ASIC2a. Ces expériences réconcilient les effets observés avec les deux toxines : PcTx1, bloquant principalement ASIC1a et ASIC1a+ASIC2b, a un effet purement opiacé-dépendant tandis que la mambalgine, bloquant ASIC1a+ASIC2a en plus, peut avoir un effet analgésique opioïde-indépendant.

L'implication des canaux ASIC centraux a également été étudiée dans un modèle de CSD : amiloride et PcTx1 diminuent sensiblement la genèse de ce phénomène, mais les souris KO ASIC1a ne présente pas de déficit particulier à ce niveau (Holland et al., 2012). L'injection *it* de PcTx1 diminue également l'hypersensibilité viscérale (Matricon et al., 2011).

c. Cas de l'amiloride

Il existe également une littérature importante sur l'utilisation de l'amiloride dans de nombreux modèles de douleur précliniques : douleur aigue (Ouyang et al., 2012), inflammatoire (formaline, CFA) (Ferreira et al., 1999; Ouyang et al., 2015; Wan et al., 2019), viscérale (Page et al., 2007) ou neuropathique (Jeong et al., 2013; Muthuraman et al., 2008). L'amiloride s'avère efficace après injection systémique et locale (périphérique ou centrale (*it*, *icv*)). La capacité de cette molécule à traverser la BBB et agir dans le SNC après injection systémique reste incertaine. Les arguments penchent néanmoins en faveur d'un passage d'une petite fraction (Ali et al., 2004, 2005, 2007; Arias et al., 2008; Durham-Lee et al., 2011; Friese et al., 2007; Vergo et al., 2011). Compte tenu de ses nombreux effets sur des cibles autres que les canaux ASIC, il convient d'interpréter avec précaution ces données *in vivo* sur l'amiloride, mais son utilisation en conjonction avec d'autres bloqueurs des canaux ASIC comme les toxines décrites précédemment peut s'avérer très intéressante.

L'ensemble de ces résultats sur l'implication des ASIC dans la douleur est résumé dans la Figure 22.



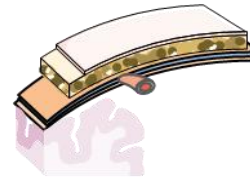
Peau
ASIC3
ASIC1b
ASIC1a
 ASIC2



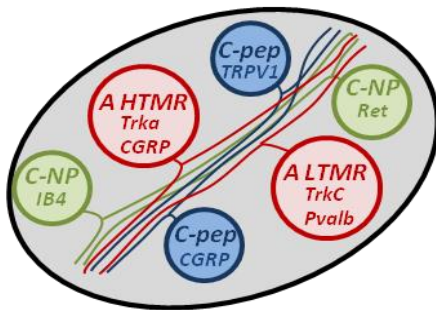
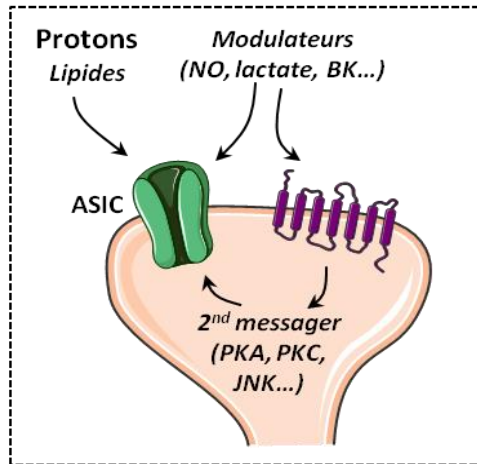
Muscles
Articulations
ASIC3
 ASIC1a
 ASIC2



Viscères
ASIC3
ASIC1a
 ASIC1b
 ASIC2



Méninges
ASIC3
 ASIC1a
 ASIC1b



ASIC1a
ASIC1b
ASIC2a-b
ASIC3

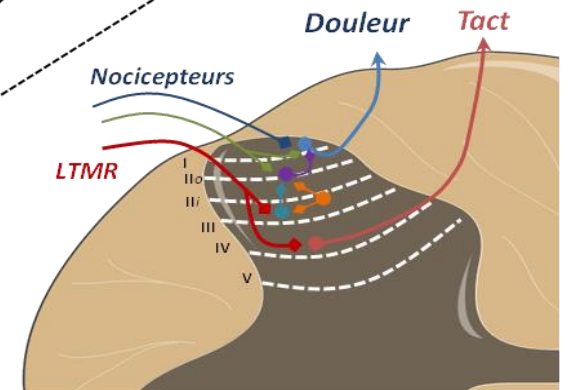
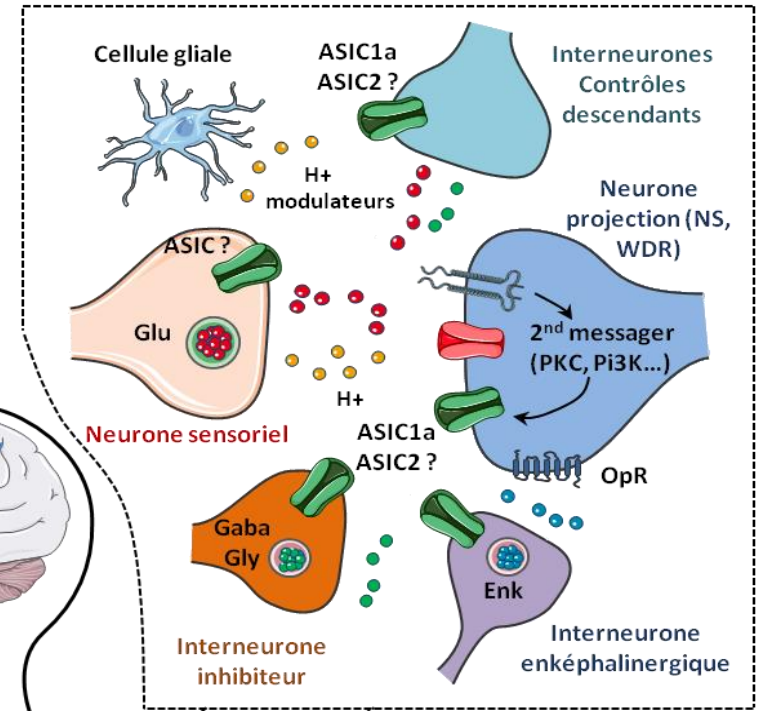
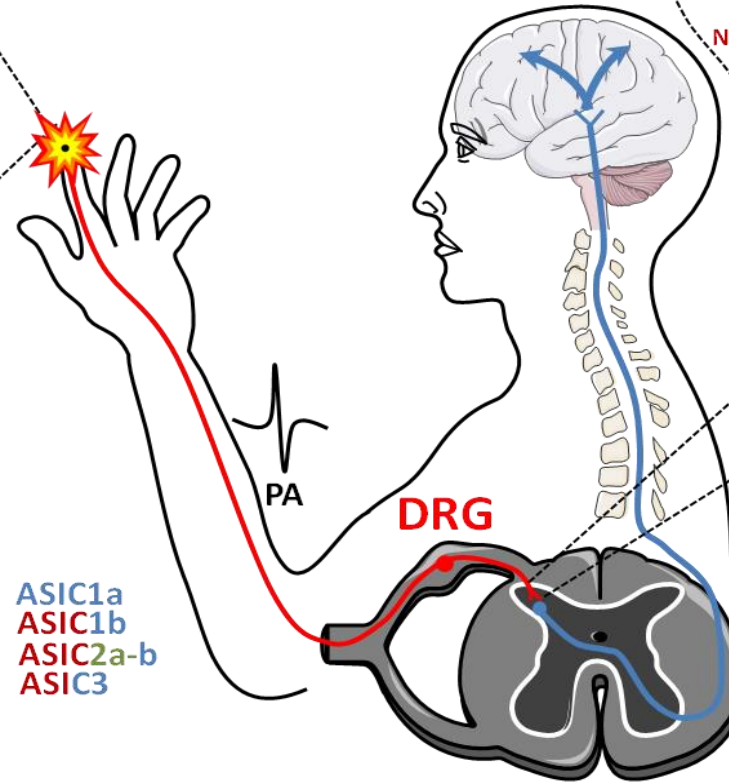


Figure 22: Implications des canaux ASIC dans les voies de la douleur

Les canaux ASIC sont exprimés dans de nombreuses sous-populations de neurones sensoriels : principalement des fibres C peptidergiques (bleue), des fibres A myélinisées (LTMR et HTMR, rouge) et dans une moindre mesure et uniquement pour ASIC2a/ASIC2b, des fibres non-peptidergiques (vert). Ces neurones vont innover de nombreux tissus : peau, muscles et articulations, viscères, méninges et les ASIC ont été impliqués dans différents modèles de douleur ciblant ces territoires. Plusieurs facteurs (lipides, voies de signalisation comme JNK ou PKC etc.) recrutés en condition pathologique peuvent agir de différentes façons pour potentialiser l'activité des ASIC périphériques. Les ASIC centraux vont également participer à la transmission et/ou la modulation du message nerveux au niveau spinal et supraspinal (non représenté), via potentiellement différents mécanismes : transmission synaptique, modulation complexe d'interneurones etc. C-pep : C peptidergique. C-NP : C non-peptidergique. Glu : glutamate. Gly : glycine. Enk : enképhaline. OpR : Opioïde Receptor. BK : Bradykinine.

Objectifs de la thèse

Les canaux ASIC contribuent donc aux mécanismes de la douleur. Les membres de cette famille de canaux ioniques sont impliqués à différents niveaux dans la génération, la modulation, la transmission, et probablement l'intégration du message douloureux. La compréhension du fonctionnement de ces canaux dans ce contexte fut largement dépendante de la découverte de toxines ciblant spécifiquement les différentes isoformes de ces canaux. Ces travaux ont ainsi permis de proposer d'une part les canaux ASIC3 périphériques comme acteurs majeurs dans la perception sensorielle douloureuse et d'autre part les canaux ASIC1a centraux comme participant à la transmission et à la modulation du message nociceptif. Bien que spécifiquement exprimée dans les neurones sensoriels, le rôle de l'isoforme ASIC1b est resté longtemps peu clair. L'identification au sein du laboratoire du premier agent pharmacologique capable d'agir spécifiquement sur ASIC1b, la mambalgine, a permis de révéler le rôle de ce dernier dans différents modèles de douleur. *In vivo*, ASIC1b a ainsi été impliqué dans la douleur thermique aiguë, dans la douleur inflammatoire et neuropathique.

Dans la première partie de cette thèse, je me suis intéressé à l'implication des canaux ASIC1b dans d'autres pathologies douloureuses et en particulier dans la migraine. L'implication des canaux ASIC1b, et plus largement des canaux ASIC1, dans un modèle de migraine fut explorée en utilisant une approche pharmacologique avec la mambalgine et comportementale en évaluant l'allodynie mécanique cutanée chez le rongeur.

Malgré le rôle émergent des canaux ASIC1b dans la douleur, il existe encore relativement peu de données concernant leurs régulations au niveau moléculaire en lien avec les processus douloureux. Dans la seconde partie de cette thèse, j'ai étudié les propriétés et la régulation d'ASIC1b par plusieurs médiateurs et voies de signalisation liées à la physiopathologie de la douleur, de même que la contribution d'ASIC1b dans les courants ASIC des neurones sensoriels via principalement des approches d'électrophysiologie (patch-clamp).

Enfin, dans la troisième partie, j'ai regroupé des résultats préliminaires visant à comprendre l'un des aspects les plus surprenants concernant ASIC1b, qui est son apparente participation dans la perception sensorielle thermique de base. En effet, le blocage pharmacologique *via* la mambalgine ou l'inactivation génétique par des siRNAs induit une élévation significative des seuils de sensibilité thermique chez l'animal naïf.

Résultats

Partie I : Evaluation des effets analgésiques de la mambalgine dans un modèle d'allodynie cutanée migraineuse : implication des canaux ASIC1

I. Contexte de l'étude

Plusieurs éléments ont contribué à la genèse de cette étude. Des résultats préliminaires furent obtenus par le Dr Emilie Piquet (CHU de Nice) lors de son Master 2 recherche au sein du laboratoire, ainsi que par les Drs Anne Baron et Sylvie Diochot. Dans un modèle de migraine récemment développé par l'équipe de Radhouane Dallel (Neurodol, Université Clermont Auvergne), l'injection *icv* de mambalgine entraîne une abolition de l'allodynie mécanique cutanée (présenté dans les résultats complémentaires à la suite de l'article). Cette expérience fut motivée par plusieurs points : la caractérisation récente des effets *in vivo* de la mambalgine dans d'autres modèles de douleur posait la question d'une potentielle implication des canaux ASIC1 centraux dans la migraine. De plus, ce fut peu avant cette période que la caractérisation des courants ASIC des neurones sensoriels des méninges et les effets du pH *in vivo* sur cette région furent publiées par l'équipe de Gregory Dussor, impliquant pour la première fois les ASIC périphériques et en particulier ASIC3 dans la physiopathologie de la douleur migraineuse (Yan et al., 2011, 2013). L'équipe de Peter Goadsby suggéra de son côté une implication d'ASIC1a (probablement centraux) dans la dépression corticale envahissante (CSD) en combinant l'utilisation de la toxine PcTx1 et des souris KO pour ASIC1a, avec en plus la démonstration des effets de l'amiloride sur la réponse des neurones du sous-noyau caudal (TNC) et la promesse de son efficacité chez l'homme dans une étude clinique pilote ouverte sur un panel réduit de patients migraineux (Holland et al., 2012).

Nous avons utilisé dans cette étude intitulée « *Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine* » des approches de pharmacologie et des tests d'évaluation de la sensibilité mécanique pour explorer l'implication des canaux ASIC1 chez le rat et la souris dans un modèle de migraine consistant en une ou plusieurs injections d'un donneur de NO à longue durée d'action, l'ISDN (Risordan®). A l'exception de la figure supplémentaire 4 et des résultats complémentaires qui apparaissent à la suite de l'article (expériences avec injection *icv*), j'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées, conjointement avec le Dr Anne Baron. Cette étude fut également la première à tester les effets analgésiques de la mambalgine chez le rat. Après la démonstration que ces effets analgésiques dans la douleur inflammatoire sont conservés chez cette espèce, nous avons

pu montrer que la mambalgine-1 injectée par voie *iv* permet une amélioration significative de l'allodynie cutanée faciale et extra-faciale consécutive à une ou plusieurs injection(s) d'ISDN (modèle de migraine aiguë ou chronique). Ces effets sont comparables à ceux des traitements de références (sumatriptan et topiramate) ainsi qu'à ceux de l'amiloride. Des injections répétées de mambalgine-1 permettent de ralentir le développement de cette allodynie cutanée associée à la migraine chronique. Enfin, dans le même modèle transposé chez la souris, avec mesure de l'allodynie extrafaciale seulement, les effets anti-allodynique de la mambalgine-1 sont conservés chez les souris KO ASIC1a, suggérant à la fois la nature périphérique des effets observés (les effets centraux de la mambalgine sont perdus chez les souris KO ASIC1a) et une possible implication d'ASIC1b mais qui reste cependant à démontrer formellement.

Cette étude montre que les canaux ASIC1 périphériques (très probablement ASIC1b) pourraient aussi jouer un rôle important dans l'allodynie cutanée de type migraineuse, en plus des canaux ASIC3 préalablement étudiés. Elle confirme aussi le potentiel thérapeutique dans la migraine d'une inhibition de ces canaux.

II. Article: “Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine”

RESEARCH PAPER

Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine

Correspondence Eric Lingueglia and Anne Baron, Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France. E-mail: lingueglia@ipmc.cnrs.fr; anne.baron@ipmc.cnrs.fr

Received 7 March 2018; **Revised** 28 June 2018; **Accepted** 26 July 2018

Clément Verkest^{1,2,3}, Emilie Piquet^{3,4}, Sylvie Diochot^{1,2,3}, Mélodie Dauvois¹, Michel Lanteri-Minet^{3,4,5}, Eric Lingueglia^{1,2,3,*}  and Anne Baron^{1,2,3,*} 

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France, ²LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France, ³FHU InovPain, Université Côte d'Azur, Nice, France, ⁴CHU Nice, Hôpital Cimiez, Département d'évaluation et de traitement de la douleur, Nice, France, and ⁵Inserm/UdA, U1107, Neuro-Dol, Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

*E. L. and A. B. contributed equally to this work.

BACKGROUND AND PURPOSE

Acid-sensing ion channels (ASICs) are neuronal proton sensors emerging as potential therapeutic targets in pain of the orofacial region. Amiloride, a non-specific ASIC blocker, has been shown to exert beneficial effects in animal models of migraine and in patients. We explored the involvement of the ASIC1-subtype in cutaneous allodynia, a hallmark of migraine affecting cephalic and extra-cephalic regions in about 70% of migrainers.

EXPERIMENTAL APPROACH

We investigated the effects of systemic injections of amiloride and mambalgin-1, a specific inhibitor of ASIC1a- and ASIC1b-containing channels, on cephalic and extra-cephalic mechanical sensitivity in a rodent model of acute and chronic migraine induced by i.p. injections of isosorbide dinitrate.

KEY RESULTS

I.v. injections of these inhibitors reversed cephalic and extra-cephalic acute cutaneous mechanical allodynia in rats, a single injection inducing a delay in the subsequent establishment of chronic allodynia. Both mambalgin-1 and amiloride also reversed established chronic allodynia. The anti-allodynic effects of mambalgin-1 were not altered in ASIC1a-knockout mice, showing the ASIC1a subtype is not involved in these effects which were comparable to those of the anti-migraine drug sumatriptan and of the preventive drug topiramate on acute and chronic allodynia respectively. A single daily injection of mambalgin-1 also had a significant preventive effect on allodynia chronification.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

These pharmacological data support the involvement of peripheral ASIC1-containing channels in migraine cutaneous allodynia as well as in its chronification. They highlight the therapeutic potential of ASIC1 inhibitors as both an acute and prophylactic treatment for migraine.

Abbreviations

ASIC, acid-sensing ion channel; CSD, cortical spreading depression; i.pl., intraplantar; ISDN, isosorbide dinitrate; KO, knockout; Mamb-1, mambalgin-1; TG, trigeminal; TNC, trigeminal nucleus caudalis

Introduction

Migraine is a major contributor to public ill health (Vos *et al.*, 2016). Its pathogenetic mechanisms are still poorly understood (Goadsby *et al.*, 2017) and possibly include extracellular acidification. Cortical spreading depression (CSD), considered to be the neurophysiological correlate of migraine aura, could activate and sensitize trigeminal (TG) meningeal nociceptors (Karatas *et al.*, 2013) through local release of extracellular compounds (K^+ , **ATP**, **NO**), and dural sterile inflammation and ischaemia associated with extracellular acidification also involving mast cell degranulation (Rozniecki *et al.*, 1999; Levy, 2009). Subsequent sensitization of central pathways would cause the cephalic and extra-cephalic cutaneous allodynia (Edelmayer *et al.*, 2009; Burstein *et al.*, 2010; Boyer *et al.*, 2014) reported by 70% of migrainers during migraine attacks (Lipton *et al.*, 2008). Per year, approximately 2.5% of episodic migrainers become chronic migrainers, with at least 15 days of headache per month (Bigal *et al.*, 2008; Lipton *et al.*, 2015), showing acute cutaneous allodynia during attacks but also interictal allodynia between them (Nahman-Averbuch *et al.*, 2018). Cutaneous allodynia is now considered as a marker and a risk factor for chronic migraine (Louter *et al.*, 2013), chronic migraine onset being increased by 30% among episodic migrainers, and chronic migraine persistence being increased by 15% in chronic migrainers (Scher *et al.*, 2017).

Preclinical migraine models in rodents are based on human observations. NO donors such as **nitroglycerin** (NTG) (Ashina *et al.*, 2013) and nitrate-based drugs with slower pharmacokinetics like **isosorbide dinitrate** (ISDN) used in the treatment of cardiovascular disease (Iversen *et al.*, 1992; Olesen and Ashina, 2015; Hansen and Olesen, 2017) trigger a delayed-migraine attack associated with cutaneous facial and extra-facial allodynia (Thomsen *et al.*, 1996). In rodents, NO donors evoke elevated **CGRP** blood levels, meningeal inflammation, photo and phonophobia, sensitization of central neurons of the trigeminal nucleus caudalis (TNC), cephalic and extra-cephalic allodynia, as well as spontaneous facial pain. The effectiveness of clinically relevant treatments like **sumatriptan**, CGRP antagonists and antibodies, anti-inflammatory drugs, or prophylactic drugs like **propranolol** and **topiramate** further support the relevance of these animal models of migraine (Bates *et al.*, 2010; Jansen-Olesen *et al.*, 2013; Pradhan *et al.*, 2014; Farkas *et al.*, 2016; Goadsby *et al.*, 2017; Harris *et al.*, 2017; Schytz *et al.*, 2017). Effects of systemic ISDN injections were recently described in rats, with a facilitation of C-fibre-evoked responses in 50% of second-order central neurons (Flores Ramos *et al.*, 2017; Dallel *et al.*, 2018), leading to cutaneous pain sensitization.

Acid-sensing ion channels (**ASICs**) are voltage-insensitive cation channels activated by extracellular acidosis (ASIC1-3) (Waldmann *et al.*, 1997) and lipids (**ASIC3**) (Marra *et al.*, 2016). They are widely expressed throughout the peripheral and central nervous system where they have been implicated in various pathophysiological processes including pain (Deval and Lingueglia, 2015). Most subunits are expressed in TG neurons, where **ASIC1**- and **ASIC3**-containing channels can contribute to the activation of meningeal afferents (Yan *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013) and the pathophysiology of migraine (Dussor, 2015). **ASIC1a** and **ASIC2a** are

expressed by second-order neurons of the TNC (Cho *et al.*, 2015), and brain **ASIC1a**-containing channels have been implicated in CSD (Holland *et al.*, 2012).

Peptide toxins from animal venoms specifically targeting different ASIC subtypes have been instrumental in revealing their roles in pain (Mazucca *et al.*, 2007; Deval *et al.*, 2008; Bohlen *et al.*, 2011; Baron *et al.*, 2013); these include mambalgins that exert potent analgesic effects against acute, inflammatory and neuropathic pain through specific inhibition of **ASIC1a**- and/or **ASIC1b**-containing channels (Diocot *et al.*, 2012; Diocot *et al.*, 2016). Using mambalgin-1 (Mamb-1) in combination with **amiloride**, a non-specific ASIC blocker, we explored the involvement of **ASIC1**-containing channels in mechanical cephalic and extra-cephalic cutaneous allodynia in the ISDN-induced model of migraine in rodents.

Methods

Animals

Experiments were performed on male Sprague Dawley rats (Janvier Labs, St Berthevin, France) weighing 250 to 400 g (mean weight: 306 ± 12 g, 6 to 9 weeks old), and on male C57BL/6J wild-type (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) and **ASIC1a**-knockout mice (Wemmie *et al.*, 2002) of 7- to 13-weeks-old weighing 20–25 g. Animals were housed in a 12 h light–dark cycle with food and water available *ad libitum*. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010). Animal procedures were approved by the Institution's Local Ethical Committee and authorized by the French Ministry of Research according to the European Union regulations and the Directive 2010/63/EU (Agreements C061525 and 01550.03). Animals were killed at experimental end points by CO_2 inhalation.

Drugs and in vivo injections

Synthetic Mamb-1, showing the same pharmacological activity as the native peptide, was purchased from Synprosis/Provepep (Fuveau, France), Smartox (Saint Martin d'Hères, France), or obtained from Commissariat à l'Énergie Atomique, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (Gif sur Yvette, France) (Mourier *et al.*, 2016). The biological activity of all synthetic Mamb-1 batches was validated on heterologously-expressed recombinant ASIC channels.

Mamb-1 was dissolved in vehicle solution containing NaCl 0.9% and BSA 0.05% to prevent non-specific toxin adsorption. For i.v. injections in rats, Mamb-1 ($11.3 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.e. $200 \mu\text{L}$ of $16.5 \mu\text{M}$ for a 300 g rat), amiloride hydrochloride hydrate ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.e. $200 \mu\text{L}$ of 56 mM for a 300 g rat, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), topiramate ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.e. $500 \mu\text{L}$ of $18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for a 300 g rat, Selleckchem, Munich, Germany), all dissolved in vehicle solution, or sumatriptan succinate ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.e. $250 \mu\text{L}$ of an injectable $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution for a 300 g rat, Imiject®, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) were injected in the caudal vein of conscious rats (restrained in a cylinder) with a 30G needle. For intraplantar s.c. (i.pl.) injections, Mamb-1 ($6.7 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.e. $50 \mu\text{L}$ of $41 \mu\text{M}$ for a 300 g rat) was injected in the left hindpaw of conscious rats with a 26G needle. For

mice, Mamb-1 (13.6 nmol·kg⁻¹, i.e. 200 µL of 1.7 µM for a 25 g mouse) dissolved in vehicle solution was i.v. injected in the caudal vein of conscious mice (restrained in a cylinder) with a 30G needle. The effects seen in our study with amiloride, sumatriptan and topiramate are consistent with the known pharmacokinetics of these drugs administered *via* the i.v. route in rodents.

Thermal and mechanical sensitivity measurements

Thermal sensitivity was assessed using the Hargreaves plantar test (Ugo Basile, Italy). Unrestrained rats were placed in individual plastic boxes on a glass floor. The withdrawal latency (s) of the rat hindpaw exposed to an infrared source (intensity of 190 ± 1 mW·cm⁻²) was measured in triplicate with at least 1 min between two stimulations, and the mean latency was calculated. A cut-off period of 20s was used to avoid potential tissue damage. Rats were trained for 2 days before the experiments. To test the effect of Mamb-1, thermal sensitivity was measured every 15 min before (basal value) and for 2 h after the Mamb-1 or vehicle injection.

The mechanical sensitivity of the face was measured using calibrated von Frey filaments (Bioseb, France). Unrestrained rats placed in individual plastic boxes on top of a wire surface were trained over 1 week; a stimulus was applied to the periorbital area, following a progressive protocol, starting with non-noxious filaments during the first 3 days of training. The face withdrawal force threshold (g) was determined by the filament evoking at least three responses over five trials, starting with lower force filaments. To test the effect of ISDN, mechanical sensitivity of the face was measured every 15 min before (basal value) and for 3 h after the i.p. injection. To test the effect of Mamb-1 and other compounds, face mechanical sensitivity was measured every 15 min before (basal value) and for 2 h after compound or vehicle injection.

The hindpaw mechanical sensitivity was evaluated with a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile). Unrestrained rats were placed in six individual plastic boxes on top of a wire surface. The rat hindpaw was subjected to a force ramped up to 30 g during 20 s, the paw withdrawal force threshold (g) was measured in triplicate, and the mean force was calculated. For 5 days, rats were habituated to repeated (every 15 min) measurements of face and hindpaw mechanical sensitivities, and basal values were determined 2 days before the experiments. To test the effect of ISDN, the hindpaw mechanical sensitivity was measured every 15 min before (basal value) and for 3 h after the i.p. injection. To test the effect of Mamb-1 and other drugs, the hindpaw mechanical sensitivity was measured every 15 min before (basal value) and for 2 h after the injection. For mice, the same procedure was used to measure the hindpaw mechanical sensitivity, except that a force ramped up to 7.5 g during 10 s was applied every 30 min and 12 mice could be tested simultaneously.

Pain and migraine rodent models

Local inflammation was induced by i.pl. injection, into a rat left hindpaw, of 100 µL of 2% carrageenan (Sigma Aldrich) with a 25G needle. Thermal and mechanical sensitivity were measured before (basal values) and 3 h after the carrageenan

injection to measure the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by inflammation (control values). Effects of drugs were followed by performing these measurements every 15 min for 2 h after their injection.

The rat model of NO-induced migraine was induced by i.p. injection of 10 mg·kg⁻¹ ISDN (Risordan®, Sanofi, Paris, France), a long-lasting NO donor, and is referred to as the ISDN-induced model in the text. The cephalic and hindpaw extra-cephalic mechanical sensitivities were measured simultaneously on the same rat. The acute mechanical allodynia induced by a single ISDN injection was followed for 3 h after injection. Chronic mechanical allodynia was induced by a single daily injection of ISDN during 4 days. Cephalic and extra-cephalic mechanical sensitivity were measured each day before the ISDN i.p. injection. Effects of drugs on chronic mechanical allodynia were tested on the fifth day and were followed every 15 min for 2 h after injection. This model has been transposed to mice using the same protocol, except that only the hindpaw extra-cephalic mechanical sensitivity was measured.

Control (or vehicle treated) and test animals were randomized within experimental sessions. Drug and peptide injections were not performed blindly in these experiments (implemented since) and data collection, analysis and statistics were performed and validated by two independent experimenters.

Data and statistical analysis

For behavioural experiments, kinetics of effects are shown, displayed as mean ± SEM as a function of time, along with cumulative effect over 2 h after injection of drugs, or over 3 h after ISDN injection, calculated as AUC (g × min for mechanical sensitivity, or s × min for thermal sensitivity) subtracted from the control value for each animal and expressed as mean ± SEM with individual data points shown. Total effect (AUC) = ∫ dYxdT, with dY the relative variation Y_{max}-Y_{control} of the measured parameter (withdrawal force or latency), and dT the time interval between two successive measurements (usually 15 min).

The power calculation was performed with an α value of 0.05 and a power of 0.8 with G*Power software, to calculate the minimum sample size per group needed depending on the expected variability of measurements (which differs between behavioural tests) and the type of statistical test to be used. For example, for the rat experiments, the minimum calculated sample size was 8 with effect sizes between 1.6 and 1.1. As most of our behavioural experiments and pharmacological treatments were not previously tested, and to anticipate the possible occurrence of non-respondent animals to pre-required treatments by carrageenan or ISDN, we set our usual minimum experimental sample size to 9. This 'n' value refers to independent values and not technical replicates (replicates were used to calculate a mean individual value). Control (or vehicle treated) animals and test animals were randomized within experimental days. Data are presented as mean values ± SEM. Data analysis and statistics were performed with Microcal Origin 6.0 and GraphPad Prism 4 softwares by two independent experimenters. The normality of data distribution was tested by KS normality test, D'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilk normality test, and parametric or non-parametric tests were

chosen for normal or non-normal data distribution respectively. Non-parametric tests were used when the number of animals per experimental group was less than 10, because the results of normality tests were not totally reliable in these conditions. The statistical difference between two different experimental groups was analysed by the parametric Student's unpaired *t*-test or by the non-parametric Mann–Whitney test. The statistical difference between more than two different experimental groups was assessed by the parametric one-way ANOVA followed by a Tukey's *post-hoc* test, or by the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post-hoc* test. For data within the same experimental group, a parametric Student's paired *t*-test or a non-parametric Wilcoxon matched pairs test was used. The level of probability $P < 0.05$ denotes a statistically significant differences between groups, and *post-hoc* tests were only run when $P < 0.05$.

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Harding *et al.*, 2018), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18 (Alexander *et al.*, 2017a,b).

Results

Anti-allodynic effects of *i.v.* mambalgin-1 against inflammatory pain in rats

Mambalgins exert analgesic effects in mice upon different routes of administration (*i.pl.*, *i.v.*, *i.t.*, *i.c.v.*) and against different types of pain, including inflammatory pain (Diochot *et al.*, 2012; Diochot *et al.*, 2016). However, their effects in rats were never tested. Before using the ISDN-induced model of migraine for simultaneous measurements of cephalic and extra-cephalic mechanical sensitivity, we first determined the effect of Mamb-1 on inflammatory pain in rats by testing a single dose extrapolated from the maximal effective concentration previously determined in mice from an *in vivo* dose–response curve (Diochot *et al.*, 2016). Three hours after *i.pl.* injection of 2% carrageenan in the hindpaw, mechanical allodynia was observed, with a decrease in withdrawal threshold force from 18.4 ± 0.5 g down to 9.2 ± 0.2 g (Figure 1A), as well as thermal hyperalgesia, with a decrease in withdrawal latency from 9.0 ± 0.3 s down to 4.3 ± 0.2 s (Figure 1B). An *i.v.* injection of Mamb-1 ($11.3 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) induced a complete and sustained reversal of the inflammatory-induced mechanical allodynia (Figure 1A, 19.1 ± 0.8 g after 45 min), as well as a

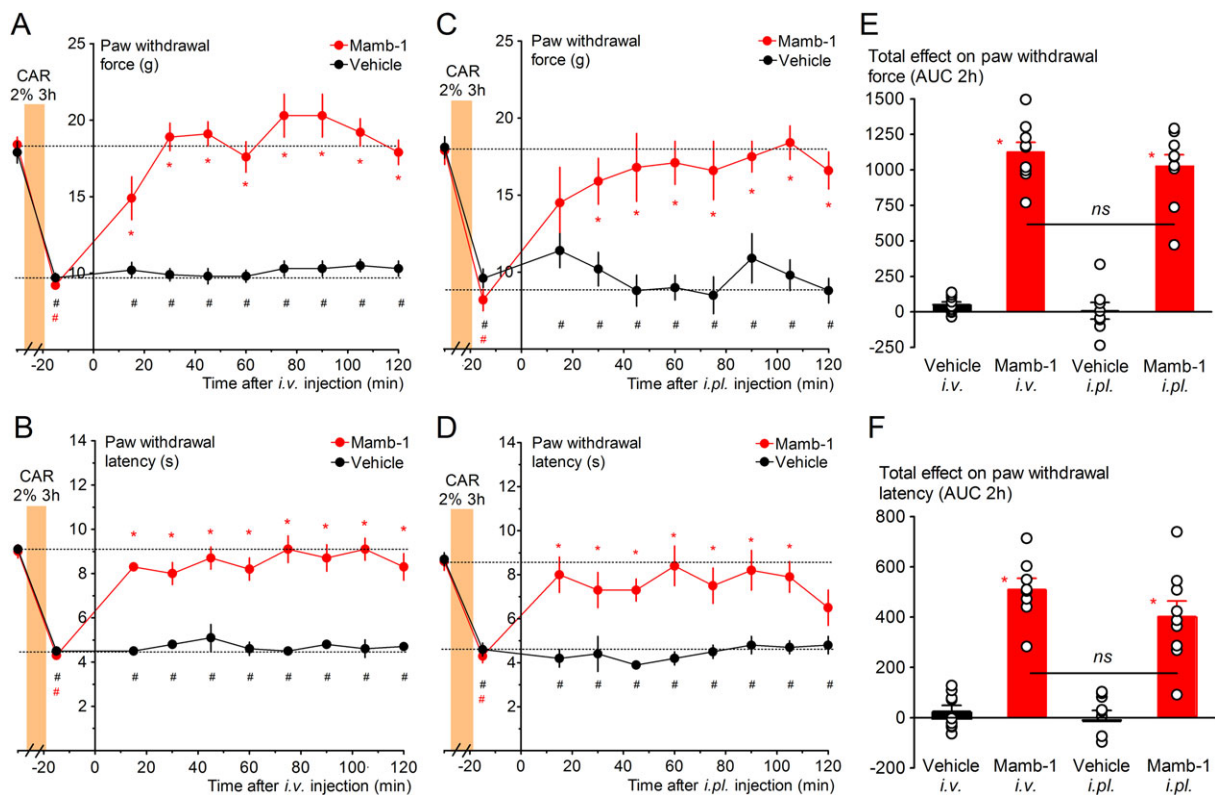


Figure 1

Reversal of inflammation-induced paw mechanical allodynia and thermal hyperalgesia by *i.v.* and local intraplantar (*i.pl.*) injections of mambalgin-1 in rats. (A, C) Full reversal by *i.v.* (A) and by *i.pl.* (C) Mamb-1 (11.3 and $6.7 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectively) of paw inflammatory mechanical allodynia (carrageenan 2%, 3 h). (B, D) Full reversal by *i.v.* (B) and *i.pl.* (D) Mamb-1 of paw inflammatory thermal hyperalgesia (carrageenan 2%, 3 h). (A–D) Results are shown as mean \pm SEM, $n = 9$. * $P < 0.05$ compared to vehicle with Mann–Whitney non-parametric test, # $P < 0.05$ compared to control non-inflamed basal value with Wilcoxon matched paired test. (E, F) Total effect of *i.v.* and of *i.pl.* Mamb-1 on paw mechanical withdrawal force (E) and on heat paw withdrawal latency (F) calculated as the AUC during the 2 h after the injection. Individual data points and mean \pm SEM are shown; $n = 9$. * $P < 0.05$ compared to vehicle with Mann–Whitney non-parametric test.

complete reversal of the inflammatory-induced thermal hyperalgesia (Figure 1B, 8.7 ± 0.5 s, after 45 min). Local i.pl. injection of Mamb-1 in the rat-inflamed hindpaw ($6.7 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) also resulted in a complete and sustained reversal of the inflammatory-induced mechanical allodynia (Figure 1C) and thermal hyperalgesia (Figure 1D). The kinetics and total effects of Mamb-1 were comparable between i.v. and i.pl. injections (Figure 1C–F). However, i.pl. and i.v. injections of Mamb-1 had no effect on hindpaw mechanical threshold in naive rats (Supporting Information Figure S1).

These data indicate that i.v. or i.pl. Mamb-1 exert anti-allodynic effects on inflammatory pain in rats, comparable to the effects we already described in mice that were mainly peripheral and caused by the inhibition of ASIC1b-containing channels (Diochot *et al.*, 2016).

Effect of i.v. mambalgin-1 and amiloride on acute cutaneous mechanical allodynia in the ISDN-induced model of migraine

The ISDN-induced chronic migraine model was developed recently in rats (Flores Ramos *et al.*, 2017; Dallel *et al.*, 2018), related to the chronic NTG-induced model first developed in mice (Pradhan *et al.*, 2014). One i.p. injection of ISDN ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) induces mechanical allodynia mimicking what is occurring during a migraine attack, with a decrease in cephalic and extra-cephalic mechanical sensitivity. The facial and hindpaw withdrawal force thresholds reached their minimal values after 1.5 h (3.3 ± 0.4 from a basal control value of 7.5 ± 0.3 g; and 12.2 ± 0.4 from a basal control value of 17.8 ± 0.2 g respectively) that were maintained for at least 3 h, whereas i.p. injections of saline were without effect (Supporting Information Figure S2A,B, black symbols, left panels). Twenty four hours later, an allodynia was still present, and one ISDN injection per day for 4 days resulted in the progressive development of a chronic basal mechanical allodynia (2.4 ± 0.3 g on the face, and 10.1 ± 0.3 g on the paw; Supporting Information Figure S2C,D), which was correlated with a progressive decrease in the ISDN-induced cephalic and extra-cephalic total effect on acute cutaneous allodynia, the last injection inducing no more significant effect (Supporting Information Figure S2A,B, right panels). The chronic basal mechanical allodynia persisted several days after the last ISDN injection, and a nearly total reversal was observed 15 days after the end of ISDN treatment (Supporting Information Figure S2C,D).

The effect of i.v. Mamb-1 on the acute mechanical allodynia induced by the first ISDN injection was tested. When Mamb-1 was injected after the full development of acute allodynia (i.e. 105 min after ISDN i.p. injection), it induced a full reversal of facial mechanical allodynia (Figure 2A), the withdrawal force increasing from the allodynic value of 3.3 ± 0.5 g up to 7.6 ± 0.4 g 1 h after the i.v. injection, which is not significantly different from the baseline (8.0 ± 0.3 g). On the same animals, Mamb-1 only induced a partial reversal of the hindpaw mechanical allodynia, the withdrawal force increasing from the allodynic value of 11.2 ± 0.5 g up to 14.0 ± 1.3 g 1 h after the i.v. injection (Figure 2B). These effects were sustained for at least 2 h. The anti-allodynic effect of i.v. Mamb-1, which significantly reduced the total effects of the first injection of ISDN on cutaneous allodynia, induced a 1 day shift in the development of chronic allodynia induced by subsequent daily i.p.

injections of ISDN in both cephalic and extra-cephalic regions, without any change in the maximal basal allodynia measured on the last day (Figure 2C,D). This supports, as suggested in humans, a causality link between occurrence of attack-like mechanical allodynia and the development of chronic allodynia.

The effect of i.v. Mamb-1 on ISDN-induced acute mechanical allodynia was compared with that of amiloride, a well-known non-selective inhibitor of ASICs, and also with that of the acute migraine therapy sumatriptan, a **5-HT_{1B}** and **5-HT_{1D}** receptor agonist. Amiloride or sumatriptan succinate, both i.v. injected in the same conditions as Mamb-1, also exerted an anti-allodynic effect. Amiloride induced a full reversal of face mechanical allodynia (Figure 3A) and a partial but significant reversal of hindpaw allodynia (Figure 3B), similar to the sustained Mamb-1 effects. As expected from its therapeutic effect, and as previously described in mice models of migraine (Bates *et al.*, 2010; Pradhan *et al.*, 2014), sumatriptan also showed sustained anti-allodynic properties, with a partial reversal of both facial (Figure 3A) and hindpaw (Figure 3B) allodynia.

All together, these data show that systemic i.v. Mamb-1 and amiloride effectively reverse the ISDN-induced cephalic, and to a lesser extent extra-cephalic, mechanical acute cutaneous allodynia, with an even higher potency than sumatriptan.

Effects of i.v. mambalgin-1 and amiloride on the maximal chronic cutaneous mechanical allodynia in the ISDN-induced model of migraine

When Mamb-1 was injected 1 day after the last ISDN injection (i.e. on the fifth day), it fully reversed the maximal chronic facial mechanical allodynia (Figure 4A), increasing the facial withdrawal force from 3.0 ± 0.4 g up to 9.6 ± 2.1 g after 1 h, to a value similar to baseline (8.6 ± 0.9 g). Mamb-1 also partially reversed the maximal chronic hindpaw mechanical allodynia (Figure 4B), increasing the paw withdrawal force from 9.8 ± 0.2 g up to 15.0 ± 1.1 g after 1 h to a value significantly different from vehicle as well as from baseline (18.0 ± 0.2 g). Amiloride also showed similar anti-allodynic effects (Figure 4A,B). Both compounds were as potent as topiramate, a clinically used preventive drug against migraine, whereas sumatriptan, used in acute migraine therapy, was ineffective (Figure 4C–F), as previously described (Pradhan *et al.*, 2014). Local i.pl. injection of Mamb-1, which was able to reverse inflammatory-induced mechanical paw allodynia (Figure 1C), was without effect on ISDN-induced chronic paw mechanical allodynia (Supporting Information Figure S3) showing that the local inhibition of ASICs in sensory neurons of the paw was not involved in the anti-allodynic effect of Mamb-1 on the paw ISDN-induced allodynia, contrary to the effects on inflammatory pain. Furthermore, the absence of effect of i.pl. injection of Mamb-1 on chronic facial ISDN-induced allodynia (Supporting Information Figure S3), contrary to what is observed after i.v. injection, confirmed that the effect of the peptide upon i.pl. injection remains local without important systemic diffusion towards blood.

These data show that systemic i.v. Mamb-1 and amiloride efficiently reverse the maximal chronic cephalic and extra-cephalic cutaneous mechanical allodynia with a potency similar to topiramate.

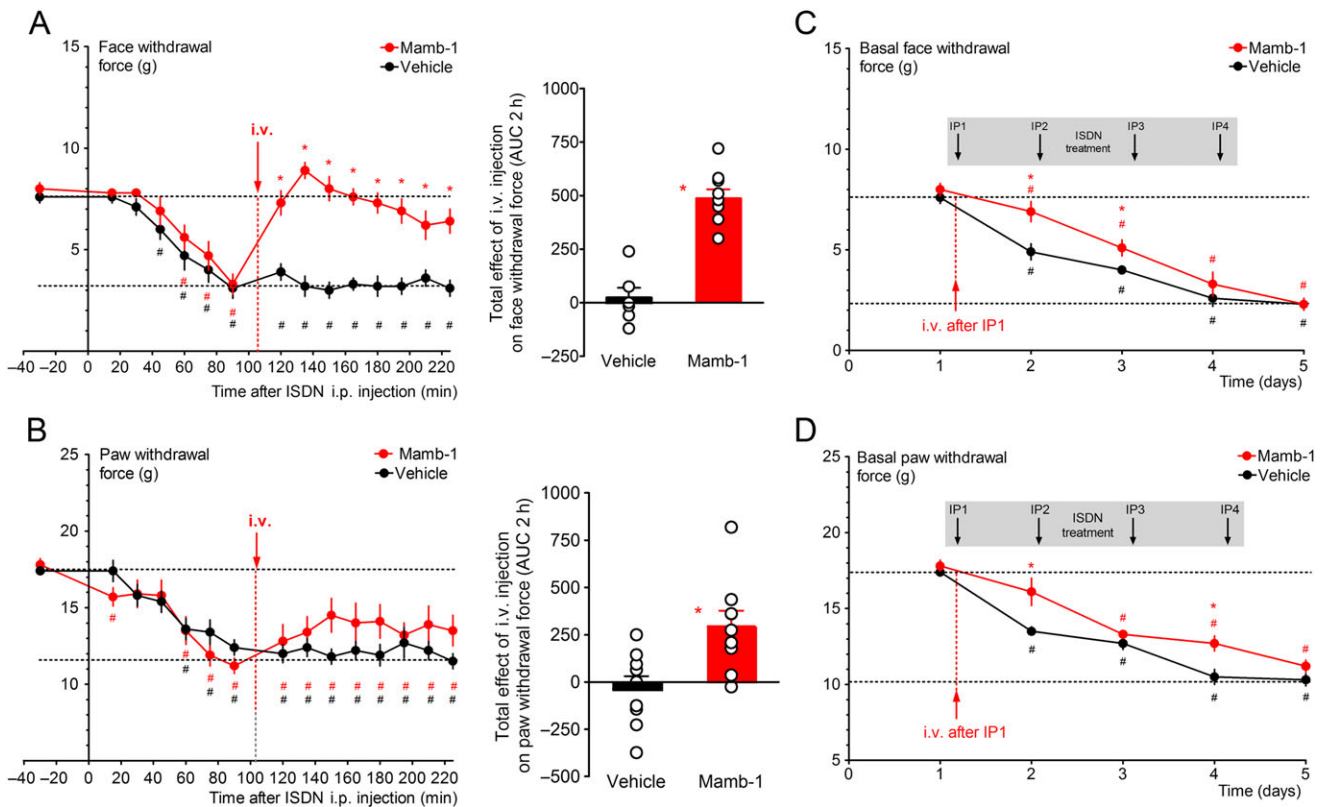


Figure 2

Reversal of ISDN-induced cephalic and extra-cephalic acute mechanical allodynia by an i.v. injection of mambalgin-1. (A, B – left panels) Kinetics of the anti-allodynic effect on face (A) and paw (B) mechanical withdrawal thresholds (g) of an i.v. injection of Mamb-1 (11.3 nmol·kg⁻¹) 105 min after the i.p. injection of ISDN in rats. Mean ± SEM, $n = 9$: * $P < 0.05$ compared to vehicle with Mann–Whitney non-parametric test; # $P < 0.05$ compared to control value before ISDN injection with Wilcoxon matched paired test. (A, B – right panels) Total effect of i.v. Mamb-1 (or vehicle) on face (A) and paw (B) withdrawal force calculated as the AUC during the 2 h after the i.v. injection. Individual data points and mean ± SEM, $n = 9$, * $P < 0.05$ compared to vehicle with Mann–Whitney non-parametric test. (C, D) One i.v. injection of Mamb-1 (11.3 nmol·kg⁻¹) after the first ISDN injection, as shown in A and B, induces a delay in the subsequent generation of ISDN-evoked chronic allodynia induced by three more daily ISDN injections. Basal face (C) and paw (D) mechanical withdrawal force (g) measured before each daily ISDN injection and the day after the last ISDN injection (day 5). Mean ± SEM, $n = 9$: * $P < 0.05$ compared to vehicle with Mann–Whitney non-parametric test; # $P < 0.05$ compared to control before the first ISDN injection with Wilcoxon matched paired test.

Preventive effect of i.v. mambalgin-1 treatment on the development of chronic cutaneous mechanical allodynia in the ISDN-induced migraine model

Mamb-1 was able to reverse the maximal chronic cutaneous allodynia induced by 4 days of ISDN injections. We tested next the effects of one daily i.v. injection of Mamb-1 for 4 days, between ISDN-induced attacks and their consequences on the development of chronic allodynia.

In good agreement with the data showing no effect of i.v. injection of Mamb-1 on basal paw mechanical threshold in naive rats (Supporting Information Figure S1), the i.v. injection of Mamb-1 30 min before the first i.p. injection of ISDN did not change the basal face and paw mechanical sensitivities (Figure 5A,B, black symbols). The acute effect of ISDN with the maximal allodynia reaching 5.3 ± 0.5 g from the basal level of 8.2 ± 0.2 g on the face, and 13.7 ± 0.3 g from a basal level of 18.5 ± 0.2 g on the paw after 2h (Figure 5A,B, black symbols), was not significantly different from that seen in vehicle injected rats (Figure 5C,D, black symbols). A basal

allodynia appeared the day after (i.e. on day 2; Figure 5E,F) that was reversed by Mamb-1, i.v. injected 30 min before the second ISDN injection (Figure 5A,B, red symbols), whereas vehicle was without effect (Figure 5C,D, red symbols). On day 3, the basal cutaneous allodynia was significantly less pronounced in Mamb-1-treated compared to vehicle-treated rats, reaching 5.1 ± 0.4 g on the face and 14.7 ± 0.3 g on the paw, and 2.9 ± 0.4 g on the face and 13.4 ± 0.2 g on the paw, respectively (Figure 5E,F). Repeated i.v. injections of Mamb-1 on days 3 and 4 finally led to a significant reduction in the maximal chronic allodynia on day 5, that is, 24 h after the last ISDN injection, reaching 4.7 ± 0.3 g on face and 13.8 ± 0.5 g on paw, compared to 1.9 ± 0.3 g and 11.5 ± 0.4 g, respectively, on vehicle-treated rats (Figure 5E,F). Consequently, an ISDN-induced acute increase in allodynia was still observed in Mamb-1-treated rats on the fourth day (Figure 5A,B, blue symbols), but not in vehicle-treated rats already close to the maximal allodynic level (Figure 5C,D, blue symbols).

Our results show that a daily “inter-attack” i.v. injection of Mamb-1 was able to significantly reduce the chronic

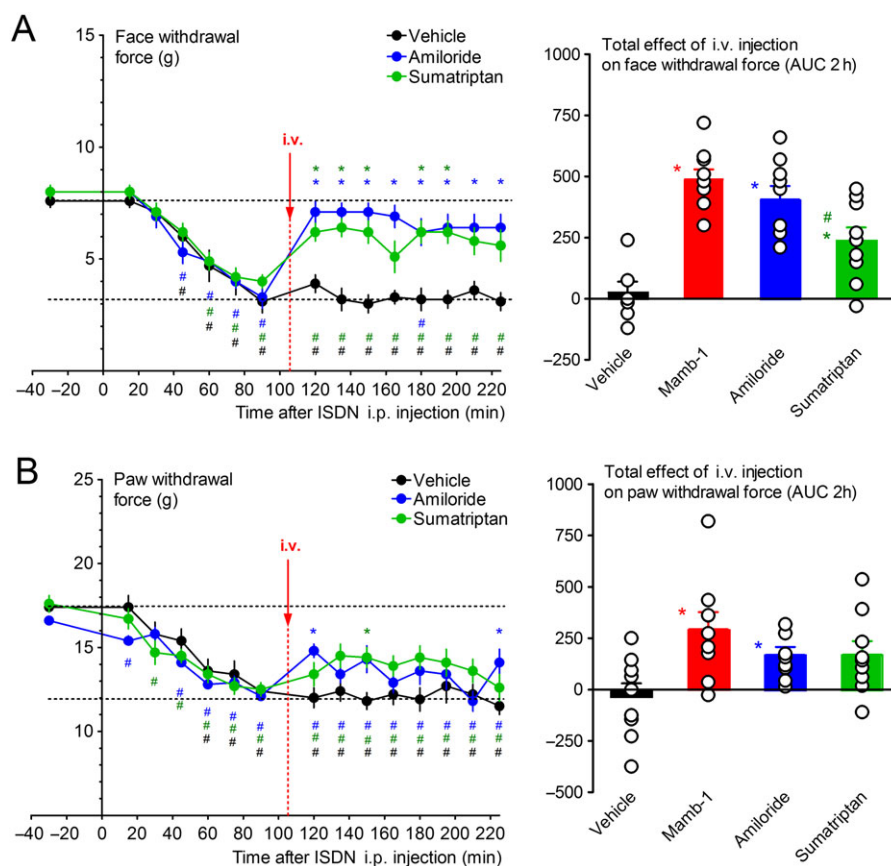


Figure 3

Comparison of the anti-allodynic effects of mambalgin-1, amiloride and sumatriptan on ISDN-induced cephalic and extra-cephalic acute mechanical allodynia. (A, B, left panels) Kinetics of the analgesic effects on face (A) and paw (B) mechanical withdrawal force (g), of amiloride ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and sumatriptan succinate (Imiject[®], $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i.v. injected 105 min after the injection of ISDN measured on the same rats. Mean \pm SEM, $n = 9$. * $P < 0.05$ with non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn's *post hoc* tests compared to vehicle; # $P < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to control value before ISDN injection. For clarity, only vehicle (same data as in Figure 2A,B) but not Mamb-1 is shown. (A, B, right panels) Total effect of vehicle, Mamb-1 (same data as in Figure 2A,B), amiloride and sumatriptan on face (A) and paw (B) withdrawal force, calculated as the AUC, during the 2 h after injection. Individual data points and mean \pm SEM, $n = 9$: * $P < 0.05$ with Mann–Whitney non-parametric test compared to vehicle; # $P < 0.05$ with Mann–Whitney non-parametric test compared to Mamb-1.

allodynia that develops upon injection of ISDN for several days, especially on the facial region, without affecting normal cutaneous sensitivity or the ability of ISDN to induce an acute allodynic effect. The absence of a preventive effect of Mamb-1 i.v. injected 30 min before the first ISDN injection could be due to the limited half-life of Mamb-1 in blood circulation regarding the 30 to 90 min needed after ISDN injection (i.e. 60 to 120 min after Mamb-1 injection) for allodynia to develop (Supporting Information Figure S2).

The anti-allodynic effect of i.v. mambalgin-1 in the ISDN-induced chronic migraine model is still present in ASIC1a knockout mice

Since Mamb-1 inhibits ASIC1-containing channels (i.e. comprising either ASIC1a and/or ASIC1b subunits), the contribution of ASIC1a to its anti-allodynic effects in the ISDN-induced chronic migraine model was tested on hindpaw mechanical sensitivity in ASIC1a-knockout (KO) mice. In wild-type mice, the first i.p. injection of ISDN induced an acute paw allodynia, with the withdrawal force decreasing from $4.1 \pm 0.1 \text{ g}$ down to $3.0 \pm$

0.1 g 2 h after the ISDN injection (Figure 6A, black symbols). Allodynia was not fully reversed the next day, and one ISDN injection per day for 4 days resulted, like in rats, in the progressive development of a chronic mechanical allodynia correlated with a progressive decrease in the daily total effect of ISDN, leading to the absence of effect of the fourth ISDN injection (Figure 6A, blue symbols). On day 5 (i.e. 24 h after the last ISDN injection), the maximal chronic allodynia reaches $2.7 \pm 0.1 \text{ g}$ from a control (day 1) value of $4.1 \pm 0.1 \text{ g}$ and was reversed towards control mechanical sensitivity by an i.v. injection of Mamb-1 (Figure 6B). Interestingly, the reversal of chronic paw allodynia was complete in mice, whereas only partial in rats. The same experiments have been done in ASIC1a-KO mice and showed no difference with wild-type animals either in the ISDN-induced acute allodynia (at day 1 and at day 4) (Figure 6C) or in the development of chronic allodynia (reaching $2.6 \pm 0.1 \text{ g}$ from a control (day 1) value of $4.1 \pm 0.1 \text{ g}$, not significantly different from wild-type mice with Mann–Whitney non-parametric test) and in the anti-allodynic effects of i.v. Mamb-1 on the maximal chronic allodynia (Figure 6D).

These data show that ASIC1a is not needed for the anti-allodynic effects of Mamb-1 or for the establishment of the

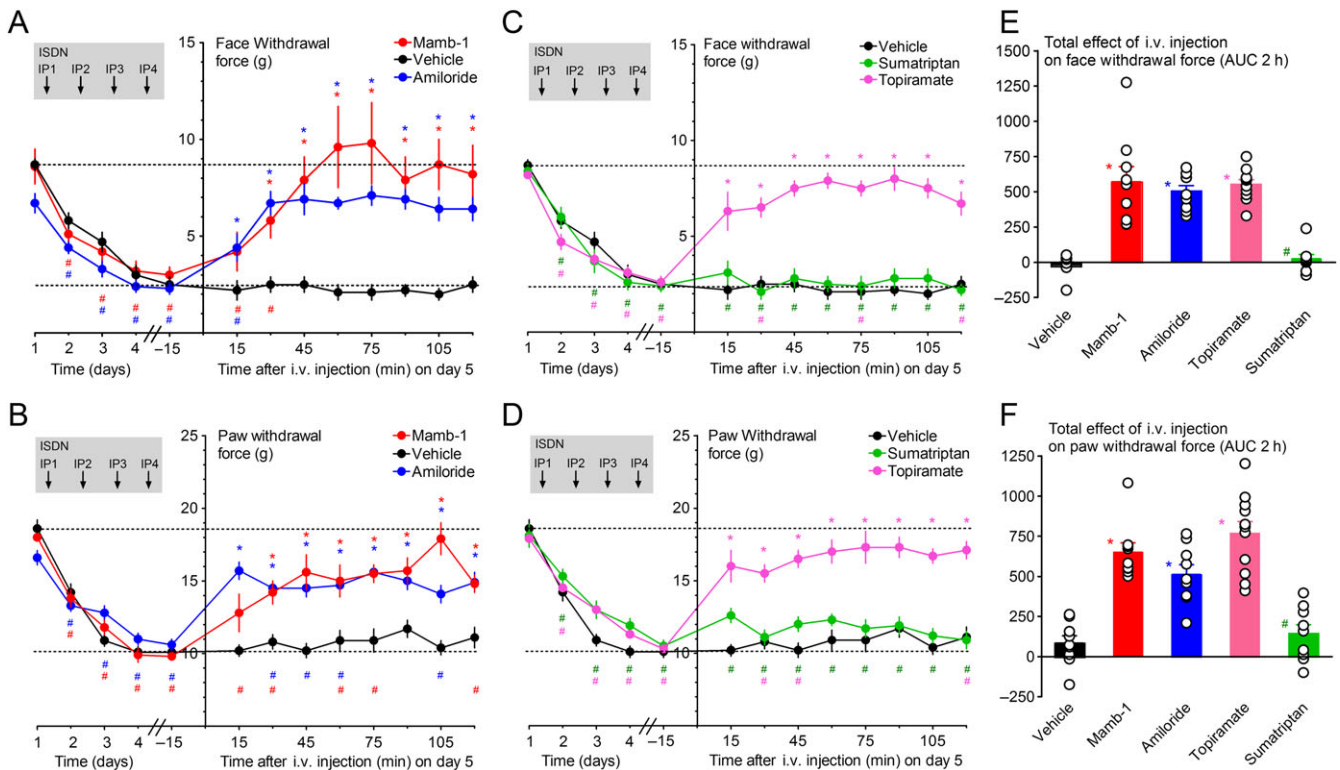


Figure 4

Reversal of ISDN-induced maximal cephalic and extra-cephalic chronic mechanical allodynia by an i.v. injection of mambalgin-1. (A–D) Kinetics of the anti-allodynic effect of Mamb-1 ($11.3 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), amiloride ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), sumatriptan succinate (Imiject, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and topiramate ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), i.v. injected 1 day after the last ISDN injection (i.e. on day 5) on face (A, C) and paw (B, D) mechanical withdrawal force (g) in rats. The basal mechanical withdrawal force (g) was measured before each daily ISDN injection (left side of the y axis), showing the chronification process of cutaneous allodynia day after day. For clarity, kinetics were split into two graphs, sharing the same data for vehicle. Mean \pm SEM, $n = 9$ except with topiramate ($n = 11$). * $P < 0.05$ with Mann–Whitney non-parametric test compared to vehicle; # $P < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to control value before the first ISDN injection (day 1), not shown, but all significant for vehicle. (E, F) Total effect on face (E) and paw (F) withdrawal force calculated as the AUC during the 2 h after the i.v. injection for each rat. Individual data points and mean \pm SEM $n = 9$: * $P < 0.05$ with Mann–Whitney non-parametric test compared to vehicle; # $P < 0.05$ with Mann–Whitney non-parametric test compared to Mamb-1.

ISDN-induced migraine model in mice. They also indicate that ISDN has a similar effect in mice as in rats after repetitive daily injections with the establishment of a maximal chronic basal allodynia, which is consistent with that previously described with nitroglycerin as the NO-donor (Pradhan *et al.*, 2014).

Discussion

In this study, we demonstrated the anti-allodynic effects of i.v. ASIC1 inhibitors in a rodent model of migraine induced by daily i.p. injection of ISDN, a long-lasting NO-donor. Mambalgin-1 and amiloride reverse cephalic and extra-cephalic cutaneous allodynia when i.v. injected during the attack-like acute effect of one ISDN injection, with an effect similar to that of sumatriptan, and caused a delay in the establishment of chronic allodynia induced by subsequent ISDN injections. ASIC1 inhibitors are also able to reverse the maximal cephalic and extra-cephalic chronic allodynia when i.v. injected after the four injections of ISDN, with an effect similar to that of topiramate. A daily “inter-attack” i.v. injection of Mamb-1 is able to significantly reduce

maximal cutaneous allodynia, thus exerting a preventive effect on the establishment of chronic allodynia.

Involvement of peripheral ASIC1-containing channels in migraine-induced cutaneous allodynia and in its chronification

The contribution of ASIC1 channels in acute and chronic cutaneous allodynia in the ISDN-induced migraine model is strongly supported by the similar anti-allodynic effects of amiloride, a well described non-selective inhibitor of ASICs, and Mamb-1, a specific inhibitor of ASIC1-containing channels (Diochot *et al.*, 2012). Mamb-1, in contrast to amiloride, does not block the **epithelial sodium channel** involved in blood pressure regulation (Supporting Information Figure S4), making it unlikely that these compounds have a significant indirect vascular contribution in the ISDN-induced migraine model. In rodents, Mamb-1 only inhibits ASIC1a- and ASIC1b-containing channels, with ASIC1a expressed in both central and sensory neurons (small diameter neurons), and ASIC1b exclusively expressed in sensory neurons (small to large diameter neurons) (Chen *et al.*,

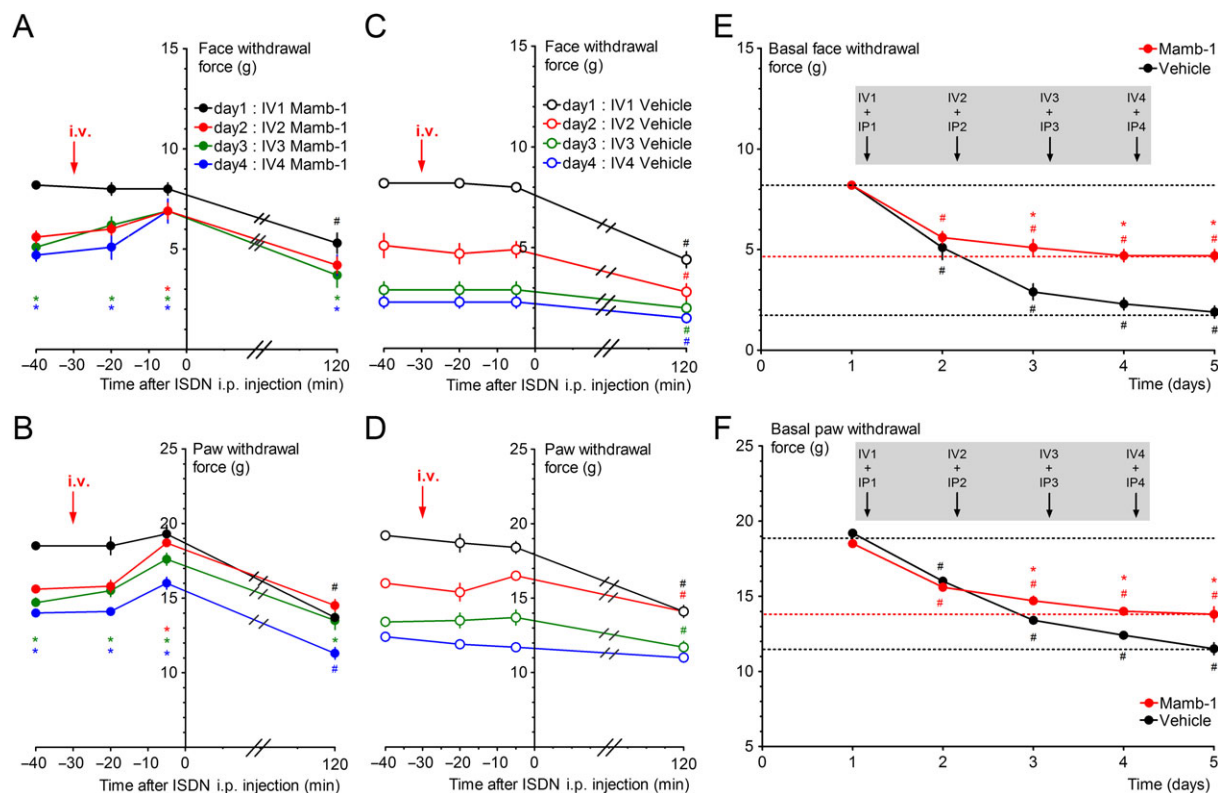


Figure 5

Preventive effect of i.v. Mamb-1 treatment on chronification of cephalic and extra-cephalic mechanical allodynia. (A–D) Kinetics of the effects of a daily i.v. injection of Mamb-1 (11.3 nmol·kg⁻¹, A, B) or vehicle (C, D) 30 min before each daily ISDN injection (10 mg·kg⁻¹) on face (A, C) and paw (B, D) mechanical withdrawal threshold (g). Mean ± SEM, *n* = 9: **P* < 0.05 with Mann–Whitney non-parametric test compared to vehicle; #*P* < 0.05 with Wilcoxon matched paired test compared to baseline value before any injection. (E, F) Effects of a daily i.v. injection of Mamb-1 or vehicle (same conditions as in A–D) on the basal face (E) and paw (F) mechanical withdrawal force threshold (g) measured on the same rats before each daily i.v. injection (values at time -40 on graphs A–D) and after the last, fourth, ISDN injection (day 5). Mean ± SEM, *n* = 9. **P* < 0.05 with Mann–Whitney non-parametric test compared to vehicle; #*P* < 0.05 with Wilcoxon matched paired test compared to control before injection.

1998). We have previously shown that the central effects of Mamb-1 are totally lost in ASIC1a-KO mice (Diochot *et al.*, 2012; Diochot *et al.*, 2016). ASIC1a is not necessary for the anti-allodynic effect of i.v. Mamb-1 in the ISDN-induced migraine model. This precludes a major contribution of central ASIC1a-containing channels and supports a peripheral effect involving ASIC1b specifically expressed in sensory neurons, although a direct demonstration would need genetic ablation of ASIC1b in TG neurons. However, native ASICs are composed of three identical or different subunits, and the contribution of peripheral ASIC1a subunits in wild-type animals cannot be ruled out, for instance, within heteromeric channels made up of ASIC1a and ASIC1b. Our results are also in good agreement with our previous data in mice showing a major role for peripheral ASIC1b-containing channels in the analgesic effect of i.v. mambalgin-1 on inflammatory pain (Diochot *et al.*, 2016).

Peripheral ASIC1-containing channels in TG sensory fibres could be therefore be involved in the pathophysiology of migraine, possibly correlated with meningeal extracellular acidification as one of the initiating events. Our results support the involvement of ASICs that can be activated by NO-induced extracellular acidification (through mast cells

degranulation) and further stimulated by inflammatory mediators and associated transduction pathways. ASIC1- and ASIC3-containing channels were proposed as important pain detectors in sensory neurons of the orofacial area (Fu *et al.*, 2016) notably in the dura mater (Yan *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013; Burgos-Vega *et al.*, 2015). About 80% of rat dural afferents trigger action potentials at pH 6.0, 50% at pH 7.0 and 30% at pH 7.1. As a consequence, an acidic pH 6.0 solution applied on dura mater generates sustained cephalic and extra-cephalic allodynia, which is maximal after 2 h and inhibited by amiloride but not TRPV1 antagonists, supporting the involvement of ASICs activation in migraine-related behaviour *in vivo* (Yan *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013). ASIC3-containing channels have been proposed to be involved in these effects (Yan *et al.*, 2013), as well as in the potentiating effects of inflammatory factors, and our data now also support the involvement of ASIC1-containing channels (presumably ASIC1b) since Mamb-1 does not inhibit ASIC3-containing channels (Diochot *et al.*, 2012). Interestingly, Mamb-1 was shown to modify the pH-dependent activation and inactivation curves of ASIC1a channels (Diochot *et al.*, 2012; Salinas *et al.*, 2014) with a higher inhibitory potency in conditions of mild acidosis, which are

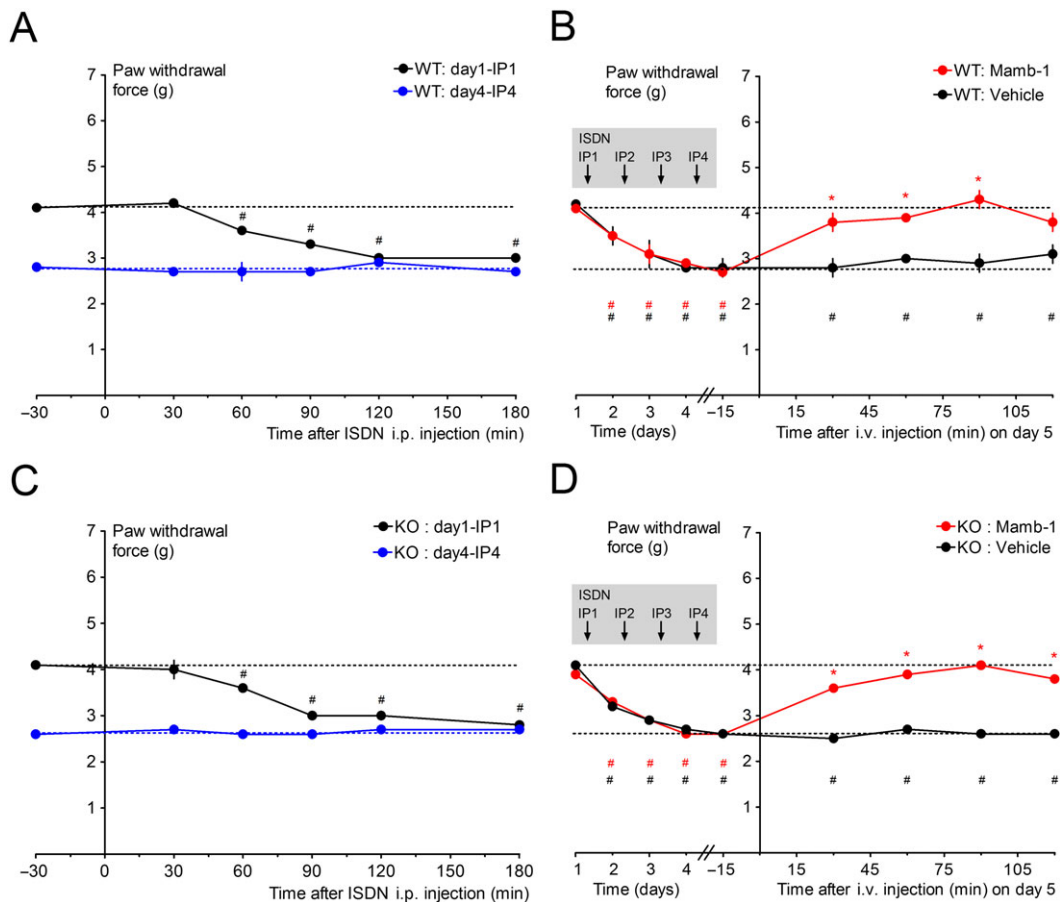


Figure 6

Reversal of ISDN-induced maximal extra-cephalic chronic mechanical allodynia by an i.v. injection of mambalgin-1 in wild-type and ASIC1a knockout (KO) mice. (A, C) Kinetics of the effects of the first ISDN injection on day 1 and of the fourth ISDN injection on day 4 on hindpaw mechanical withdrawal threshold (g) of wild-type (A, $n = 20$) and ASIC1a-KO (C, $n = 17$) mice. Mean \pm SEM, $^{\#}P < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to control value before the ISDN injection, all non-significant for day 4 data. (B, D) Kinetics of the anti-allodynic effect of Mamb-1 ($13.6 \text{ nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) and vehicle i.v. injected 1 day after the last ISDN injection (i.e. on day 5) on paw mechanical withdrawal force (g) of wild-type (B, $n = 10$) and ASIC1a-KO (D, $n = 8-9$) mice. The basal mechanical withdrawal force (g) was measured before each daily ISDN injection (left side of the Y axis, which includes the values at -30 min for day 1 and 4 in A and C), showing the chronification process of cutaneous allodynia day after day. Mean \pm SEM, $n = 8-10$. $^*P < 0.05$ with Mann-Whitney non-parametric test compared to vehicle; $^{\#}P < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to control value before the first ISDN injection (day 1). Groups of mice used in A and C were then divided in half to be injected with either vehicle or Mamb-1, as shown in B and D.

thought to happen around sensory nerves terminals in pathological conditions such as inflammation or migraine triggering. In addition to ASIC3-containing channels, which are expressed in 80% of pH-sensitive dural fibres (Yan *et al.*, 2013), the ASIC1a, ASIC1b and ASIC2 subunits were also present in TG neurons (Manteniotis *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2015; Flegel *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016), and data obtained with ASIC1a-KO mice support the involvement of ASIC1-like currents in TG ganglion in orofacial inflammatory pain (Fu *et al.*, 2016). Transcriptome analyses recently showed higher expression of ASIC1 in TG versus lumbar DRG neurons (Lopes *et al.*, 2017). Another interesting point concerns the NO potentiation of ASICs in heterologous systems as well as in rat sensory neurons (Cadiou *et al.*, 2007), with transient effects on ASIC1a, ASIC2a and ASIC3 currents, but an irreversible effect on rat ASIC1b current that could also contribute to the role of ASIC1b in the ISDN-induced model.

Inhibition of peripheral ASIC1-containing channels in TG afferents by systemic Mamb-1 and amiloride could thus participate in the analgesic effects seen in the ISDN-induced rat migraine model. Local i.pl. injection of Mamb-1 in the paw was not able to reverse ISDN-induced chronic paw mechanical allodynia, whereas it fully reversed the inflammatory-induced one. The systemic extra-cephalic, anti-allodynic effect of i.v. Mamb-1 would thus not be due to local inhibition of peripheral sensory ASIC1-containing channels in the paw but would rather be a consequence of the reversal of cephalic ISDN-induced allodynia through inhibition of ASIC1-containing channels in TG sensory fibres. Peripheral sensitization of the TG sensory neurons leads to secondary central sensitization of the second order neurons of the TNC and upper cervical spinal cord (C1-C2), thus causing subsequent cephalic allodynia, whereas extra-cephalic allodynia would reflect the further extension of central

sensitization to upper central pain relays (like thalamus), particularly during the settlement of a chronic state (Boyer *et al.*, 2014). Highly diffusible NO is also able to directly exert central effects, with modulation of medullary dorsal horn neurons (Flores Ramos *et al.*, 2017), TNC neurons and VPM thalamus neurons (Goadsby *et al.*, 2017), thus amplifying cutaneous pain sensitization. The anti-allodynic and anti-chronification effects of ASIC1 inhibitors are weaker on extra-cephalic than on cephalic allodynia in our experiments in rats. Similar incomplete effects were reported for amiloride in another rat migraine model with a direct dural acidic stimulation (Yan *et al.*, 2013) and in a mice NTG-induced model of chronic migraine (Tipton *et al.*, 2016). The complete reversibility of cephalic allodynia by ASIC1 inhibitors that we observed would suggest that sensitization of the TNC and the upper cervical dorsal horn could depend directly on the activity of TG sensory neurons expressing ASIC1-containing channels, whereas extra-cephalic allodynia would be partially independent of them, involving central mechanisms independent of TG fibres activation (Bernstein and Burstein, 2012) or ASIC-independent effects of NO on paw sensory fibres (Ferrari *et al.*, 2016).

Systemic ASIC1 blockers against migraine

Treatment of migraine, and particularly chronic migraine, remains challenging, and numerous therapeutic drugs are non-specific, sometimes inefficient, with side effects and contraindications (Serrano *et al.*, 2015; Schytz *et al.*, 2017). Cutaneous allodynia in chronic migraine is associated with inadequate outcomes for any anti-migraine medication (Lipton *et al.*, 2017). Furthermore, a significant proportion of chronic migraine cases are due to anti-migraine medication abuse or misuse (Bigal and Lipton, 2009; Lipton *et al.*, 2015), highlighting the need for new medications, including new prophylactic approaches to prevent the chronification process.

We showed that i.v. amiloride and mambalgin-1 both exert long-lasting anti-allodynic effects against acute and chronic cutaneous allodynia in the ISDN-induced migraine model, not only in extra-cephalic regions, as usually assessed, but also in cephalic ones, and that i.v. mambalgin-1 is able to exert a prophylactic effect on the development of chronic allodynia, without affecting normal cutaneous sensitivity. This supports systemic (among which orally administered) ASIC1 inhibitors as new potential therapeutic leads against migraine and headaches, and this is in good agreement with data showing that a preventive daily therapy with i.p. amiloride in mice partially reduces acute NTG-induced as well as chronic basal mechanical paw hypersensitivity (Tipton *et al.*, 2016). A pilot open clinical study has also shown that systemic treatment with amiloride reduced aura and headache symptoms in four of seven patients with intractable aura (Holland *et al.*, 2012). The drawback of amiloride, which is used in humans as a diuretic and antihypertensive, is its poor specificity, and our data suggest that more specific ASIC1 blockers like mambalgin-1 could also be used (i) to relieve migraine attack, with benefits on subsequent chronification, (ii) to relieve established chronic allodynia and (iii) as a preventive treatment against chronification.

Acknowledgements

We thank R. Dallel for initial help with the ISDN-induced model in rats and discussion, D. Servent for providing synthetic mambalgin-1, E. Deval, P. Inquimbert, J. Noël, M. Salinas, M. Chafai, S. Marra and T. Besson for helpful discussions, M. Lazdunski for his support, V. Friend for expert technical assistance, and V. Berthieux for secretarial assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20110421309) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV4-0009, ANR-17-CE18-0019 and ANR-11-LABX-0015-01).

Author contributions

C.V., E.P., M.L.M., E.L. and A.B. designed the research. C.V., E.P., S.D., M.D. and A.B. performed the research, and C.V., E.P., S.D., M.L.M., E.L. and A.B. wrote the paper.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

References

- Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA *et al.* (2017a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 174: S17–S129.
- Alexander SP, Peters JA, Kelly E, Marrion NV, Faccenda E, Harding SD *et al.* (2017b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 174: S130–S159.
- Ashina M, Hansen JM, Olesen J (2013). Pearls and pitfalls in human pharmacological models of migraine: 30 years' experience. *Cephalalgia* 33: 540–553.
- Baron A, Diochot S, Salinas M, Deval E, Noel J, Lingueglia E (2013). Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 75: 187–204.
- Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI *et al.* (2010). Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia* 30: 170–178.
- Bernstein C, Burstein R (2012). Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology. *J Clin Neurol* 8: 89–99.

- Bigal ME, Lipton RB (2009). Overuse of acute migraine medications and migraine chronification. *Curr Pain Headache Rep* 13: 301–307.
- Bigal ME, Serrano D, Buse D, Scher A, Stewart WF, Lipton RB (2008). Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: a longitudinal population-based study. *Headache* 48: 1157–1168.
- Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, Medzihradsky KF, Zhou S, King D *et al.* (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479: 410–414.
- Boyer N, Dallel R, Artola A, Monconduit L (2014). General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain* 155: 1196–1205.
- Burgos-Vega C, Moy J, Dussor G (2015). Meningeal afferent signaling and the pathophysiology of migraine. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131: 537–564.
- Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R *et al.* (2010). Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol* 68: 81–91.
- Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB *et al.* (2007). Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 27: 13251–13260.
- Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10240–10245.
- Cho JH, Choi IS, Nakamura M, Lee SH, Lee MG, Jang IS (2015). Proton-induced currents in substantia gelatinosa neurons of the rat trigeminal subnucleus caudalis. *Eur J Pharmacol* 762: 18–25.
- Dallel R, Descheemaeker A, Luccarini P (2018). Recurrent administration of the nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a persistent cephalic cutaneous hypersensitivity: a model for migraine progression. *Cephalalgia* 38: 776–785.
- Deval E, Lingueglia E (2015). Acid-sensing ion channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* 94: 49–57.
- Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V *et al.* (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27: 3047–3055.
- Diochot S, Alloui A, Rodrigues P, Dauvois M, Friend V, Aissouni Y *et al.* (2016). Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 157: 552–559.
- Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS *et al.* (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490: 552–555.
- Dussor G (2015). ASICs as therapeutic targets for migraine. *Neuropharmacology* 94: 64–71.
- Edelmayer RM, Vanderah TW, Majuta L, Zhang ET, Fioravanti B, De Felice M *et al.* (2009). Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann Neurol* 65: 184–193.
- Farkas S, Bolcskei K, Markovics A, Varga A, Kis-Varga A, Kormos V *et al.* (2016). Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 77: 33–44.
- Ferrari LF, Levine JD, Green PG (2016). Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 317: 121–129.
- Flegel C, Schobel N, Altmüller J, Becker C, Tannapfel A, Hatt H *et al.* (2015). RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS One* 10: e0128951.
- Flores Ramos JM, Devoize L, Descheemaeker A, Molat JL, Luccarini P, Dallel R (2017). The nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a cephalic cutaneous hypersensitivity, associated with sensitization of the medullary dorsal horn. *Neuroscience* 344: 157–166.
- Fu H, Fang P, Zhou HY, Zhou J, Yu XW, Ni M *et al.* (2016). Acid-sensing ion channels in trigeminal ganglion neurons innervating the orofacial region contribute to orofacial inflammatory pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43: 193–202.
- Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S (2017). Pathophysiology of migraine: a disorder of sensory processing. *Physiol Rev* 97: 553–622.
- Hansen EK, Olesen J (2017). Towards a pragmatic human migraine model for drug testing: 2. Isosorbide-5-mononitrate in healthy individuals. *Cephalalgia* 37: 11–19.
- Harding SD, Sharman JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S *et al.* (2018). The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucl Acids Res* 46: D1091–D1106.
- Harris HM, Carpenter JM, Black JR, Smitherman TA, Sufka KJ (2017). The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J Neurosci Methods* 284: 63–70.
- Holland PR, Akerman S, Andreou AP, Karsan N, Wemmie JA, Goadsby PJ (2012). Acid-sensing ion channel 1: a novel therapeutic target for migraine with aura. *Ann Neurol* 72: 559–563.
- Iversen HK, Nielsen TH, Garre K, Tfelt-Hansen P, Olesen J (1992). Dose-dependent headache response and dilatation of limb and extracranial arteries after three doses of 5-isosorbide-mononitrate. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 31–35.
- Jansen-Olesen I, Tfelt-Hansen P, Olesen J (2013). Animal migraine models for drug development: status and future perspectives. *CNS Drugs* 27: 1049–1068.
- Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, Sen ZD *et al.* (2013). Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339: 1092–1095.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Levy D (2009). Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr Pain Headache Rep* 13: 237–240.
- Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML *et al.* (2008). Cutaneous allodynia in the migraine population. *Ann Neurol* 63: 148–158.
- Lipton RB, Fanning KM, Serrano D, Reed ML, Cady R, Buse DC (2015). Ineffective acute treatment of episodic migraine is associated with new-onset chronic migraine. *Neurology* 84: 688–695.
- Lipton RB, Munjal S, Buse DC, Bennett A, Fanning KM, Burstein R *et al.* (2017). Allodynia is associated with initial and sustained response to acute migraine treatment: results from the American migraine prevalence and prevention study. *Headache* 57: 1026–1040.
- Lopes DM, Denk F, McMahon SB (2017). The molecular fingerprint of dorsal root and trigeminal ganglion neurons. *Front Mol Neurosci* 10: 1–11.

- Louter MA, Bosker JE, van Oosterhout WP, van Zwet EW, Zitman FG, Ferrari MD *et al.* (2013). Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain* 136: 3489–3496.
- Manteniotis S, Lehmann R, Flegel C, Vogel F, Hofreuter A, Schreiner BS *et al.* (2013). Comprehensive RNA-Seq expression analysis of sensory ganglia with a focus on ion channels and GPCRs in Trigeminal ganglia. *PLoS One* 8: e79523.
- Marra S, Ferru-Clement R, Breuil V, Delaunay A, Christin M, Friend V *et al.* (2016). Non-acidic activation of pain-related acid-sensing ion channel 3 by lipids. *EMBO J* 35: 414–428.
- Mazucca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N *et al.* (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10: 943–945.
- Mourier G, Salinas M, Kessler P, Stura EA, Leblanc M, Tepshi L *et al.* (2016). Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition. *J Biol Chem* 291: 2616–2629.
- Nahman-Averbuch H, Shefi T, Schneider VJ 2nd, Li D, Ding L, King CD *et al.* (2018). Quantitative sensory testing in patients with migraine: a systematic review and meta-analysis. *Pain* 159: 1202–1223.
- Olesen J, Ashina M (2015). Can nitric oxide induce migraine in normal individuals? *Cephalalgia* 35: 1125–1129.
- Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A (2014). Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain* 155: 269–274.
- Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC (1999). Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res* 849: 1–15.
- Salinas M, Besson T, Delettre Q, Diochot S, Boulakirba S, Douguet D *et al.* (2014). Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* 289: 13363–13373.
- Scher AI, Buse DC, Fanning KM, Kelly AM, Franznick DA, Adams AM *et al.* (2017). Comorbid pain and migraine chronicity: the chronic migraine epidemiology and outcomes study. *Neurology* 89: 461–468.
- Schytz HW, Hargreaves R, Ashina M (2017). Challenges in developing drugs for primary headaches. *Prog Neurobiol* 152: 70–88.
- Serrano D, Buse DC, Manack Adams A, Reed ML, Lipton RB (2015). Acute treatment optimization in episodic and chronic migraine: results of the American migraine prevalence and prevention (AMPP) study. *Headache* 55: 502–518.
- Thomsen LL, Brennum J, Iversen HK, Olesen J (1996). Effect of a nitric oxide donor (glyceryl trinitrate) on nociceptive thresholds in man. *Cephalalgia* 16: 169–174.
- Tipton AF, Tarash I, McGuire B, Charles A, Pradhan AA (2016). The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine. *Cephalalgia* 36: 1048–1056.
- Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A *et al.* (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. GBD 2015 disease and injury incidence and prevalence collaborators. *Lancet* 388: 1545–1602.
- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386: 173–177.
- Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC *et al.* (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34: 463–477.
- Yan J, Edelmayer RM, Wei X, De Felice M, Porreca F, Dussor G (2011). Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain* 152: 106–113.
- Yan J, Wei X, Bischoff C, Edelmayer RM, Dussor G (2013). pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache* 53: 1250–1261.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

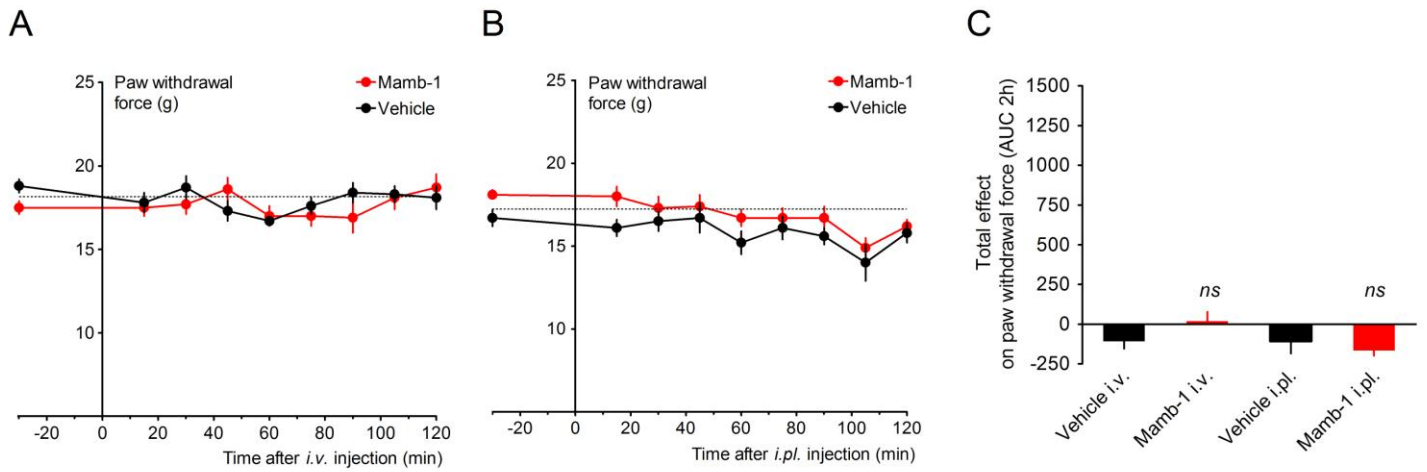
<https://doi.org/10.1111/bph.14462>

Figure S1 Absence of effect of intravenous and local intraplantar injections of mambalgin-1 on paw mechanical sensitivity of naive rats.

Figure S2 Migraine-like, ISDN-induced cephalic and extra-cephalic acute and chronic mechanical allodynia.

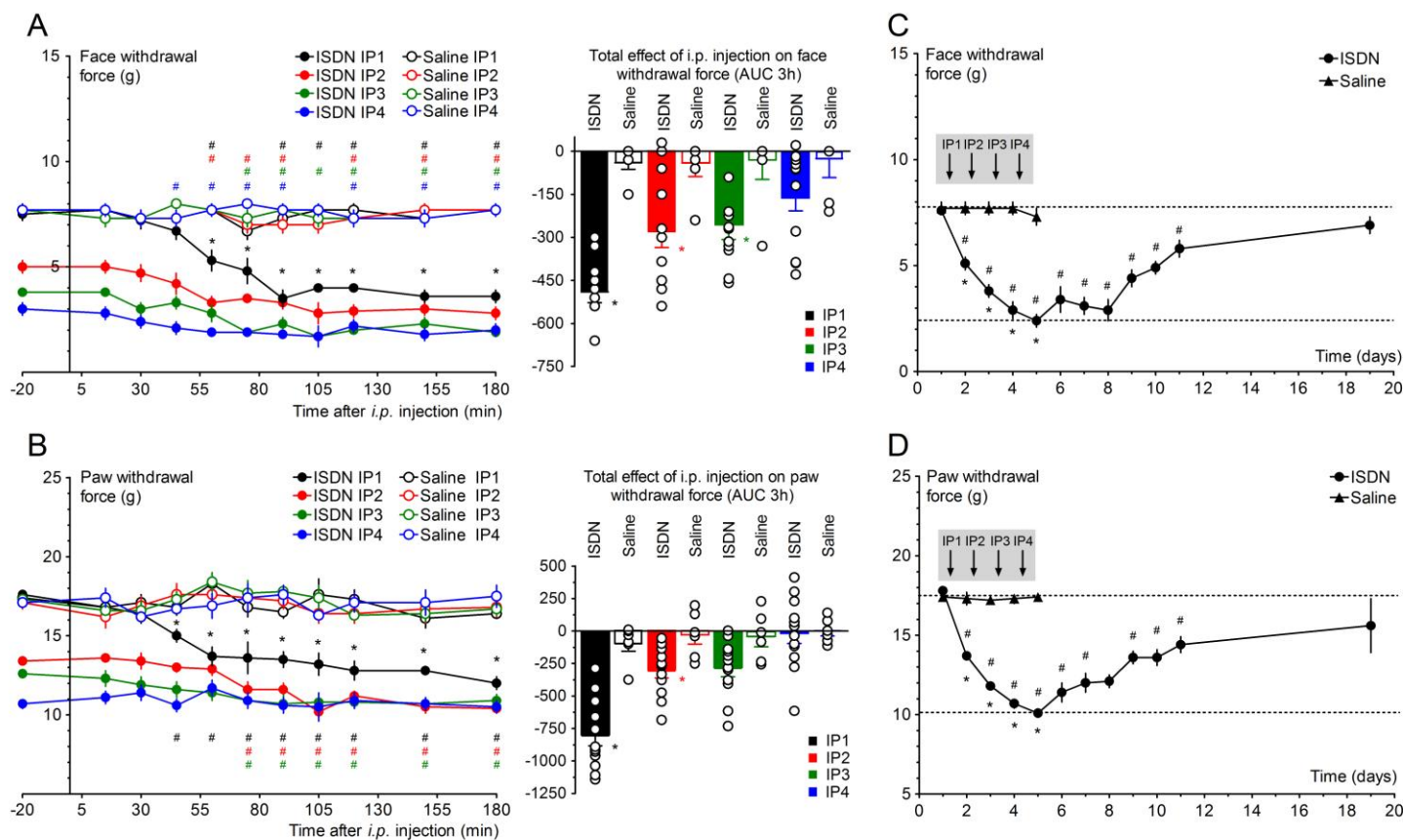
Figure S3 Absence of effect of intraplantar injection of mambalgin-1 on ISDN-induced cephalic and extra-cephalic chronic mechanical allodynia.

Figure S4 Mambalgin-1 does not inhibit the epithelial sodium channel.



Supplementary Fig. 1: Absence of effect of intravenous and local intraplantar injections of mambalgin-1 on paw mechanical sensitivity of naive rats.

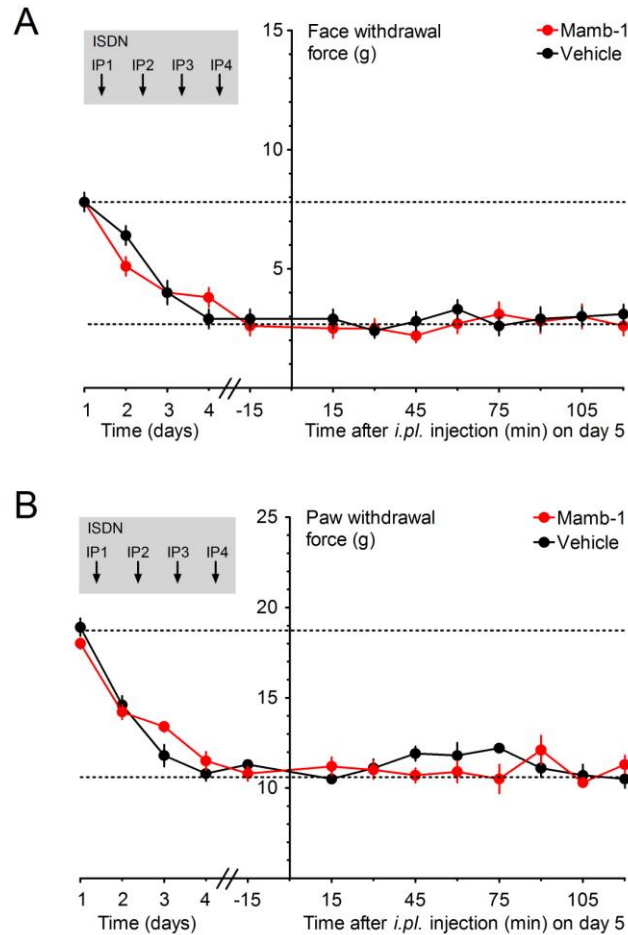
A, B - Effect of *i.v.* (**A**) and *i.pl.* (**B**) Mamb-1 on paw mechanical sensitivity. Paw mechanical withdrawal force (g), mean \pm SEM, n=7-14, No significant statistical difference compared to vehicle with Mann Whitney non parametric test. **C**, -Total effect of *i.v.* and of *i.pl.* Mamb-1 on paw mechanical withdrawal force calculated as the Area Under Curve (AUC) during 2 hours after the injection. Mean \pm SEM, no significant statistical difference compared to vehicle with Mann Whitney non parametric test.



Supplementary Fig. 2: Migraine-like, ISDN-induced cephalic and extra-cephalic acute and chronic mechanical allodynia.

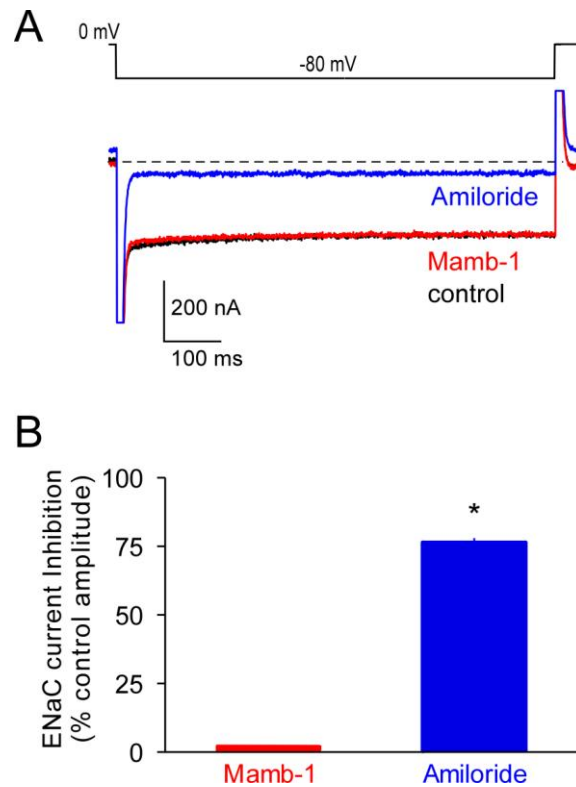
A, B - Left panels - Kinetics of the effects of each of the four consecutive daily *i.p.* injections of the ISDN (10 mg/kg) or of saline control on the face mechanical withdrawal threshold measured with von Frey filaments (**A**) and on the hindpaw mechanical withdrawal threshold measured with dynamic plantar aesthesiometer (**B**) on the same rats. Mean \pm SEM, n = 6 and 12 for saline and ISDN, respectively: * $p < 0.05$ with Mann Whitney non parametric test compared to saline control (ISDN IP1 only), # $p < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to basal value before ISDN. **Right panels** - Total effect on the same rats of each injection on face (**A**) and paw (**B**) withdrawal force calculated as the Area Under Curve (AUC) during 3 hours after the injection. Mean \pm SEM and individual data points, * $p < 0.05$ with Mann Whitney non parametric test compared to saline control.

C, D - Basal mechanical face (**C**) and paw (**D**) withdrawal force threshold (g) measured on the same rats before each daily injection and after the last fourth injection. Mean \pm SEM, n=6 and 12 for saline and ISDN, respectively: * $p < 0.05$ with Mann Whitney non parametric test compared to saline control; # $p < 0.05$ with Wilcoxon matched paired test compared to control before the first injection.



Supplementary Fig. 3: Absence of effect of intraplantar injection of mambalgin-1 on ISDN-induced cephalic and extra-cephalic chronic mechanical allodynia.

Kinetics of the effect of the local *i.pl.* injection of Mamb-1 (6.7 nmol/kg) one day after the last ISDN injection (*i.e.*, on day 5) on face (**A**) and paw (**B**) mechanical withdrawal force (g) measured on the same rats (n=9). The basal mechanical withdrawal force (g) was measured before each daily ISDN injection (left side of the y axis), showing the chronification process of cutaneous allodynia day after day. Mamb-1 effect was not significantly different ($p > 0.05$) from vehicle (Mann Whitney non parametric test).



Suppl. Fig. 4: Mambalgin-1 does not inhibit the epithelial sodium channel.

cDNAs of the α , β and γ subunits of the epithelial sodium channel (ENaC, 10 ng/ μ l each), were co-injected into *Xenopus* oocytes (oocytes preparation and cDNA injections as previously described (Besson *et al.*, 2017)), and oocytes were kept during two days at 19°C in saline (ND96) extracellular solution (96 mM NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ and 5 mM HEPES, pH7.4 with NaOH) where Na⁺ has been replaced by N-methyl D-glucamine, a non-permeant cation. **A**, Original traces of ENaC current recorded in Na⁺-containing ND96 during voltage-steps from 0 to -80 mV every 10 s, in control condition and after application of either Mamb-1 (3 μ M, a concentration that inhibits ASIC channels by 70 to 100% (Diochot *et al.*, 2012)) or amiloride (10 μ M). Dotted line: zero current level. **B**, ENaC current (% of control current amplitude) was blocked by amiloride as expected (inhibition of 77 ± 5%) but was not inhibited by Mamb-1 (2 ± 0.9%). Mean ± SEM, n=8, * p<0.05 with Wilcoxon matched paired non parametric test.

III. Résultats complémentaires

Comme évoqué en préambule de cet article, les premières données obtenues par le laboratoire sur ce modèle concernent les effets centraux de la mambalgine. Ceux-ci ont été explorés dans les deux formes du modèle de migraine : aigue et chronique. Le protocole expérimental utilisé est donc similaire à celui présenté dans l'article, avec les variations suivantes :

-La sensibilité mécanique extra-faciale est évaluée avec des filaments de von Frey (appareil de von Frey dynamique dans l'article).

-Certaines injections *icv* de mambalgine sont réalisées avec de la toxine purifiée à partir du venin brut (toxine synthétique dans l'article).

Cette injection *icv* se déroule de la façon suivante : Les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane, induction à 4% avec un débit de 2L/min puis entretien à 2,5% avec un débit à 1,5L/min et aspiration au masque avec un débit de 150ml/min. L'injection stéréotaxique est faite à l'aide d'une seringue Nanofil de 10 μ l sans volume mort. La concentration de mambalgine utilisée est 100 μ M et le véhicule utilisé est le même que pour l'article et les injections *iv* (NaCl 0,9% et BSA 0,05%). Les repères stéréotaxiques pour atteindre le ventricule latéral gauche chez le rat à partir du Bregma sont les suivants : -0,8mm en antéro-postérieur et 1,4mm en latéral et -3,6mm en profondeur. L'injection *icv* est réalisée 90min après celle d'ISDN (modèle aigue, temps nécessaire au développement de l'allodynie) ou le lendemain de la 4^{ème} injection (modèle chronique). 10 à 15min sont nécessaires pour injecter un animal. La première mesure de la sensibilité mécanique faciale et extra-faciale est réalisée 15min après l'injection *icv*.

Les résultats sont présentés dans la Figure 23. De façon intéressante, l'injection *icv* de mambalgine dans le modèle de migraine aigue reverse totalement et durablement l'allodynie cutanée faciale et extra-faciale (Figure 23 A-B). Les seuils de sensibilité mécaniques passent de $2,9\pm 0,4$ à $9,8\pm 1,1$ g pour la face dès 15min post-injection et de $4,4\pm 0,3$ à $14,6\pm 1,6$ g pour la patte. Il convient de souligner l'effet particulièrement fort de la mambalgine contre l'allodynie extra-faciale lorsque'elle est injectée par voie *icv*. A l'inverse, par la voie *iv* (Figure 2 de l'article), l'effet est beaucoup plus faible. Dans le modèle de migraine chronique réalisé sur des effectifs restreints (n=4 et 6) (Figure 23 C-D), une injection de mambalgine produit des effets anti-allodyniques similaires. Une heure après injection *icv*, les seuils sont passés de $3,7\pm 0,8$ à $9,2\pm 4,3$ g pour la face (Figure 23C) et de $5,7\pm 1,0$ à $20,3\pm 5,4$ g pour la patte (Figure 23D). Néanmoins, il serait nécessaire de compléter ces expériences du fait des faibles effectifs et de la grande variabilité observée afin de confirmer l'implication des canaux ASIC1a centraux dans l'allodynie migraineuse chronique et le bénéfice thérapeutique de leur blocage.

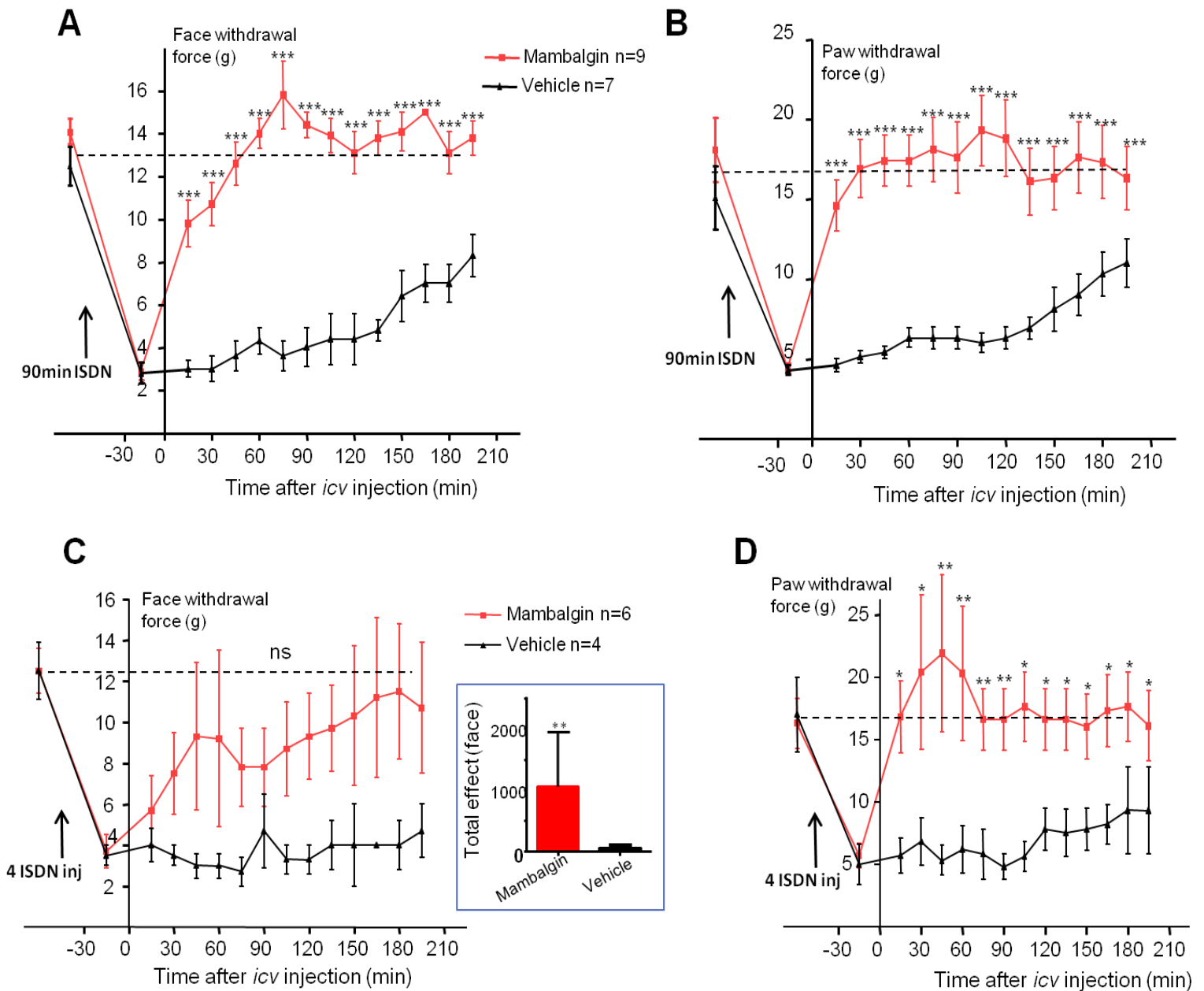


Figure 23 : Effets anti-allodynie consécutifs à une injection centrale par icv de mambalgine dans les modèles de migraine aiguë et chronique

(A-B) Cinétique des effets d'une injection icv de mambalgine ($100\mu\text{M}$) ou de véhicule sur l'allodynie faciale (A) et extra-faciale (B) après une injection intrapéritonéale d'ISDN. Moyenne \pm SEM. N=9-7. Two-way ANOVA avec post test Bonferroni (mambalgine versus véhicule, significatif pour chaque point en A et B, $*p<0,05$).

(C-D) Cinétique des effets d'une injection icv de mambalgine ($100\mu\text{M}$) ou de véhicule sur l'allodynie faciale (C) et extra-faciale (D) un jour après les quatre injections intrapéritonéales d'ISDN. Cadre : Effet total sur la sensibilité faciale calculé à partir de l'aire sous la courbe. Moyenne \pm SEM. N=4-6. Cadre : Test Mann Whitney, mambalgine versus véhicule $*p<0,05$. Cinétique : Two-way ANOVA avec post test Bonferroni (mambalgine versus véhicule, significatif pour chaque point pour la sensibilité extra-faciale $*p<0,05$, non significatif pour la sensibilité faciale).

L'article précédent s'est focalisé sur l'effet très probablement périphérique de la mambalgine injectée par voie *iv*. Ces résultats supplémentaires montrent que le blocage des canaux contenant ASIC1a centraux par la mambalgine dans ces deux modèles de migraine est tout aussi bénéfique que celui périphérique. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par l'équipe de Peter Goadsby mentionnés en introduction de l'article, qui suggèrent une implication des canaux ASIC1a centraux dans les processus migraineux (Holland et al., 2012).

Ces données permettent donc d'étendre les implications des canaux ASIC en conditions pathologiques ainsi que le potentiel thérapeutique de la mambalgine et plus généralement des bloqueurs ASIC1 : les canaux ASIC1 périphériques, et très certainement ASIC1b, contribuent à l'allodynie faciale et extra-faciale de type migraineuse, de même que les canaux ASIC1a centraux. Cette implication à différents niveaux suggère également des mécanismes différents dans les voies de la douleur pour chaque sous-unité, comme démontré auparavant pour la douleur inflammatoire (Diochot et al., 2012). Il est important de noter également que les canaux ASIC existants sous forme hétéromérique, la combinaison des sous-unités ASIC1a et ASIC1b avec d'autres sous-unités, voire même possiblement ensemble dans certains neurones sensoriels, doit aussi être prise en considération.

Ces résultats complémentaires ouvrent donc de nombreuses perspectives et hypothèses sur le rôle global des canaux ASIC dans la migraine, discutées en détails dans la partie Discussion et Perspectives.

Partie II : Exploration des propriétés biophysiques, pharmacologiques et des régulations affectant les canaux ASIC1b.

I. Contexte de l'étude

Malgré l'implication démontrée ou fortement suggérée d'ASIC1b dans un nombre croissant de modèles de douleur comme la douleur migraineuse présentée dans la première partie des Résultats, la littérature sur ASIC1b reste maigre comparée aux autres sous-unités comme ASIC1a ou ASIC3. Les paramètres biophysiques des canaux (cinétiques, sensibilité au pH etc.) sont bien décrits dans l'ensemble, mais certains aspects restent à explorer : comme illustré en Introduction, les modulations et les possibles régulations en lien avec la douleur et affectant ASIC1b ont été très peu étudiées, la plupart des études s'étant jusque-là focalisées sur ASIC1a et/ou ASIC3. Le but ici était donc d'implémenter nos connaissances sur le canal ASIC1b en adressant plusieurs points:

-Une exploration des effets de plusieurs modulateurs (voies de signalisation, molécules endogènes) sur ASIC1b, avec la caractérisation détaillée d'une voie de signalisation identifiée par ces travaux et régulant ASIC1b : la voie C-Jun N-terminal Kinase (JNK).

-Une caractérisation biophysique et pharmacologique des canaux ASIC1b et des hétérotrimères associés.

-La mambalgine, en association avec les autres toxines ciblant les canaux ASIC, offre également l'opportunité d'étudier en détail la contribution potentielle des canaux contenant ASIC1b dans le courant ASIC natif des neurones sensoriels. Cet aspect et cette contribution, bien que suggérés auparavant (Diochot et al., 2012; Lin et al., 2016), n'ont jamais été explorés en détail jusqu'à présent chez la souris. Comme évoqué en introduction, les différentes études de caractérisation des courants ASIC des neurones sensoriels chez cette espèce ne sont pas forcément cohérentes. Avec ces outils pharmacologiques et un protocole de culture primaire spécifique, nous pouvons proposer une nouvelle caractérisation des courants ASIC chez la souris.

Ces aspects ont été étudiés principalement par des techniques d'électrophysiologie (patch-clamp sur lignée cellulaire et culture primaire de neurones sensoriels) et de biologie moléculaire. Les données obtenues sur la régulation des ASIC par la voie de signalisation JNK seront d'abord présentées dans un article en préparation intitulé « *C-Jun N-terminal kinase regulation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 1b and 3* ». Les études biophysiques, pharmacologiques et sur les régulations additionnelles d'ASIC1b et des hétéromères associés seront ensuite présentées en tant

que résultats complémentaires, de même que des données concernant la caractérisation des courants ASIC dans les neurones sensoriels. J'ai réalisé l'intégralité des expériences présentées.

Afin de découvrir potentiellement de nouvelles régulations, une attention particulière fut portée sur le segment intracellulaire N-terminal d'ASIC1b, étant beaucoup plus long et différent de celui d'ASIC1a (voir Introduction). Pour ce faire, une étude *in silico* fut réalisée. Un logiciel de prédiction d'interaction (Eukaryotic Linear Motif (ELM) (Dinkel et al., 2012)) a été utilisé sur les segments intracellulaires d'ASIC1a, 1b, 2a, 2b et 3 provenant de l'homme, de la souris et du rat. Un autre logiciel de prédiction de sites de phosphorylation a également été utilisé en complément (Group Prediction Site software (GPS v3.0) (Xue et al., 2008)). Les résultats prédictifs sont présentés dans les Tables 12 (GPS) et 13 (ELM). De cette façon, il a ainsi été possible d'identifier la MAP kinase JNK comme candidat potentiel. Un site prédictif fut donc identifié sur le segment N-terminal d'ASIC1b (Sérine 59) mais aussi d'ASIC2a (Sérine 6) et sur le segment C-terminal d'ASIC3 (Thréonine 512 chez le rat et l'homme). De façon intéressante, le site potentiel JNK n'est pas conservé chez le variant ASIC3 de souris. En complément, les données obtenues avec ELM suggèrent sur le segment N-terminal d'ASIC1b l'existence de deux motifs consensus de liaison avec TRAF2, une protéine partenaire du récepteur au TNF α (Figure 7). De plus, ASIC3 dispose de deux sites d'interactions potentiels avec les MAPK localisés en N- et C-terminal (Table 13). L'ensemble de ces données de bioinformatique ont donc motivé l'étude de la régulation des canaux ASIC par la voie JNK.

Nous avons ainsi identifié JNK comme modulateur positif de l'activité des canaux ASIC1b et ASIC3, probablement par phosphorylation directe. Une régulation directe des ASIC par les MAPK n'était pas connue jusqu'à présent, hormis une seule étude sur une potentielle implication d'ERK sur les courants ASIC des neurones sensoriels (Qu et al., 2015). Ces travaux montrent que les canaux ASIC1b et ASIC3 sont régulés positivement par la voie JNK, tout comme Les canaux hétéromériques contenant au moins l'une de ces sous-unités. Les courants ASIC natifs sont pour la grande majorité régulés positivement par la voie JNK. Il existe une différence étonnante entre espèces dans ces effets : chez le rat, ASIC1b et ASIC3 sont tous deux régulés mais seul ASIC1b l'est chez la souris. L'application de TNF α , un médiateur retrouvé dans de nombreuses pathologies douloureuses et connu pour activer la voie JNK via ses récepteurs spécifiques, potentialise aussi les courants ASIC natifs de façon majoritairement JNK-dépendante.

Position	Residue	Kinase	Motif	GPS score	Cut-off
59	S	JNK2	ELDEGDDSPRDLVAF	32,676	6,118
37	S	CK2	HRQQQDSSESEEEEE	22,326	7,389
39	S	CK2	QQQDSSESEEEEEKE	22,953	7,389
10	S	VRK2	IQIFCSVSFSSGEEA	19	4
76	S	BARK1	SCTLHGASHVFEVGG	18,119	3,384
8	S	VRK2	MPIQIFCSVSFSSGE	17,25	4
59	S	MAPK11	ELDEGDDSPRDLVAF	17,074	5,425
13	S	VRK2	FCSVSFSSGEEAPGS	16,5	4
51	S	CK2	EKEMEAGSELDEGDD	16,122	7,389
59	S	CDK5	ELDEGDDSPRDLVAF	16,111	7,867

Position	Residue	Kinase	Motif	GPS score	Cut-off
558	T	BARK1	RGTFEDFTC*****	20,452	3,384
553	T	BARK1	PHHPARGTFEDFTC*	16,333	3,384
553	T	PRKCA	PHHPARGTFEDFTC*	15,515	5,842
510	S	PRKCB	QKEAKRSSADKGVAL	14,948	8,434
558	T	GRK	RGTFEDFTC*****	14,345	6,103
509	S	RPS6KA5	CQKEAKRSSADKGVA	13,778	8,69
553	T	BARK	PHHPARGTFEDFTC*	13,628	3,806
558	T	PLK	RGTFEDFTC*****	13,403	8,093
509	S	AurC	CQKEAKRSSADKGVA	12,833	6,434
553	T	PAKA	PHHPARGTFEDFTC*	11,953	6,397

Table 12: Liste des 10 phosphorylations potentielles les plus probables obtenus avec GPS3.0 et de leur site en N-terminal d'ASIC1b (haut) et en C-terminal (bas)

Position	Residue	Pattern	Elm Description	Probability
rASIC1b 13-16 39-42	SGEE SEEE	[PSAT].[QE]E	TRAF2-binding consensus motif. Members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)	4.300e-03
rASIC1b 10-15	SFSSGE	[DNS].[DES][TNS]GE	Motif that binds to the Kelch domain of KEAP1 with high affinity, for Cul3-based E3 ligase	5.950e-05
rASIC1b 554-559	FEDFTC	...[VLIFY].[ACVILF]	C-terminal class 2 PDZ-binding motif	7.889e-05
rASIC1b 546-551	PHHPAR	P..P.[KR]	Motif recognized by class II SH3 domains	1.111e-03
rASIC3 12-20	RRQASDIRV	[KR]{0,2}[KR].{0,2}[KR].{2,4}[ILVM].[ILVF]	MAPK interacting molecules docking motif	4.324e-03
rASIC3 497-505	RTHVPHLSL	[RK].{2,4}[LIVMP].[LIV].[LIVMF]	Kinase docking motif mediating interaction towards the ERK1/2 and p38 subfamilies of MAP kinases	2.584e-03
rASIC3 528-533	YLVTRL	...[ST].[ACVILF]	C-terminal class 1 PDZ-binding motif	7.255e-05
rASIC3 504-510	SLGPRPP	...[PV]..P	Motif recognized by class I SH3 domains	1.317e-02

Table 13: Interactions potentielles obtenues sur les segments N- et C-terminaux d'ASIC1b et ASIC3 avec ELM

II. Article préliminaire: « C-Jun N-terminal kinase regulation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 1b and 3 »

C-Jun N-terminal kinase regulation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 1b and 3

Clément Verkest^{1,2,3}, Anne Baron^{1,2,3}, and Eric Lingueglia^{1,2,3},

¹: Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, France.

²: LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France.

³: FHU InovPain, Université Côte d'Azur, Nice, France.

Acknowledgements : We thank E. Deval, J. Noël, M. Salinas, A. Negm, M. Chafai, L. Pidoux, K. Delanoë and B. Labrum for helpful discussions, M. Lazdunski for his support, V. Friend and J. Salvi-Leyral for expert technical assistance, and V. Berthieux for secretarial assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE18-0019, ANR-17-CE16-0018 and ANR-11-LABX-0015-01).

Abstract

Neuronal proton-gated Acid-sensing ion channels (ASICs) participate in the detection of tissue acidosis, a phenomenon often encountered in painful pathological disease. In addition, such conditions often involved in parallel the activation of various signaling pathways such as the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs). Ultimately, this leads to modifications in the phenotype of sensory neurons. Here, we identify one member of the MAPKs, c-Jun N-terminal Kinase (JNK), as a regulator of ASIC channels in rodent sensory neurons. JNK increases the amplitude of H⁺-induced currents in a subunit and species dependent manner, the ASIC1b subunit being the sole target in mice while both ASIC1b and ASIC3 subunits are targeted in rat. The regulation by JNK on recombinant ASIC1b- and ASIC3-containing channels (homomers and heteromers) is lost upon mutation of a putative phosphorylation site within their intracellular N- and the C-terminal domain, respectively. Moreover, JNK signaling regulates native ASIC1b- and ASIC3-containing channels in rodent sensory neurons, and is involved in the potentiation of ASIC activity by the proinflammatory cytokine TNF α . Collectively, our data propose a novel mechanism of regulation of sensory neuron-expressed ASIC1b- and ASIC3-containing channels that may contribute to peripheral sensitization and pain hypersensitivity.

Introduction

Chemodetection of noxious and innocuous stimuli by sensory neurons encompasses the detection of a broad range of chemically distinct molecules such as protons, lipids, irritants, toxins or cytokines, often encountered in inflammatory or itch processes (Dong and Dong, 2018; Petho and Reeh, 2012). The various pain-related mediators that are released are acting on receptors and associated signaling pathways, which are critical in the establishment of pain hypersensitivity (Hucho and Levine, 2007; Pinho-Ribeiro et al., 2017). It includes several protein kinases like PKA, PKC (Reichling and Levine, 2009) and also several members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family like extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 and c-jun N-terminal kinase (JNK) (Doya et al., 2005; Ji et al., 2002; Obata et al., 2004). JNK is of particular interest regarding its activation in DRG neurons that has been well established in various pain models: migraine (Huang et al., 2016), neuropathic pain (Manassero et al., 2012; Zhuang et al., 2006) or cancer (Simonetti et al., 2014).

Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) are critical for the detection of tissue acidosis, which is a hallmark of several painful diseases (Deval and Lingueglia, 2015). At least six subunits are expressed in rodents (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 and ASIC4) encoded by four genes, which associate in trimeric functional channels that are widely distributed in the nervous system, especially all along the pain pathway. Besides protons, ASICs can be modulated by multiple pain-related mediators, including lipids (Marra et al., 2016; Smith et al., 2007), small molecules (Cadiou et al., 2007; Li et al., 2010; Wang et al., 2013), neuropeptides (Askwith et al., 2000). Early work on ASICs in sensory neurons has shown that the ASIC3 subunit is an important player in different pain models (Deval et al., 2008; Marra et al., 2016; Price et al., 2001; Yan et al., 2013). Recent pharmacological and genetic evidences have refined this idea by proposing that ASIC1 subunits, and especially sensory neuron-specific ASIC1b, can also participate in peripheral pain (Bohlen et al., 2011; Diochot et al., 2012, 2016; Verkest et al., 2018).

We found here that the MAPK JNK is a potent regulator of the DRG-specific ASIC1b- and ASIC3-containing channels. JNK potentiates the activity of recombinant and native ASIC1b- and ASIC3-containing channels in a species-dependent manner. The effect is dependent of key residues in a putative phosphorylation site within the N-terminal domain of ASIC1b and the C-terminal domain of rat and human, but not mouse, ASIC3. JNK signaling also potentiates activation of native ASIC1b- and ASIC3-containing channels by protons in DRG neurons as shown using a pharmacological approach. We therefore provide molecular and cellular evidences of a regulation by the MAPK JNK of sensory neuron-expressed ASIC1b- and ASIC3-containing channels that probably significantly participates to their role in various pain conditions.

Materials and Methods

Animal

Experiments were performed on male C57BL/6J mice of 6-14 week-old weighting 20-25g and 6-8 week-old male Wistar rats (Charles River Laboratories). Animals were housed in a 12 hours light-dark cycle with food and water available ad libitum and were acclimated for at least one week before

being tested. Animal procedures were approved by the Institutional Local Ethical Committee and authorized the French Ministry of Research according to the European Union regulations and the Directive 2010/63/EU (Agreements C061525 and 01550.03 and XXXXXX). Animals were sacrificed at experimental end points by CO₂ euthanasia.

Cell culture

HEK293 cells were grown in DMEM medium (Lonza) with 10% fetal bovine serum (Biowest) and 1% penicilline/streptomycine (Lonza) in an incubator at 37°C with 5% CO₂. One day after being plated at a density of 20,000 cells in 35 mm diameter dishes, cells were transfected with one or several of the following plasmids : pIRES2-rASIC1a-EGFP, pCI-rASIC1a, pIRES2-rASIC1b-EGFP, pCI-rASIC1b, pCI-rASIC2a, pIRES2-rASIC2b-EGFP, pCI-rASIC2b, pIRES2-rASIC3-EGFP, pCI-rASIC3, pCDNA3.1 rTRPV1, pIRES2-EGFP, pIRES2-hASIC1b-EGFP, pIRES2-hASIC3a-EGFP or pIRES2-hASIC1a-EGFP vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). 0.5ug of DNA per dish was generally used, unless for homomeric ASIC3 (1µg). For co-expression of two ASIC subunits, a 1:1 plasmid ratio was used. Fluorescent cells were selected for patch-clamp recordings 2–4 days after transfection. Heteromeric currents were identified by combining several biophysical and pharmacological properties.

Mutagenesis

Point mutants were obtained by recombinant PCR strategies as previously described (Ref) using the following primers: rASIC1b S59A, forward: 5'AGGGTGATGACGCACCTAGGGAC 3', reverse: 5'GTCCCTAGGTGCGTCATCACCT 3'. mASIC3 A509T, forward: 5'CCTCCTACCACTCCCAGTGCT 3', reverse: 5'AGCACTGGGAGTGGTAGGAGG 3'. Constructs were subsequently subcloned into pIRES2-EGFP vector using NheI-EcoRI restriction enzymes. All constructs were fully sequenced to confirm the presence of the mutation.

Primary culture of DRG neurons

DRG neurons were prepared from male C57Bl6J mice (6–14 weeks old) and Wistar male rats (6-8 weeks old) and processed in a similar way, unless noticed, than previously described (Francois et al., 2013). After isoflurane anesthesia, animals were killed by decapitation and thoracolumbar DRG were collected on cold HBSS and enzymatically digested at 37°C for 40min with collagenase II (Biochrom, 2mg/ml, 235U/mg) for mice and collagenase I (Worthington, 4mg/ml, 370U/mg) for rats and dispase II (Gibco, 5mg/ml, 1,76U/mg) for both. Gentle mechanical dissociation was done with a 1ml syringe and several needles with progressively decreasing diameter tips (18G, 21G and 26G) to obtain a single cell suspension. Neurons were plated on poly-D-lysine/laminin coated dishes with the following medium: Neurobasal-A (Gibco) completed with L-glutamine (Lonza, 2mM final), B27 supplement (Gibco, 1X) and 1% penicilline/streptomycine. One to two hours later, neurons were carefully washed to remove cellular debris and incubated with complete medium. The following additional growth factors were used: Nerve Growth Factor (NGF) 100ng/ml and retinoic acid, 100nM (both from Sigma), Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) 2ng/ml, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) 10ng/ml and Neurotrophin 3 (NT3) 10ng/ml (all three from Peprotech). Patch-clamp recording were done 1-4 days after plating on both "small" (capacitance <40pF) and "large" (>40pF)

diameter neurons. Acutely-dissociated mouse DRG neurons were processed the same way as above, except that they were incubated without the additional neurotrophic growth factors listed above and recorded 3-10h after plating.

Patch-clamp recording experiments

Ion currents were recorded using the whole cell patch-clamp technique. Recordings were made at room temperature using axopatch 700A (Axon Instruments) or 200B (Molecular Devices) amplifiers, with a 2-5 kHz low-pass filter. Data were sampled at 10 kHz using pClamp9 or 10 softwares. The borosilicate patch pipettes (2–7 M Ω) contained the following (in mM): 135 KCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 EGTA and 10 HEPES (pH 7.25 with KOH). For experiments investigating potent regulations by mediators or protein kinase in HEK293 cells and DRG neurons, 2.5mM Na₂-ATP was used instead of NaCl. The control bath solution contained the following (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucose and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). MES was used instead of HEPES to buffer solutions ranging from pH \leq 6. Cells were voltage-clamped at a holding potential of -60mV or -80mV for neurons (to minimize potassium channels contribution). ASIC currents were activated by a rapid pH drop by shifting one out of eight outlets of a gravity driven perfusion system from a control solution (i.e., pH 7.4 or pH 8.0) to an acidic test solution.

Activation curves were determined by activating whole-cell ASIC currents at a given test pH after a 30s perfusion of control pH7.4 or pH8.0 solution. Inactivation curves were obtained by maximally activating whole-cell ASIC currents by pH5.0, pH4.5 or pH4.0 after a 30s perfusion at a given test pH. For reactivation experiments, currents were first activated by pH5.0 and then reactivated after various time intervals at a given holding pH.

To test the effect of a mediator or a signaling pathway, several 10s control pH-pulses were applied every 30s (every 15s for ASIC3 homomeric current, every min for ASIC1a homomeric current) until reproducible ASIC current amplitude were recorded. The control amplitude was measured on the last two ASIC currents. The mediator or activator was then perfused for 5 to 10 minutes, with repetitive pH-pulses still triggering ASIC currents during this time. The amplitude of the two last currents was measured. This was followed by perfusion of an inhibitor for another 5 to 10 minutes in order (1) to test the specificity of the signaling pathway and (2) to compare the maximal inhibited current amplitude with the control amplitude and determine the occurrence of a potential endogenous basal activation. The total regulation effect was expressed as the percentage increase in peak current amplitude measured as the ratio (in %) between the current amplitude after the activator perfusion and the amplitude of the maximally inhibited current after the inhibitor (in some cases, the control responses were used). One cell per culture dish was recorded to ensure that data were not obtained from cells that had been already exposed to pharmacological compounds.

For DRG neurons, action potentials (APs) were evoked by 2ms depolarizing current injections of increasing amplitudes (Δ 50-100pA) and rheobase was determined. Acidic pH effect on membrane potential was also investigated, with 5s pulses of pH5.0 and 6.6. Then, on voltage clamp mode, a pharmacological characterization of the acid-triggered ASIC current was done by applying for 30s the ASIC inhibitory toxins, with at least 1min wash-out and 2 controls pH pulses between each toxins application. Toxins experiments were usually performed with a pH5.0 activation, also sometimes pH6.6 was additionally tested to provide further details into the ASIC current characterization. An inhibition threshold of 20% was used for a current to be considered as significantly blocked by a toxin. Investigation of the effect of a signaling pathway was then done as described previously on

HEK293 cells. Neurons that display a resting membrane potential superior to -40mV or no action potential were not selected. 154 mouse DRG neurons from 10 cultures, 49 rat DRG neurons from 4 cultures and 28 acutely-dissociated mouse DRG neurons from 4 cultures were used in the analysis.

Time constant of current decay were fitted with a single exponential function. The curves of pH-dependant activation and inactivation were fitted by a Hill function : $I = a + (I_{max} - a)/(1 + (pH_{50}/[H])^n)$, where I_{max} is the maximal current, a is the residual current, pH_{50} is the pH at which half-maximal activation/inhibition of the transient peak ASIC current was achieved, and n is the Hill coefficient. To determine reactivation parameters, the ratio of the amplitude of an experimental current versus a control current ($I/I_{control}$) was calculated and plotted as a function of the time interval (s) between the end of the control pH drop and the onset of the next pH drop. Data were fitted as a one-phase exponential following the equation: $Y = Y_{max} * [1 - \exp(-k * t)]$, with half reactivation time $T_{1/2} = 0.69/k$. AP duration (APD, in ms) was measured at the onset of a clear sharp deviation from the passive subthreshold response to the acceleration of membrane depolarization and AP firing, until the declining phase crosses the basal resting membrane potential. Time derivative of membrane voltage was calculated to determine if the falling phase had one or two component.

Site prediction analysis

Site prediction analysis was carried on intracellular N-terminal and C-terminal sequences of ASIC1a, 1b, 2a, 2b and 3 from different species (mouse, rat and human, Uniprot as source) using Eukaryotic Linear Motif (ELM) resource (Dinkel et al., 2012). Subsequent analysis for putative phosphorylation sites was run using Group Prediction Site software (GPS v3.0) (Xue et al., 2008) with a medium sensitivity threshold in order to refine the list of potential protein kinases.

Chemicals

Sodium nitroprusside (SNP, Sigma), Rp-8-pCPT-cGMPS (Tocris), Chelerythrine (Tocris), Phorbol 12, 13-dibutyrate (Tocris), H89 (Tocris), dibutyryl cAMP (Sigma), 8-pCPT-cGMP (Sigma), Arachidonic acid (Sigma), Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (OxPAPC) (InvivoGen), Lysophosphatidylcholine (LPC) 16:0 (Avanti), Anisomycin (Tocris), SP600125 (Selleckchem), TNF α (Peprotech, 10ng/ml) were prepared as stock solution and dissolved in either ethanol, DMSO or water, as appropriate. Final dilution into extracellular solution was made just before the experiments. Final concentration of ethanol or DMSO never exceeds 0.1% and was added to the control solution. ASIC toxins (PcTx1, APETx2 and Mambalgin-1) were purchased from Smartox and were dissolved in water or saline, with 0.05% Bovine Serum Albumin (BSA) added to the final solution for patch-clamp or behavior experiments in order to avoid non-specific adsorption on vessels and tubings.

Experimental design and statistical analysis

Details of experimental design, data collection/analysis, and experimenter blinding have been described under each individual experiments throughout the Materials and Methods section. Data are presented as mean \pm SEM. Number of cells and animals are indicated in the legends. For patch-clamp experiments, data within the same cell before and after treatment were analyzed by a

paired t-test or a Wilcoxon non-parametric paired test and for two different group comparisons, by an unpaired t-test or Mann Whitney non-parametric unpaired test. For multiple comparisons, a one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons was performed. $p < 0.05$ in each set of data comparisons was considered statistically significant. Analysis was performed using GraphPad Prism v4.0 and v6.0 (GraphPad Software, Inc.).

Results

Recombinant ASIC1b and ASIC3 channels are positively regulated by JNK signaling.

Activation of the MAPK JNK has been shown to play important roles in pain, and we directly investigated the effect of JNK signaling on ASIC currents expressed in HEK293 cells transiently transfected with recombinant ASIC subunits. A rapid drop of the pH from 7.4 to 5.0 evoked rASIC1b transient inward current at the holding potential of -60 mV (Fig. 1A). The cells were incubated for 5 to 10 min with the JNK activator anisomycin (50 μ M). Depending on the recorded cell, a small increase in rASIC1b peak current amplitude was sometimes observed but was not significantly different from the control current (Fig. 1B). Subsequent incubation (after washout of anisomycin) with the JNK inhibitor SP600125 (50 μ M) for another 5 to 10min induced a strong decrease of the rASIC1b current amplitude (Fig. 1A). In outside-out patches, SP600125 was shown to have no effect on the rASIC1b current amplitude, ruling-out potential non-specific inhibitory effects through direct interaction of the drug with the channel ($n=3$, not shown). The decrease of the rASIC1b current induced by SP600125 is therefore consistent with inhibition of a high basal level of JNK activity, which is also in agreement with the lack of significant stimulatory effect of anisomycin. To estimate the JNK total effect, we therefore calculated the ratio of rASIC1b peak current amplitude between the maximally JNK-stimulated (*i.e.*, after anisomycin) and the maximally JNK-inhibited (*i.e.*, after SP600125) currents. JNK increased the rASIC1b current amplitude by approximately 50% for every test pH used (+63.2 \pm 11.6% at pH6.3, +48.4 \pm 7.9% at pH6.0 and +48.0 \pm 10.9% at pH5.0) (Fig. 1B). JNK regulation did not change the biophysical properties of rASIC1b, with similar $pH_{0.5}$ for activation (6.08 \pm 0.70 after anisomycin versus 6.05 \pm 0.09 after SP600125) and inactivation (6.78 \pm 0.04 after anisomycin versus 6.80 \pm 0.04 after SP600125) (Fig. 1F) and similar inactivation time constant (Supplementary Fig. 1A).

We next explored the effect of JNK in the same conditions on the other ASIC channel isoforms. Peak current of the rASIC3 channel was also significantly potentiated (+63.4 \pm 23.1% at pH7.0 and +88.0 \pm 25.0% at pH6.6) (Fig. 1C). On the other hand, currents associated with rASIC1a and rASIC2a homomeric channels were not potentiated, whatever the test pH used (Fig 1D). ASICs can also form heteromeric channels, and we next assessed the effect of JNK on several ASIC heteromers. JNK potentiated the peak current of all the rat ASIC1b- or ASIC3-containing heteromeric channels tested, but not of rat ASIC1a+2a heteromers (Fig 1E). The sustained currents associated to ASIC3 (Salinas et al., 2009), *i.e.*, the window current activated by pH close to 7.4, and the pH5.0-evoked sustained current were also potentiated by JNK (+53.4 \pm 13.5% for rASIC3 at pH7.0 and +27.4 \pm 6.1% for

rASIC3+2b at pH5.0) (Supplementary Fig. 1B). The human ASIC1b and ASIC3 isoforms were also potentiated by JNK in a similar way than their rat counterparts (Supplementary Fig. 1C,D).

These data show that the MAPK JNK is a potent positive regulator of recombinant rat and human ASIC1b- and ASIC3-containing channels, and that the presence of these subunits is necessary and sufficient to confer regulation to heteromeric channels containing subunits that are not per se regulated like ASIC1a and ASIC2a.

The JNK regulation depends on a putative phosphorylation site within the intracellular domains of ASIC1b and ASIC3 subunits and is species-dependent.

To address the mechanism that underlies the JNK-dependent potentiation of ASICs, we first performed a bioinformatic analysis on the intracellular segments of rASICs to identify putative phosphorylation sites. Interestingly, we identified a putative JNK2 phosphorylation site in the rASIC1b N-terminal domain (S59) as well as in the rASIC3 C-terminal domain (T512) (Fig 2A). These sites are conserved in rat, mouse and human except for mouse ASIC3 where the threonine is replaced by an alanine (Fig. 2A). To confirm the relevance of these sites in the effects observed, we performed point mutations of the putative phosphorylation residues. The rASIC1b S59A mutant had biophysical properties similar to the wild-type channel (pH_{50} activation and inactivation, inactivation time constant, not shown), but lost the regulation by JNK whatever the test pH used (Fig. 2B). Consistent with the lack of putative JNK phosphorylation site (Fig. 2A), the mouse ASIC3 channel failed to be potentiated by JNK (Fig 2C), whereas the mASIC3 A509T mutant in which the alanine is replaced by a threonine to create a putative JNK phosphorylation site, was significantly potentiated by JNK (Fig 2C). Interestingly, since mouse and rat ASIC3 have more than 96% protein identity, mASIC3 A509 could be indeed considered as a “natural” mutation of the rat ASIC3 channel, confirming together with the A509T mutation that recreates in mouse the rat putative JNK phosphorylation site, its importance in the JNK-dependent regulation of rat ASIC3.

These results suggest that the potentiation of ASIC1b- and ASIC3-containing channels by JNK is supported by a phosphorylation of the ASIC1b and ASIC3 subunits at intracellular S59 and T512, respectively. The importance of this site is further confirmed by the fact that a single mutation of the putative phosphorylation residue is sufficient to confer JNK-regulation to mouse ASIC3.

Native ASIC channels in DRG neurons are positively regulated by JNK signaling.

The effect of JNK on native proton-gated currents in cultured DRG sensory neurons were then investigated. Rapid acidification down to pH5.0 on cultured mouse and rat DRG neurons (r/mDRG) hold at -80mV and randomly selected produced inward currents in all the neurons tested (n=101 and 49, respectively), with various shapes and kinetics. Neurons expressing transient ASIC-like currents, associated or not with a sustained current of variable amplitude (Supplementary Fig. 2A, traces #1 and #2) were selected, while neurons showing only a sustained current without any peak (Supplementary Fig. 2A, traces #3 and #4) were excluded. DRG neurons expressed a number of different, and often heteromeric, ASIC channels (Benson et al., 2002; Poirot et al., 2006). We used a set of specific and potent ASIC-blocking toxins (Baron et al., 2013) to perform a pharmacological

profiling of ASIC-like transient currents recorded in cultured DRG neurons to confirm their nature and the channel subtypes possibly associated. PcTx1, APETx2 and mambalgin-1 were shown to block ASIC1a-containing (Escoubas et al., 2000; Sherwood et al., 2011), ASIC3-containing (Diochot et al., 2004), and both ASIC1a- and ASIC1b-containing (*i.e.*, ASIC1-containing) (Diochot et al., 2012) channels, respectively (Fig. 3E). The three toxins were systematically tested on each neuron expressing an ASIC-like peak current and an inhibition by at least 20% by APETx2 (3 μ M), PcTx1 (20nM), or mambalgin-1 (1 μ M) was interpreted as a significant participation of ASIC3-containing channels, ASIC1a channels, or ASIC1-containing channels, respectively. The different pharmacological profiles obtained in ASIC-positive neurons and the inferred ASIC channel subtypes possibly associated are listed in Table 1. ASIC-positive neurons can be found into both small and medium/large neurons based on their capacitance (<40pF and >40pF, respectively) and also into those that display, or not, a prominent shoulder on the falling phase of the action potential (not shown), consistent with the broad distribution of ASIC in the global sensory neuron population.

The JNK activator anisomycin was then perfused on mouse and rat ASIC-expressing neurons (n= 40 and 20, respectively) and showed little potentiating effect on ASIC peak current associated with various pharmacological profiles (Fig. 3A-C), as the culture process is known to increase the basal activity of this pathway (Kristiansen and Edvinsson, 2010). However, subsequent perfusion of the JNK inhibitor SP600125 revealed indeed a high basal level of regulation of ASIC currents by JNK in at least 80% of the neurons tested in mouse and rat (32/40 and 18/20 neurons, respectively, Table 1). A total JNK effect of +100.8 \pm 17.4% at pH5.0 and +107 \pm 19.0% at pH6.6 in mouse DRG neurons, and of +78.8 \pm 13.6% at pH5.0 and +66.6 \pm 15.5% at pH6.6 in rat DRG neurons was calculated (Fig. 3A-C). Interestingly, a small subset of mouse neurons expressed APETx2-sensitive (*i.e.*, associated with ASIC3-containing channels) but JNK-insensitive currents (Table 1 and Fig. 3D, upper traces) while all currents sensitive to APETx2 were sensitive to JNK in rat (Table 1 and Fig. 3D, lower trace). This is consistent with experiments in HEK293 cells and with the fact that the JNK regulation in mice solely involves the ASIC1b, but not the ASIC3, subunit. However, a large proportion of neurons expressing APETx2-sensitive currents in mouse were indeed regulated by JNK (Table 1 and Fig. 3A, lower traces), suggesting that ASIC3-containing channels in these neurons might include the ASIC1b subunit. Two neurons displaying currents sensitive to mambalgin-1 and PcTx1 and likely expressing dominant ASIC1a-containing channels were not sensitive to JNK (Table 1 and Fig. 3D, middle-down traces), but neurons likely expressing ASIC1b-containing channels (*i.e.*, sensitive to the toxin mambalgin-1 but not PcTx1) all showed regulated currents (Table 1 and Fig. 3D, middle-up traces), in good agreement with our previous experiments on recombinant ASIC channels in HEK293 cells.

All together, these data show that the activity of native ASIC1b- and ASIC3-containing channels is up-regulated by JNK in most mouse and rat DRG neurons.

JNK-dependent up-regulation of native ASIC channels in DRG neurons by the proinflammatory cytokine TNF α .

The ability of endogenous pain-related mediators to regulate native ASIC channels in DRG neurons *via* the JNK-pathway was then tested. The effect of TNF α , a pain-related cytokine and a well-known activator of receptor-mediated JNK activity (Natoli et al., 1997; Pinho-Ribeiro et al., 2017; Pollock et al., 2002; Reinhard et al., 1997; Song et al., 1997), was evaluated in acutely dissociated

mDRG neurons (3-10h in culture), deprived of neurotrophic factors in order to limit basal activation of JNK. The ASIC-like peak currents were characterized in these neurons as previously described and displayed pharmacological profiles close to those established in primary cultures (Fig. 4B versus Fig. 3B, lower panels). The subsequent perfusion of TNF α (10ng/ml) on these neurons led to a rapid increase of the ASIC peak current amplitude in response to acidic pH in more than half of the neurons tested (11/19) (Fig. 4A,B; Table 1). Subsequent perfusion of the JNK inhibitor SP600125 induced a decrease of the current amplitude in 9/11 TNF α -responding neurons, including 8 neurons that are only sensitive to mambalgin-1 and not to PcTx1, *i.e.*, likely expressing JNK-sensitive ASIC1b-containing channels (Table 1). There was no major difference in the magnitude of increase induced by TNF α alone (TNF α effect compared to control) and the TNF α -JNK total effect (+36.4 \pm 11.1% vs +58.1 \pm 11.8% at pH5.0, and +57.2 \pm 18.4 vs +62.3 \pm 15.8 at pH6.6, not statistically significantly different, Fig. 4B). The TNF α -induced increase of ASIC peak current amplitude thus appears to mainly involved activation of JNK. The potentiating effect of TNF α was not reversed by SP600125 in two neurons (out of 11), including a neuron that predominantly expresses JNK-sensitive ASIC1b-containing channels (*i.e.*, only sensitive to mambalgin-1 and not to PcTx1) (Table 1), suggesting the possible existence of other JNK-independent TNF α -associated regulation(s) of ASICs in DRG neurons.

The proinflammatory cytokine TNF α is therefore a potent up-regulator of ASIC1b-containing channel activity in mouse sensory neurons, and this effect is largely dependent on the activation of the JNK pathway.

Discussion

By combining electrophysiological approaches with specific pharmacologic tools, we identified a JNK-mediated potentiation of the activity of ASIC1b- and ASIC3-containing channels. This regulation might involve a direct phosphorylation of the intracellular domains of the ASIC subunits since it is disrupted by mutation of a putative JNK phosphorylation site in the ASIC1b N-terminal domain (S59A) and it is lacking in mouse ASIC3 where an alanine (A509) replaced the threonine residue in the phosphorylation site. In addition, the A509T mutant where a point mutation recreates the site in mouse, gain the ability of being regulated by JNK. Native ASIC channels in DRG neurons are also potentiated by JNK with a functional profile consistent with the data found from recombinant channels in HEK293 cells. Finally, the JNK signaling pathway is involved in the potentiation of H⁺-activated ASIC currents in sensory neurons by the proinflammatory cytokine TNF α .

MAPKs as potent regulators of ASIC channels

A large range of mediators of various origins have been shown to directly or indirectly modulate the activity of ASIC channels. Several pain-related signaling pathway targeting ASICs have been previously characterized, including PKC (Baron et al., 2002a; Deval et al., 2004; Duggan et al., 2002), PKA (Chai et al., 2007; Leonard et al., 2003) or phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB/Akt) (Duan et al., 2012). A MAPK-dependent transcriptional regulation of ASIC3 has been associated to the effect of NGF (Mamet et al., 2002, 2003) or interleukin 1 β (Ross et al., 2016) and ASIC1a to interleukin 6 (Zhou et al., 2015), but a direct effect on ASIC channels has never been

extensively described. Our data are consistent with a phosphorylation by JNK of the ASIC1b and ASIC3 (except mouse ASIC3) subunits. The time scale of the effect (less than 10 minutes) makes an indirect transcriptional contribution to the effect unlikely. The biophysical properties of ASIC1b channels including proton sensitivity, inactivation time constant or conductance, are not affected by the JNK regulation, which may suggest an increase in the opening probability of the channel or an effect mediated at least in part through an increase in channel trafficking to the plasma membrane. Enhanced forward trafficking and increased surface expression of ASICs *via* direct phosphorylation has been already reported for the regulation of ASIC1a by BDNF through the PI3-kinase/Akt pathway in the spinal cord (Duan et al., 2012). The effect of JNK phosphorylation on a given target is often linked to the establishment of new protein-protein interactions (Zeke et al., 2016). One might thus speculate that this phosphorylation could be a switch to increase channel number at the plasma membrane, as shown previously (Simonetti et al., 2014; Thomas et al., 2008), or to also prevent ion channels to be internalized.

An important point to consider in our results is the involvement of the MAPK signaling pathway and of JNK in particular, versus other pathways. First, we have combined in our experiments an activator (anisomycin) and an inhibitor (SP600125) that displays at the concentration used (50 μ M) good selectivity for JNK versus the other MAPKs (Bain et al., 2007). Secondly, the effect strictly depends on putative JNK phosphorylation sites in ASIC1b and ASIC3 subunits. SP600125 has the potency to inhibit to some extent other kinases (e.g., DYRK, PDK1, CK2 or SGK1) (Bain et al., 2007), but the predictive phosphorylation sites for these kinases that are present in the ASIC1b and/or ASIC3 intracellular domains, are clearly different from the two that has been shown to be mandatory for the effect described here. In addition, some of these predictive phosphorylation sites such as SGK1 are also present in the ASIC1a or ASIC2a subunits, which are not affected by SP600125. A role for JNK is therefore strongly supported by these complementary elements, even if minor contributions of other signaling pathways cannot be completely excluded. It is noteworthy to mention that native ASIC-like currents were shown to be potentiated by estrogen receptor activation and through the ERK signaling pathway (Qu et al., 2015). JNK putative sites, despite sharing the same motif (S/T-P) as others kinases, are known to be selective and exclusive (Zeke et al., 2016). Although there is possible connection between the two pathways, further experiments are required to decipher the precise cellular events underlying this potentiating effect and the ASIC subunits involved.

Native proton-gated currents of sensory neurons are strongly potentiated by JNK

Our results demonstrate that the vast majority of DRG neurons expressing ASIC currents (including small and medium/large neurons) are positively regulated by JNK signaling. The molecular identity of these currents can be, at least partially, inferred from their biophysical properties and their sensitivity to different ASIC toxins specifically blocking complementary set of homomeric and/or heteromeric channels (Baron et al., 2013). JNK-insensitive currents have been only recorded in ASIC1a-expressing neurons in rat, while they have been also found in ASIC3-expressing neurons in mouse (all ASIC3-expressing neurons express JNK-regulated ASIC currents in rat). It fits with our experiments on recombinant channels in HEK293 cells showing a regulation supported by both the ASIC1b and ASIC3 subunits in rat but only the ASIC1b subunit in mouse. However, more than 70% of

mouse ASIC3-expressing neurons display JNK-regulated currents despite the lack of regulation of ASIC3, suggesting the presence in DRG neurons of a high proportion of ASIC3 heteromeric channels containing ASIC1b. It further supports, together with the high proportion of JNK-regulated ASIC1b-expressing neurons in mouse, a broad functional expression of ASIC1b in sensory neurons, at least in our experimental culture conditions. This is fully consistent with our previous work indicating a significant role for sensory-neuron expressed ASIC1b-containing channels in pain (Diochot et al., 2012, 2016).

Direct (as well as indirect) regulation of DRG-specific ASIC1b- and ASIC3-containing channels by JNK represents a new mechanism for pathological potentiation of ASIC channels upon activation of this signaling pathway in peripheral sensory neurons. Extracellular mediators contributing to pain sensitization can participate in this process like the cytokine $TNF\alpha$ (Pinho-Ribeiro et al., 2017; Zelenka et al., 2005) that rapidly increases the amplitude of ASIC currents mainly in a JNK-dependent manner as shown here. However, another study reported a lack of potentiating effect of $TNF\alpha$ on rat vagal sensory neurons but one on TRPV1 activity through a COX2-dependant mechanism. Differences in the protocol ($TNF\alpha$ concentration, perfusion time, origins of the neurons and culture condition) could explain such discrepancies. Interestingly, this situation involving JNK signaling regulation of the activity of ASIC1b- and ASIC3-containing channels in sensory neurons is reminiscent to the one previously mentioned of BDNF, PI3-kinase/Akt pathway and ASIC1a channels in the spinal cord (Duan et al., 2012).

In conclusion, our results identify a novel mechanism of regulation of sensory neuron-expressed ASIC1b- and ASIC3-containing channels by JNK, which could involve direct phosphorylation of the channels. This may have important role in various pathophysiological pain conditions involving the JNK signaling pathway including inflammatory, neuropathic and migraine pain where ASIC1b and/or ASIC3-containing channels have been involved (Deval et al., 2008; Diochot et al., 2012, 2016; Verkest et al., 2018; Yan et al., 2013). In addition, they provide further evidence of a large functional expression of ASIC1b-containing channels in sensory neurons, supporting the emerging role in pain of the ASIC1b subunit. Since the JNK regulation is conserved in human ASIC1b and ASIC3 channels, interfering with this regulation might harbour therapeutical potential against pain.

References (54)

- Askwith, C.C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26, 133–141.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevvernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.

Baron, A., Deval, E., Salinas, M., Lingueglia, E., Voilley, N., and Lazdunski, M. (2002). Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *J. Biol. Chem.* 277, 50463–50468.

Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noël, J., and Lingueglia, E. (2013). Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 75, 187–204.

Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2002). Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2338–2343.

Bohlen, C.J., Chesler, A.T., Sharif-Naeini, R., Medzihradsky, K.F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E.E., Burlingame, A.L., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479, 410–414.

Cadiou, H., Studer, M., Jones, N.G., Smith, E.S.J., Ballard, A., McMahon, S.B., and McNaughton, P.A. (2007). Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13251–13260.

Chai, S., Li, M., Lan, J., Xiong, Z.-G., Saugstad, J.A., and Simon, R.P. (2007). A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J. Biol. Chem.* 282, 22668–22677.

Deval, E., and Lingueglia, E. (2015). Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology*.

Deval, E., Salinas, M., Baron, A., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2004). ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *J. Biol. Chem.* 279, 19531–19539.

Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.* 27, 3047–3055.

Dinkel, H., Michael, S., Weatheritt, R.J., Davey, N.E., Van Roey, K., Altenberg, B., Toedt, G., Uyar, B., Seiler, M., Budd, A., et al. (2012). ELM--the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Res.* 40, D242-251.

Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516–1525.

Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552–555.

Diochot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschalier, A., Lingueglia, E., and Baron, A. (2016). Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 157, 552–559.

- Dong, X., and Dong, X. (2018). Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* 98, 482–494.
- Doya, H., Ohtori, S., Fujitani, M., Saito, T., Hata, K., Ino, H., Takahashi, K., Moriya, H., and Yamashita, T. (2005). c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 132–138.
- Duan, B., Liu, D.-S., Huang, Y., Zeng, W.-Z., Wang, X., Yu, H., Zhu, M.X., Chen, Z.-Y., and Xu, T.-L. (2012). PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6351–6363.
- Duggan, A., Garcia-Anoveros, J., and Corey, D.P. (2002). The PDZ domain protein PICK1 and the sodium channel BNaC1 interact and localize at mechanosensory terminals of dorsal root ganglion neurons and dendrites of central neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 5203–5208.
- Escoubas, P., De Weille, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., and Lazdunski, M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 275, 25116–25121.
- Francois, A., Kerckhove, N., Meleine, M., Alloui, A., Barrere, C., Gelot, A., Uebele, V.N., Renger, J.J., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2013). State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)_{3.2} selectivity and support analgesic effects. *Pain* 154, 283–293.
- Huang, D., Ren, L., Qiu, C.-S., Liu, P., Peterson, J., Yanagawa, Y., and Cao, Y.-Q. (2016). Characterization of a mouse model of headache. *Pain* 157, 1744–1760.
- Hucho, T., and Levine, J.D. (2007). Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. *Neuron* 55, 365–376.
- Ji, R.-R., Samad, T.A., Jin, S.-X., Schmoll, R., and Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. *Neuron* 36, 57–68.
- Kristiansen, K.A., and Edvinsson, L. (2010). Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion. *J. Headache Pain* 11, 485–495.
- Leonard, A.S., Yermolaieva, O., Hruska-Hageman, A., Askwith, C.C., Price, M.P., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2003). cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2029–2034.
- Li, W.-G., Yu, Y., Zhang, Z.-D., Cao, H., and Xu, T.-L. (2010). ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Mol. Pain* 6, 88.
- Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10662–10670.
- Mamet, J., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 48907–48913.

- Manassero, G., Repetto, I.E., Cobianchi, S., Valsecchi, V., Bonny, C., Rossi, F., and Vercelli, A. (2012). Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol. Pain* 8, 39.
- Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebille, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J.*
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF Receptor 1 Through a Noncytotoxic TRAF2-Dependent Pathway. *Science* 275, 200–203.
- Obata, K., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Mizushima, T., Katsura, H., Fukuoka, T., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2004). Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10211–10222.
- Petho, G., and Reeh, P.W. (2012). Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol. Rev.* 92, 1699–1775.
- Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A., and Chiu, I.M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 38, 5–19.
- Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I., and Kellenberger, S. (2006). Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J. Physiol.* 576, 215–234.
- Pollock, J., McFarlane, S.M., Connell, M.C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J., and Scott, R.H. (2002). TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* 42, 93–106.
- Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32, 1071–1083.
- Qu, Z.W., Liu, T.T., Ren, C., Gan, X., Qiu, C.Y., Ren, P., Rao, Z., and Hu, W.P. (2015). 17beta-Estradiol Enhances ASIC Activity in Primary Sensory Neurons to Produce Sex Difference in Acidosis-Induced Nociception. *Endocrinology* 156, 4660–4671.
- Reichling, D.B., and Levine, J.D. (2009). Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* 32, 611–618.
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L.T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* 16, 1080–1092.
- Salinas, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009). Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J. Biol. Chem.* 284, 31851–31859.
- Sherwood, T.W., Lee, K.G., Gormley, M.G., and Askwith, C.C. (2011). Heteromeric Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) Composed of ASIC2b and ASIC1a Display Novel Channel Properties and Contribute to Acidosis-Induced Neuronal Death. *J. Neurosci.* 31, 9723–9734.

- Simonetti, M., Agarwal, N., Stösser, S., Bali, K.K., Karaulanov, E., Kamble, R., Pospisilova, B., Kurejova, M., Birchmeier, W., Niehrs, C., et al. (2014). Wnt-Fzd signaling sensitizes peripheral sensory neurons via distinct noncanonical pathways. *Neuron* 83, 104–121.
- Smith, E.S., Cadiou, H., and McNaughton, P.A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145, 686–698.
- Song, H.Y., Régnier, C.H., Kirschning, C.J., Goeddel, D.V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9792–9796.
- Thomas, G.M., Lin, D.-T., Nuriya, M., and Haganir, R.L. (2008). Rapid and bi-directional regulation of AMPA receptor phosphorylation and trafficking by JNK. *EMBO J.* 27, 361–372.
- Verkest, C., Piquet, E., Diochot, S., Dauvois, M., Lanteri-Minet, M., Lingueglia, E., and Baron, A. (2018). Effects of systemic inhibitors of Acid-Sensing Ion Channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine. *Br. J. Pharmacol.*
- Wang, X., Li, W.-G., Yu, Y., Xiao, X., Cheng, J., Zeng, W.-Z., Peng, Z., Xi Zhu, M., and Xu, T.-L. (2013). Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 4265–4279.
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7, 1598–1608.
- Yan, J., Wei, X., Bischoff, C., Edelmayer, R.M., and Dussor, G. (2013). pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache* 53, 1250–1261.
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., and Bogoyevitch, M.A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 80, 793–835.
- Zelenka, M., Schäfers, M., and Sommer, C. (2005). Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 116, 257–263.
- Zhuang, Z.-Y., Wen, Y.-R., Zhang, D.-R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G.R., Decosterd, I., and Ji, R.-R. (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3551–3560.

Figure 1: Regulation of recombinant ASICs by JNK

A, Top: Representative time course of whole-cell rASIC1b current amplitude recorded at -60mV in HEK293 cells. Currents were activated by a pH drop from 7.4 to 6.3. Anisomycin (50 μ M) and the JNK inhibitor SP600125 (50 μ M) were successively applied in the extracellular solution for 5 and 10 minutes, respectively. Bottom: Representative current traces of ASIC1b current in control condition (a, black), after anisomycin application (b, cyan) and after SP600125 application (c, grey). **B**, Mean potentiation by JNK of H⁺-activated rASIC1b peak current recorded at different pHs. Individual data points and mean \pm SEM are shown. Control (black) values were calculated as the ratio of the last two control currents, activator effects (cyan) were calculated as illustrated by the ratio of b/a current amplitudes, and the total JNK effects (blue) were calculated as illustrated by the ratio of b/c current amplitudes (between one of the last two pulses after anisomycin and the ones after SP600125 perfusion). One-way ANOVA (F(2, 20)=26.50, $p < 0.0001$, *** $p < 0.0001$ pH6.3 JNK total effect vs control, ### $p < 0.0001$ activator vs JNK, ns $p = 0.91$ activator vs control; F(2, 20)=12.01, $p = 0.0004$, *** $p = 0.0006$ pH6.0 JNK total effect vs control, ## $p = 0.0027$ activator vs JNK, ns $p = 0.77$ activator vs control; F(2, 16)=12.8, $p = 0.0005$, *** $p = 0.0009$ pH5.0 JNK total effect vs control, ## $p = 0.0018$ activator vs JNK, ns $p = 0.92$ activator vs control). n=9-11 cells. **C, D, E**, Mean potentiation by JNK (total effects) of H⁺-activated rASIC3 (C), rASIC2a and rASIC1a (D), and heteromeric ASIC (E) peak currents recorded at different pHs (calculated and plotted as in panel B). Bottom in C-E: Representative current traces in control condition (black), and after anisomycin and SP600125 application (cyan and grey, respectively). Wilcoxon paired test versus appropriate control. In C, * $p = 0.015$ pH7.0 and pH6.6 peak current and pH7.0 sustained current. n=7-8 cells. In D, n=7-8 cells. In E, * $p = 0.031$ ASIC3+2b and 1b+2a, * $p = 0.015$ ASIC3+1b and 3+1a, ** $p = 0.0039$ ASIC1b+1a, ns $p = 0.437$ ASIC1a+2a. n=5-9 cells. 3 to 4 different pH tested per combination (not shown). **F**, pH-dependent curves of activation and inactivation of rat ASIC1b currents after anisomycin (black) and SP600125 (blue) application on the same cell (n=4-14). Protocols used for activation and inactivation are shown beside the curves.

Figure 2: The JNK regulation depends on a putative phosphorylation site within the intracellular domains of ASIC1b and ASIC3 subunits and is species-dependent

A, Partial sequence alignments of rat, mouse and human ASIC1b and ASIC3 intracellular N- and C-terminal domain, respectively. The potential JNK phosphorylation sites found with GPS and ELM softwares are highlighted (phosphorylated S/T residues followed by P in blue). **B,C**, Mean potentiation by JNK (total effects) of H⁺-activated rASIC1b WT and S59A mutant (B), and H⁺-activated mASIC3 WT and A509T mutant (C), recorded at different pHs (calculated and plotted as in Fig. 1B). In B, one-way ANOVA (F(2, 26)=13.79, p<0.0001, ns p=0.83 pH6.3 control S59A vs JNK S59A, ### p=0.0009 pH6.3 WT JNK vs JNK S59A; F(2, 26)=14.20, p<0.0001, ns p=0.38 pH6.0 control S59A vs JNK S59A, ## p=0.003 pH6.0 WT JNK vs JNK S599; F(2, 26)=13.07, p<0.0001, ns p=0.27 pH5.0 control S59A vs JNK S59A, ## p<0.0048 pH5.0 WT JNK vs JNK S59A); n=9-12 cells. In C, one-way ANOVA (F(3, 28)=8.00, p=0.0005 pH7.0, ## p=0.0011 control A509T vs JNK A509T, ns p=0.80 control WT vs JNK WT, # p=0.02 JNK A509T vs JNK WT; F(3, 27)=11.88, p<0.0001 pH6.6, ### control A509T vs JNK A509T p<0.0001, ns p>0.99 control WT vs JNK WT, ## p=0.0027 JNK A509T vs JNK WT); n=6-9 cells.

Figure 3: JNK regulates ASIC currents in rodent DRG neurons

A, Top: Representative time course of whole-cell mDRG ASIC-like peak currents recorded at -80mV upon stimulation with pH5.0 and extracellular perfusion with anisomycin (50 μ M) and the JNK inhibitor SP600125 (50 μ M) for 5 and 10 minutes, respectively. Bottom: Representative current traces of APETx2 and mambalgin-1-sensitive currents (see Table 1 for details) recorded from mouse sensory neuron activated at pH5.0. **B**, Top: Mean potentiation by JNK of H⁺-activated mouse DRG neuron ASIC peak current recorded at different pHs (calculated and plotted as in Fig. 1B). One-way ANOVA (F(2,78)=22.04, p<0.0001, ***p<0.0001 pH5.0 JNK total effect vs control, ### p<0.0001 activator vs JNK pH5.0, ns p=0.82 activator vs control pH5.0; F(2,70)=27.68, p<0.0001, ***p<0.0001 pH6.6 JNK total effect vs control, ### p<0.0001 activator vs JNK pH6.6, ns p=0.89 activator vs control pH6.6), n=36-40. Bottom: Pharmacological properties regarding the three ASIC inhibitory toxins of the ASIC peak currents in mouse DRG neurons tested for JNK regulation (proportion of neurons with a particular profile; n=40). **C**, Top: Mean potentiation by JNK of H⁺-activated rat DRG neuron ASIC peak current recorded at different pHs (same protocol as for mouse). One-way ANOVA (F(2,38)=10.62, p=0.0002, ***p=0.0002 pH5.0 JNK total effect vs control, ## p=0.0052 activator vs JNK pH5.0, ns p=0.53 activator vs control pH5.0; F(2,22)=13.96, p<0.0001, ***p=0.0001 pH6.6 JNK total effect vs control, ## p=0.0026 activator vs JNK pH6.6, ns p=0.43 activator vs control pH6.6). n=12-20. Bottom: Pharmacological profile (as in B) of the ASIC peak currents in rat DRG neurons tested for JNK regulation (n=20). **D**, Representative current traces at two different pHs of rat and mouse DRG neuron ASIC currents with different pharmacological profiles regarding inhibition by mambalgin-1, PcTx1 and APETx2 toxins in control condition (black), and after anisomycin and SP600125 application (cyan and grey, respectively). See Table 1 for interpretation of the pharmacological profiles and text for details.

Figure 4: TNF α potentiates H⁺-activated ASIC currents from acutely dissociated mouse sensory neurons through JNK activation

A, Top: Representative time course of whole-cell mDRG ASIC-like peak currents upon stimulation with pH5.0 and extracellular perfusion with TNF α (10ng/ml) and the JNK inhibitor SP600125 (50 μ M) for 5 and 10 minutes, respectively. Bottom: Representative pH5.0-evoked mambalgin-1 and APETx2-sensitive current traces recorded from mDRG neuron (see Table 1 for details). **B**, Top: Mean potentiation by TNF α of H⁺-activated ASIC peak currents in mouse DRG neurons recorded at different pH (calculated and plotted as in Fig. 1B) and comparison with the TNF α -JNK total effect. One-way ANOVA ($F(2,36)=10.47$, $p=0.0004$, $***p=0.0003$ pH5.0 TNF α -JNK total effect vs control, # $p=0.022$ TNF α vs control pH5.0, ns $p=0.29$ TNF α vs TNF α -JNK pH5.0; $F(2,34)=6.461$, $p=0.0042$, $**p=0.0075$ pH6.6 TNF α -JNK total effect vs control, # $p=0.014$ TNF α vs control pH6.6, ns $p=0.96$ TNF α vs TNF α -JNK pH6.6), $n=18-19$. Bottom: Pharmacological profiles of the ASIC peak currents in mouse DRG neurons tested for TNF α regulation (proportion of neurons with a particular profile; $n=19$).

Supplementary Figure 1: JNK-regulation of human ASIC1b and ASIC3 peak currents, and of rASIC3-associated sustained currents

A, JNK-dependent potentiating effect on rASIC3 sustained window current at pH7.0 (left) and on rASIC3+2b pH 5.0-evoked sustained current (right). Wilcoxon paired test versus appropriate control, * $p=0.015$ rASIC3 pH7.0 and $p=0.031$ rASIC3+2b pH5.0 current. $n=6-8$. **B**, Scatter plots of inactivation time constants (in ms) of rASIC1b at pH5.0 and rASIC3 pH6.6, before and after treatments. One-way ANOVA ($F(2, 22)=0.43$, ns rASIC1b; $F(2, 12)=0.37$, ns rASIC3. $n=7-11$ cells. **C** and **D**, Mean potentiation by JNK of H⁺-activated human ASIC1b (C) and ASIC3 (D) peak currents recorded at different pHs (total effects as calculated in Fig. 1A,B). Bottom: Representative current traces in control condition (black), and after anisomycin (cyan) and SP600125 (grey) application. Wilcoxon paired test total JNK effect (blue dots) versus appropriate control (black dots), * $p=0.046$ pH6.6 hASIC1b, * $p=0.031$ pH6.0 hASIC1b, * $p=0.015$ pH5.0 hASIC1b, * $p=0.037$ pH7.0 hASIC3, * $p=0.048$ pH6.6 hASIC3, * $p=0.013$ pH6.0 hASIC3, * $p=0.019$ pH5.0 hASIC3. $n=6-7$.

Supplementary Figure 2: Characterization of ASIC-like currents in mouse DRG neurons

A, Representative proton-activated (pH5.0 and 6.6) inward currents at -80mV in cultured mouse DRG neurons from 4 different cells showing transient ASIC-like currents associated or not with a sustained current of variable amplitude (#1 and #2), or neurons with only sustained currents without any peak (#3 and #4). **B**, Representative recordings from 3 different neurons showing ASIC-like currents blocked by the indicated toxins.

Number of neurons			Toxin selectivity	mambalgin-1		APETx2
JNK-sensitive/total		TNF α -sensitive/JNK-sensitive/total		PcTx1		
Mouse (32/40)	Rat (18/20)	Mouse TNF α (11/9/19)	<i>DRG currents blocked by :</i>	ASIC1a	ASIC1a/2a or ASIC1b-cont	ASIC3-cont
5/9	6/6	2/1/7	mambalgin-1 + APETx2 + PcTx1	+	+	+
17/21	5/5	6/6/7	mambalgin-1 + APETx2	-	+	+
	3/5		mambalgin-1 + PcTx1	+	+	-
10/10		3/2/5	mambalgin-1	-	+	-
	4/4		APETx2	-	-	+

Table 1: Pharmacological profiles of DRG expressed JNK-sensitive and -insensitive ASIC currents and possibly associated ASIC channel subtypes inferred from peptide toxins blocking selectivity.

Left, number of sensory neurons expressing toxin-inhibited ASIC currents in mouse and rat primary cultures (JNK-sensitive versus total JNK-tested) and their distribution according to the different pharmacological profiles. JNK-dependent and -independent TNF α up-regulation of ASIC currents in acutely dissociated mouse DRG neurons is also shown.

Right, ASIC channel subtypes possibly associated with the different pharmacological profiles. Channel subtypes regulated by JNK *in vitro* are indicated in bold. Only ASIC1b-containing channels are regulated in mouse including ASIC3 channels containing ASIC1b. Note that when different types of channels might be present together into a neuron (*e.g.*, ASIC1b-containing and ASIC3-containing channels), the proportion of each channel type can significantly vary given the inhibition threshold of 20% used for a current to be considered as significantly blocked by a toxin.

Fig 1

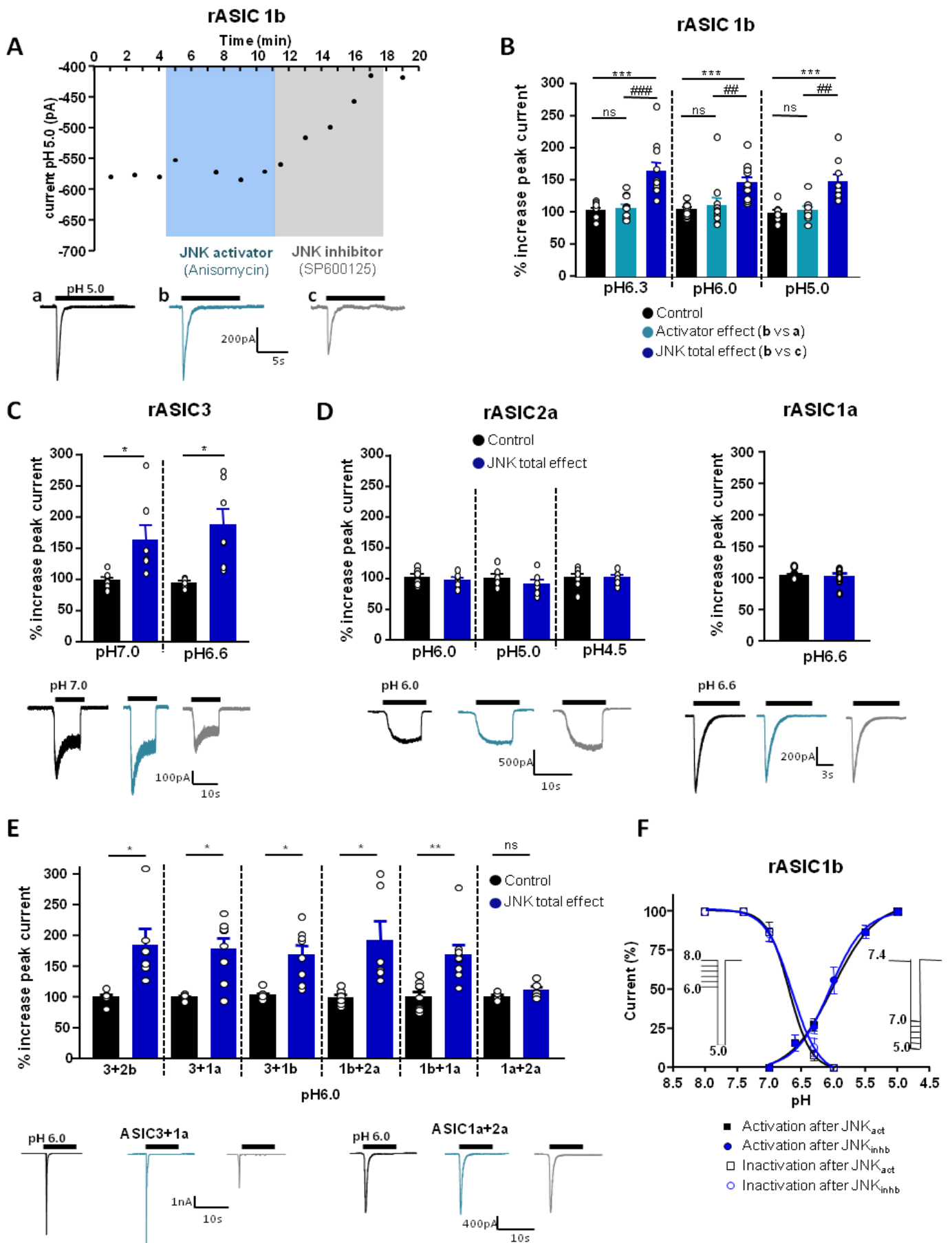
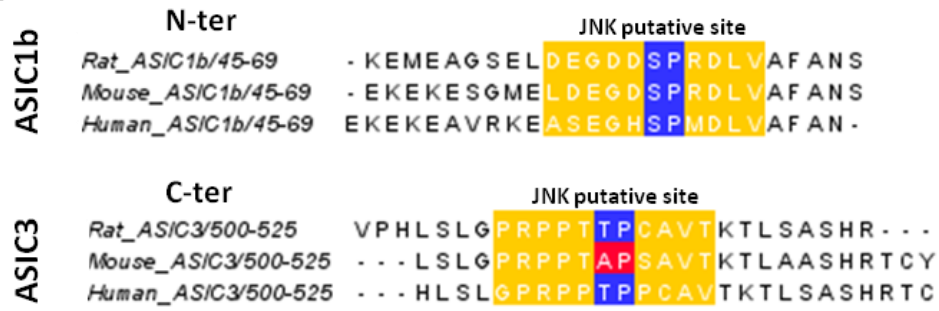
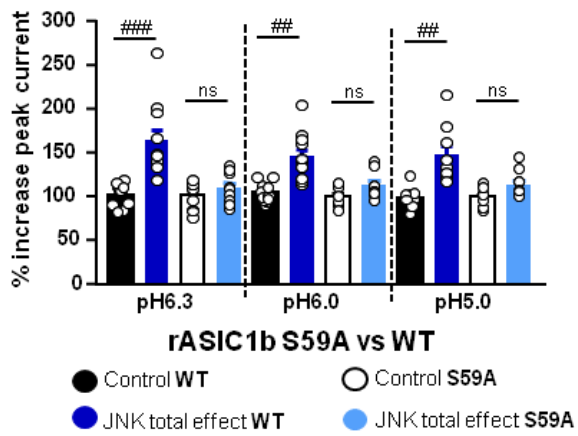


Fig 2

A



B



C

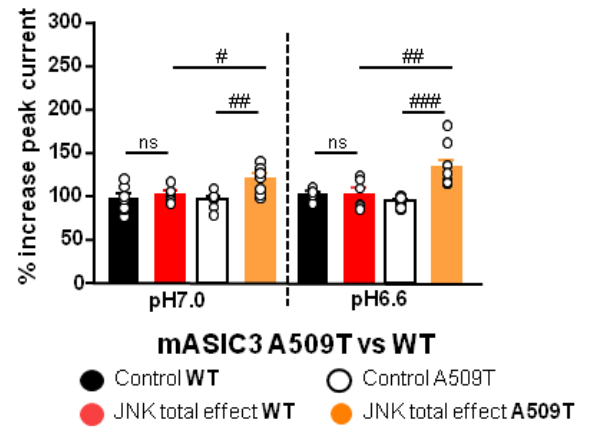


Fig 3

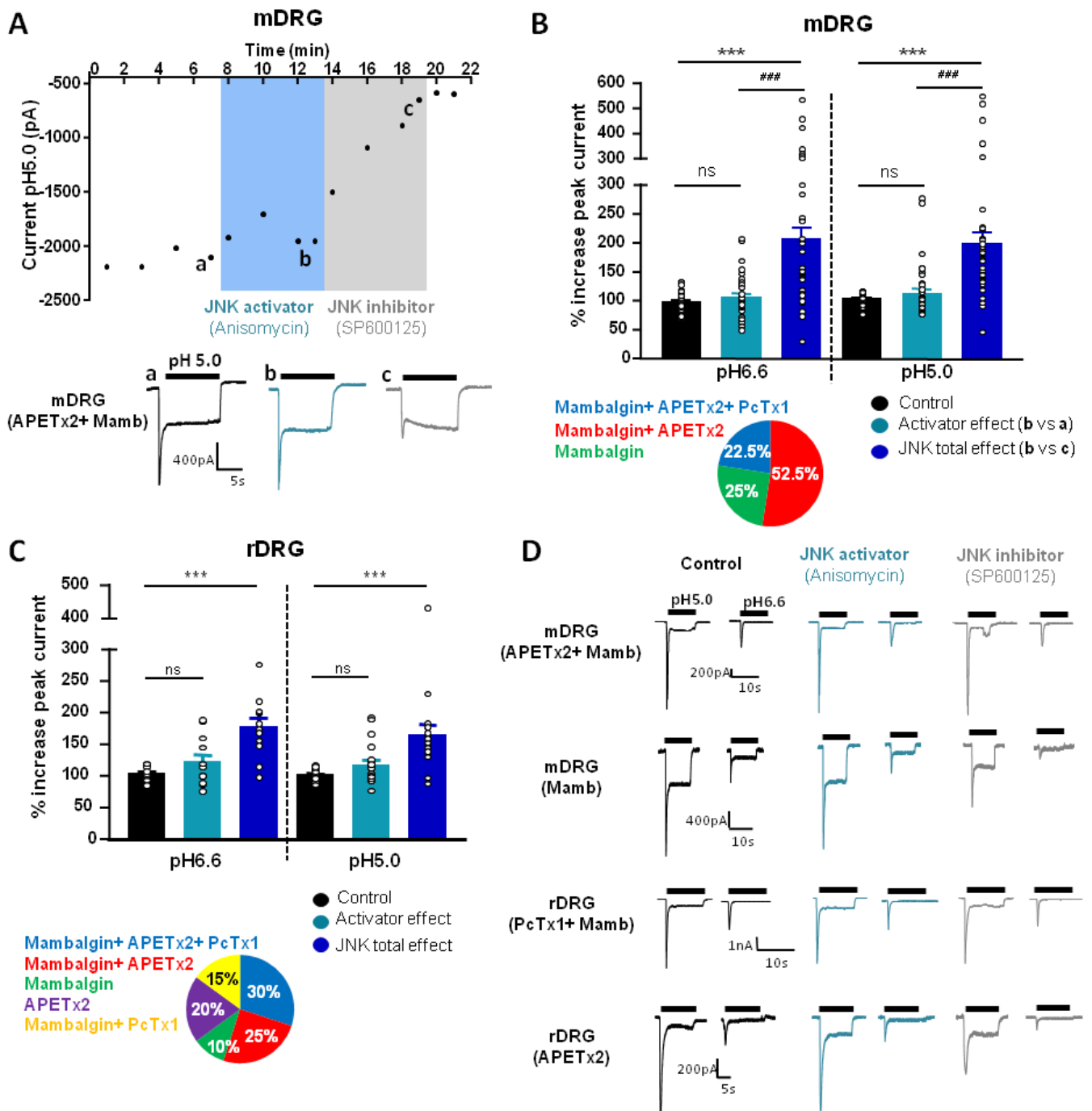
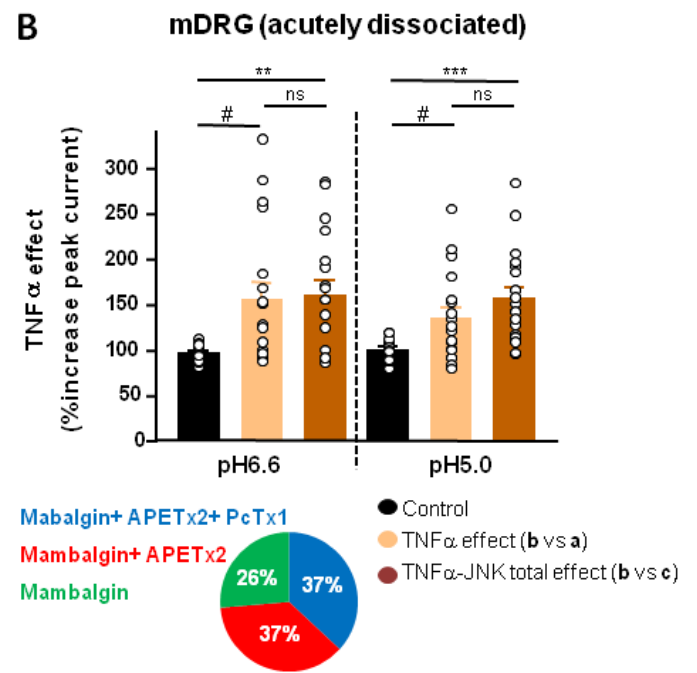
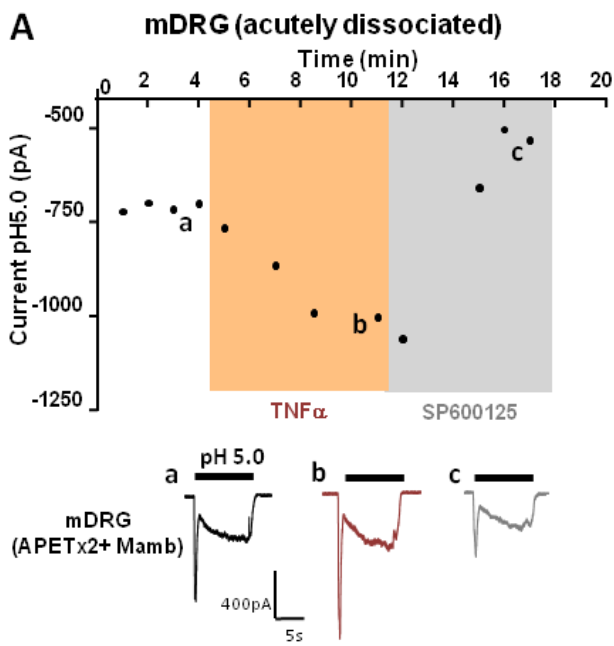
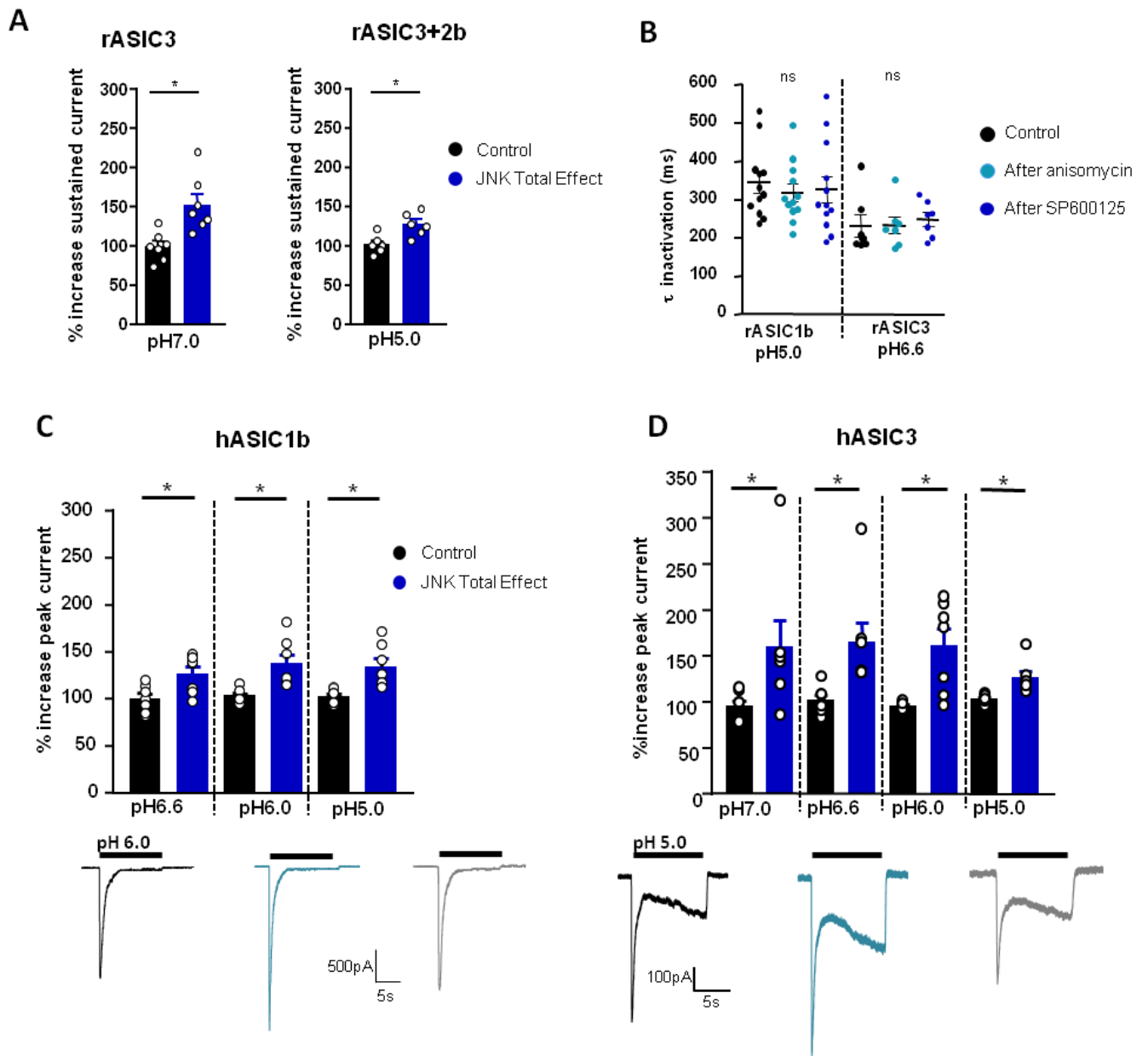


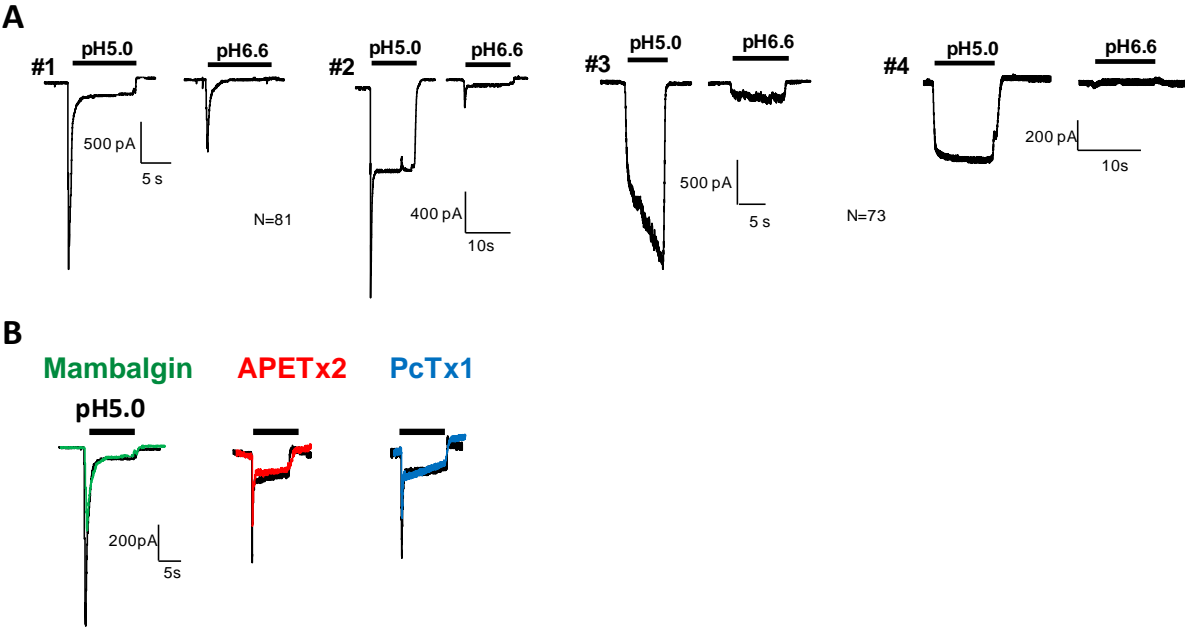
Fig 4



Supplementary Fig1



Supplementary Fig2



III. Résultats complémentaires

1. Caractérisation biophysique et pharmacologique des canaux ASIC1b

La plupart des propriétés biophysiques d'ASIC1b sont bien connues. Durant ma thèse, j'ai pu confirmer ces paramètres et élargir les connaissances sur certains aspects bien précis. La sensibilité au pH et les cinétiques d'inactivation des canaux ASIC1b homomériques et hétéromériques avaient notamment été déterminés lors d'une étude de caractérisation exhaustive de l'ensemble des hétéromères ASIC (au moins pour les doubles combinaisons) (Hesselager et al., 2004). En revanche, la cinétique de réactivation et la sensibilité à la mambalgine de certains de ces hétéromères étaient inconnus (comme pour ASIC1b+ASIC2). Ces propriétés sont également peu connues pour le variant humain d'ASIC1b. Les méthodes et techniques employées dans cette partie de « Résultats complémentaires » sont identiques et toutes décrites dans la partie « Material and Methods » du manuscrit précédent.

L'expression dans des cellules HEK d'ASIC1b seul ou avec d'autres sous-unités ASIC génèrent des canaux ASIC sensibles à une gamme large de pH (Figure 24A-B) : les seuils d'activation commencent à environ pH6,8 pour ASIC1b+ASIC1a ou ASIC1b+ASIC3 et à environ pH6,2 pour ASIC1b+ASIC2a, le moins sensible. Il en va de même pour les pH de demi-activation, couvrant une gamme vaste de pH ($pH_{0.5act}$ 6,25 pour ASIC1b+ASIC1a et 5,25 pour ASIC1b+ASIC2a, Table 14). De façon intéressante, la combinaison ASIC1b+ASIC2b a été initialement décrite comme non-fonctionnelle, les courants pH-activés ne dépassant pas 100pA (Hesselager et al., 2004). Néanmoins, dans nos conditions, il a été possible d'observer un tel courant, différant d'ASIC1b homomérique. La densité des courants de cette combinaison est cependant faible vis-à-vis des autres canaux ASIC1b (en moyenne 9,3pA/pF contre 44,2pA/pF pour ASIC1b à pH5,0). Nos résultats sont supportés par l'une des rares études démontrant la présence de courant contenant ASIC1b dans des neurones sensoriels particuliers (propriocepteurs) et montrant la présence exclusive par single-cell PCR d'ASIC1b et ASIC2b, avec des courants ayant des cinétiques similaires aux nôtres (voir Figure 24 G) (Lin et al., 2016). La réactivation des canaux ASIC1b a également été déterminée (Figure 24C, Table 14). Une première étude sur le variant ASIC1b ayant le segment N-terminal court (ASIC β) a rapporté un temps de demi-réactivation d'environ 4s, relativement similaire aux nôtres (6,16s dans nos conditions) (Benson et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'hétéromérisation d'ASIC1b accélère systématiquement et significativement ce processus, même dans le cas où ASIC1b est exprimé avec une sous-unité se réactivant plus lentement sous forme homomérique (ASIC1a en l'occurrence, τ réactivation 11s) (Baron et al., 2008).

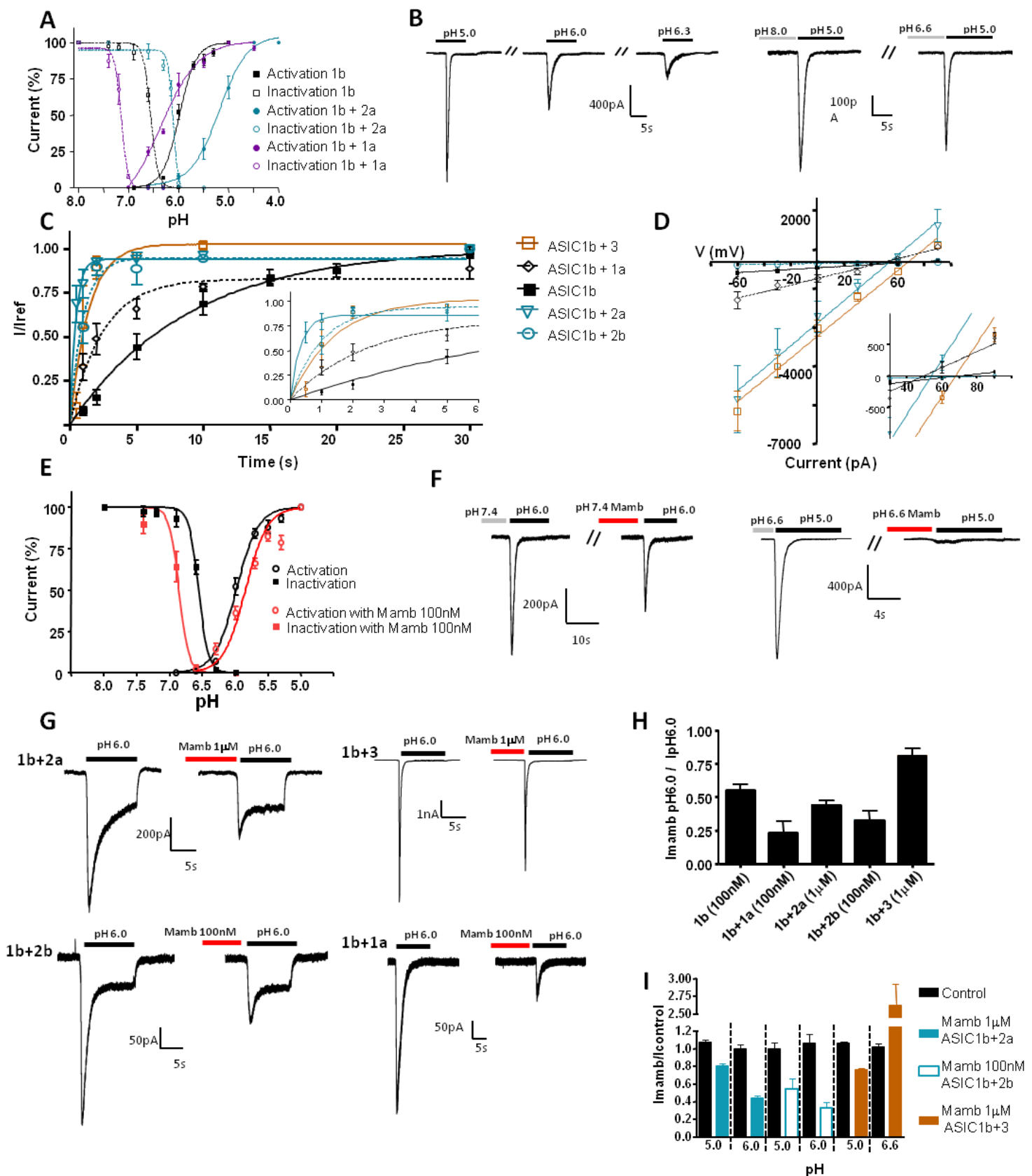


Figure 24: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux ASIC1b

A. Courbes d'activation (cercles et carrés remplis) et d'inactivation (vides) en fonction du pH des canaux ASIC1b homomériques (noir) et hétéromériques (deux combinaisons représentés); les courbes représentent l'ajustement à la fonction de Hill, cercles et carrés représentent la moyenne \pm S.E.M. $n=3-10$ cellules par pH testé. **B.** Courants pH-activés représentatifs provenant d'une cellule HEK exprimant ASIC1b. Gauche: Activation aux pH indiqués (5,0-6,0-6,3 à partir d'un pH de conditionnement de 7,4, appliqué pendant 30s entre chaque saut de pH de 10s). Droite: Inactivation des canaux ASIC1b. Courants activés par des sauts à pH5,0 de 10s après 30s de conditionnement à pH8,0 et 6,6. **C.**

Réactivation des canaux ASIC1b. Les courants sont induits par un saut de pH5,0 à 10s puis réactivés après un intervalle de temps donné. Le rapport de l'amplitude des courants réactivés avec celle des courants contrôles (I/I ref), est exprimé sous forme moyenne \pm SEM et en fonction de l'intervalle de temps(s) entre la fin du saut de pH contrôle et le début du saut suivant. Les effectifs vont de 5 à 11 cellules par intervalle de temps et par canal. D. Relation courant/potentiel des canaux ASIC1b, avec dans l'encart un agrandissement de la zone du potentiel d'inversion. Les courants sont induits par des sauts à pH5,0 et différents potentiels de membrane. Les points représentent la moyenne \pm S.E.M. n=6-7 cellules par potentiel et par canal contenant ASIC1b. E. La mambalgine est un modulateur de l'activité des canaux ASIC1b. Courbes d'activation et d'inactivation pH-dépendantes avec 100nM de mambalgine (rouge) et sans (noir, mêmes données qu'en A). Les courbes représentent l'ajustement à la fonction de Hill, les cercles et les carrés représentent la moyenne \pm S.E.M. n=4-10 cellules par pH testé. F. Exemples d'enregistrements montrant les effets de la mambalgine. Gauche : Activation d'ASIC1b par des sauts à pH6,0 avec et sans 30s de perfusion d'une solution de 100nM de mambalgine à pH7,4. Droite: Activation par des sauts à pH5,0 d'ASIC1b avec et sans 30s de perfusion d'une solution avec 100nM de mambalgine à pH6,6. G. La mambalgine a une affinité différente pour les canaux ASIC1b hétéromères. Représentation de différentes expériences montrant le blocage par la mambalgine à 100nM ou 1 μ M des canaux ASIC1b+1a, ASIC1b+2a, ASIC1+2b et ASIC1b+3 exprimés dans des cellules HEK (cotransfection au ratio 1:1). H. Quantification des effets de la mambalgine sur les courants ASIC1b à pH6,0. Les données représentent les ratios des amplitudes des courants avec et sans perfusion préalable de mambalgine, n=4-9 cellules. I. Exemples des effets pH- et sous-unités-dépendants de la mambalgine sur les canaux ASIC1b. Le ratio entre un courant activé à un pH donné sans mambalgine (contrôle, noir) et avec mambalgine est représenté. n=6-7 cellules.

Les valeurs de potentiel d'inversion pour chaque combinaison sont relativement proches, conformément au fait que les canaux ASIC sont particulièrement sélectifs au sodium (Figure 24D, Table12). Plusieurs aspects relatifs à l'action de la mambalgine sur ASIC1b n'étaient pas connus auparavant. Le mécanisme d'action de la mambalgine sur ASIC1a fut déterminé auparavant : la toxine entraîne un changement significatif de la courbe d'activation du canal ASIC1a vers des valeurs beaucoup plus acides, stabilisant ainsi le canal dans un état fermé (Baron et al., 2013; Diochot et al., 2012). La mambalgine a un effet restreint sur la courbe d'inactivation des canaux ASIC1a (très léger décalage vers des valeurs de pH plus basiques). Ce mécanisme diffère donc de celui observé pour PcTx1. L'effet sur l'activation, c'est-à-dire lorsque la mambalgine est appliquée à pH7,4, ne permet pas un blocage total du courant ASIC1b, même à forte concentration (1 μ M) (Diochot et al., 2012). L'effet de la mambalgine sur ASIC1b est sensiblement différent : la toxine entraîne un changement beaucoup plus prononcé sur l'inactivation et permet un blocage total du courant ASIC1b (Figure 24E), avec en parallèle un effet non négligeable sur l'activation (Figure 24 E-F). Ces effets conjoints sur l'activation et l'inactivation permettent donc de bloquer dynamiquement le canal ASIC1b dans un état fermé ou désensibilisé, avec un effet supérieur lors de faibles acidifications qui ont très certainement une plus grande pertinence pathophysiologique. La mambalgine bloque également

l'ensemble des hétéromères ASIC1b (Figure 24 G-I). Des différences d'affinités sont observées, les canaux ASIC1b+ASIC2a et ASIC1b+ASIC3 étant les moins sensibles (Figure 24H). Des différences de mécanisme d'action sont également à noter : l'effet de la mambalgine est plus efficace pour des pH d'activation faibles (pH6,0 versus pH5,0) pour ASIC1b+ASIC2a et ASIC1b+ASIC2b. De façon surprenante, la toxine est capable de fortement potentialiser le courant à pH6,6 d'ASIC1b+ASIC3. Ces données suggèrent donc des mécanismes d'actions plus complexes de la mambalgine sur les hétéromères ASIC1b comparé à ses effets sur ASIC1b ou ASIC1a homomériques.

Comme mentionné auparavant, les propriétés du variant humain d'ASIC1b ont été très peu étudiées. Il possède néanmoins quelques spécificités par rapport aux canaux de rongeurs : il a un profil d'expression légèrement plus large (faible expression dans d'autres tissus comme le cerveau) mais conserve un enrichissement caractéristique dans les DRG, il est capable de produire un courant soutenu avec une légère composante calcique en réponse à une acidification prolongée et il a une cinétique d'inactivation beaucoup plus rapide. Il conserve néanmoins la même sensibilité aux protons (pH de demi-activation de 5,85 et de demi-inactivation de 6,50, Figure 25A) et une régulation par certains peptides (dynorphine et PcTx1) au même titre que les canaux de rongeurs (Hoagland et al., 2010). Le variant humain d'ASIC1b est régulé différemment par la mambalgine : bien que l'on observe également un changement des courbes d'inactivation vers des pH plus basiques (pH de demi-inactivation de 6,66 avec mambalgine versus 6,50 sans, Figure 25A), la mambalgine augmente la sensibilité d'hASIC1b aux protons (pH demi-activation avec mambalgine de 6,0 versus 5,85 sans), résultant en une potentialisation du courant lorsque ce canal est activé par des acidifications moyennes (pH6,0, Figure 25B). De ce fait, l'affinité apparente de la mambalgine pour le canal lorsque cette dernière est appliquée à pH7,4 semble mauvaise, résultant en une faible inhibition (25% à 1 μ M). En revanche, la toxine serait beaucoup plus efficace en condition d'acidification modérée et prolongée, n'occultant donc pas son potentiel *in vivo*. De plus, il sera aussi intéressant de tester ses effets sur les hétéromères humains d'ASIC1b. L'une des singularités d'hASIC1b est sa réactivation extrêmement rapide (Figure 25D). La demi-réactivation à pH7,4 est de 0,25s, étant plus rapide que tous les autres canaux ASIC de rongeurs (Table 8). De façon intéressante, ce processus de réactivation est dépendant du pH : une légère acidification (pH6,9-6,6) du milieu extracellulaire pendant ce laps de temps ralentit considérablement ce phénomène (les demi-réactivations passant de 1,13s à pH6,9 et 5,54s à pH6,6). Cette propriété, initialement démontrée pour ASIC3 (Immke and McCleskey, 2003) et ASIC1a/ASIC2 ((Baron et al., 2008) est également conservée pour rASIC1b et hASIC1a (Figure 25E-F) : les demi-réactivations de rASIC1b passent de 6,16s (pH7,4) à 6,71s (pH7,2) et à 114s (pH6,9) et celles de hASIC1a de 0,82s et 1s (pH7,4 et pH7,2) à 24,1s (pH6,9). hASIC1a a

également la particularité d'avoir deux états désensibilisés, résultant en une réactivation incomplète (80% à pH7,4 et 50% à pH6,9), comme démontré par d'autres auteurs (Li et al., 2012).

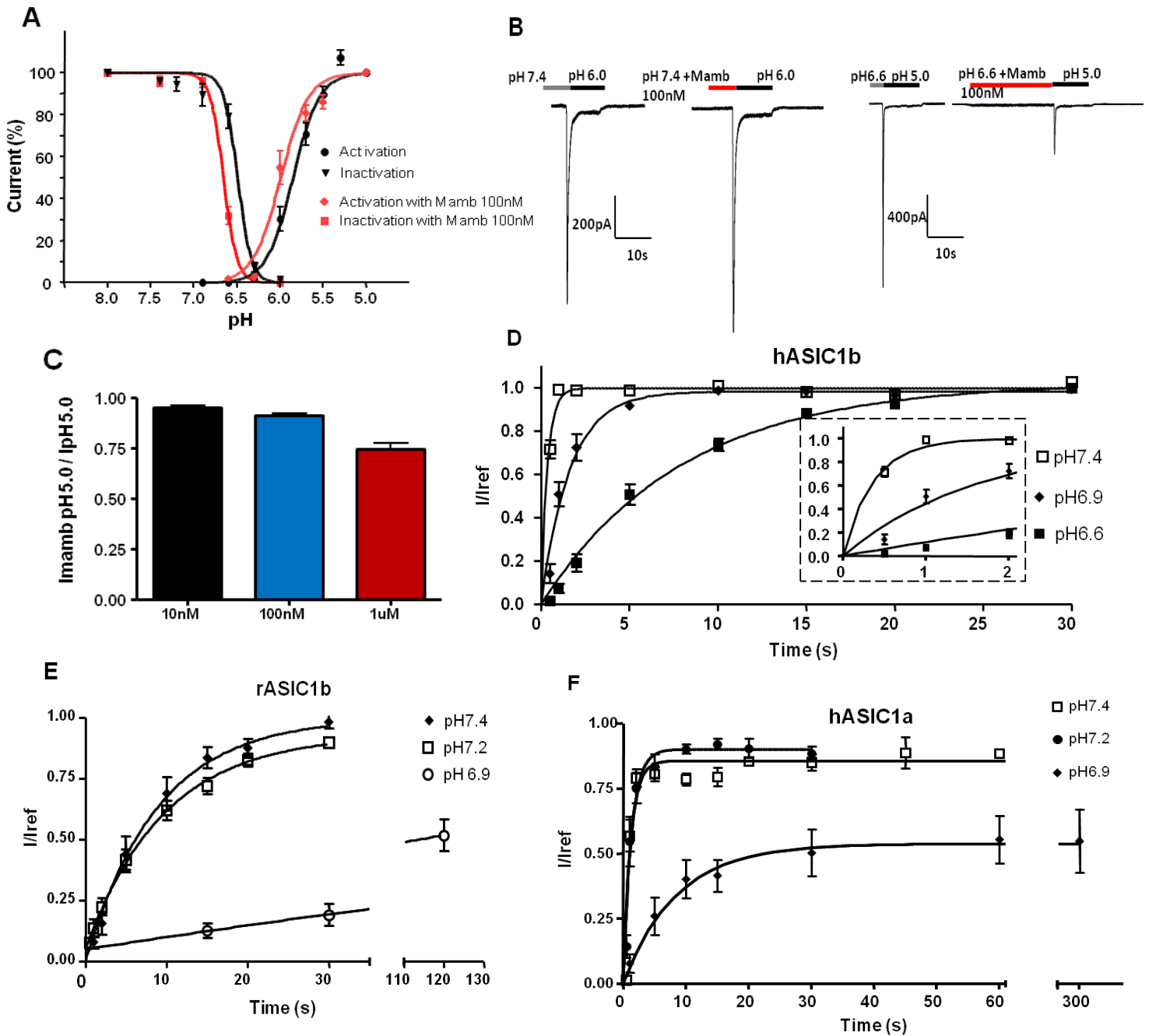


Figure 25: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux humain ASIC1b

A, La mambalgine modifie l'activité des canaux hASIC1b. Courbes d'activation et d'inactivation avec 100nM de mambalgine (rouge) et sans (noir). Les courbes représentent l'ajustement à la fonction de Hill, les cercles et carrés représentent la moyenne \pm S.E.M. $n=4-13$ cellules par pH. **B**, Exemples d'enregistrements montrant les effets de la mambalgine. Gauche: Activation par un saut à pH6,0 des courants hASIC1b avec et sans 30s de conditionnement en présence de 100nM de mambalgine à pH7,4. Droite: Activation par un saut à pH5,0 des courants hASIC1b avec et sans 30s de conditionnement en présence de 100nM de mambalgine à pH6,6. **C**, Inhibition du courant hASIC1b par différentes concentrations de mambalgine après 30s de perfusion à pH 7,4. Le courant est activé par des sauts à pH5,0. $N=7-10$ cellules par concentration. **D-F**, Réactivation des canaux hASIC1b (D,

avec en encart un focus sur les deux premières secondes), rASIC1b (E) et hASIC1a (F) à différents pH de conditionnement. Les courants sont induits par un saut à pH5,0 de 10s puis réactivés après un intervalle de temps donné. L'amplitude des courants réactivés est exprimée comme le ratio avec celle des courants contrôles (I/I ref), indiqué sous forme moyenne \pm SEM et en fonction de l'intervalle de temps(s) entre la fin du saut de pH contrôle et le début du saut suivant. Les effectifs vont de 4 à 13 cellules par intervalle de temps et par canal.

ASIC subtypes	pH _{0,5} activation / inactivation	Current density (pH5.0, pA/pF)	Reversal potential, mV	τ inactivation, ms (pH5.0)	τ reactivation, s	Inhibition 100nM Mamb1 (% inhibition)	Inhibition 1 uM Mamb1 (% inhibition)
ASIC1b	5,98 \pm 0,01 / 6,55 \pm 0,01	44,2 \pm 9,2	67 \pm 0.5	375,5 \pm 17,9	6,16 \pm 0,97	yes (\approx 45)	yes (\approx 70)
ASIC1b+1a	6,25 \pm 0,10 / 7,15 \pm 0,02	90,1 \pm 25,5	49 \pm 1.6	641,4 \pm 67,9	2,30 \pm 0,72	yes (\approx 76)	yes (\approx 80)
ASIC1b+2a	5,23 \pm 0,17 / 6,18 \pm 0,03	232,6 \pm 40,23	55 \pm 2.5	1610 \pm 160,9	0,23 \pm 0,15	no	yes (\approx 57)
ASIC1b+2b	6,03 \pm 0,07 / 6,42 \pm 0,09	6,9 \pm 1,6	68 \pm 3.4	598,4 \pm 82	0,69 \pm 0,1	yes (\approx 67)	yes (\approx 75)
ASIC1b+3	6,05 \pm 0,02 / 6,84 \pm 0,01	290,2 \pm 53,3	67 \pm 1.3	186,6 \pm 11,2	0,97 \pm 0,31	no	yes (\approx 20)

Table 14: Propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux ASIC1b

Résumé des propriétés des canaux ASIC1b homomériques et hétéromériques de rat (ratio transfection 1 :1). Moyenne \pm écart standard à la moyenne. N=3 cellules au minimum par paramètre.

En conclusion, cette étude a permis de caractériser les propriétés biophysiques des canaux ASIC1b homomériques et hétéromériques chez le rat, et dans une moindre mesure chez l'homme. En particulier, plusieurs paramètres liés à la réactivation des canaux ASIC1b se sont avérés originaux : accélération systématique apportée par l'hétéromérisation et pH-dépendance du processus. Elle a permis également d'affiner les effets de la mambalgine sur les canaux ASIC1b : mécanisme d'action, profil pharmacologique sur les hétéromères ASIC1b+ASIC2 et ASIC1b+ASIC3 et mode d'action sur l'isoforme humaine d'ASIC1b.

2. Régulation d'ASIC1b par différents médiateurs liés à la physiopathologie de la douleur

L'étude des régulations en lien avec la douleur et affectant les canaux ASIC s'est principalement focalisée sur ASIC1a et ASIC3, notamment du fait de la disponibilité historique d'outils pharmacologiques (PcTx1 et APETx2) et génétiques (souris KO ASIC1a et ASIC3). Au début de cette thèse, seul le NO et certains peptides (dynorphine, FMRFamide et apparentés) étaient connus

comme étant des régulateurs d'ASIC1b avec un lien potentiel avec la physiopathologie de la douleur. D'autres se sont avérés être des modulateurs *via* une hétéromérisation avec ASIC3 (sérotonine, polyamines, voir Annexe 3) (Li et al., 2010; Wang et al., 2013). Certaines régulations pouvaient aussi être suggérées, du fait de l'homologie entre ASIC1a et ASIC1b (les deux tiers de la protéine sont similaires). Cela inclut des voies de signalisation comme la PKA et la PKC. Face à ces maigres données, une partie de cette thèse fut consacrée à la caractérisation des effets de médiateurs connus des ASIC mais jamais testé sur ASIC1b, et à l'identification de nouveaux régulateurs d'ASIC1b et des ASIC en général. Les méthodes et techniques employées dans cette partie sont identiques et toutes décrites dans la partie « Material and Methods » de l'article préliminaire précédent.

Plusieurs modulateurs exogènes ont donc été testés sur le courant ASIC1b (Figure 26 A-B). L'application de lipides connus pour réguler les ASIC comme la LPC et l'AA augmentent l'amplitude des courants ASIC1b évoqués par un saut de pH6,3 (+165% pour la LPC et +73,5% pour l'AA comparé au contrôle). Le mélange de lipides oxydés oxPAPC (oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine), jamais évalué auparavant sur les ASIC mais présentant des similitudes structurales avec la LPC, potentialise l'amplitude des courants ASIC1b (+61%). Ces lipides oxydés sont notamment connus pour être produit en grande quantité lors d'inflammation et sont capables d'activer TRPA1 (Liu et al., 2016a; Oehler et al., 2017). Le NO (via la perfusion de nitroprusside de sodium), comme proposé par Cadiou et al., est également capable de potentialiser ASIC1b (+46.9%). De façon intéressante, nous avons également observé une potentialisation durable, l'amplitude du courant restant significativement plus grande même 15 minutes après la fin de la perfusion du donneur de NO (+42,6%, non représenté). Cette action durable n'est pas observée pour ASIC1a (+31,4% à pH6,0 versus +15% 5 minutes après lavage, non représenté). Cet effet du NO est observable à pH6,3 et pH6,0 mais pas à pH5,0 (non représenté), en accord avec le mode d'action proposé par Cadiou et al., (augmentation de la sensibilité aux protons du canal).

Partageant le même domaine C-terminal avec ASIC1a, ASIC1b possède donc le domaine PDZ lui permettant d'interagir potentiellement avec les différents partenaires identifiés pour ASIC1a (Table 10). Cela inclut notamment PICK1, permettant la régulation d'ASIC1a et ASIC2 par la PKC. Dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour l'étude de la voie JNK (perfusion d'un activateur puis d'un inhibiteur et ratio des amplitudes des derniers courants pendant les deux phases, Figure 26D), nous avons pu observer que les voies de signalisations de la PKC et de la PKA augmentent significativement l'amplitude des courants ASIC1b (+63,6% pour la PKC, +34,4% pour la PKA, Figure 26C-D). Ces effets sont dépendants du pH d'activation pour la PKA mais indépendants pour la PKC : l'augmentation des courants à pH6,3 et pH5,0 est de +50,2% et +67,4% pour la PKC alors que pour la PKA la potentialisation n'est pas observée à pH5,0 (+9,3%, non significatif, non

représenté). Les travaux de Cadiou et al., sur le NO ont également testé la potentielle implication de la voie GMPc-PKG sur les courants ASIC natifs des neurones sensoriels chez le rat. Aucun effet de cette voie de signalisation ne fut observé sur ces courants (Cadiou et al., 2007). Nous avons également évalué les effets de cette voie particulière sur les canaux ASIC1b recombinants : cette voie ne régule pas l'amplitude des courants ASIC1b (+10,5%, non significatif), et ce quelque soit le pH appliqué (pH6,3-6,0-5,0, non représenté).

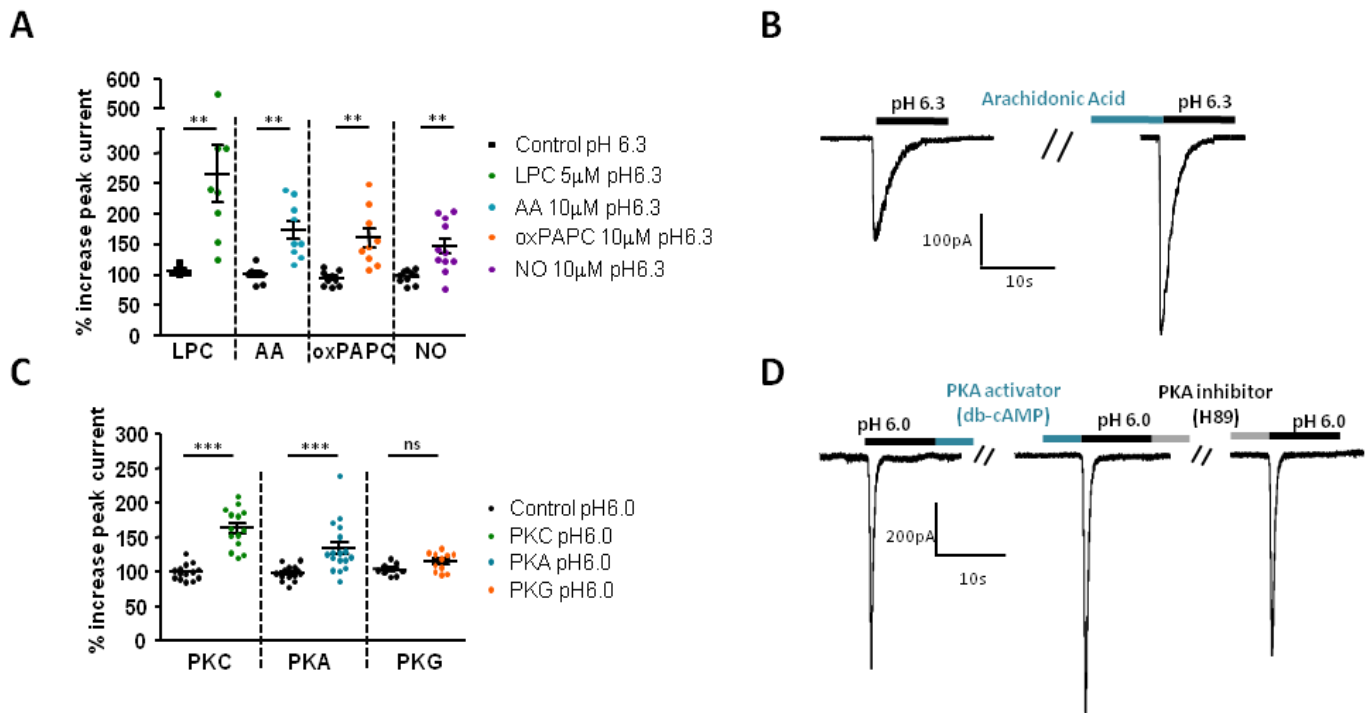


Figure 26 : Régulations des canaux ASIC1b par différents modulateurs en lien avec la douleur

A, Potentialisation relative des courants rASIC1b par différents modulateurs appliqués pendant 5min. Les courants ASIC1b sont activés par un saut de pH6,3. Le ratio entre le dernier courant avant (contrôle) et après perfusion des modulateurs est représenté. Lysophosphatidylcholine (LPC, 5µM, vert), Acide arachidonique (AA, 10µM, bleu), oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (oxPAPC, 10µM, orange) and Nitric Oxide (NO, nitroprusside de sodium, 10µM, violets). Wilcoxon paired test versus contrôle (noir), **p=0.0078 LPC, **p=0.0016 AA, **p=0.0039 oxPAPC, **p=0.0049 NO. n=8-11 cellules HEK différentes par modulateur. **B**, Représentation d'une expérience montrant la potentialisation par l'AA des courant rASIC1b activés par un saut de pH6,3. **C**, Potentialisation relative des courants rASIC1b activé par un saut à pH6,0 par différentes voies de signalisation: PKC (vert, PdBu 1µM comme activateur et chelerythrine 10µM comme inhibiteur), PKA (bleu, db-cAMP 100µM activateur et H89 1µM inhibiteur) et PKG (orange, 8-pCPT-cGMP 100µM activateur et Rp-8-pCPT-cGMP 10µM inhibiteur). Les activateurs sont perfusés pendant 5 à 10 minutes puis les inhibiteurs pendant le même laps de temps. La potentialisation relative est calculée entre l'amplitude du dernier courant après perfusion de l'activateur et celle du dernier courant après perfusion de l'inhibiteur et comparée par rapport au contrôle approprié (noir), comme décrit auparavant dans l'article préliminaire. Wilcoxon paired test versus contrôle, ***p=0.0002 PKC, ***p=0.0005 PKA, ns p=0.24 PKG. n=11-17 cellules différentes par modulateur. **D**, Représentation d'une expérience montrant la potentialisation de l'activation par la voie PKA des courant rASIC1b activés par un saut à pH6,0.

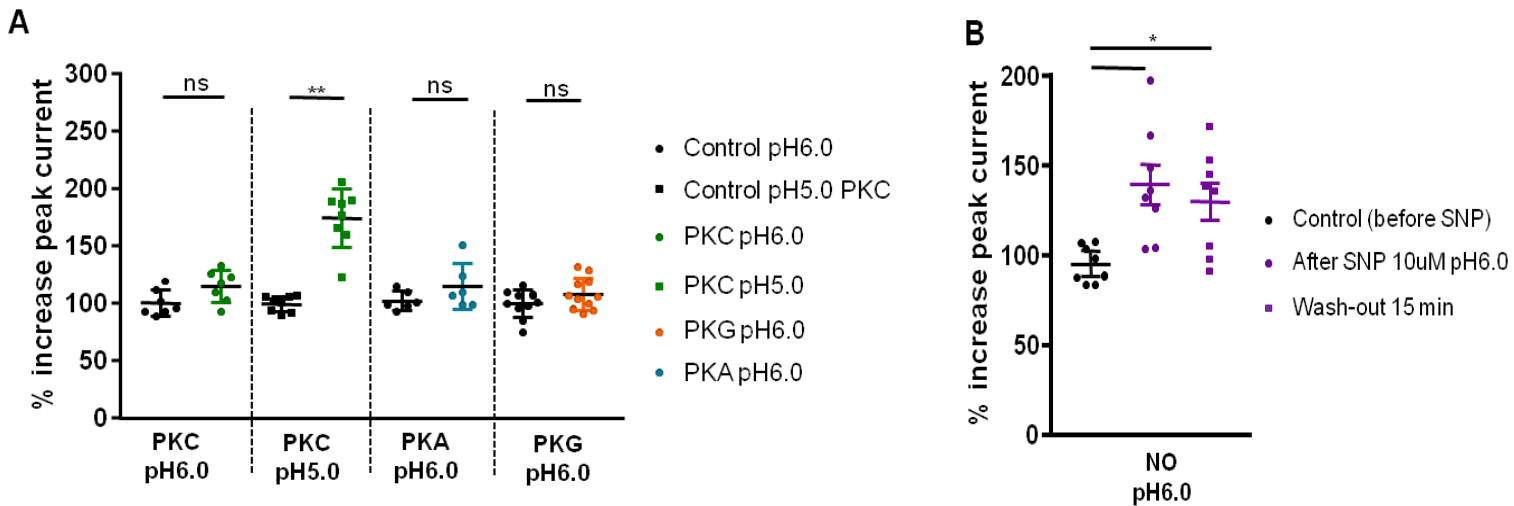


Figure 27 : Modulation des canaux ASIC1b humains par le NO et différentes voies de signalisations
A, Potentialisation relative des courants hASIC1b activés par un saut à pH6,0 ou à pH5,0 par différentes voies de signalisation: PKC (vert, PdBu 1 μ M comme activateur et chelerythrine 10 μ M comme inhibiteur), PKA (bleu, db-cAMP 100 μ M activateur et H89 1 μ M inhibiteur) et PKG (orange, 8-pCPT-cGMP 100 μ M activateur et Rp-8-pCPT-cGMP 10 μ M inhibiteur). Les activateurs sont perfusés pendant 5 à 10 minutes puis les inhibiteurs pendant le même laps de temps. La potentialisation relative est calculée entre l'amplitude du dernier courant après perfusion de l'activateur et celle du dernier courant après perfusion de l'inhibiteur et comparée par rapport au contrôle approprié (noir). Wilcoxon paired test versus contrôle, ** $p=0.0078$ PKC pH5,0, ns $p=0.07$ PKC pH6,0, ns $p=0.09$ PKA, ns $p=0.27$ PKG. $n=6-11$ cellules différentes par modulateur. **B**, Potentialisation relative des courants hASIC1b par le NO (nitroprusside de sodium) appliqué pendant 5min. Les courants hASIC1b sont activés par un saut à pH6,0. Le ratio est exprimé entre le dernier courant avant (contrôle, noir), après perfusion du NO (after SNP, cercles violet) et 15 minutes après lavage (carrés violet). Wilcoxon paired test versus contrôle, * $p=0.015$ after SNP, * $p=0.039$ après 15min wash-out. $n=8$ cellules.

Les effets de certains de ces médiateurs furent aussi évalués sur les canaux ASIC1b humains (Figure 27). Les voies de la PKA et de la PKG n'ont pas d'effet sur hASIC1b, quelque soit le pH d'activation utilisé (Figure 27A, pH6,0 représenté : PKA +15%, PKG +8,4% non significatifs; pH6,3 et pH5,0 testés également, non représentés). L'activation de la voie de la PKC potentialise l'amplitude des courants hASIC1b activés à pH5,0 (+74,5%) mais pas à pH6,0 (+15,1%, non significatif). Ces résultats diffèrent donc sensiblement de ceux obtenus chez le rat. La régulation par le NO, avec son effet à long terme, est néanmoins conservée (+39,6% après 5 minutes de perfusion de SNP et +30,1% après 15 minutes de lavage) (Figure 27B).

En conclusion, les résultats obtenus sur les canaux recombinants indiquent que le courant ASIC1b est régulé, en plus des effets de la MAPK JNK présentés précédemment, par de nombreux

médiateurs associés à la douleur tels que des lipides (dont l'oxPAPC), le NO (potentialisation durable des courants), et l'activation des kinases PKC et PKA. Ces résultats confirment certaines données déjà publiées (NO, certains lipides) et sont compatibles avec les régulations connues d'ASIC1a, comme celles par la PKC et la PKA impliquant le domaine C-terminal qui est conservé entre les deux variants d'ASIC1. De nombreux médiateurs chimiques peuvent activer ces voies de signalisation (Table 4), ASIC1b doit maintenant être considéré comme cible potentielle.

En dehors de l'oxPAPC, l'ensemble de ces médiateurs ont déjà été testés sur d'autres ASIC. Ces travaux visaient donc essentiellement en une confirmation : au vu des données obtenues précédemment sur les autres ASIC, de tels effets sur ASIC1b étaient fortement suspectés mais nécessitaient une confirmation expérimentale. Ces expériences ont également confirmé les effets du NO sur les ASIC et notamment ASIC1b, induisant une potentialisation durable des courants. Ces travaux ont également permis de tester certaines de ces régulations sur le canal ASIC1b humain. Peu de données sont disponibles sur les régulations des canaux ASIC humains. Seul le NO et la PKC potentialise hASIC1b, avec un effet différent de rASIC1b pour cette dernière. Une étude précédente a évalué les effets de la PKC sur hASIC1a : l'activation de la PKC bloque hASIC1a, via deux résidus situés en N-terminal (S40) et en C-terminal (S499). hASIC1b ne possède que le site en C-terminal en commun avec hASIC1a. Ces différences pourraient en partie expliquer l'effet de la régulation par la PKC sur hASIC1b : potentialisation de l'amplitude des courants mais avec un effet différent sur la sensibilité aux protons comparé à la régulation PKC sur rASIC1b (Bashari et al., 2009). L'absence d'effet de la PKA sur le canal hASIC1b pourrait être expliquée par l'absence de 4 sérines sur le segment N-terminal comparé à celui de rat.

3. Caractérisation des courants activés par les protons des neurones sensoriels

Notre étude de la régulation des canaux ASIC par JNK nous a amené à explorer en détail les courants ASIC des neurones sensoriels des segments thoraco-lombaires de rat et de souris. Cette partie apportera des résultats complémentaires sur la caractérisation fonctionnelle de ces neurones en se basant notamment sur des critères relatifs à la taille et aux propriétés des potentiels d'action, en plus du criblage complet avec les différentes toxines ciblant les canaux ASIC. Les effets de JNK sur la phase soutenue des courants pH-activés seront présentés car cette dernière est vraisemblablement le résultat de l'activité de plusieurs types de canaux dont les canaux TRPV1 (Ergonul et al., 2016). Les méthodes et techniques employées dans cette partie sont identiques et toutes décrites dans la partie « Material and Methods » de l'article en préparation.

La représentation en fonction de la taille des différentes populations de neurones sur lesquelles les trois toxines (mambalgine, APETx2 et PcTx1) ont été testées (déterminée selon la capacitance des neurones avec un seuil de 40pF pour les neurones « moyens/larges » (Bardoni et al., 2014; Petruska et al., 2000, 2002)), ainsi qu'en fonction des différents types de potentiels d'action (PA), permet de faire apparaître des différences notables (Figure 28). Des courants ASIC sont retrouvés dans la même proportion (environ 65%) quelque soit la taille des neurones sensoriels. Les courants ASIC avec une composante ASIC1a (blocage d'au moins 20% par PcTx1 et par la mambalgine ; voir Table 1 de l'article en préparation pour plus de détails) sont retrouvés majoritairement dans les neurones de petites tailles alors que ceux avec une composante vraisemblablement ASIC1b (blocage d'au moins 20% par la mambalgine mais insensible à PcTx1) sont enrichis aussi dans des neurones de taille moyenne/large (Figure 28A). En moyenne, la part du courant ASIC bloqué par une toxine représente environ 40 à 50 % du courant total à pH5,0, bien que cette proportion soit très variable d'un neurone à l'autre (Figure 28B). Plus précisément, au sein des neurones sensibles aux trois toxines, la comparaison des pourcentages d'inhibition de la mambalgine et de PcTx1 au sein d'un même neurone nous indique que la mambalgine bloque en moyenne une part plus importante du courant ASIC, ce qui est cohérent avec un profil pharmacologique plus large pour cette toxine (Figure 28C, colonne de gauche). Néanmoins, quelques neurones présentent le profil inverse (28C, colonne centrale) : malgré le fait que le profil de PcTx1 soit compris dans celui de la mambalgine, un tel résultat pourrait refléter les différences de mécanisme d'action entre les deux toxines (actions différentes de PcTx1 et de la mambalgine sur l'activation et l'inactivation d'ASIC1a ou ASIC1b). Quelques rares neurones ont un pourcentage d'inhibition identique entre les deux toxines, suggérant dans ce cas précis le blocage du même type de canal (ASIC1a ou ASIC1a+ASIC2b, compte tenu des concentrations de PcTx1 utilisées).

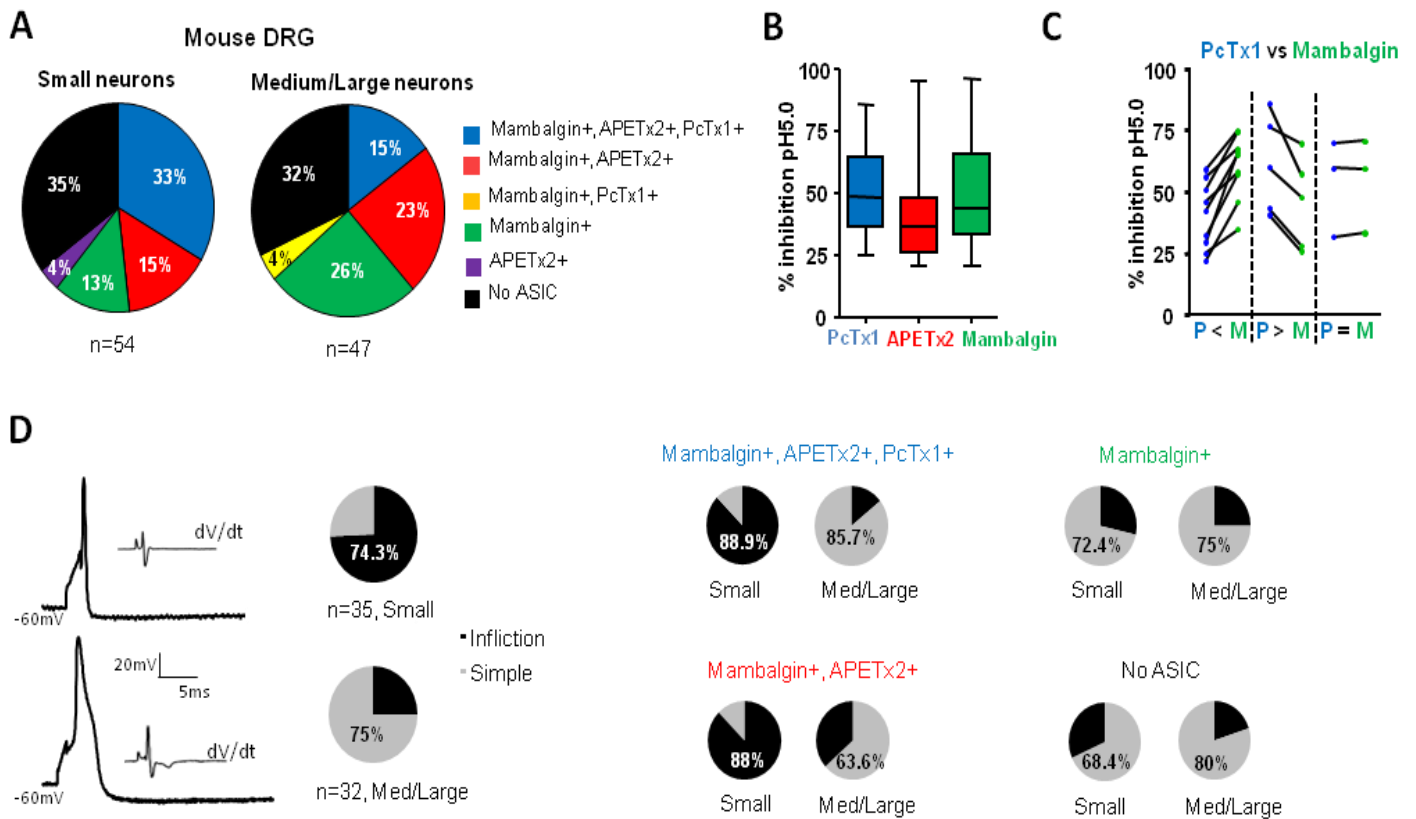


Figure 28 : Caractéristiques des neurones sensoriels de souris

A, Représentation des proportions (%) des différents types de courants activés par une acidification en fonction de la taille des neurones (Small <40pF, n=54, et Medium/Large >40pF, n=47) au sein des neurones sensoriels de souris. Un courant est qualifié de sensible à une toxine si celle-ci produit au moins 20% d'inhibition du courant **B**, Représentation des pourcentages d'inhibition de chaque toxine ciblant les canaux ASIC sur les courants activés par un saut à pH5,0. **C**, Comparaison des pourcentages d'inhibition des courants activés par un saut à pH5,0 par PcTx1 et la mambalguine au sein des mêmes neurones. **D**, Gauche : Représentation de deux types de potentiel d'action évoqués par des sauts de courant de 50pA en configuration courant-imposé. La dérivée en fonction du temps permettant de caractériser la phase descendante du PA (simple ou avec épaulement ou « inflection ») est indiquée, ainsi que la proportion de chaque type de PA au sein des neurones « Small » et « Medium/Large » et ayant un courant ASIC. Droite : Détails des proportions de chaque type de PA dans les neurones de différentes tailles ayant différents types de courant ASIC.

Un niveau de classification supplémentaire peut être apporté par le type de PA du neurone. Deux types peuvent être distingués : avec ou sans épaulement dans la phase descendante (Figure 28D). Cet épaulement est souvent utilisé pour indiquer la présence du canal Nav1.8, considéré comme marqueur des nocicepteurs et qui est enrichi dans les fibres C. Ce type de PA est principalement retrouvé dans les neurones de petite taille, appartenant potentiellement au groupe des fibres C, et contenant des courants ASIC sensibles à la mambalguine mais également à PcTx1

(contenant ASIC1a) et APETx2 (contenant ASIC3), en accord avec d'autres données de la littérature sur la répartition de ces canaux dans les DRG (Table 11). A l'inverse, la population de neurones sensible uniquement à la mambalgine (quelque soit la taille) présente majoritairement un type de PA sans cet épaulement et suggère un enrichissement de ce type de courant dans des neurones non-nociceptifs. Les neurones n'ayant pas de courant ASIC seraient donc principalement non-nociceptifs (Figure 28D). Cette classification obtenue sur des neurones en culture, bien que spéculative et ayant plusieurs limites, semble correspondre à la distribution identifiée par analyse transcriptomique. Elle sera reprise en détail dans la partie Discussion et Perspectives.

Un tel travail de classification peut également être réalisé sur la population de neurones sensoriels de rat, bien qu'étant moins représentative du fait de l'effectif plus limité (n=49 neurones) (Figure 29). Sur l'ensemble de la population, environ les deux tiers des neurones ont des courants ASIC, avec un léger enrichissement au sein des neurones de petite taille (Figure 29A). Les courants ASIC sensibles aux trois toxines et contenant ASIC1a (sensibles à la PcTx1) sont également enrichis au sein de cette population, comme chez la souris. Mais des différences entre espèces sont également notables : des courants majoritairement dus à ASIC3 (sensibles uniquement à APETx2) sont retrouvés en proportion non négligeable, de même que des courants sensibles à la mambalgine et PcTx1 et ayant des caractéristiques proches des canaux ASIC1a homomériques (Figure 29A-B). A l'inverse, la population de neurones ayant des courants uniquement sensibles à la mambalgine est principalement retrouvée dans les neurones de petite taille alors que celle sensible à la mambalgine et APETx2 est retrouvée quasi-exclusivement dans les neurones plus larges. Quelque soit le type de courant ASIC, les neurones de petite taille vont avoir majoritairement un PA avec épaulement. Ceux de taille moyenne/large n'auront que dans une proportion moindre ce type de PA. Dans l'ensemble, ces données sont cohérentes avec celles obtenues auparavant sur le rat au sein du laboratoire (Deval et al., 2008; Diochot et al., 2012) ou par d'autres équipes (Poirot et al., 2006), confirmant la relative bonne reproductibilité de ces expériences sur les canaux ASIC des neurones sensoriels de rat. Des différences rat/souris ont également été observées (Leffler et al., 2006). Ces données sur la caractérisation des neurones sensoriels et des courants ASIC natifs chez le rat et la souris sont résumées dans la Table 15. Ces données seront également discutées plus en détail dans la partie Discussion et Perspectives.

En conclusion, il ressort de cette étude que les canaux ASIC1 et potentiellement ASIC1b contribuent significativement aux courants ASIC des neurones sensoriels chez le rongeur. L'expression fonctionnelle de ce dernier semble, dans nos conditions, importante et il apparaît comme un acteur majeur de la réponse au pH de ces neurones. Les courants ASIC natifs sont pour la grande majorité régulés positivement par la voie JNK.

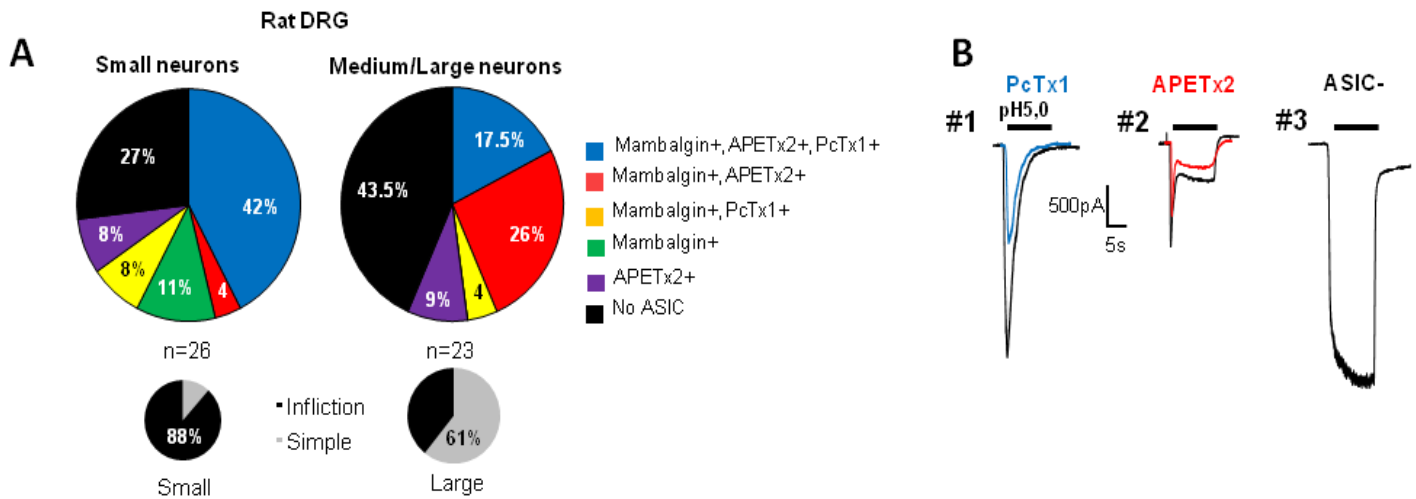


Figure 29 : Caractéristiques des neurones sensoriels de rat

A, Représentation des proportions (%) des différents types de courants protons-activés en fonction du profil pharmacologique, de la forme du PA et de la taille des neurones (Small<40pF, n=26, et Medium/Large>40pF, n=23) au sein des neurones sensoriels de rat. Pour chaque sous-classe de taille est indiquée en dessous la proportion de PA ayant ou non un épaulement. **B**, Exemples de courants activés par un saut à pH5,0 dans trois neurones différents (#1-3), enregistrés au potentiel imposé de -80mV et bloqués ou non par différentes toxines.

Culture type	Capacitance (pF)	Resting membrane potential (mV)	Action potential duration (ms)	Rheobase (pA)	Transient current density (pA/pF, pH5.0)	Transient current density (pA/pF, pH6.6)	Sustained current density (pA/pF, pH5.0)	Peak current Inactivation time constant (ms, pH5.0)	Peak current Ratio pH6.6/5.0
Mouse DRG	43.24±0.15 (15 / 94)	-59.32±0.44 (-71.6/-40)	3.02±0.15 (0.84/9.27)	545.8±33.3 (50/2611)	36.08±3.92 (2.11/231.1)	9.13±1.35 (0.29/60)	21.8±2.73 (0.66/234.5)	376.2±50.2 (73/1472)	0.28±0.02 (0.01/0.86)
Mouse DRG acute	38.73±3.56 (13/82)	-59.29±1.24 (-80/-43)	3.146±0.4 (0.82/8.44)	749.3±83.9 (199/1706)	33.99±9.95 (0.86/127.3)	4.451±0.9 (0.22/10.79)	16.96±7.56 (1/211.5)	336.6±96.38 (79/921)	0.22±0.04 (0.05/0.62)
Rat DRG	42.25±2.72 (18/89)	-57.59±1.11 (-76/-40)	4.87±0.35 (1.09/10.03)	1446±147.4 (50/4950)	85.13±18.16 (3.29/342.3)	30.42±8.86 (0.66/99.79)	38.84±6.98 (1.21/193.9)	562.3±89.72 (159/1436)	0.30±0.03 (0.07/0.50)

Table 15 : Résumé des principales caractéristiques des neurones sensoriels de rat et de souris (deux conditions de culture)

Sont représentés les données obtenues sur des cultures primaires de neurones sensoriels de rat et de souris (1-4 jours en culture, n=4-10 cultures indépendantes) ainsi que des neurones de souris venant de cultures « aigue » (3-10h, n=4). Moyenne±SEM, (Minimum/Maximum). N=15-154 neurones.

Partie III : Etude de l'implication d'ASIC1b dans la douleur aigue

I. Contexte de l'étude

La dernière partie de cette thèse concerne les effets analgésiques sur la douleur thermique aigue chaude obtenus avec la mambalgine ou des siRNA dirigés contre ASIC1b (Diochot et al., 2012, 2016). Les travaux très préliminaires présentés dans cette partie visent à comprendre les mécanismes impliquant un canal sensible à l'acidité dans la perception thermique nocive basale. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer un tel résultat :

-ASIC1b serait un senseur thermique direct. Cette hypothèse est néanmoins peu probable au vue de la littérature. Plusieurs études ont étudié la régulation et l'activation des canaux ASIC par des températures froides (Askwith et al., 2001) ou chaudes (Blanchard and Kellenberger, 2011) : les ASIC ne sont pas activés par de tels stimuli, cependant un refroidissement (20°C à 6°C) ralentit l'inactivation des canaux ASIC alors qu'un réchauffement (25°C à 35°C) a l'effet inverse. De plus, comme évoqué en introduction, la détection de températures chaudes passerait majoritairement par les canaux TRPV1, TRPM3 et TRPA1, les souris KO pour ces trois canaux étant complètement insensibles à de tel stimulus (Vandewauw et al., 2018).

-ASIC1b serait un senseur thermique indirect. Deux mécanismes peuvent être liés à cette hypothèse. Le premier impliquerait qu'un stimulus thermique entraîne une libération locale de protons pouvant activer les canaux ASIC. Un tel phénomène est par exemple avancé avec l'ATP pour la modulation de la perception thermique et mécanique par les canaux P2X4 (Moehring et al., 2018b, 2018c). Les récentes avancées concernant la compréhension de l'activation des ASIC dans le SNC ont pu démontrer des effets autocrines/paracrines des protons dans la communication cellulaire et un tel rôle est donc concevable en périphérie (Du et al., 2014a; Kreple et al., 2014; Lalo et al., 2007; Miesenböck et al., 1998; Nomura et al., 2018). Le second mécanisme résulterait d'une interaction des canaux ASIC avec les senseurs directs, les canaux TRP par exemple, et modulant *in fine* l'activité de ces derniers. Cette interaction pourrait être directe, comme celle suspectée entre les canaux ASIC et les canaux BK ou P2X3 (Petroff et al., 2008; Stephan et al., 2018) ou indirecte. Par exemple, il a récemment été démontré que la protéine AKAP150, connue pour interagir avec certains ASIC, était capable de créer des complexes contenant plusieurs types de canaux ioniques comme TRPV1, Cav1.2 ou certains Kv7.x, *via* des approches de microscopie à très haute résolution. Cette association entraîne une modulation des activités respectives de ces canaux : par exemple le blocage de Cav1.2 ralentit la désensibilisation de TRPV1 suite à des stimulations répétées (Zhang et al., 2016). Ainsi, il est donc envisageable de postuler que de telles interactions puissent exister entre ASIC1b et TRPV1.

-ASIC1b serait un modulateur indirect de la perception thermique via un/des mécanisme(s) inconnu(s). Un tel mécanisme pourrait impliquer le système opioïde endogène. Cette hypothèse repose sur deux aspects :

*D'abord, certains effets analgésiques liés aux ASIC sont dépendants des enképhalines. En effet, l'injection dans le SNC de PcTx1 entraîne une augmentation des niveaux d'enképhaline dans le CSF. Cet effet est également reproduit par injection de siRNA contre ASIC1a (Mazucca et al., 2007). Des résultats préliminaires ont suggéré que les souris KO pour ASIC1a avaient aussi des niveaux d'enképhaline plus élevés (CSF et certaines régions cérébrales comme l'amygdale, la PAG ou le RVM). L'injection de naloxone sur des souris KO ASIC1a entraîne des comportements typiques de sevrage (Kreple et al., 2011). Le blocage des canaux ASIC1a est donc relié en partie, et au moins au niveau du SNC, à une élévation des opiacés endogènes. Le mécanisme aboutissant à cette élévation est cependant inconnu et plusieurs hypothèses peuvent être envisagées (évoquées plus en détails dans la partie Discussion). Néanmoins, dans notre cas, comment cet effet opioïde-dépendant peut-il être relié aux effets périphériques et associés à l'inhibition d'ASIC1b ? Le deuxième aspect de cette hypothèse pourrait permettre d'apporter ce lien manquant.

*Récemment, le groupe de John Wood a proposé que le phénotype observé chez les patients porteurs d'une mutation entraînant une perte de fonction du canal sodique Nav1.7 soit lié, en partie et non exclusivement, à une élévation des opiacés endogènes. Chez un patient ayant cette mutation et étant complètement insensible à la douleur, l'injection de naloxone a permis à ce dernier de ressentir une douleur suite à une stimulation thermique nocive. Les souris KO Nav1.7 ont également un phénotype similaire (altération des seuils de douleur thermique, supprimé par injection de naloxone). Chez ces souris KO Nav1.7, mais pas celles KO Nav1.8 ou Nav1.9, l'expression du gène codant pour le précurseur des enképhalines (Penk) est augmentée dans les DRG alors que celle du récepteur 5HT4 est diminuée (l'activation de ce dernier est pronociceptive). *In vitro*, la diminution de la concentration intracellulaire de sodium mime ces effets sur l'expression de Penk (Minett et al., 2015). Consécutivement à cette étude, il a été montré que le blocage de Nav1.7 modulait positivement l'activité des récepteurs Mu aux opiacés dans les neurones sensoriels, un effet qui serait lié aux concentrations intracellulaires de sodium (Isensee et al., 2017; Kanellopoulos et al., 2017). Les souris KO Nav1.7 ainsi que pour les récepteurs Mu et Delta ont également un phénotype hyposensible réduit par rapport aux animaux KO Nav1.7 seul (Pereira et al., 2018). Il a ainsi été proposé que le sodium entrant par le canal Nav1.7 était à l'origine de ces effets : une possible interaction entre Nav1.7 et récepteur Mu pourrait expliquer les effets de modulation du canal et du sodium sur l'activité du récepteur (expliqué par la suite), *via* certains partenaires protéiques (Kanellopoulos et al., 2018) et les effets transcriptionnels sur le gène Penk passeraient par l'inhibition

du facteur de transcription sodium-dépendant NFAT5 qui réprime l'expression de Penk : les souris KO NFAT5 ont des niveaux d'expression de Penk plus importants mais n'ont pas l'hyposensibilité thermique des souris KO Nav1.7, suggérant que d'autres mécanismes sont nécessaires pour l'établissement de ce phénotype. L'injection d'un bloqueur de Nav1.7 et d'une faible dose d'agoniste des récepteurs Mu produit une analgésie puissante, résultant de la synergie des deux composés (Deuis et al., 2017). Cependant, cette hypothèse liant Nav1.7 et opioïdes est contestée (McDermott et al., 2019). Ces effets intracellulaires du sodium sur la fonctionnalité des GPCR sont connus depuis longtemps : en effet, dès l'identification du récepteur Mu par Pert et Snyder dans les années 70, il fut observé que ce paramètre pouvait modifier l'affinité d'un agoniste pour ce récepteur (l'augmentation intracellulaire de sodium diminue l'affinité) (Pert and Snyder, 1973; Pert et al., 1973). Plus récemment, les nombreuses avancées produites par les études de cristallographie ont permis d'identifier et de comprendre ce mécanisme de régulation allostérique des GPCR de classe A par les ions sodium (Katritch et al., 2014; Liu et al., 2012a). Il existe donc un site de liaison intracellulaire entre l'ion sodium et le GPCR. La fixation du sodium module l'activité du récepteur : il favorise l'état inactif du récepteur, diminuant de ce fait l'affinité des agonistes. Il entraîne également un biais de signalisation, en particulier sur la signalisation β -arrestine dépendante (favorisant cette dernière à priori dans le cas des récepteurs aux opiacés) (Fenalti et al., 2014; Livingston and Traynor, 2014; Stanczyk et al., 2019; Sun et al., 2017b). Cette signalisation β -arrestine est associée à plusieurs effets indésirables des opiacés comme la dépression respiratoire ou la tolérance (Bohn et al., 1999, 2000). Récemment, des stratégies thérapeutiques ont donc concerné la mise au point d'agonistes biaisés, permettant un recrutement minime de la signalisation β -arrestine (Manglik et al., 2016; Schmid et al., 2017). Cet ion sodium aurait ainsi une importance capitale dans la signalisation cellulaire associée aux GPCRs. Notre hypothèse serait donc similaire à celle de Nav1.7 : il existerait un lien entre ASIC1b et récepteurs aux opiacés. Le sodium provenant d'ASIC1b modulerait localement l'activité du récepteur et le blocage du canal agirait indirectement sur le récepteur, favorisant son activité liée aux effets analgésiques. Néanmoins, comment ASIC1b pourrait-il contribuer à ce flux de sodium chez des animaux sains, sans qu'une acidification extracellulaire ait à priori lieu dans ces conditions ? De plus, d'où proviennent ces opioïdes endogènes ?

La partie suivante présente donc quelques résultats en lien avec ces hypothèses concernant ASIC1b et douleur thermique aiguë.

II. Résultats

1. Matériels et méthodes complémentaires

Les expériences présentées dans cette partie sont relativement similaires à celles présentées dans les deux premiers articles : patch-clamp sur canaux recombinants exprimés dans des cellules HEK et expériences de comportement. La plupart des méthodes sont décrites dans ces deux études précédentes. Les variations sont les suivantes :

-Pour les expériences de patch-clamp, des cellules HEK ont été transfectées avec les vecteurs suivants : pCDNA3.1 rTRPV1, pIRES2-EGFP, pIRES2-rASIC1b-EGFP, pIRES2-mTREK1-EGFP et pCI-hMOR (Mu Opioid Receptor). 0,5µg d'ADN par boîte est utilisé pour ASIC1b, 0,1µg pour TREK1 et 2,5µg pour MOR. La transfection de TRPV1 et de la GFP se fait avec un ratio 1 :1 (0,5µg de chaque). Les changements rapides de température de perfusion des cellules sont réalisés avec le système WAS-02 (Dittert et al., 2006). Une sonde thermique est attachée à l'extrémité de la perfusion et contrôlée *via* l'interface du logiciel pClamp. Pour les courants TREK1, un protocole de rampe de potentiel est appliqué: après passage en configuration cellule-entière, la cellule est maintenue à un potentiel de -80mV, puis 40ms à -100mV, puis augmentation progressive jusqu'à +50mV en 400ms. Le courant TREK1 est mesuré à 0mV. Ce protocole est réalisé toutes les 30 secondes. L'activation des MOR est faite avec de la morphine (Cooper, 50µM), perfusée pendant 5 minutes.

-Pour les expériences de comportement, des souris mâles C57Bl6 (Charles River) de 8 à 12 semaines sont utilisées. Le test de paw-flick est réalisé : les souris sont immobilisées manuellement dans un morceau de tissu afin de les immobiliser. La patte arrière gauche de l'animal est ensuite plongée dans un bain-marie à 46°C. Le temps de latence de retrait de la patte est alors déterminé (en secondes), avec une limite de 30s. Au moins 5 minutes séparent chaque stimulation. Les souris sont habituées 1 à 2 jours avant l'expérience. Après détermination de la latence contrôle (au moins trois valeurs), les souris reçoivent une injection intraplantaire de mambalgine (34µM, dans 10µl de sérum physiologique avec 0,05% de BSA), d'un mélange mambalgine + naloxone (Sigma, 15mM) ou de naloxone seule. La sensibilité thermique est ensuite évaluée toutes les 15 minutes pendant une heure. Les expériences sont réalisées en aveugle vis-à-vis du traitement.

2. ASIC1b et détection d'un stimulus thermique

Le premier aspect évalué concerne la potentielle implication d'ASIC1b en tant que senseur thermique. Comme évoqué précédemment, une élévation de température accélère l'inactivation d'ASIC1b. Néanmoins, un effet de températures nocives (supérieure à 40°C) n'a jamais été testé

(Blanchard and Kellenberger, 2011). La Figure 30 présente ces effets sur ASIC1b (Figure 30A, C) et TRPV1 (Figure 30B).

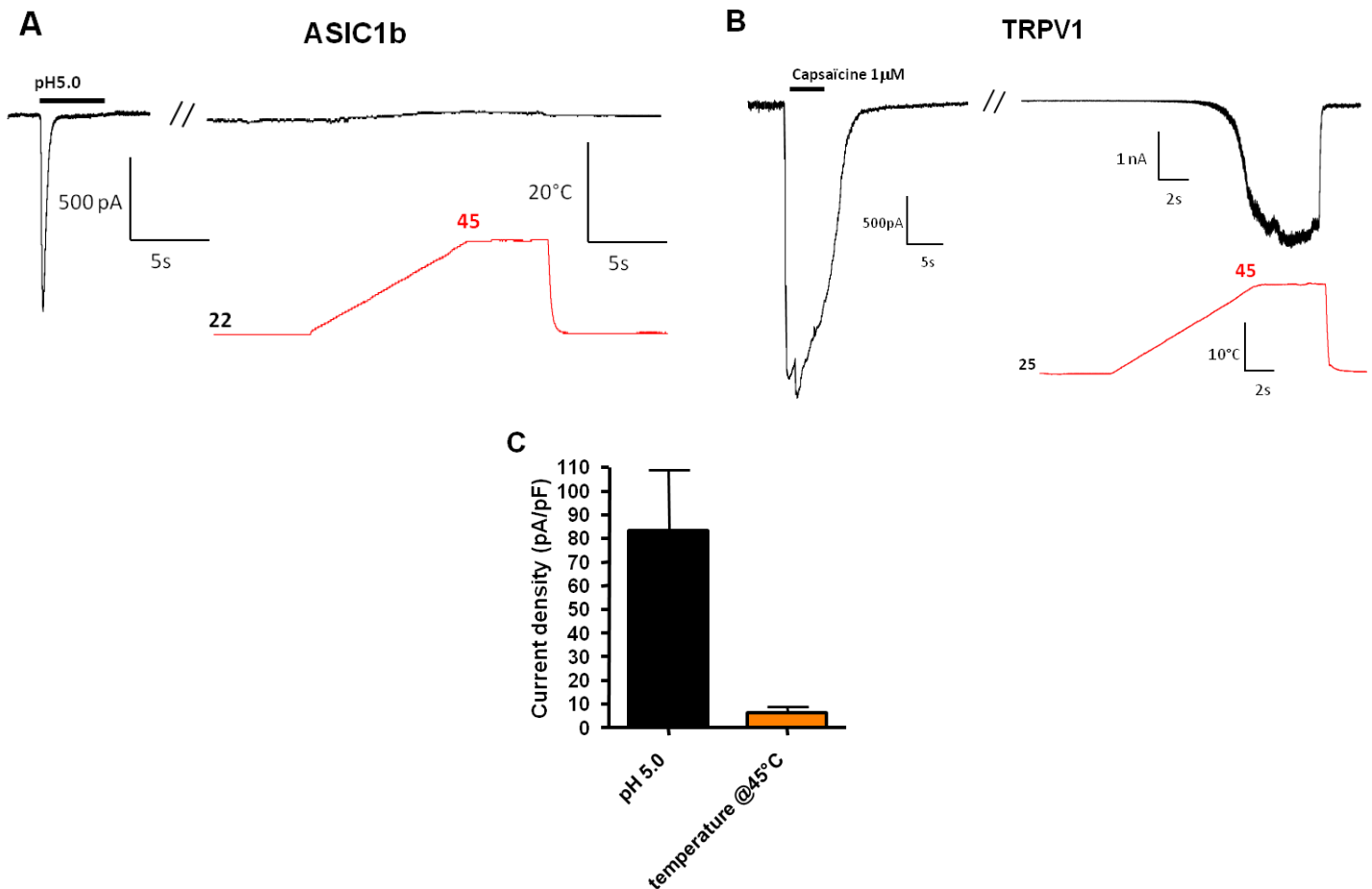


Figure 30 : Effet de la température chaude nocive sur l'activation des canaux ASIC1b et TRPV1

A, Représentation d'un courant ASIC1b évoqué par un saut de pH5,0 (gauche) et par une augmentation progressive de la température (22°C-45°C) de la solution perfusée sur les cellules HEK (droite). En rouge (trace du bas) est représentée la température de la solution perfusée sur la cellule. Potentiel imposé -60mV **B**, Représentation d'un courant TRPV1 en réponse à une stimulation par la capsaïcine (1µM, gauche) et par une augmentation progressive de la température de perfusion (25°C-45°C, droite). Potentiel imposé -60mV **C**, Quantification des effets du saut à pH5,0 et du changement de température sur la densité des courants ASIC1b (pA/pF). N=6 cellules.

Cette expérience montre qu'une telle stimulation thermique chaude *in vitro* n'active pas ASIC1b, contrairement à TRPV1 (Figure 30 B-C). Des rampes de température plus rapide (de 20°C à 42°C en moins d'une seconde) n'ont pas réussi à entraîner une activation d'ASIC1b (non présenté). Ces données confirment donc qu'ASIC1b n'est pas un senseur thermique direct.

3. Implication des récepteurs aux opiacés dans les effets de la mambalgine sur la douleur thermique aiguë

Dans un second temps, nous avons exploré la possible implication des récepteurs aux opiacés dans les effets observés concernant ASIC1b et douleur aiguë au chaud. L'injection locale intraplantaire de mambalgine augmente sensiblement le seuil de retrait de la patte en réponse à une stimulation chaude nocive chez la souris (Figure 31A, 8,88s à 13,57s, t+30 minutes) ou après injection *iv* chez le rat, mais l'effet est très transitoire dans ce cas (Figure 31B, 9,65s à 13,03s, t+15 minutes). De façon intéressante, la coinjection de mambalgine et de naloxone abolit totalement l'effet analgésique observée avec la mambalgine seule chez la souris. L'injection locale de naloxone seule n'a pas d'effet sur la sensibilité thermique également, un résultat consistant avec d'autres études (Parsons et al., 1990).

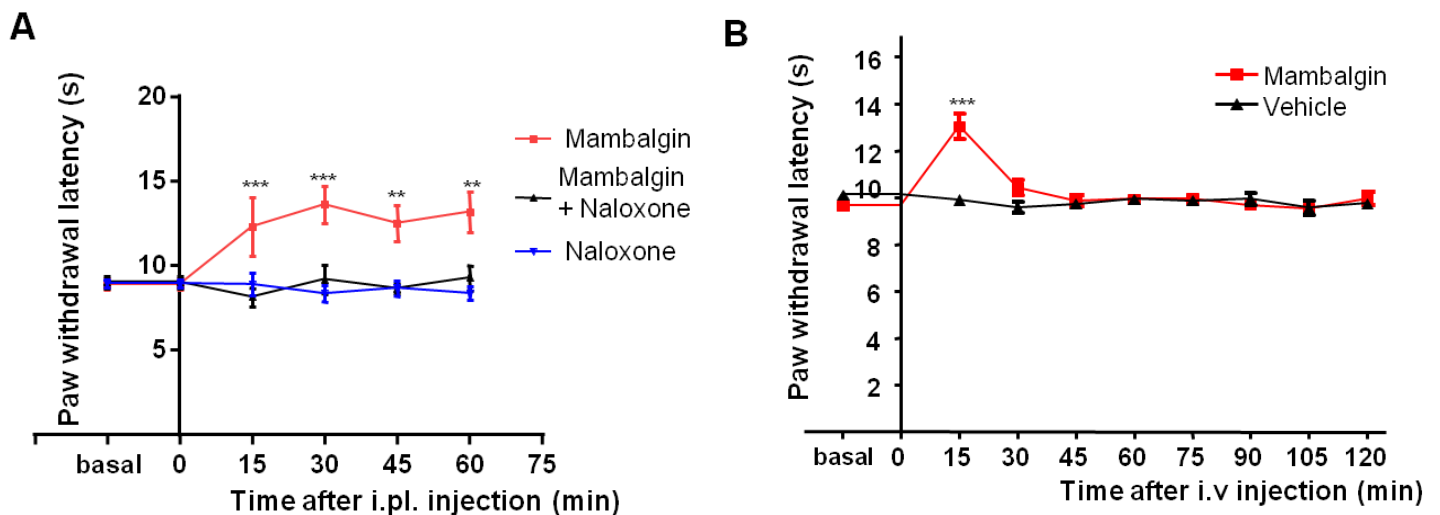


Figure 31 : Effets de la mambalgine sur la douleur thermique aiguë chez la souris et le rat

A, Cinétique des effets locaux d'une injection intraplantaire de mambalgine ($34\mu\text{M}$, rouge), mambalgine+naloxone ($34\mu\text{M}$ mambalgine et 15mM naloxone, noir) et de naloxone seule (15mM , bleu) sur la sensibilité thermique évaluée par le test de paw-flick (46°C) chez la souris. Two-way ANOVA, $(F(10,130)=5.247, p<0.0001, \text{post-test Bonferroni } ***/** p<0.001, \text{Mambalgin versus Mambalgine+Naloxone ou Naloxone. } n=9-10$. **B**, Cinétique des effets d'une injection intraveineuse de mambalgine ($34\mu\text{M}$, rouge) ou de véhicule (solution physiologique +BSA0,05%) sur la sensibilité thermique évaluée par le test de Hargreaves chez le rat. Two-way ANOVA, $F(9,198)=10.7, p<0.0001, \text{post-test Bonferroni } ***p<0.0001 \text{ Mambalgine versus vehicule. } n=10-14$.

Cette expérience indique que l'effet analgésique de la mambalgine observé sur la douleur aigue au chaud passerait par une activation des récepteurs aux opiacés, la naloxone seule n'interagissant pas directement avec la mambalgine sur ASIC1b (expériences de patch-clamp, n=3, non représentées).

Afin d'explorer plus en détails les possibles mécanismes à l'origine de cet effet, nous avons décidé de tester les effets que pouvaient avoir ASIC1b sur l'activité des MOR. Pour ce faire, nous avons exprimé dans des cellules HEK ce récepteur avec le canal K2P TREK1, bien connu pour être régulé positivement par les protéines Gi notamment suite à l'activation du MOR (Devilliers et al., 2013; Noel et al., 2011), avec ou sans ASIC1b (Figure 32).

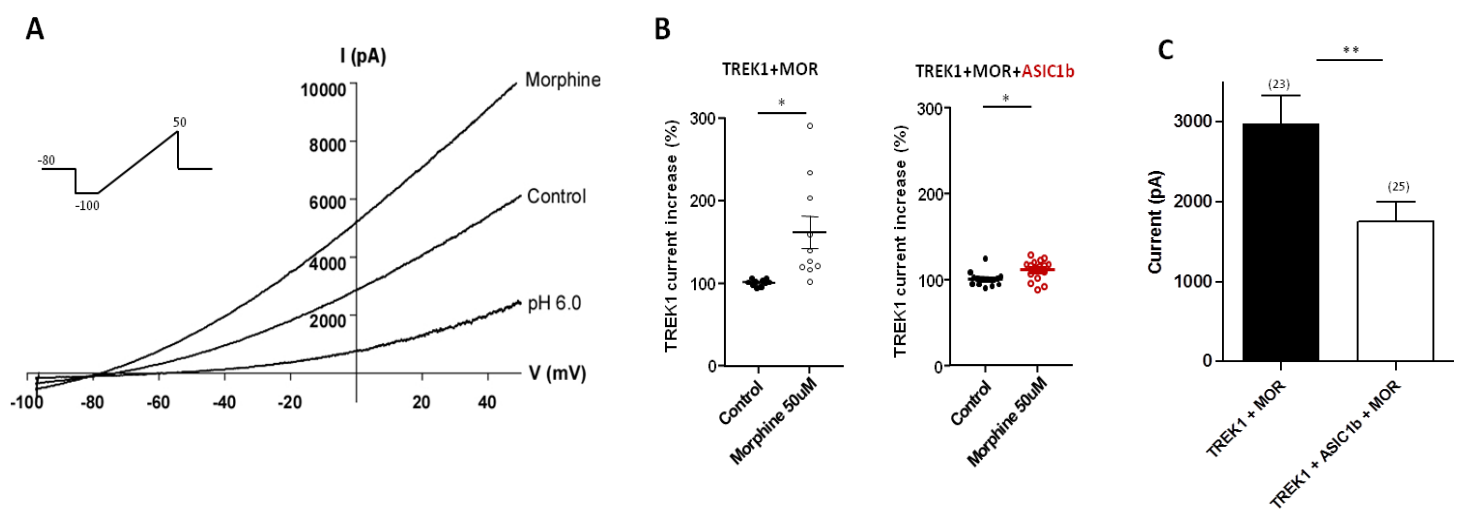


Figure 32 : Modulation de TREK1 par l'activité des MOR et influence d'ASIC1b

A, Courbes courant/potentiel des canaux TREK1 évoqués par un protocole de rampe de potentiel (-100mV à 50mV en 400ms) avant (Control) ou après perfusion de morphine (5 minutes, 50µM.) L'application de pH6.0 confirme la présence de TREK1. **B**, Quantification de la potentialisation des courants TREK1 par la morphine (5 minutes) sur des cellules HEK transfectées avec TREK1 et MOR (gauche) et TREK1, MOR et ASIC1b (droite). Paired t-test, morphine versus control, * $p=0,0150$ (TREK1+MOR), * $p=0,023$ (TREK1+MOR+ASIC1b). Unpaired t-test, morphine (TREK1+MOR) versus morphine (TREK1+MOR+ASIC1b), ** $p=0,0035$ (non représenté) .N=10-16. **C**, Quantification de l'amplitude du courant TREK1 enregistré à 0mV juste après le passage en configuration cellule-entière dans des cellules HEK transfectées avec TREK1+MOR versus TREK1+MOR+ASIC1b. Unpaired t-test, ** $p=0,0061$. N=23-25.

Il ressort de ces expériences que l'activation des MOR par la morphine potentialise le courant TREK1 (+62,1%, courant à 0mV, Figure 32A-B), confirmant les résultats obtenus précédemment (Devilliers et al., 2013). Ce courant TREK1 peut être largement inhibé par une perfusion de pH acide (Sandoz et al., 2009). En revanche, dans des cellules coexprimant TREK1, MOR et ASIC1b, la morphine ne potentialise que très faiblement ces courants TREK1 (+11,3%, Figure 32B). Il semblerait donc que

la présence d'ASIC1b diminue la capacité du récepteur Mu à potentialiser l'activité de TREK1 en réponse à la morphine. La seule présence d'ASIC1b semble également diminuer sensiblement l'activité de base de TREK1 mesurée consécutivement au passage en configuration cellule-entière dans des cellules contenant TREK1-MOR-ASIC1b (2979pA versus 1751pA, Figure 32C). Une possible interaction fonctionnelle entre ASIC1b et TREK1 n'est donc pas à exclure et devra être testée.

Ces données préliminaires pourraient suggérer que les effets observés avec ASIC1b sur la douleur aigue puissent impliquer les récepteurs aux opiacés. Le mécanisme d'action impliqué est loin d'être déterminé mais pourrait faire intervenir une possible interaction avec le récepteur Mu (ou avec TREK1). Des contrôles et des expériences supplémentaires sont maintenant nécessaires afin d'affiner ces résultats préliminaires. Bien que non exploré dans cette partie, une possible interaction entre ASIC1b et TRPV1 reste également possible, TRPV1 lui-même régulant l'activité des récepteurs Mu (Basso et al., 2019; Scherer et al., 2017). Ces aspects concernant ASIC1b et douleur aigue ainsi que les questions soulevées dans cette partie seront évoqués plus largement dans la partie Discussion et Perspectives.

Discussion et Perspectives

I. Canaux ASIC et migraine

Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse ont permis de démontrer l'implication potentielle des canaux ASIC1 périphériques dans l'allodynie cutanée migraineuse. L'injection *iv* de mambalgine à un effet bénéfique dans un contexte de migraine aiguë, chronique ainsi qu'en prévention du développement de l'allodynie liée à la forme chronique. La conservation des effets de la mambalgine dans les souris KO ASIC1a suggère indirectement une implication potentielle d'ASIC1b. L'efficacité de l'amiloride et du blocage des canaux ASIC1 centraux ouvrent également des perspectives intéressantes pour les canaux ASIC1 dans la migraine, à la fois au niveau physiopathologique et thérapeutique (Verkest et al., 2018).

1. Les canaux ASIC1 périphériques sont impliqués dans l'allodynie cutanée migraineuse

Les effets anti-allodyniques observés dans notre étude supportent l'implication des canaux ASIC1 périphériques dans ce modèle. Plusieurs arguments viennent étayer cette affirmation. Les données actuelles concernant les effets centraux de la mambalgine ainsi que de PcTx1 indiquent une entière dépendance vis-à-vis de la sous-unité ASIC1a, les souris KO ASIC1a étant complètement insensibles à l'effet sur la douleur d'une injection *icv* ou *it* à ces toxines (Diochot et al., 2012, 2016). Les effets de la mambalgine injectée par voie *iv* dans ce modèle d'allodynie migraineuse étant pleinement conservés chez les souris KO ASIC1a, une contribution des ASIC centraux est donc très peu probable. De plus, même si le statut de la mambalgine vis-à-vis de la BHE n'est pas encore établi, à la vue des caractéristiques physicochimiques de ce peptide de 57 acides aminés, un passage à travers la BHE reste peu probable. Une possible perméabilisation de cette membrane durant une crise de migraine serait envisageable mais il s'agit d'un aspect controversé (DosSantos et al., 2014) : quelques études chez des patients migraineux avec aura ou de type FHM ont pu démontrer directement (rarement) ou indirectement (via des élévations plasmatiques de protéases) un tel phénomène. Dans certains des modèles précliniques (donneur de NO inclus) et chez les patients migraineux sans aura, l'intégrité de la BHE semble préservée (Amin et al., 2017; Lundblad et al., 2015; Schankin et al., 2016), bien que la question semble toujours d'actualité en particulier dans des modèles chroniques (Fried et al., 2017; Zhao et al., 2016). Une absence d'effet suite à des injections *icv* de mambalgine chez des souris KO ASIC1a dans ce modèle, comme observée dans les modèles de douleur inflammatoire et neuropathique, fournirait un argument et un contrôle supplémentaire. ASIC1b est donc suffisant pour médier les effets *iv* de la mambalgine, bien qu'une implication d'ASIC1a (périphérique au sein par exemple de canaux hétéromériques avec ASIC1b, et/ou centrale),

au moins partielle, ne soit pas à exclure dans les souris sauvages et les rats. Il convient de rappeler cependant que le profil d'expression d'ASIC1b et d'ASIC1a dans les neurones sensoriels est potentiellement très différent, que ce soit chez le rat (Ugawa et al., 2005) ou la souris (Chen et al., 1998), et pourrait être confirmé par exemple par hybridation *in situ* par RNAscope. L'ablation génétique spécifique d'ASIC1b dans les TG apporterait la démonstration directe de l'implication de cette sous-unité via l'utilisation de souris KO pour ASIC1a et ASIC1b (Staniland and McMahon, 2009) malheureusement plus disponibles, de souris KO pour ASIC1b (développées très récemment mais pas encore publié) (Chen and Chen, 2018) ou d'approche virale plus accessibles (Royal et al., 2018). Le développement récent de souches virales optimisées (AAV PHP.S) permettant de cibler principalement les neurones périphériques après une seule injection systémique *iv* pourrait permettre relativement facilement une manipulation génétique d'ASIC1b, via l'expression de short-hairpin RNA (shRNA) dirigé contre cette sous-unité, en utilisant des promoteurs permettant une expression dans certaines sous-populations neuronales (Chan et al., 2017). Cette approche de knock-down peut cependant générer un certain nombre d'effets « off-target » qui nécessitent des contrôles appropriés.

Ainsi se pose la question du site d'action de la mambalgine dans ce modèle de migraine. Il existe un faisceau d'arguments importants liant injection de donneur de NO et inflammation des méninges (Koulchitsky et al., 2004; Reuter et al., 2001) (voir table Annexe 2), mais cela reste à démontrer en détail pour l'ISDN (Dallel et al., 2017; Ramos et al., 2017). Bien que les effets excitateurs des protons sur les méninges soient connus avant même le clonage des ASIC (Strassman et al., 1996), les premières caractérisations des courants ASIC des neurones sensoriels innervant les méninges ne furent publiées que récemment, principalement chez le rat. Il ressort de ces études qu'une très grande fraction des neurones des méninges expriment des courants ASIC : les proportions vont d'environ 60% chez la souris (Burgos-Vega et al., 2018) à plus de 80% pour le rat (Nakamura and Jang, 2018; Yan et al., 2011). Les cinétiques d'inactivation observées sont majoritairement ($\approx 75\%$) rapides (τ inactivation $< 500\text{ms}$) : une telle caractéristique a souvent été choisie pour indiquer la présence d'ASIC3 sous forme d'homo- ou d'hétérotrimères. En effet, 80% des neurones des méninges expriment ASIC3 (Yan et al., 2013). Cependant, mes propres données obtenues sur des neurones sensoriels de DRG thoraco-lombaires de rat et de souris montrent que les neurones ayant un courant ASIC avec une inactivation rapide sont, pour la très grande majorité, sensibles à la mambalgine en plus d'APETx2. Bien que cela reste à démontrer pour les neurones sensoriels des méninges, il est probable que ces courants ASIC contiennent une part de canaux ASIC1a/ASIC1b en plus d'ASIC3. La caractérisation réalisée par Nakamura et Jang identifia les neurones de diamètre intermédiaire et large, mais dans une moindre mesure ceux de petit diamètre,

comme extrêmement enrichis en ASIC. Ces neurones expriment quasiment tous les canaux Nav1.8 et TRPV1 et le neuropeptide CGRP. De façon intéressante, il a été montré que l'injection *iv* d'amiloride chez le rat bloque spécifiquement la réponse des fibres A δ en réponse à une stimulation électrique de l'artère méningée (Holland et al., 2012) et que les anticorps dirigés contre le CGRP pouvait agir contre ce type de neurone (Melo-Carrillo et al., 2017a, 2017b). De plus, il a été montré récemment qu'une destruction des fibres exprimant le canal TRPV1 supprimait l'allodynie mécanique faciale consécutive à une injection de donneurs de NO (Marone et al., 2018). En revanche, cette destruction n'affecterait pas l'allodynie mécanique extra-faciale (voir par la suite) (Kim et al., 2017). Ces différentes données, en complément de celles de notre étude, indiquent que les canaux ASIC, dont probablement ASIC1b, sont idéalement situés au niveau des neurones sensoriels méningés potentiellement importants pour la physiopathologie de la douleur et de l'allodynie migraineuse (Karsan et al., 2018).

2. Les canaux ASIC dans la migraine, implications physiopathologiques et potentiel thérapeutique

Notre étude alimente donc le faisceau de preuves impliquant les canaux ASIC dans la physiopathologie de la migraine. Comme évoqué auparavant, plusieurs groupes ont pu contribuer à ces avancées, démontrant un rôle de certains canaux ASIC à des niveaux différents dans les processus de la migraine.

Ainsi, les canaux ASIC des neurones sensoriels, en particulier ASIC3 mais aussi ASIC1 (ASIC1b ?) comme démontré dans cette thèse (Verkest et al., 2018), sont importants pour la physiopathologie de la douleur migraineuse (Holton et al., 2016; Wang et al., 2018c; Yan et al., 2013; Zhou et al., 2018a). Il est bien établi que l'application de solution d'acidité croissante directement sur les méninges induit un comportement douloureux et une allodynie cutanée de façon dose-dépendante (Wang et al., 2018d; Yan et al., 2013). Plusieurs études ont également montré qu'une sensibilisation préalable des neurones méningés par différents médiateurs comme le BDNF, l'IL6 ou le CGRP pouvait rendre ces derniers sensibles à des stimuli normalement non-nocifs (faible dose de donneur de NO, solution faiblement acide : pH6,8-7,2) (Avona et al., 2019; Burgos-Vega et al., 2016, 2018). De façon intéressante, il a été montré qu'une stimulation acide pouvait induire une libération de CGRP par les neurones des TG et de la dure-mère (Averbeck and Reeh, 2001; Zimmermann et al., 2002). En plus de la sécrétion classique via le calcium intracellulaire, un autre mécanisme sodium-dépendant passant en partie par les canaux ASIC contenant ASIC3 mais pas TRPV1 a été proposé (Durham and Masterson, 2013). Néanmoins, une autre étude ne confirma pas ces résultats et

proposa TRPV1 comme responsable de ce mécanisme. Des différences de protocole (DRG versus TG, pH6,0 versus pH5,5, temps d'application des solutions) pourraient expliquer ces résultats opposés (Boillat et al., 2014). Il est à noter qu'une libération de CGRP par les terminaisons afférentes via l'activation d'ASIC3 a aussi été proposée dans le mécanisme de la PIV (Pressure Induce Vasodilatation, vasodilatation induite par une pression exercée sur la peau) (Fromy et al., 2012). Ces éléments suggèrent néanmoins un rôle important des canaux ASIC périphériques dans les phénomènes d'activation et de sensibilisation des neurones sensoriels des méninges en lien avec la douleur migraineuse. Les niveaux élevés de neurotrophines (NGF et BDNF en particulier) et potentiellement d'autres médiateurs proinflammatoires retrouvés chez les patients migraineux pourraient être impliqués dans la sensibilisation des canaux ASIC (van Dongen et al., 2017; Martins et al., 2015). Par exemple, le blocage de la voie CaMKII, connue pour réguler les ASIC, permet de diminuer sensiblement la douleur provoquée par l'injection d'acide sur la dure-mère, ainsi que l'augmentation d'expression de ces canaux suite à l'application de « soupe inflammatoire » (Wang et al., 2018d). L'application du contenu des granules des mastocytes (histamine, protéases, prostacyclines etc.) potentialise également les effets du pH *in vitro* et *in vivo* sur les neurones sensoriels des méninges (Levy et al., 2007; Yan et al., 2013; Zhang et al., 2007).

Un lien émergent entre migraine et TNF α est également apparu ces dernières années : certaines études ont retrouvé des élévations des niveaux plasmatiques et urinaires de cette cytokine chez des patients migraineux (Covelli et al., 1991, 1992; Oliveira et al., 2017). Un variant affectant le gène codant pour TNF α a été récemment associé à la migraine (Chen et al., 2015). L'application méningée de cette cytokine potentialise les fibres méningées C et A δ (Zhang et al., 2011b). Nous avons montré que cette cytokine peut potentialiser les courants ASIC, potentiellement via la voie de signalisation JNK (ASIC1b/ASIC3), ou Pi3K/Akt (ASIC1a/ASIC2), il est donc concevable qu'un tel phénomène puisse contribuer à la douleur migraineuse. De façon intéressante, il est maintenant bien établi que la voie JNK est activée au niveau des neurones sensoriels des TG en réponse à différents stimuli (Kristiansen and Edvinsson, 2010; Lei et al., 2012; Wu et al., 2008) et aussi dans différents modèles de douleur migraineuse *in vivo* : soupe inflammatoire appliquée sur les méninges (Huang et al., 2016) ou stress chronique (Hawkins et al., 2018). Enfin, certains traitements contre la migraine pourraient agir indirectement sur les ASIC : le sumatriptan, via son effet sur les récepteurs 5HT1D mais pas 5HT1B, diminue les courants ASIC des neurones sensoriels des TG via l'inhibition de la PKA, qui régule aussi ASIC1b. Bien que cela n'ait pas encore été directement démontré, un tel phénomène n'est pas à exclure pour les anti-CGRP : le récepteur (complexe CLR et RAMP1) est localisé dans des fibres myélinisées A δ où les ASIC sont majoritairement exprimés. Le peptide CGRP est lui restreint dans les fibres C (Eftekhari et al., 2013). L'activation des ASIC dans ces dernières pourraient participer

à la libération de CGRP, comme mentionné précédemment. L'activation du récepteur dans les fibres A δ pourrait potentialiser l'activité des ASIC via la voie PKA (signalisation membranaire) ou PKC (signalisation endosomale) et augmenter ainsi les niveaux d'expression des ASIC via la signalisation CREB/ERK au niveau du noyau (Manoukian et al., 2019; Walker et al., 2018; Yarwood et al., 2017).

Les données supportant une implication des ASIC périphériques dans la douleur migraineuse sont donc nombreuses. A l'inverse, le rôle de ces derniers dans le SNC et en lien avec la migraine est moins détaillé. Les données obtenues dans l'équipe avec la mambalgine injectée par voie *icv* suggèrent que le blocage des canaux contenant ASIC1a au niveau central abolit l'allodynie cutanée de type migraineuse. Dans la lignée des travaux précédents de l'équipe, il serait donc intéressant et relativement simple d'adresser les points suivants regardant ces effets centraux du blocage des canaux contenant la sous-unité ASIC1a par la mambalgine :

-Implication du système opioïde endogène. Les effets analgésiques centraux de la mambalgine sur la douleur inflammatoire et neuropathique diffèrent dans le recrutement du système enképhalinergique : il est négligeable pour la douleur inflammatoire mais compte pour près de la moitié des effets analgésiques observés dans la douleur neuropathique. De plus, l'implication des enképhalines suite au blocage d'ASIC1a n'a pas encore été démontrée chez le rat. Un potentiel effet opioïde est particulièrement important pour la migraine : les opiacés sont en effet déconseillés dans la prise en charge de la céphalée migraineuse. Bien qu'efficaces lors des premières administrations, ils favorisent l'apparition des crises migraineuses et en augmentent la sévérité en cas d'usage répété. Les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas entièrement établis mais ils pourraient toucher les nocicepteurs peptidergiques exprimant le récepteur Mu, entraînant notamment une augmentation d'expression de CGRP et l'activation accrue des voies MAPK (Corder et al., 2017; De Felice and Porreca, 2009; Deng et al., 2019; Ma et al., 2001) ainsi que des neurones centraux impliqués dans les contrôles descendants (Okada-Ogawa et al., 2009). Bien évidemment, le rôle et l'importance des opiacés endogènes par rapport aux opiacés exogènes dans ces phénomènes reste à démontrer.

-Confirmation de la dépendance des effets analgésiques de la mambalgine vis-à-vis d'ASIC1a. Les effets centraux des toxines PcTx1 et mambalgine sont, jusqu'à présent, entièrement dépendants d'ASIC1a. Au vue des données précédentes (Diochot et al., 2012; Mazzuca et al., 2007), un tel résultat peut donc être espéré dans ce modèle de migraine. Par ailleurs, il a été récemment décrit la présence d'ASIC3 dans le TNC, en plus des quelques rares régions du SNC où il a été initialement observé, comme certains noyaux hypothalamiques (Wang et al., 2018c; Zhou et al., 2018a). L'injection *icv* d'APETx2 s'est avérée efficace pour bloquer l'allodynie faciale et extrafaciale

consécutives à plusieurs applications de médiateurs inflammatoires sur les méninges. L'injection intrathécale d'APETx2 dans d'autres modèles de douleur s'est aussi révélée efficace (Karczewski et al., 2010). Néanmoins, du fait de son action sur d'autres canaux ioniques, ces résultats sur un rôle au niveau central d'ASIC3, tous liés à l'utilisation de fortes concentrations d'APETx2, sont à considérer avec précautions et d'autres études sont nécessaires pour confirmer une éventuelle implication d'ASIC3.

-Implication potentielle des sous-unités ASIC2a et/ou ASIC2b. L'utilisation des souris KO ASIC2 ou de PcTx1 pourrait apporter rapidement des premiers éléments de réponses. La contribution de chaque sous-unité ASIC2 pourrait être également explorée. Du fait de leur large distribution dans le SNC, mais potentiellement différente dans certaines régions clés, et des propriétés différentes des hétéromères ASIC1a+ASIC2a et ASIC1a+ASIC2b, la question du rôle respectif de chacun est donc particulièrement intéressante et nécessiterait une étude à part entière.

En complément de ces expériences, les canaux ASIC1a centraux pourraient avoir d'autres rôles potentiels dans la migraine : depuis la première caractérisation des souris KO ASIC1a et de leur déficit dans certains aspects cognitifs (Wemmie et al., 2002), de nombreuses études ont démontré un rôle de ces canaux dans le fonctionnement neuronal en particulier au niveau synaptique. Des courants ASIC contenant ASIC1a et ASIC2a ont été enregistrés dans les neurones de la lamina II du TNC (Cho et al., 2015). De même, une étude a attesté leur présence dans certaines sous-populations neuronales de l'hypothalamus (neurones orexinergiques) (Song et al., 2012). Ces dernières années ont également vu plusieurs travaux démontrer l'importance des ASIC dans des régions clés de l'intégration et la modulation du message douloureux comme le cortex insulaire (Li et al., 2016c), le cortex antérieur cingulaire (Li et al., 2019a), la PAG (Li et al., 2019b; Zhou et al., 2018b), l'hippocampe (Liu et al., 2016b; Wang et al., 2018b) et l'amygdale (Aissouni et al., 2017; Chiang et al., 2015). Il serait donc pertinent d'évaluer dans un modèle de migraine le rôle des ASIC dans ces différentes régions. Cette distribution vaste pourrait également impliquer les ASIC dans différentes phases et/ou processus liés à la migraine autres que les aspects en lien avec la douleur (symptômes prémonitoires, comorbidités, photophobie etc.), et notamment la CSD. Les résultats obtenus par l'étude d'Holland et al., suggèrent que le blocage d'ASIC1a via l'amiloride ou PcTx1 permet de bloquer la CSD, un effet perdu dans les souris KO ASIC1a. Ce phénomène de CSD est notamment connu pour induire, entre autres, une diminution transitoire du pH extracellulaire et une élévation de la concentration en lactate pouvant durer plusieurs dizaines de minutes (Lourenço et al., 2017; Menna et al., 2000; Scheller et al., 1992). Les canaux ASIC sont donc probablement massivement recrutés lors d'un tel phénomène. De façon intéressante, il a été démontré que la CSD était le phénomène à l'origine des céphalées dans la migraine avec aura (Bolay et al., 2002; Zhang et al.,

2010, 2011a). Les mécanismes moléculaires responsables de cette activation des nocicepteurs méningés feraient intervenir une ouverture des canaux neuronaux Pannexin1, suite à l'activation intense des récepteurs NMDA, et initiant une cascade de réactions aboutissant à l'activation des cellules gliales de la BHE et *in fine* à une inflammation (Chen et al., 2017; Karatas et al., 2013). Il a récemment été montré que les canaux ASIC1a pouvaient moduler et potentialiser certains sous-types de récepteurs NMDA (Ma et al., 2019). Ces données viennent compléter d'autres études suggérant un couplage fonctionnel entre les deux canaux via CaMKII (Gao et al., 2005; Yu et al., 2018). Ainsi, il serait tentant de postuler que les canaux ASIC1a pourraient participer à ce phénomène d'initiation de la cascade inflammatoire consécutive à la CSD. De ce fait, les ASIC seraient donc impliqués à différents niveaux : centrale avec ASIC1a donc, et très probablement au niveau périphérique dans la détection de l'inflammation résultante de la CSD avec ASIC1 et/ou ASIC3. Il serait également intéressant de regarder les effets de la CSD et le rôle des ASIC *in vitro* sur tranches avec application de toxines ou encore chez des souris KO afin d'affiner l'implication de ces derniers sur la transmission ou la modulation de la CSD.

Les données acquises jusqu'à ce jour soulignent donc le rôle émergent des ASIC dans la migraine. Ces derniers sont impliqués à différents niveaux de la pathologie et mettent en jeu différentes sous-unités dans plusieurs processus clés de cette pathologie : ASIC1a et CSD, ASIC1b et ASIC3 périphérique dans la douleur et l'allodynie migraineuse (possiblement avec ASIC1a central). Ces différents éléments, bien que nécessitant une exploration plus détaillée sur certains aspects, placent les canaux ASIC dans une position idéale comme cible thérapeutique dans la migraine : étant susceptibles d'être impliqués virtuellement à quasiment tous les niveaux de la pathologie, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Un blocage restreint au niveau périphérique des canaux ASIC1 et/ou ASIC3 pourrait être intéressant contre la douleur migraineuse. Du fait des propriétés de la mambalgine et de son action périphérique, ce peptide pourrait être un bon point de départ utilisé sous forme injectable pour agir sur la céphalée et potentiellement l'allodynie associée. Par exemple, les difficultés rencontrées avec Nav1.7 pour obtenir des petites molécules sélectives et efficaces remontent l'intérêt pour ces toxines peptidiques (Sisignano et al., 2019; Wulff et al., 2019). Un blocage plus large des ASIC peut également être envisagé. L'utilisation et l'efficacité démontrée de l'amiloride dans différentes études précliniques (Tipton et al., 2015; Verkest et al., 2018) et clinique (à confirmer) (Holland et al., 2012) offre une solution intéressante : utilisation per os, peu d'effets indésirables, prix faible (comparé aux anticorps anti-CGRP) et action sur des cibles différentes des traitements actuels (beta-bloquants, topiramate et anti-épileptique, anti-CGRP, sumatriptan). L'utilisation de l'amiloride pourrait donc se faire dans une optique de traitement de fond ou de crise. Sa spécificité est cependant faible avec de nombreuses cibles (échangeur sodium-protons, canal

sodium épithélial etc.) et son site d'action reste flou : un passage dans le SNC d'une fraction de la dose est envisageable. Son effet sur les symptômes de l'aura pointe également vers une part d'effet liée à un passage au niveau central. Néanmoins, la récente démonstration de l'efficacité des anti-CGRP dans la prévention et le traitement de la migraine épisodique et chronique peut également indiquer un site périphérique préférentiel (ces derniers étant largement confinés au niveau périphérique). Les données sur les canaux ASIC et la migraine sont résumées dans la Figure 33.

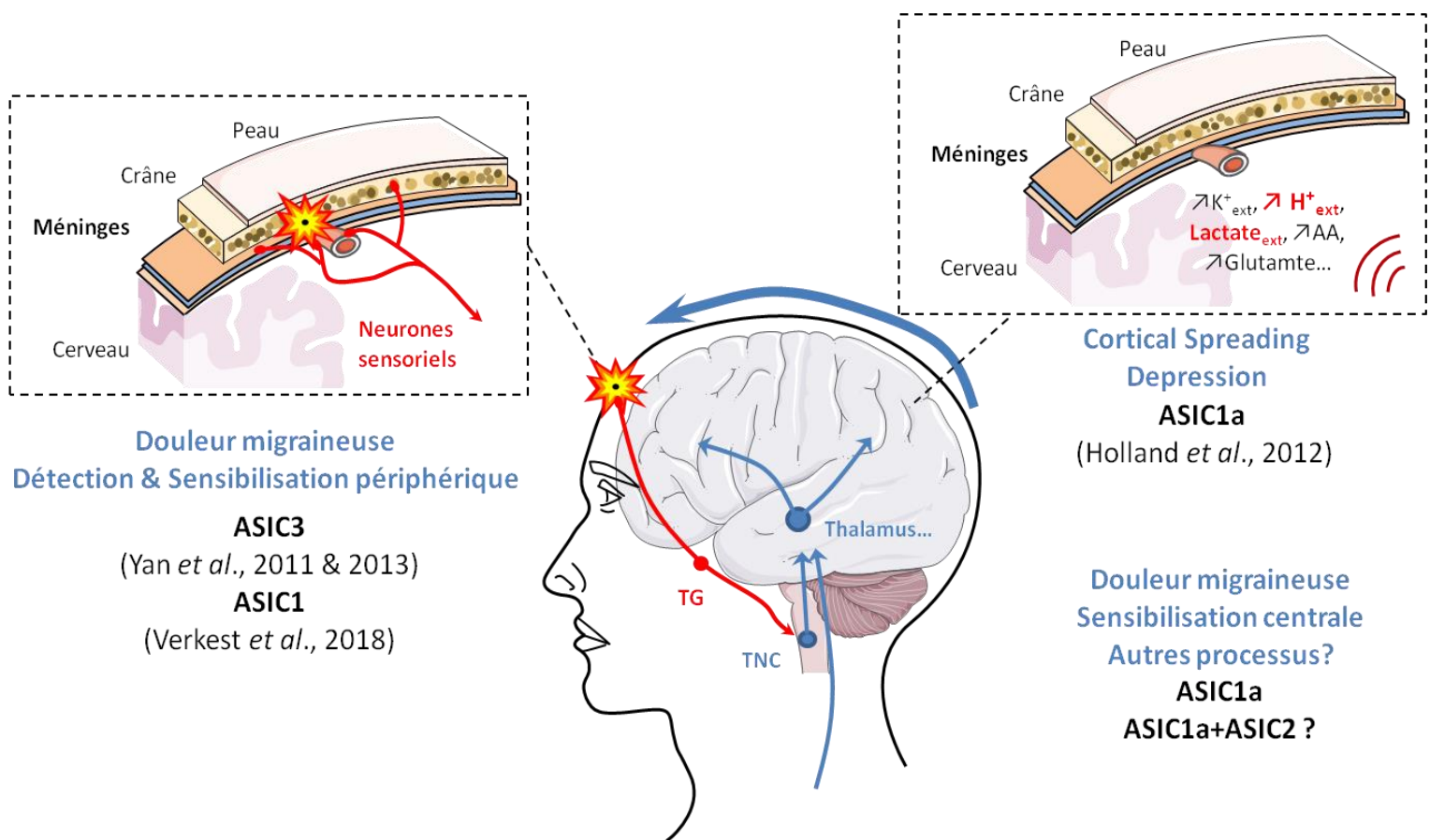


Figure 33 : Implication des canaux ASIC dans la physiopathologie de la migraine

Les canaux ASIC sont impliqués à différents niveaux dans la pathologie migraineuse. ASIC3 et ASIC1 (ASIC1b ?) localisés sur les fibres sensorielles méningées pourraient participer à la détection de la douleur migraineuse et à l'initiation des phénomènes de sensibilisation centrale, responsables de l'allodynie cutanée. Les canaux ASIC1a sont impliqués dans la CSD et aussi, peut-être avec ASIC2, dans les phénomènes de sensibilisation centrale. Le blocage de ces canaux localisés à différents niveaux anatomiques via différents agents pharmacologiques (mambalgine, APETx2, amiloride) s'avèrent particulièrement efficace pour abolir l'allodynie cutanée migraineuse.

II. Régulations des canaux ASIC1b

Mes travaux présentés dans cette thèse sur ASIC1b ont permis de caractériser et d'affiner ses principales propriétés biophysiques et pharmacologiques. En particulier, le mécanisme d'action de la mambalgine sur ce canal a été déterminé et ce dernier s'avère singulier vis-à-vis de ceux des autres canaux ASIC dont ASIC1a. Cette étude a également permis l'identification de la voie de signalisation JNK comme nouvelle régulation d'intérêt des canaux ASIC dans la douleur. Elle cible les deux canaux ASIC largement exprimés dans les neurones sensoriels : ASIC1b et ASIC3. JNK potentialise l'amplitude des courants contenant au moins l'une de ces sous-unités, à la fois en système hétérologue sur des canaux recombinants et dans des neurones sensoriels de rat et de souris en culture. Cette régulation JNK est dépendante de l'espèce considérée : seul ASIC1b est régulé chez la souris alors qu'ASIC1b et ASIC3 participent chez le rat. Au vu des profils pharmacologiques obtenus, ASIC1b apparaît également comme un contributeur important des courants ASIC natifs. Ces courants sont également potentialisés par la cytokine $TNF\alpha$, via principalement l'activation de la voie JNK. En plus de cette voie de signalisation, mes travaux ont pu mettre en évidence qu'ASIC1b était régulé par de nombreux autres modulateurs déjà connus pour agir sur les autres canaux ASIC : lipides, PKA et PKC. ASIC1b apparaît donc comme un potentiel intégrateur de nombreux signaux pronociceptifs. Ces données permettent donc d'établir un premier lien au niveau moléculaire entre les propriétés d'ASIC1b et son importante implication *in vivo* dans différents modèles de douleur.

1. Propriétés fonctionnelles des canaux ASIC1b

Au début de ces travaux de thèse, la plupart des informations disponibles sur ASIC1b concernaient certaines de ses propriétés biophysiques basiques comme sa sensibilité au pH ou ses cinétiques (Chen et al., 2006b; Hesselager et al., 2004). Les canaux ASIC1b homomériques ou hétérotrimériques couvrent une large gamme de pH (6,8-4,0) et ont des cinétiques d'inactivation et de réactivation variables (Table 14). Plus précisément, les propriétés d'ASIC1b peuvent être considérées comme « intermédiaires » au sein de la famille des ASIC : il n'a pas la haute sensibilité au pH d'ASIC3 ou d'ASIC1a mais est plus sensible qu'ASIC2a et son inactivation est plus lente qu'ASIC3 mais plus rapide qu'ASIC1a (Table 8). Les seules singularités qui peuvent le distinguer sont : l'importante coopérativité lors de son activation (nombre de Hill de la courbe d'activation pH-dépendante déterminée expérimentalement autour de 3-4 pour les homomères et certains hétéromères comme ASIC1b+ASIC3, contre environ 1,5 pour les autres canaux ASIC) et le faible écart entre son pH de demi-activation et de demi-inactivation ($\pm 0,6$ unité pH, seul ASIC3 a un écart comparable, pour ASIC1a et ASIC2a cet écart est ≥ 1). Ces propriétés singulières sont notamment

conservées pour les hétéromères ASIC1b+ASIC3 et ASIC1b+ASIC2b, probablement les combinaisons majoritairement retrouvées dans les neurones sensoriels à la vue de leurs distributions respectives. Par ailleurs, l'un des aspects qui n'avaient pas encore été exploré en détail concerne la réactivation des canaux ASIC1b. De façon intéressante, l'hétéromérisation d'ASIC1b accélère systématiquement ce processus, même lors d'association avec une sous-unité plus lente comme ASIC1a. Ce résultat contraste avec les autres études ayant évalué la réactivation des courants ASIC des neurones sensoriels, ayant toutes fait état de réactivations rapides (demi-réactivation inférieure à une seconde) qui dépendrait des sous-unités ASIC3 et ASIC2 mais pas d'ASIC1a (Benson et al., 2002; Gautam and Benson, 2013; Gibbons et al., 2015; Gu and Lee, 2006; Sutherland et al., 2001). Nos données, ainsi que d'autres (Baron et al., 2008; Gautam and Benson, 2013), suggèrent que des hétéromères ASIC1a+ASIC2 et ASIC1b+ASIC2 seraient capables de médier une telle réactivation rapide. Un aspect peu étudié également concerne la modulation par le pH de ce processus. Une légère diminution du pH extracellulaire, potentiellement retrouvée en conditions pathologiques, altère significativement la réactivation des canaux ASIC1b, entraînant un ralentissement conséquent même lors de faible acidose (\approx pH7,0). Ce phénomène est aussi observé au niveau spinal avec les canaux ASIC1a (Baron et al., 2008) et également pour ASIC3 (Immke and McCleskey, 2003). Il serait donc intéressant d'explorer cet aspect sur les hétéromères ASIC1b.

Comment ces différentes propriétés biophysiques vont-elles se traduire au niveau pathophysiologique? La proximité des pH de demi-activation et inactivation pourraient favoriser l'apparition de courants dits de fenêtre, consécutifs à un chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation, et présentant une cinétique soutenue. Il est donc tentant de postuler qu'en condition pathologique, la combinaison d'une faible acidose prolongée (pH6,8-6-5, dans la gamme d'activité des canaux contenant ASIC1b) et de certains facteurs connus pour moduler la sensibilité au pH (NO, lipides, polyamines sur ASIC3+ASIC1b par exemple) pourraient produire de tels courants de fenêtre (Deval et al., 2010). C'est notamment le cas d'ASIC1b+ASIC2b, combinaison la plus à même de produire ce courant mais jamais caractérisée jusqu'à présent malgré une potentielle relevance physiologique (Lin et al., 2016). La modulation de la réactivation par le pH pourrait aussi permettre une régulation des ASIC en condition pathologique d'acidose prolongée. Cette propriété pourrait limiter la capacité des canaux ASIC à s'activer de façon répétitive lors d'oscillations rapides du pH extracellulaire. De façon intéressante, un niveau de régulation supplémentaire de ce paramètre existe, étant modulé en parallèle par la concentration externe en calcium (une augmentation de la concentration en calcium accélère la réactivation) (Immke and McCleskey, 2003). De ce fait, une condition combinant acidose prolongée et élévation de la concentration en lactate pourrait réguler finement la réactivation des ASIC. Néanmoins, compte tenu de l'incertitude sur la dynamique des

fluctuations de pH au niveau des tissus périphérique et en condition pathologique, il est difficile de postuler précisément à l'heure actuelle sur la relevance de ces mécanismes concernant la réactivation des canaux ASIC1b et sa modulation par le pH (Grunder and Pusch, 2015).

Deux études récentes ont mis en valeur une propriété singulière des ASIC : leur activation par des sauts de pH très bref (moins de 100ms) empêche le passage du canal dans un état inactif (Li et al., 2012). Ce phénomène (déactivation) permet aux ASIC d'être activé par des stimulations brèves et à hautes fréquences, sans désensibilisation, contrairement aux canaux ioniques impliqués dans la neurotransmission (MacLean and Jayaraman, 2016; Papke et al., 2011). Cette propriété est également retrouvée sur des canaux natifs de neurones sensoriels et peut être modulée par le pH extracellulaire, comme le phénomène de réactivation illustrée dans cette thèse et auparavant (Baron et al., 2008; Immke and McCleskey, 2003). De façon intéressante, les autres canaux ioniques impliqués dans la neurotransmission comme les AMPAR ne semblent pas affectés par la concentration extracellulaire de leur ligand, faisant donc des ASIC un cas particulier dans les mécanismes de neurotransmission (MacLean and Jayaraman, 2017). Cette propriété et ce phénomène de déactivation soulèvent plusieurs questions : si de telles stimulations brèves peuvent être considérées dans le SNC et la neurotransmission, pourrait-il en être de même au niveau périphérique ? Comme évoqué plusieurs fois au cours de cette thèse, les fluctuations de pH *in situ*, dans une condition pathologique particulière ou un tissu spécifique sont totalement inconnues. Des mesures ont été effectuées dans plusieurs études mais elles manquent de précision (spatiale et temporelle) (Gallagher et al., 2008; Spahn et al., 2017; Wright et al., 2018) (table exhaustive présentée dans (Stein and Gaveriaux-Ruff, 2018)). Néanmoins, il a été décrit que les mastocytes pouvaient former des structures similaires à des synapses, pouvant recréer l'environnement nécessaire à de telles fluctuations rapides de pH (Joulia et al., 2015).

2. Propriétés pharmacologiques des canaux ASIC1b

Le deuxième aspect de cette partie concerne les effets de la mambalgine sur ASIC1b. Initialement, seuls les effets de la toxine sur les canaux ASIC1b+ASIC1a et ASIC1b+ASIC3 (absence d'inhibition) étaient connus (Diochot et al., 2012). Mes travaux ont ainsi pu montrer que la mambalgine pouvait aussi bloquer les canaux ASIC1b+ASIC2, de même qu'ASIC1b+ASIC3. La mambalgine exerce donc un effet inhibiteur sur l'ensemble des hétéromères contenant ASIC1b. Néanmoins, ces expériences ont également révélé des différences d'affinités et de mécanismes d'action : potentialisation à pH6,6 d'ASIC1b+ASIC3, même à de faibles concentrations de mambalgine, effet inhibiteur plus important lors d'activation à pH6,0 comparé à pH5,0 pour ASIC1b+ASIC2. Contrairement à ses effets sur les canaux ASIC1a, la mambalgine agit principalement

sur l'inactivation des canaux ASIC1b, avec également un effet non-négligeable sur l'activation. De ce fait, cette toxine permet un blocage dynamique du canal ASIC1b, favorisant les conformations fermées ou désensibilisées. Cet effet sur l'inactivation permet notamment un blocage total du canal lors d'une faible acidification. Les différents résultats entrevus avec les hétéromères suggèrent néanmoins que le mécanisme d'action de la mambalgine puisse être différent d'un hétéromère à l'autre.

3. Propriétés des canaux ASIC1b humains

Enfin, cette thèse a aussi été l'occasion de caractériser certaines propriétés du variant humain d'ASIC1b. Certaines, comme la sensibilité au pH, ne diffèrent pas de celles déjà publiées et sont relativement similaires aux variants de rongeurs (Hoagland et al., 2010). Néanmoins, hASIC1b se caractérise par une inactivation extrêmement rapide (demi-inactivation 160ms contre 375ms pour hASIC3a à pH5,0) et une réactivation également rapide. La pH-dépendance de ce processus est également conservée, néanmoins il semblerait que hASIC1b soit moins affecté par le pH que rASIC1b. La mambalgine a également un effet particulier sur hASIC1b : tout comme sur rASIC1b, elle favorise l'état inactivé du canal mais potentialise son activation par des pH intermédiaires (demi-activation : pH6,0). L'effet inhibiteur observé lors de l'activation du canal par des pH plus acides comme pH5,0 est également peu important, nécessitant des concentrations élevées de toxine (supérieures au micromolaire). hASIC1b est également régulé par plusieurs modulateurs pronociceptifs comme le NO, la voie PKC ou JNK, mais pas par la PKA contrairement aux canaux de rongeur. L'implication fonctionnelle chez l'homme d'ASIC1b demeure inconnue à l'heure actuelle, malgré potentiellement une expression conséquente (Hoagland et al., 2010; North et al., 2019). La seule étude montrant des effets de la mambalgine sur des courants ASIC de neurones sensoriels chez l'homme a été réalisée sur neurones dérivés de cellules souches, avec une forte inhibition des courants ASIC par la mambalgine. Les propriétés déterminées (sensibilité au pH, inactivation, réactivation) diffèrent de celles des canaux hASIC1b homomériques. Le profil de la mambalgine sur les hétéromères hASIC1b reste encore à déterminer afin de pouvoir interpréter correctement ces résultats (Young et al., 2014). L'utilisation de plus en plus fréquente de culture primaire de DRG humains pourrait à l'avenir permettre de caractériser son implication potentielle.

4. Caractérisation pharmacologique des courants et distribution des ASIC dans les neurones sensoriels chez les rongeurs

L'un des aspects abordés dans cette de thèse fut la caractérisation pharmacologique des courants ASIC des neurones sensoriels via l'utilisation des toxines PcTx1, APETx2 et mambalgine. Comme évoqué en Introduction, un travail de caractérisation a déjà été réalisé par de nombreux

groupes, avec des résultats cohérents chez le rat mais très disparates chez la souris. Les conditions et le protocole utilisés dans notre étude, basés principalement sur trois articles (Clark et al., 2018; Francois et al., 2013; Zeisel et al., 2018), nous ont permis d'enregistrer des courants ASIC dans environ 65% des neurones sensoriels de rat comme de souris, une proportion attendue au vue de la distribution *in situ* et retrouvée dans certaines études (Benson et al., 2002; Bohlen et al., 2011; Drew et al., 2004; Ergonul et al., 2016), avec une densité moyenne des courants ASIC à pH5,0 chez la souris supérieure à celles reportées dans plusieurs études (Ergonul et al., 2016; Leffler et al., 2006; Smith et al., 2011). Cette densité reste néanmoins inférieure à celle observée chez le rat. De plus, l'autre différence notable avec le rat concerne la sensibilité de ces courants : le ratio d'amplitude moyen pH6,0/pH5,0 chez la souris dans nos conditions est d'environ 0,5, une valeur retrouvée par d'autres (Benson et al., 2002). Ce ratio est d'environ 0,4 pour le rat pour celui de pH6,6/pH5,0, en accord avec d'autres études et traduisant une plus haute sensibilité à l'acidification (Deval et al., 2008; Jiang et al., 2006; Petruska et al., 2000, 2002; Poirot et al., 2006). Ces données suggèrent donc qu'il existerait un enrichissement probable d'ASIC1a et d'ASIC3 ou des niveaux plus faibles d'ASIC2a chez le rat. Il n'existe à priori pas de différences en termes de propriétés biophysiques entre les canaux de rat et de souris. Néanmoins, il est possible que des différences de signalisation cellulaire et d'adressage à la membrane existent, pouvant impliquer directement les ASIC (Xu et al., 2018) (et voir partie suivante sur JNK) ou les autres acteurs de ce mécanisme (récepteurs, kinases etc.)(voir par exemple : (Omerbašić et al., 2016)).

Au vue de la distribution de ces courants, il est tentant de faire un parallèle avec les données existantes sur la distribution des ASIC (Table 11).

-La majeure partie des courants sensibles à PcTx1 sont retrouvés dans des neurones de petite taille avec principalement un potentiel d'action présentant un épaulement dans la phase descendante. Ce résultat concorde avec l'enrichissement de la sous-unité ASIC1a dans cette population. Il aurait été possible également de marquer les neurones en culture avant enregistrement avec de l'IB4 afin d'affiner la classe de nocicepteurs. Au vue des données existantes, il est fortement probable que cette sous-population de neurones ayant des courants ASIC sensibles à PcTx1 appartient à une classe de nocicepteurs peptidergiques (Bohlen et al., 2011).

-Le fait que la quasi-totalité des courants des neurones sensoriels ASIC soient sensibles à la mambalgine suggère une distribution très large des sous-unités ASIC1a et ASIC1b. Si l'on part du principe que les courants ASIC sensibles à la mambalgine mais pas à PcTx1 seraient principalement dus à des canaux contenant ASIC1b, nos données seraient consistantes avec un enrichissement dans les neurones de diamètres moyen/large ainsi qu'avec une expression non négligeable dans certaines

populations de neurones de petit diamètre. Si l'on considère en plus la distribution d'ASIC1b et ASIC1a dans différentes populations, il est alors logique d'observer une proportion si forte de courants ASIC sensibles à la mambalgine. Ces travaux sont donc les premiers à démontrer indirectement une importante contribution fonctionnelle d'ASIC1b dans la réponse ASIC des neurones sensoriels chez la souris et le rat. Ce résultat est important car il pourrait fournir une première explication au rôle significatif de ce canal observé *in vivo*. La plupart des études de caractérisation des courants ASIC se sont basées soit sur des animaux KO ou sur des outils pharmacologiques non-spécifiques (AINS, amiloride) ou partiels (utilisation seulement de PcTx1 ou d'APETx2), ne permettant pas d'isoler la part potentielle liée à ASIC1b, sauf cas particulier (Lin et al., 2016). Quelques études ont également suggéré que cette sous-unité était exprimée plus fortement qu'ASIC1a (Hoagland et al., 2010; Sugino et al., 2019). Néanmoins, il est possible que dans nos conditions (concentration de PcTx1, pH d'application de la toxine), certaines combinaisons de canaux contenant ASIC1a et pouvant être bloquées par PcTx1 ne le soient pas, alors qu'elles le sont par la mambalgine (ASIC1a+ASIC2a par exemple), sous-estimant ainsi l'implication d'ASIC1a. La potentialisation d'ASIC1b par PcTx1 (même relativement faible avec 20nM) pourrait également masquer l'implication d'ASIC1a, comme l'a suggéré une autre étude chez le rat (Jiang et al., 2006). Enfin, il convient d'évoquer les résultats obtenus par deux études sur des neurones provenant de souris triple KO ASIC1a-ASIC2-ASIC3 (Gautam and Benson, 2013; Kang et al., 2012). Dans ce cas particulier, aucun courant de type ASIC ne fut enregistré. Ces études questionnent donc l'implication d'ASIC1b. Il est possible qu'au sein des neurones sensoriels l'expression membranaire d'ASIC1b soit dépendante de l'hétéromérisation avec d'autres sous-unités, le trafficking d'ASIC1b étant singulier (Bässler et al., 2001; Kadurin et al., 2008).

-Les données obtenues avec APETx2 confirment la distribution variée d'ASIC3 dans des populations neuronales nociceptives ou pas, et de toutes tailles. Nos expériences suggèrent également une coexpression quasi-systématique avec ASIC1, un aspect non retrouvé chez le rat où il existerait une population ASIC3 dominante. Des données obtenues chez des souris KO ASIC3 suggèrent également une forte colocalisation, la proportion de neurones ayant un courant ASIC étant la même entre souris sauvages et KO ASIC3 (Drew et al., 2004; Price et al., 2001). Cependant ce résultat n'est pas retrouvé par d'autres études (Gautam and Benson, 2013; Lin et al., 2016, 2008) et les données de la littérature suggèrent également une distribution d'ASIC3 dans quelques populations n'ayant pas ASIC1.

-La principale faiblesse de cette caractérisation est l'absence d'information concernant ASIC2. Le manque d'outils pharmacologiques spécifiques à l'heure actuelle complique la mise en évidence fonctionnelle de ces sous-unités ASIC2. Il aurait été possible d'utiliser le zinc à forte concentration

(>100 μ M) afin de potentialiser les courants contenant ASIC2a. Une étude réalisée sur des neurones sensoriels innervant le muscle a de cette façon pu démontrer qu'ASIC2a était exprimé dans la plupart des neurones (Gautam and Benson, 2013), consistant avec les autres données suggérant une distribution particulièrement large de cette sous-unité. Néanmoins, les neurones sensoriels de souris KO ASIC2 ont des proportions similaires de neurones ayant des courants ASIC comparés aux souris sauvages (Price et al., 2000). Les données de RNAseq suggèrent une forte expression d'ASIC2 au sein des neurones non-peptidergiques où ASIC1 et ASIC3 sont supposés être absents. Cependant, *in vitro*, cette population n'a pas ou peu de courants ASIC. La question concernant la capacité d'ASIC2 à générer des courants seul dans des neurones reste donc ouverte, également au niveau du SNC où des résultats contradictoires ont été obtenus (Askwith et al., 2004; Chiang et al., 2015). Il semblerait que le pH nécessaire pour voir une telle activation d'ASIC2 doit être nécessairement inférieure à pH5,0. Une telle valeur n'est retrouvée cependant que dans des situations très particulières (digestion etc.) et un pH aussi acide n'est que rarement utilisé (Holzer, 2011).

Ainsi, les données obtenues dans notre classification électrophysiologique *in vitro* sont globalement cohérentes avec la distribution potentielle des ASIC (Table 11). Cependant, la représentativité dans notre culture par rapport à la situation *in vivo* reste inconnue et une certaine retenue dans l'interprétation de ces données est nécessaire. Il est possible que les conditions utilisées aient pu favoriser un type cellulaire par rapport à un autre. Des expériences complémentaires de marquage par hybridation *in situ* pourraient permettre de répondre avec une bonne précision à deux grandes questions concernant la distribution des ASIC dans les neurones sensoriels, comme cela a pu être fait récemment pour Piezo2 (Szcot et al., 2017) : quel est le niveau de colocalisation entre les différentes sous-unités ASIC et quelles sont les sous-populations impliquées ?

5. Régulation des canaux ASIC par JNK

Un résultat important de cette thèse est l'identification d'une régulation des canaux ASIC par la voie JNK. Les premiers éléments concernant une potentielle régulation des ASIC par les MAPK concernaient des effets transcriptionnels par le NGF (Mamet et al., 2002, 2003) ou l'IL1 β pour ASIC3 (Ross et al., 2016) et l'IL6 pour ASIC1a (Zhou et al., 2015). Nos travaux montrent qu'en plus de cet effet, la voie JNK pourrait réguler rapidement l'amplitude des courants ASIC contenant ASIC1b (souris, rat, homme) et/ou ASIC3 (rat, homme), avec potentiellement des conséquences importantes sur la douleur. L'identification de cette voie par des techniques simples de bioinformatique a pu mettre en évidence d'autres aspects probablement nécessaires à une telle régulation. En effet, la phosphorylation directe d'une cible par JNK nécessite des conditions particulières :

-Concernant ASIC1b, le segment N-terminal où le site de phosphorylation est situé est intrinsèquement désordonné. Une telle propriété favorise une possible régulation par JNK (Garai et al., 2012; Iakoucheva et al., 2004; Zeke et al., 2016). En amont du site potentiel, deux séquences prédictives d'interaction avec la protéine TRAF2 ont été identifiées (Table 12-13). TRAF2 est un partenaire important du récepteur au TNF α (Figure 7). Un autre partenaire associé à ce récepteur, RIP1, a été identifié comme pouvant interagir avec ASIC1b et ASIC1a (site en C-terminal) (Wang et al., 2015b). Un membre de la famille des récepteurs au TNF a même été identifié comme potentiel partenaire d'ASIC1 lors d'un récent screening d'interactions protéiques à grande échelle (Huttlin et al., 2017). Il est bien établi que l'activation de ces récepteurs entraîne l'activation de JNK, avec TRAF2 apparaissant comme un partenaire clé dans ces effets (Liu et al., 1996; Natoli et al., 1997; Reinhard et al., 1997; Song et al., 1997). Ces résultats ont donc motivé l'exploration des effets de la voie JNK sur ASIC ainsi que l'effet possible du TNF α .

-ASIC3 présente deux séquences prédictives d'interactions avec les MAPK, l'une en N-terminal et l'autre en C-terminal, en amont du site potentiel de phosphorylation. La région C-terminale d'ASIC3 est également intrinsèquement désordonnée. Par ailleurs, la protéine JLP interagissant avec JNK (JNK interacting Leucine Zipper protein) a été identifiée comme possible partenaire d'ASIC3 (Donier et al., 2008). Il convient de noter que lors de notre analyse bioinformatique, le site prédictif de phosphorylation d'ASIC3 pour JNK indiquait également une potentielle interaction avec d'autres membres des MAPK, ERK et p38. Bien qu'expérimentalement les données de la littérature tendent à montrer que les sites JNK sont exclusifs vis-à-vis des autres MAPK (Bardwell et al., 2009) et que le SP600125 que nous avons utilisé est sélectif vis-à-vis des autres MAPK (Bain et al., 2007), il n'est pas exclu que d'autres membres des MAPK puissent aussi agir sur ASIC3. En effet, il existe des boucles de rétrocontrôles ainsi que des interactions entre les différentes voies de signalisation des MAPK : par exemple p38 peut être recruté par MAPKK7 alors que cette dernière cible principalement JNK (Figure 7). De plus, il a été montré dans des neurones sensoriels de rat que les courants ASIC pouvaient être potentialisés par l'activation des récepteurs aux oestrogènes et la voie ERK (Qu et al., 2015). L'absence de régulation du canal ASIC3 de souris est également intrigante. L'alignement des variants ASIC3 d'une vingtaine d'espèces montre que cette région particulière en C-terminal autour du site JNK est la moins bien conservée, la position et la nature du site potentiel pouvant énormément varier. Des espèces comme le cochon, le hamster doré ou le cobaye ne présentent pas ce site potentiel JNK. La conséquence d'une absence de régulation d'ASIC3 reste énigmatique. Elle est toutefois à tempérer car l'association d'ASIC3 de souris à la sous-unité ASIC1b confère la régulation JNK au canal hétéromérique ainsi formé. Chez quelques espèces de rongeurs, certaines mutations sur des canaux ioniques en lien avec la douleur (Nav1.7, TRPA1,

TRPV1) ont été décrites, reflétant des adaptations à un environnement particulier (Eigenbrod et al., 2019; Rowe et al., 2013; Smith et al., 2011). Nos données chez la souris montre qu'une large proportion des neurones est fortement régulée (73% environ de répondeurs au sein des neurones sensibles à APETx2, +100% d'augmentation de l'amplitude du courant), suggérant une importante contribution d'ASIC1b. Une étude inter-espèce récente sur Piezo2 a permis de corrélérer un enrichissement des neurones exprimant ce canal à certains comportements propres à certaines espèces (Schneider et al., 2019). Une étude similaire pourrait être conduite pour ASIC et JNK, explorant la part d'ASIC1b dans les courants natifs chez des espèces pour laquelle ASIC3 ne serait pas régulé par JNK afin d'observer la contribution d'ASIC1b dans ces cas particuliers.

-Un site prédictif JNK fut identifié sur le segment N-terminal d'ASIC2a (souris, rat, homme). Néanmoins, nos expériences montrent que les canaux ASIC2a homomériques ou hétéromériques ASIC2a+ASIC1a ne sont pas régulés par JNK. La position de ce site potentiel à l'extrémité du segment N-terminal (Sérine 6) pourrait expliquer l'absence de régulation, la kinase se fixant principalement en amont du site de phosphorylation. Une phosphorylation indirecte via une protéine partenaire permettant d'apporter la kinase n'est cependant pas à exclure (Zeke et al., 2016). Il convient d'évoquer qu'au niveau spinal, Pi3K/Akt régule et potentialise spécifiquement ASIC1a et ASIC2 mais pas ASIC1b ou ASIC3. Ainsi, deux voies de signalisation différentes vont pouvoir agir à différents niveaux dans les voies de la douleur en ciblant spécifiquement certains canaux ASIC (Duan et al., 2012).

La régulation des ASIC par cette voie ouvre de nombreuses perspectives en termes d'implications de ces canaux dans différentes pathologies douloureuses. Au niveau neuronal, la voie JNK est impliquée dans plusieurs processus. Elle tient un rôle clé dans la réponse cellulaire à différents stimuli potentiellement dommageables pour les neurones et rencontrés lors d'ischémie ou de pathologies neurodégénératives, dans la morphogénèse cérébrale (SNC) et aussi dans la migration et régénération neuronale (Coffey, 2014). A cela s'ajoute un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire : plusieurs cytokines comme le TNF α et l'IL1 β , certains facteurs associés à des pathogènes (LPS et activation des Toll-like récepteurs, TLR, par exemple) ainsi que les ROS peuvent activer cette voie de signalisation (neurones sensoriels et cellules gliales spinales notamment) (Pollock et al., 2002; Zeke et al., 2016). Au niveau des neurones sensoriels, JNK pourra donc être recruté dans de nombreuses conditions pathologiques douloureuses : une littérature riche lie cette voie particulière à des modèles de douleur neuropathique et inflammatoire en particulier.

-Dans des modèles de neuropathie traumatique (CCI, SNI, SNL etc.), une hyperactivation de JNK est observée. Celle-ci peut être consécutive à la production de différents ligands comme ceux

appartenant à la famille Wnt (Wingless integration site). Ces glycoprotéines sont notamment sécrétées lors du développement du système nerveux et dans la régénération tissulaire. Une augmentation de ces protéines est observée au sein des DRG dans le modèle CCI ou dans un modèle de douleur cancéreuse avec métastases osseuses. L'activation de leurs récepteurs (Frizzled, Ryk) entraîne un recrutement, entre autres, de la voie JNK et le blocage de ce système à différents niveaux est bénéfique. De façon intéressante, ces effecteurs agissent plus spécifiquement sur les neurones myélinisés et l'activation de JNK à ce niveau serait en partie responsable de l'allodynie mécanique (Liu et al., 2015; Simonetti et al., 2014; Zhang et al., 2013b). Cette spécificité fut également retrouvée dans un modèle de neuropathie diabétique (Middlemas et al., 2006) mais semble être différente dans le modèle SNL (recrutement de JNK dans les petits neurones) (Obata et al., 2004). La cinétique de recrutement de JNK dans ces modèles est particulière : le nombre de neurones où cette voie est active augmente rapidement après ligature du nerf sciatique, dès 30 minutes post-opération, persistant pendant plusieurs jours (Kenney and Kocsis, 1998; Lindwall et al., 2004; Zhuang et al., 2006). Les souris KO pour le variant JNK2, supposé agir sur les ASIC, ont une réduction de l'allodynie mécanique (Manassero et al., 2012). De même, les souris KO pour une MAPKKK (Dual leucine zipper kinase, DLK, en amont de JNK) sont également protégés contre le développement de ce symptôme (Wlaschin et al., 2018).

-Comme évoqué auparavant, de nombreuses cytokines/récepteurs vont donc être capables de recruter JNK. Lors d'une inflammation (modèle CFA), JNK est également recruté rapidement (<30 minutes). Ce phénomène peut être mimé par injection de NGF (Doya et al., 2005). Les récepteurs TLR4, activés lors d'infections, vont aussi être capables de recruter JNK (Baral et al., 2019; Li et al., 2019c). De même, un recrutement de JNK fut observé dans un modèle d'ischémie musculaire, via l'action de l'IL1 β (Ross et al., 2014, 2016) ainsi que dans un modèle de douleur migraineuse après injection de médiateurs inflammatoires directement sur les méninges (Huang et al., 2016).

Les données *in vivo* obtenues précédemment sur ASIC1b, et dans une moindre mesure sur ASIC3, dans différents modèles de douleur peuvent être remises en perspectives : l'implication d'ASIC1b dans l'hypersensibilité inflammatoire, neuropathique et migraineuse peut alors être expliquée par le rôle important que joue JNK dans ces modèles. De façon intéressante, des effets analgésiques massifs après injection *iv* ou intraplantaire de mambalgine furent observés dans la douleur neuropathique (Diochot et al., 2016). Ces résultats peuvent paraître à première vue surprenants car plusieurs études ont fait état d'une diminution de l'expression des ASIC (ASIC1 et ASIC3) dans les DRG dans des modèles de douleur neuropathique (Cobos et al., 2018; Poirot et al., 2006; Vicuña et al., 2015). Cette disparité pourrait être expliquée par une dissociation entre transcription (diminution de cette activité) et translation (augmentation) dans ce cas particulier: il

serait possible que les ARNm des ASIC soient transportés le long de l'axone jusqu'au site blessé où ils seraient localement traduits. L'activation de JNK à ce niveau pourrait alors massivement potentialiser l'activité des canaux ASIC localement, expliquant potentiellement l'effet analgésique massif de la mambalgine dans la douleur neuropathique (Diochot et al., 2016). Un tel mécanisme a été décrit par exemple pour Nav1.8 (Megat and Price, 2018). Récemment, l'utilisation de neurones sensoriels en culture stimulés à différents niveaux (corps cellulaire, axones, terminaisons) a révélé une différence notable entre la localisation de la stimulation et la sensibilité aux protons, suggérant un enrichissement conséquent des canaux ASIC dans les terminaisons (Clark et al., 2018). Ainsi, en plus des effets transcriptionnels de JNK et ceux directs sur plusieurs cibles dont des canaux ioniques (AMPA, NMDA, TRPA1, P2X3 etc.), nous proposons que les canaux ASIC1b et ASIC3 soient aussi des cibles importantes de cette régulation avec des implications majeures dans la physiopathologie de la douleur.

De nombreuses questions demeurent sur la régulation des ASIC par JNK et des expériences complémentaires devront être poursuivies. Le mécanisme d'action de JNK sur les ASIC pourrait être affiné. En effet, les échaffaudages protéiques complexes et les nombreuses interactions et cibles possibles de cette kinase font que, en l'état de nos données, nous ne pouvons conclure définitivement sur un effet direct de la kinase sur le canal, et ce malgré les expériences de mutagenèses et la relative sélectivité du SP600125. Des expériences de phosphorylation *in vitro* entre le segment N-terminal d'ASIC1b et JNK pourraient être réalisées, ou alternativement l'analyse par spectrométrie de masse des phosphorylations avant et après activation de JNK sur les sites identifiés. Des expériences supplémentaires sur la possible régulation d'ASIC3 par ERK ou p38 pourront aussi être menées. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la PKC pouvait réguler ASIC1b et cette voie peut également agir sur JNK (Comalada et al., 2003; Lang et al., 2004; López-Bergami et al., 2005). Il serait intéressant de voir si cet effet observé avec la PKC et JNK serait commun. L'effet de cette potentielle phosphorylation par JNK pourrait être exploré plus en détail. Nos données suggèrent qu'elle n'affecterait pas la sensibilité des canaux au pH mais qu'elle pourrait jouer sur d'autres paramètres comme le nombre de canaux à la membrane ou encore la probabilité d'ouverture. Des expériences préliminaires en configuration canal-unitaire ont été réalisées et pourront apporter des réponses sur ces points, de même que des expériences évaluant le trafficking d'ASIC1b (imagerie en temps réel, quantification biochimique des canaux à la membrane). JNK est connu pour agir principalement sur les interactions entre deux protéines. Il serait aussi intéressant d'explorer cette possibilité et d'identifier ce partenaire, s'il s'avère qu'un tel mécanisme ait lieu, de même que d'identifier formellement l'isoforme de JNK responsable de l'effet. La principale faiblesse de nos données est que nous nous basons exclusivement sur le SP600125. Il serait également

nécessaire de confirmer nos résultats avec d'autres outils génétiques ou pharmacologiques comme le peptide spécifique et bien documenté D-JNK-1 (Zhuang et al., 2006). De même, une preuve directe de l'implication exclusive d'ASIC1b chez la souris serait nécessaire: des expériences avec des siRNA sur culture de neurones de DRG pourraient rapidement apporter un tel résultat. Enfin, des expériences *in vivo* sont également prévues pour tester l'effet d'un activateur direct ou indirect de JNK sur la réponse comportementale des souris en réponse à une injection d'acide dans la patte (douleur acide). Ces données sur la régulation des canaux ASIC1b sont résumées dans la Figure 34.

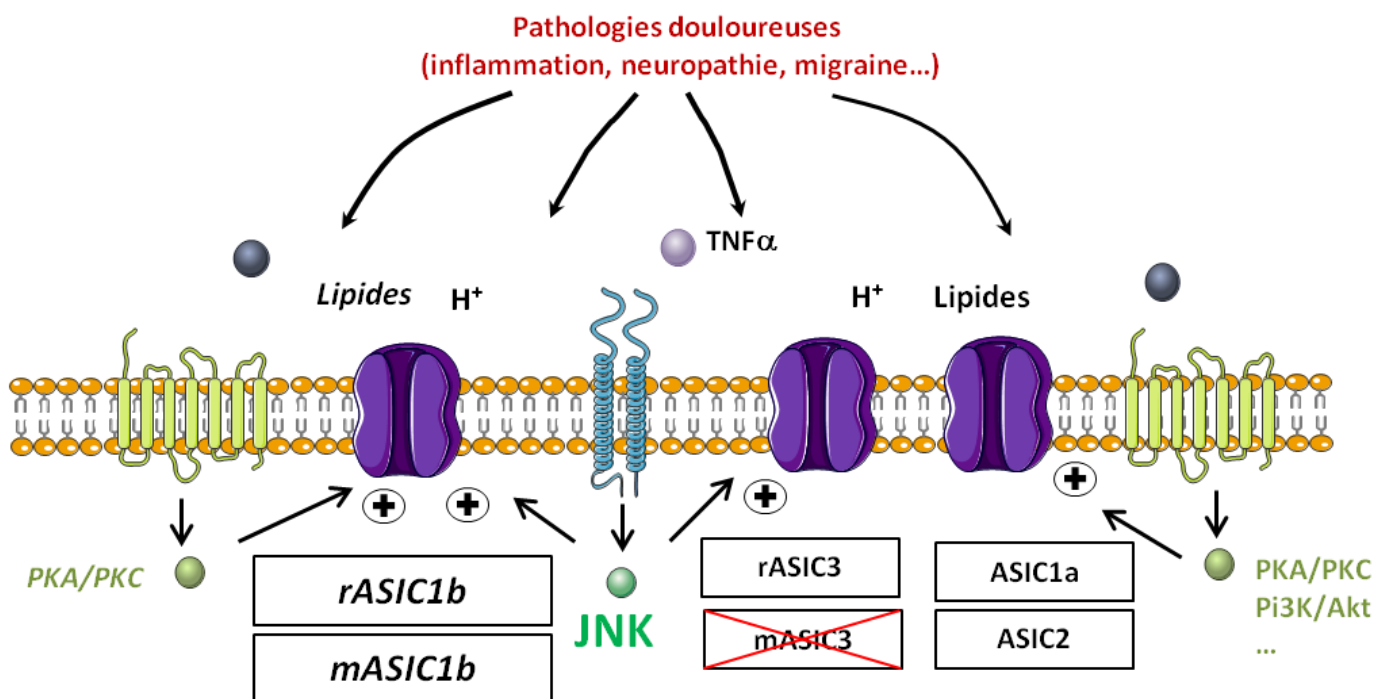


Figure 34 : Régulations des canaux ASIC1b par des voies de signalisation intracellulaires

Les canaux ASIC sont régulés de façons différentes par plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La PKA et la PKC ciblent ASIC1a, ASIC1b, ASIC2 mais pas ASIC3. JNK agit sur ASIC1b et seulement sur l'isoforme de rat ASIC3. L'hétéromérisation des différentes sous-unités ASIC permet d'augmenter le nombre de canaux ASIC potentiellement ciblés par une régulation comme par exemple pour mASIC3 et JNK avec mASIC1b ou encore rASIC3 et PKC avec rASIC2b.

6. Implication d'ASIC1b dans la perception thermique douloureuse basale : possible interaction avec le système opioïde endogène ?

Les résultats préliminaires obtenus sur cet aspect suggèrent que l'effet analgésique de la mambalgine sur la douleur thermique aigue serait dépendant des opiacés endogènes. Ce résultat intrigant devra être validé plus en détail et confirmé par d'autres approches quantifiant

directement l'activité des récepteurs aux opiacés (BRET/FRET, biosenseurs de voies de signalisation etc.) (Ehrlich et al., 2019; Fenalti et al., 2014; Mehta et al., 2018). Les questions soulevées par cet effet opioïde-dépendant sont nombreuses :

-Cet effet opioïde lié à la mambalgine est-il conservé dans d'autres situations, pathologiques notamment ? L'étude précédente conduite au laboratoire a évalué la potentielle contribution des récepteurs aux opiacés dans les effets *iv* de la mambalgine sur un modèle de douleur inflammatoire et neuropathique : l'injection préventive et sous-cutanée de naloxone dans ces conditions ne modifient pas les effets de la mambalgine (Diochot et al., 2016). Néanmoins, des études précédentes ont montré une dichotomie d'effet de la naloxone selon son mode d'administration : dans le cas d'un modèle d'inflammation de la patte, l'injection locale de naloxone directement dans la patte aggrave l'hypersensibilité car les cellules immunitaires recrutées libèrent des opiacés endogènes limitant ce phénomène. Ce résultat n'est pas retrouvé après injection sous-cutané ou intrapéritonéale de naloxone et seulement partiellement après injection *iv* (Alves et al., 2012; Khalefa et al., 2012; Parsons et al., 1990; Perrot et al., 2001; Schafer et al., 1996). Il serait également intéressant de tester si l'effet analgésique obtenu après invalidation génétique transitoire d'ASIC1b serait naloxone-sensible.

-Par quels mécanismes le blocage pharmacologique d'ASIC1b conduit à un effet analgésique dépendant des opiacés ? D'où viennent ces opiacés ? L'hypothèse actuelle pour expliquer cet effet serait similaire à celle proposée pour Nav1.7 (Pereira et al., 2018). Comme détaillé auparavant, le sodium peut significativement moduler l'activité des GPCR de classe A, récepteurs aux opiacés inclus. ASIC1b pourrait donc moduler négativement le récepteur, soit via le sodium intracellulaire ou soit via un autre mécanisme (interaction proche etc.). Le blocage des canaux ASIC entrainerait donc une levée d'inhibition du GPCR et une potentialisation de la signalisation liée à la protéine Gi. Cette hypothèse nécessiterait une interaction close entre ASIC1b et le récepteur (Kanellopoulos et al., 2018). Des données préliminaires dans des cellules HEK (n=5 cellules, non représenté) suggèrent que l'activation du récepteur Mu n'affecte pas l'amplitude des courants ASIC1b. Néanmoins, une étude a décrit un blocage des courants ASIC natifs de neurones sensoriels de rat par la morphine (Cai et al., 2014). De plus, l'origine des opiacés au niveau local et en condition non-pathologique reste mystérieuse. Il se pourrait que la stimulation thermique de la patte ou l'injection locale puisse induire un relargage local d'endorphines ou d'enképhalines par les kératynocytes, les fibroblastes, les cellules immunitaires ou les neurones eux-mêmes, bien que pour ces derniers la présence de ces peptides à ce niveau soit controversée (Chiu et al., 2014; François et al., 2017). Une autre possibilité serait l'existence d'une activation constitutive d'une partie des récepteurs aux opiacés. Si ce phénomène commence à être bien connu, il n'a été décrit que dans des conditions pathologiques

(stress chronique, inflammation) (Brackley et al., 2016; Corder et al., 2013; Polter et al., 2017; Walwyn et al., 2016). Quelques études récentes ont aussi suggéré qu'ASIC1 (ASIC1a) pouvait médier certains effets cellulaires, notamment des activations de voie de signalisation ou des modulations de l'activité d'autres cibles (via couplage fonctionnel ou interaction proche) (Li et al., 2019a; Ma et al., 2019; Yu et al., 2018). Bien que cette propriété soit souvent rattachée à sa perméabilité calcique, quelques études ont pu démontrer que certains mécanismes seraient indépendants de sa conduction ionique (Ma et al., 2019; Wang et al., 2015b). Ce potentiel rôle de « récepteur » et d'intermédiaire de signalisation suggère une implication différente de ces canaux, étant probablement plus que de simples canaux dépolarisants (Kaczmarek, 2006).

-Comment ASIC1b est-il activé dans ces conditions non-pathologiques ? Est-ce le seul ASIC impliqué? L'hypothèse d'un effet du sodium sur les récepteurs implique une activation d'ASIC1b. En l'absence d'apparente acidose, le mécanisme aboutissant à cette potentielle activation est inconnu. Il serait possible qu'*in situ* une activation constitutive ait lieu. De plus, il a été décrit dans les cellules HEK l'existence d'une libération spontanée de vésicules acides pouvant entraîner une activation des ASIC (Lalo et al., 2007). En l'état actuel des connaissances, il est impossible de savoir quelles sont les fluctuations locales de pH à ce niveau. Les effets observés au niveau du SNC avec ASIC1a pourraient suggérer que l'effet opioïde-dépendant soit également lié à un tel mécanisme. Il a été observé dans une étude chez le rat un effet analgésique synergique de l'amiloride injecté par voie intrathécale avec la morphine ou la clonidine, un agoniste des récepteurs alpha 2 adrénergiques (GPCR de classe A) (Ouyang et al., 2012). Une telle synergie a été observée pour les bloqueurs Nav1.7 et il serait intéressant de tester des bloqueurs ASIC plus spécifiques dans de telles conditions (Deuis et al., 2017). Concernant ASIC3, l'inactivation par siRNA ne modifie pas les seuils de sensibilité thermique et mécanique cutanés (Deval et al., 2008; Sluka and Gregory, 2015). Il est peu probable que ce dernier participe à cet effet, bien que cela nécessite d'être confirmé.

Ces travaux de thèse ont ainsi permis de montrer que l'injection intraveineuse de mambalgine, un bloqueur des canaux ASIC1a et ASIC1b, pouvait abolir l'allodynie cutanée faciale et extra-faciale dans un modèle de migraine consécutif à une ou plusieurs injection d'un donneur d'oxide nitrique. Les effets de cette toxine sont conservés dans les souris KO ASIC1a, suggérant une implication des canaux périphériques ASIC1b dans ces phénomènes d'allodynie et cette pathologie migraineuse. Le blocage répété de ces canaux s'avère également bénéfique, limitant le développement de l'allodynie cutanée lors de l'établissement de la migraine chronique.

Les résultats obtenus *in vitro* ont permis de caractériser en détails les propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux ASIC1b homomériques et hétéromériques. Plusieurs modulateurs connus pour réguler certains ASIC mais jamais testés sur ASIC1b se sont avérés capables de moduler positivement ce dernier. De plus, la voie de signalisation JNK, importante dans l'établissement de l'hypersensibilité douloureuse dans de nombreux modèles, est capable de potentialiser les courants des canaux contenant ASIC1b, notamment chez la souris où ASIC1b s'avère être le seul ASIC ciblé. L'étude pharmacologique de la réponse des courants ASIC natifs dans les neurones sensoriels de rat et de souris montre que ce canal est un acteur important de ces courants. Enfin, les résultats préliminaires obtenus sur les effets de la mambalgine sur la douleur aigue suggèrent une possible interaction entre les canaux ASIC1b et le système opiacé endogène, mettant potentiellement en lumière de nouveaux rôles pour ces canaux.

Ces travaux de thèse permettent pour la première fois de lever le voile sur les mécanismes moléculaires potentiellement responsables de l'implication d'ASIC1b *in vivo* dans de nombreuses situations pathologiques : inflammation, neuropathie traumatique et aussi migraine. Ces données, ajoutées à celles sur ASIC3, indiquent que le blocage de ces canaux ASIC périphériques représente une solution thérapeutique intéressante dans de nombreux cas de figures.

Annexes

Annexe 1 : Etude du rôle du canal K2P TRESK dans la migraine

I. Contexte de l'étude et discussion

Les canaux K2P font partie de la superfamille des canaux potassiques. Le groupe des K2P comporte 15 gènes encodant 15 sous-unités α divisées en six sous-familles (TREK, TALK, TWIK, TASK, THIK et TRESK). Ces sous-unités α sont constituées de 4 domaines transmembranaires, avec la particularité d'avoir deux domaines pores, et s'assemblent sous forme de dimères fonctionnels. Ces canaux génèrent des courants dits de fond ou de fuite : ils produisent instantanément des courants potassiques sortant et persistant sur une gamme large de potentiel de membrane. Ces canaux sont donc particulièrement importants pour l'établissement du potentiel de membrane. Ils sont exprimés largement dans de nombreux tissus, notamment au niveau neuronal où certains canaux vont être présents dans les neurones sensoriels (Bautista et al., 2008; Feliciangeli et al., 2015). Ils sont régulés par de nombreux stimuli comme les lipides, certains GPCR et les voies de signalisation associées, le pH, la température ou le stress mécanique (Noel et al., 2011). Au fil des études, certains membres de cette famille comme TREK1, TRESK ou TASK3 sont apparus comme des cibles d'intérêts dans la douleur (Alloui et al., 2006; Castellanos et al., 2019; Devilliers et al., 2013; Morenilla-Palao et al., 2014; Noël et al., 2009; Yang et al., 2018).

Deux aspects ont contribué à la genèse de cette étude :

-D'abord, en 2010, l'identification chez des patients migraineux d'une mutation affectant le canal TRESK, induisant une perte de fonction de ce dernier et un effet de dominant négatif sur un canal TRESK normal (F139WfsX24 : délétion de deux nucléotides causant une modification du cadre de lecture et entraînant une troncation de la protéine) (Lafrenière et al., 2010). De part son expression enrichie au sein des TG et également dans plusieurs régions cérébrales, il fut postulé que cette mutation conduisait à une hyperexcitabilité neuronale, contribuant à ce phénotype migraineux (Liu et al., 2013). Néanmoins, cette étude identifia également quatre autres mutations. L'une d'entre elles, C110R, cause également une perte de fonction de TRESK et un effet de dominant négatif sur le canal sauvage. Mais il s'avère que cette mutation est retrouvée également chez des patients sains ne présentant pas de crise de migraine (Andres-Enguix et al., 2012; Guo et al., 2014; Lafrenière et al., 2010). De ce fait, les résultats de l'étude de Lafrenière et al., 2010 sont fortement contestés.

-En parallèle, plusieurs études se sont intéressées à l'hétéromérisation des canaux K2P. En particulier, deux articles publiés récemment par les équipes des Drs Guillaume Sandoz et Florian Lesage et utilisant différentes approches ont pu démontrer qu'un tel phénomène était possible entre certains membres de la famille des K2P, à savoir TREK1, TREK2 et TRAAK (Blin et al., 2016; Levitz et

al., 2016). En étudiant différentes combinaisons d'hétéromères K2P, les Drs Perrine Royal et Guillaume Sandoz ont fait la découverte très intéressante que TREK1 et TRESK pouvaient former des hétéromères fonctionnels, malgré une homologie relativement faible entre les deux. A partir de ce résultat, les effets des mutants TRESK associés à la migraine furent testés et caractérisés en les coexprimant avec TREK1 afin de voir si ces mutations pouvaient affecter ce dernier via hétéromérisation. Ainsi, seule la mutation F139WfsX24 affecte TREK1 et ce via un nouveau mécanisme : cette mutation entraîne la production de deux protéines dont une est capable d'interagir avec et d'inhiber TREK1. Cette interaction pourrait être responsable du phénotype migraineux observé uniquement chez les patients porteurs de cette mutation mais pas chez ceux ayant la mutation C110R, cette dernière n'affectant pas TREK1 (Royal et al., 2018). Pour ce travail en collaboration, j'ai effectué des études de comportement sur la souris et j'ai participé à la mise en place de celles chez le rat.

Les implications de cette étude sont multiples :

- Elle réconcilie des données controversées, apportant une réponse au niveau moléculaire sur les mécanismes de cette mutation. De façon intéressante, une autre mutation (Y121LfsX44) engendrant les mêmes effets fut retrouvée dans une base de données, suggérant que ce mécanisme ciblant TRESK pourrait affecter une part plus large de patients. Ces mutations engendrent une initiation de la traduction différentielle, conduisant à la production d'une deuxième protéine. Cette étude souligne donc les conséquences que pourraient avoir de telles mutations en aval du codon d'initiation, suggérant qu'un tel mécanisme puisse être retrouvé dans d'autres pathologies liées à des mutations.

-Elle souligne l'importance de l'hétéromérisation des canaux ioniques. Notre étude sur la régulation JNK des ASIC démontre que chez la souris, une part importante des courants neuronaux ASIC et contenant ASIC3 est régulée par JNK, très probablement via ASIC1b. Récemment, une étude préliminaire a identifié une mutation sur le gène KCNG4 (Kv6.4), induisant une rétention intracellulaire du canal et *in fine* une absence d'hétéromérisation avec Kv2.1, diminuant l'excitabilité de certains neurones sensoriels et la douleur liée à l'accouchement (Lee et al., 2018).

-Elle pourrait suggérer une importante contribution des neurones sensoriels dans la migraine (en lien avec les résultats obtenus avec les anti-CGRP). En effet, il semblerait que TRESK soit restreint au niveau périphérique, où il serait enrichi dans les neurones sensoriels non-peptidergiques et certains neurones myélinisés, ainsi que dans des neurones noradrénergiques sympathiques du SNA (Furlan et al., 2016; Zeisel et al., 2018). Contrairement à TREK1 ou TREK2, TRESK est très peu exprimé au niveau cérébral, que ce soit chez la souris ou chez l'homme (Lake et al., 2016; Lein et al., 2007;

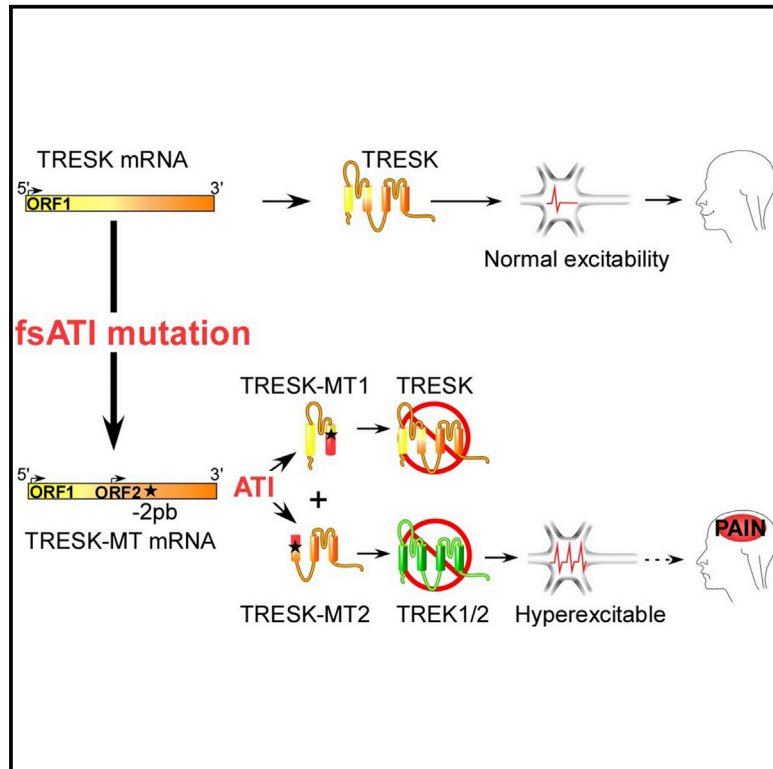
Zhang et al., 2014). Ainsi, cette étude montre que les neurones sensoriels coexprimant ces canaux K2P sont importants dans l'établissement de l'allodynie cutanée migraineuse (et probablement des céphalées également) et elle pourrait suggérer que la population de neurones sympathiques coexprimant ces K2P puissent aussi être impliqués dans la physiopathologie de la migraine.

II. Article: Migraine-associated TRESK mutations increase neuronal excitability through alternative translation initiation and inhibition of TREK

Neuron

Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK

Graphical Abstract



Authors

Perrine Royal, Alba Andres-Bilbe, Pablo Ávalos Prado, ..., Xavier Gasull, Joshua Levitz, Guillaume Sandoz

Correspondence

sandoz@unice.fr

In Brief

Royal et al. demonstrate that migraine-associated frameshift mutations of TRESK, a two-pore-domain K⁺ channel, lead to the production of a second protein fragment, which carries the pathophysiological function by inhibiting TREK1 and 2, due to a mechanism called frameshift mutation-induced alternative translation initiation (fsATI).

Highlights

- TRESK, a K_{2P} channel implicated in migraine, heteromerizes with TREK1 and TREK2
- Migraine-associated TRESK-MT mutant induces formation of two proteins: MT1 and MT2
- MT2 is produced by frameshift mutation-induced alternative translation initiation
- MT2 inhibits TREK to increase neuronal excitability and induce a migraine phenotype



Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK

Perrine Royal,^{1,2} Alba Andres-Bilbe,³ Pablo Ávalos Prado,^{1,2} Clément Verkest,^{2,4} Brigitte Wdziekonski,^{1,2} Sébastien Schaub,¹ Anne Baron,^{2,3} Florian Lesage,^{2,4} Xavier Gasull,³ Joshua Levitz,⁵ and Guillaume Sandoz^{1,2,6,*}

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, Institut de Biologie Valrose, Nice, France

²Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Nice, France

³Neurophysiology Laboratory, Department of Biomedicine, Medical School, Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁴Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France

⁵Department of Biochemistry, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA

⁶Lead Contact

*Correspondence: sandoz@unice.fr

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.039>

SUMMARY

It is often unclear why some genetic mutations to a given gene contribute to neurological disorders and others do not. For instance, two mutations have previously been found to produce a dominant negative for TRESK, a two-pore-domain K⁺ channel implicated in migraine: TRESK-MT, a 2-bp frameshift mutation, and TRESK-C110R. Both mutants inhibit TRESK, but only TRESK-MT increases sensory neuron excitability and is linked to migraine. Here, we identify a new mechanism, termed frameshift mutation-induced alternative translation initiation (fsATI), that may explain why only TRESK-MT is associated with migraine. fsATI leads to the production of a second protein fragment, TRESK-MT2, which co-assembles with and inhibits TREK1 and TREK2, two other two-pore-domain K⁺ channels, to increase trigeminal sensory neuron excitability, leading to a migraine-like phenotype in rodents. These findings identify TREK1 and TREK2 as potential molecular targets in migraine and suggest that fsATI should be considered as a distinct class of mutations.

INTRODUCTION

Migraine is a common, disabling neurological disorder with a genetic, environmental, and hormonal component with an annual prevalence estimated at ~15%. It is characterized by attacks of severe, usually unilateral, and throbbing headache and can be accompanied by nausea, vomiting, and photophobia. Migraine is clinically divided into two main subtypes: migraine with aura (MA), when a migraine is preceded by transient neurological disturbances that are usually visual, and migraine without

aura (MO). Cortical spreading depression (CSD) underlies the aura, although its precise relationship to headache is unclear. Activation and sensitization of trigeminal neurons (TG) leading to the release of pro-inflammatory peptides is likely a key component in pain initiation and transmission in migraine (Noseda and Burstein, 2013; Yan and Dussor, 2014).

Recent evidence points to a pivotal contribution of a variety of two-pore-domain potassium (K_{2P}) channels in chronic pain processing. The diverse K_{2P} channel family is made of 15 subtypes, which form 6 subfamilies. The activity of these channels drives the membrane potential toward the K⁺ equilibrium potential and therefore reduces cellular excitability. Expression of several K_{2P} channel subunits has been detected in nociceptive dorsal root ganglion and trigeminal neurons (Alloui et al., 2006; Bautista et al., 2008; Blin et al., 2016; Morenilla-Palao et al., 2014; Noël et al., 2009; Yamamoto et al., 2009). One subtype of K_{2P} channels that is highly expressed in sensory neurons, TRESK, has been directly linked to MA via a causally linked 2-bp frameshift mutation (F139WfsX24) identified in the KCNK18 gene, which causes premature truncation of TRESK ("TRESK-MT"; Lafrenière et al., 2010; Wood, 2010). This mutation segregated perfectly with the MA phenotype in a large pedigree and was shown to produce a non-functional protein that can serve as a dominant negative that functionally downregulates the wild-type (WT) TRESK channel (Lafrenière et al., 2010; Wood, 2010). TRESK-MT has been shown to induce hyperexcitability of TG neurons (Guo et al., 2014; Liu et al., 2013), which likely underscores its role in migraine. However, in subsequent genetic screening studies, another missense TRESK variant, C110R, was identified (Andres-Enguix et al., 2012). TRESK-C110R, similar to TRESK-MT, exerts a dominant-negative effect on WT-TRESK in heterologous cells, but expression of this mutant was found to have no effect on TG excitability (Guo et al., 2014). This absence of effect explains why this mutant was found in both migraine patients and control subjects (Guo et al., 2014). Therefore, despite the fact that both mutations lead to the same apparent effect on TRESK function, only TRESK-MT is able to increase TG excitability and is linked to migraine pathophysiology.



Classically a eukaryotic mRNA is thought to contain one translation start codon, which allows the production of a single protein species. However, in some cases, eukaryotic ribosomes can recognize several alternative translation start sites to induce the formation of several different proteins from the same mRNA (Kochetov, 2008). This alternative translation initiation is a means of expanding the proteome (Kochetov, 2008) and has been shown to increase the functional diversity of K_{2P} channels (Thomas et al., 2008), raising the possibility that it plays a role in TRESK-mediated migraine pathophysiology.

In this study, we addressed why TRESK-MT (F139WfsX24), but not TRESK-C110R, is able to increase TG excitability and, potentially, play a role in migraines. Using single-molecule fluorescence and chemical optogenetic methods, we found that TRESK is able to heterodimerize with 2 distantly related K_{2P} channels from another subfamily, TREK1 and TREK2, and that TRESK-MT strongly inhibits TRESK, TREK1, and TREK2 currents. In stark contrast, we show that TRESK-C110R is only able to inhibit TRESK, but not TREK1 or TREK2. Furthermore, we show, using double knockout (KO) mice for TREK1 and TREK2, that TRESK-MT increases TG neuronal excitability by inhibiting TREK1 and TREK2. Consistent with a role for TREK1 and TREK2 in migraine induction, we found that double-KO mice for TREK1 and TREK2 present, at rest, a migraine-like allodynia phenotype. These results resolve the contradictory lack of effect of TRESK-C110R, which targets only TRESK and not TREK1 or TREK2. Strikingly, we next find that the 2-bp frameshift mutation of TRESK-MT puts an alternative start codon in frame, which leads to the translation of a second TRESK fragment, termed MT2, which specifically co-assembles with TREK1 and TREK2 to downregulate their function, leading to the TG excitability increase. Consistent with a role for MT2 in migraine induction, we found that MT2 expression within the trigeminal ganglia induced a migraine-like allodynia phenotype in rat. Finally, we find that other previously uncharacterized migraine-associated TRESK mutations also produce multiple fragments via alternative translation initiation (ATI) that can have distinct effects on TRESK and TREK channels. Together, these findings identify frameshift-induced ATI (fsATI) as a mechanism initiated by TRESK mutations, which leads to two protein fragments with dominant-negative effects on distinct channel targets to, ultimately, increase sensory neuron excitability, which may contribute to migraine induction.

RESULTS

TRESK Heteromerizes with TREK1 and TREK2

Despite the fact that K_{2P} channels share a similar architecture and global function, they share a low level of sequence identity, even between members of the same subfamily. Surprisingly, this low level of identity does not preclude heteromerization, as we and others recently showed within the TREK subfamily (Blin et al., 2016; Hwang et al., 2014; Lengyel et al., 2016; Levitz et al., 2016). Based on this and the fact that TG neurons express many K_{2P} channels (TREK1, TREK2, TRAAK, TASK1, and TASK3; Bautista et al., 2008; Yamamoto et al., 2009), we hypothesized that the difference between TRESK mutants is due to their differential ability to modify the function of other K_{2P} chan-

nels through heteromerization. To assess the ability of TRESK to heteromerize with other K_{2P} channels that are expressed in TG neurons, we used the single-molecule pull-down (“SiMPull”) assay (Jain et al., 2012) to visualize individual antibody-immobilized protein complexes on polyethylene-glycol-passivated glass coverslips (Figure 1A). We co-expressed GFP-TRESK with either hemagglutinin HA-TRESK, HA-TREK1, HA-TREK2, HA-TRAAK, HA-TASK1, or HA-TASK3 and assessed their ability to co-immunoprecipitate (coIP) GFP-TRESK via an anti-HA antibody. HA-TRESK, HA-TREK1, and HA-TREK2, were able to coIP many fluorescent GFP-TRESK spots (Figures 1B and 1C), whereas no GFP-TRESK spots were observed for HA-TRAAK, HA-TASK1, or HA-TASK3 (Figure 1C), indicating that TRESK co-assembly with other K_{2P} channels is specific for TREK1 and TREK2. Importantly, controls showed that identical results were observed in two different non-ionic detergents (Figure 1C), that similar expression levels were seen for GFP-TRESK when co-expressed with HA-TREK1 or HA-TRESK (Figure S1A), that all HA-tagged K_{2P} constructs were able to pull down themselves (Figures S1B and S1C), and that pull-down was dependent on the presence of the anti-HA antibody (Figure S1D) and confirm that TREK1, TREK2, and TRESK can be co-expressed in the same cultured TG neurons using immunofluorescence and single-cell RT-PCR (Figure S1F).

We next used photobleaching step analysis (Ulbrich and Isacoff, 2007) to determine the stoichiometry of TREK1 and TRESK complexes to test the hypothesis that they form heterodimers. First, we confirmed that HA-GFP-TREK1 form homodimers in our assay by observing ~70% 2-step bleaching for each when expressed and immunoprecipitated alone with anti-HA antibodies (Figure S2A), consistent with the formation of strict dimers with a GFP maturation rate of ~80%. Then, we counted the number of GFP-TRESK subunits within a HA-TREK1/GFP-TRESK complex by observing bleaching steps of GFP-TRESK coIP with immobilized HA-TREK1 (Figure S2C). The majority of fluorescence intensity trajectories showed one bleaching step (~70%; Figure S2C). This distribution is similar to the one observed for HA-TREK1/GFP-TREK1 complexes (Figure S2B) and agrees well with a 1:1 stoichiometry showing that TREK1-TRESK is primarily a heterodimer.

To test the functionality of the TREK1-TRESK heterodimer, we developed a heterodimerization assay based on an engineered “photoswitchable conditional subunit” (TREK1-PCS) of TREK1. The TREK1-PCS is a TREK1 subunit where the C terminus has been deleted to produce endoplasmic reticulum retention, which can be rescued through co-assembly with a full-length subunit (Sandoz et al., 2012). Following co-assembly and surface targeting, TREK1-PCS can then optically control the channel via a tethered photoswitchable blocker (“MAQ”), which attaches to a genetically engineered cysteine. Therefore, gain of photosensitivity of an identified co-expressed TREK-interacting subunit allows for the verification of a functional heteromer with TREK1. As expected, expression of TREK1-PCS alone did not generate a photoswitchable current (Figure 1D), but co-expression with either TREK1 or TRESK induced a robust photoswitchable current (Figures 1E and 1F), indicating that the TRESK subunit is able to co-assemble with TREK1-PCS. Consistent with SiMPull data, no photocurrent was observed when TASK1 (Figure 1G)

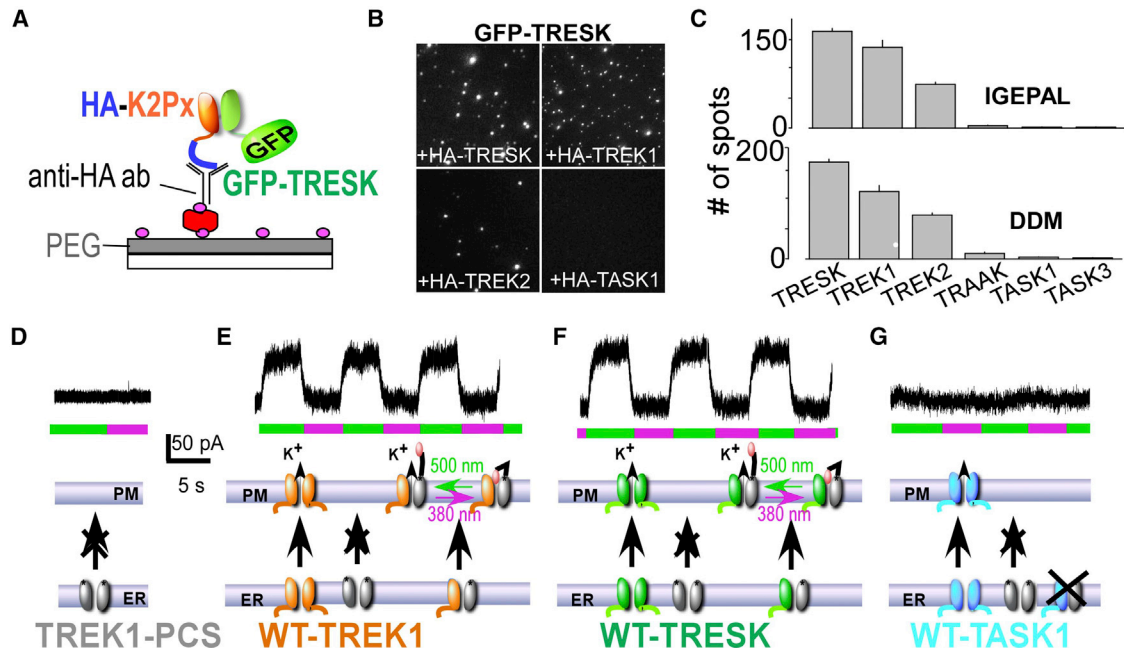


Figure 1. TRESK Heteromerizes Physically and Functionally with TREK1 and TREK2

(A) Schematic of single-molecule pull-down (SiMPull) of GFP-TRESK. HEK293T cells expressing GFP-TRESK and an HA-tagged K2P channel (“HA-K2Px”) were lysed and then immobilized on a polyethylene glycol (PEG)-passivated coverslip conjugated to a biotinylated anti-HA antibody.

(B and C) Representative images (B) (IGEPAL) and summary bar graphs (C) with 2 different detergents, IGEPAL and DDM, showing pull-down of GFP-TRESK by HA-TRESK, HA-TREK1, or HA-TREK2, but not by HA-TASK1, HA-TASK3, or HA-TRAAK. Data are represented as mean \pm SEM.

(D–G) Co-expression of TREK1-PCS with WT-TREK1 produces a heteromeric channel that traffics from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (PM) and which can be light gated due to attachment of a photoswitchable blocker to the TREK1-PCS. TREK1-PCS expression alone does not produce any photoswitchable current (D), but co-expression of TREK1 (E) or TRESK (F), but not TASK1 (G), leads to a photoswitchable current indicating that TREK1-TRESK form functional heteromers, but there is no functional assembly of TREK1 and TASK1.

See also Figures S1, S2, and S3.

or TASK3 (Figure S1E) were co-expressed with TREK1-PCS. Furthermore, the bleaching step distribution of GFP-TREK1-PCS spots colPeped with immobilized HA-TREK1 is similar to HA-TREK1/GFP-TREK1; the majority of fluorescence spots showed one bleaching step (\sim 70%; Figure S2D), supporting the conclusion that the light-gated TREK1-PCS/TRESK current is carried by a TREK1-PCS/TRESK heterodimer with a common pore.

Next, to test the functional properties of the TREK1-TRESK heteromer, we constructed a linked, tandem dimer to have a uniform representation at the surface of the cell of the TREK1-TRESK heteromer (Figure S3). This heteromeric channel displayed properties that are a mix of those from TREK1 and TRESK homodimers. Notably, TRESK is insensitive to arachidonic acid and TREK1 is sensitive (Figures S3A–S3C) and TRESK-TREK1 tandems show an intermediate sensitivity to arachidonic acid (Figure S3C). Furthermore, similar to TRESK, but not TREK1, TRESK-TREK1 tandems showed sensitivity to intracellular calcium, as tested with ionomycin application (Figures S3D and S3F). Consistent with this, the light-gated TREK1-PCS/TRESK current is also calcium sensitive (Figures S3E and S3F), confirming that the light-gated TREK1-PCS/TRESK current is carried by a TRESK1-TRESK heteromer with a common pore.

Having found that TREK can physically and functionally heteromerize with TRESK and that all three channel subtypes are

co-expressed in sensory neurons, we next investigated the ability of TRESK mutants to modify TREK1 and TREK2 currents.

TRESK-MT, but Not TRESK-C110R, Acts as a Dominant Negative on TREK1 and TREK2 Channels

As previously shown (Andres-Enguix et al., 2012), both TRESK-MT and TRESK-C110R exert a dominant-negative effect on whole-cell TRESK currents (Figures 2A–2C). Because TREK1 can co-assemble with TRESK (Figure 1), we addressed the impact of the MT and C110R variants on TREK1 current. We found that TRESK-C110R co-expression did not modify TREK1 current, whereas TRESK-MT co-expression induced a near-complete inhibition of TREK1 current (Figures 2D–2F). Similar to TREK1, TRESK-MT, but not TRESK-C110R, strongly inhibited TREK2 current (Figures 2G–2I). This dominant-negative effect is specific and likely dependent on co-assembly because TASK1, TASK3, and TRAAK, which do not colP with TRESK (Figure 1), were not sensitive to TRESK-MT co-expression (Figure S4). To address why TRESK-C110R does not modify TREK1 or TREK2 current, we used the SiMPull assay to test the ability of TRESK-C110R to physically interact with TREK1. We co-expressed HA-TREK1 with either GFP-TRESK or GFP-TRESK-C110R and tested their ability to be colPeped with HA-TREK1 via an anti-HA antibody. Whereas GFP-TRESK was able to be colPeped with HA-TREK1, leading to many fluorescent spots,

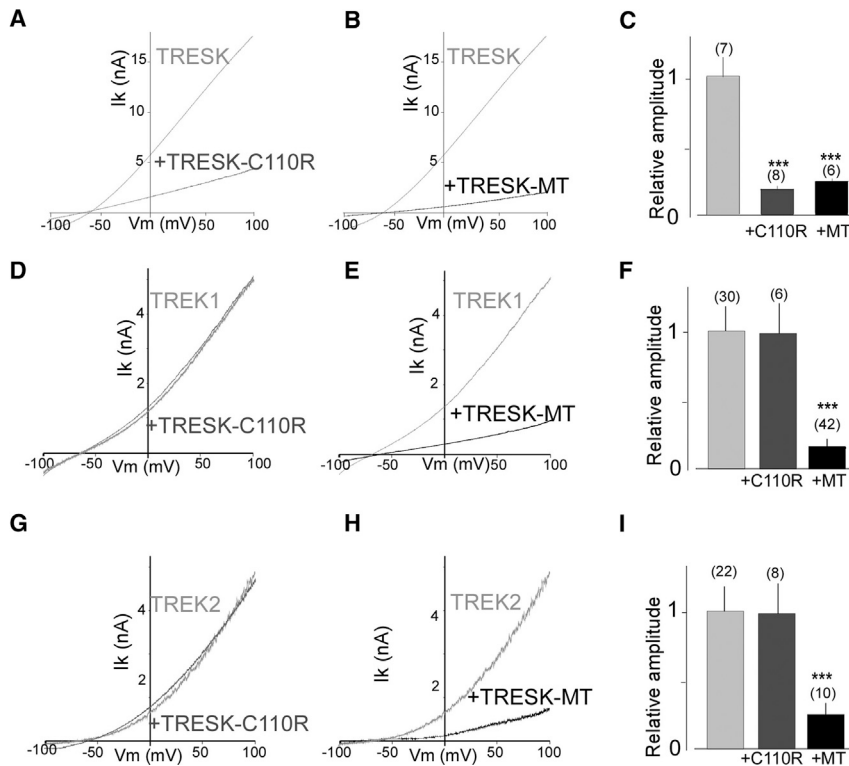


Figure 2. TRESK-MT, but Not TRESK-C110R, Acts as a Dominant Negative on TREK1 and TREK2 Channels

(A and B) Representative traces showing the effect of TRESK-C110R (A) and TRESK-MT (B) co-expression on TRESK current in HEK293T cells. Currents were elicited by voltage ramps (from -100 to 100 mV; 1 s duration).

(C) Bar graph summarizing the relative TRESK current amplitude at 0 mV for TRESK when TRESK-C110R and TRESK-MT are or not co-expressed. Data are represented as mean \pm SEM.

(D–F) Same as (A)–(C) for TREK1.

(G–I) same as (A)–(C) for TREK2. The numbers of cells tested are indicated in parentheses on the graphs. Student's *t* test (***) $p < 0.001$.

See also Figures S4 and S5.

very few spots were observed for GFP-TRESK-C110R (Figure S5A). This indicates that TREK1 can co-assemble with TRESK and that the C110R mutation leads to a drastic reduction of this association, explaining why TRESK-C110R has no effect on TREK1 current. Together, these data show that TRESK-MT can inhibit TRESK, TREK1, and TREK2, whereas TRESK-C110R is only able to inhibit TRESK. Based on the fact that TRESK-MT, but not TRESK-C110R, is able to induce TG neuron hyperexcitability (Guo et al., 2014; Liu et al., 2013), we hypothesized that TRESK-MT induces sensory neuron hyperexcitability primarily by acting on TREK1 and TREK2, not TRESK.

TRESK-MT Increases Neuronal Excitability through the Inhibition of TREK1 and TREK2

To investigate the role of TREK1 and TREK2 in the induction of TG hyperexcitability by TRESK-MT, we tested whether overexpression of GFP-TRESK-MT alters the passive and active electrophysiological properties of small-diameter (<25 μ m) TG neurons from wild-type or TREK1/TREK2 double-knockout (*TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−}) mice. As previously shown, TRESK-MT expression in WT TG neurons led to a decrease of the lamotrigine current (Figure S6), leading to an increase in excitability (Figure 3C), which included a decrease in the rheobase (74 ± 11 pA versus 47 ± 5 pA; $p < 0.05$ for TG neurons expressing GFP or TRESK-MT, respectively) and an increase in the number of action potentials (APs) evoked by suprathreshold current injections compared to control (Figures 3A and 3C). As shown in Figure 3B, neurons from *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} mice were more excitable than WT TG neurons. These neurons have a smaller lamotrigine current

(Figure S6), smaller rheobase (55 ± 6 pA; $p < 0.05$) and a significant increase in the number of APs evoked by suprathreshold current injections compared to WT TG neurons. Consistent with a role for TREK1 and 2 in mediating the effects of TRESK-MT, TRESK-MT overexpression did not alter the excitability of *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} mice (Figure 3D). *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} TG neurons showed no increase in the number of evoked APs or a reduction in rheobase

(55 ± 6 pA versus 53 ± 5 pA for TG neuron expressing GFP or TRESK-MT, respectively; $p > 0.5$). Together, these data strongly support a major role for TREK1 and TREK2 in the control of TG neuron excitability and support the idea that TRESK-MT differs functionally from TRESK-C110R in its ability to target TREK1 and TREK2 to increase the excitability of TG neurons, which is likely a crucial step in the induction of migraines.

TREK1^{−/−}/*TREK2*^{−/−} Mice Show a Mechanical Allodynia, which Is Not Increased by NO Donors

Having found that expression of the TRESK-MT mutant increases TG excitability through TREK1-TREK2 inhibition, we hypothesized that *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} mice would show an increased susceptibility to a migraine-related phenotype. Migraine is associated with an increase of the sensitivity to all sensory modalities, and cutaneous allodynia can be used as a quantifiable marker of migraine disorder (Bates et al., 2010; Verkest et al., 2018). One approach to model acute and chronic migraine is the quantification of this increase in response to known migraine triggers, such as nitric oxide (NO) donors (Bates et al., 2010), including isosorbide dinitrate (ISDN) (Verkest et al., 2018). We quantified ISDN-evoked mechanical allodynia in *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} and wild-type controls in acute and chronic conditions. In a first experiment, paw mechanical nociception thresholds were determined with a dynamic von Frey aesthesiometer before and during a 3-hr period after intraperitoneal injection of ISDN (10 mg/kg; Figure 3E; Bates et al., 2010; Verkest et al., 2018). In a second experiment, we assessed mechanical nociception thresholds in both *TREK1*^{−/−}/*TREK2*^{−/−} and wild-type controls

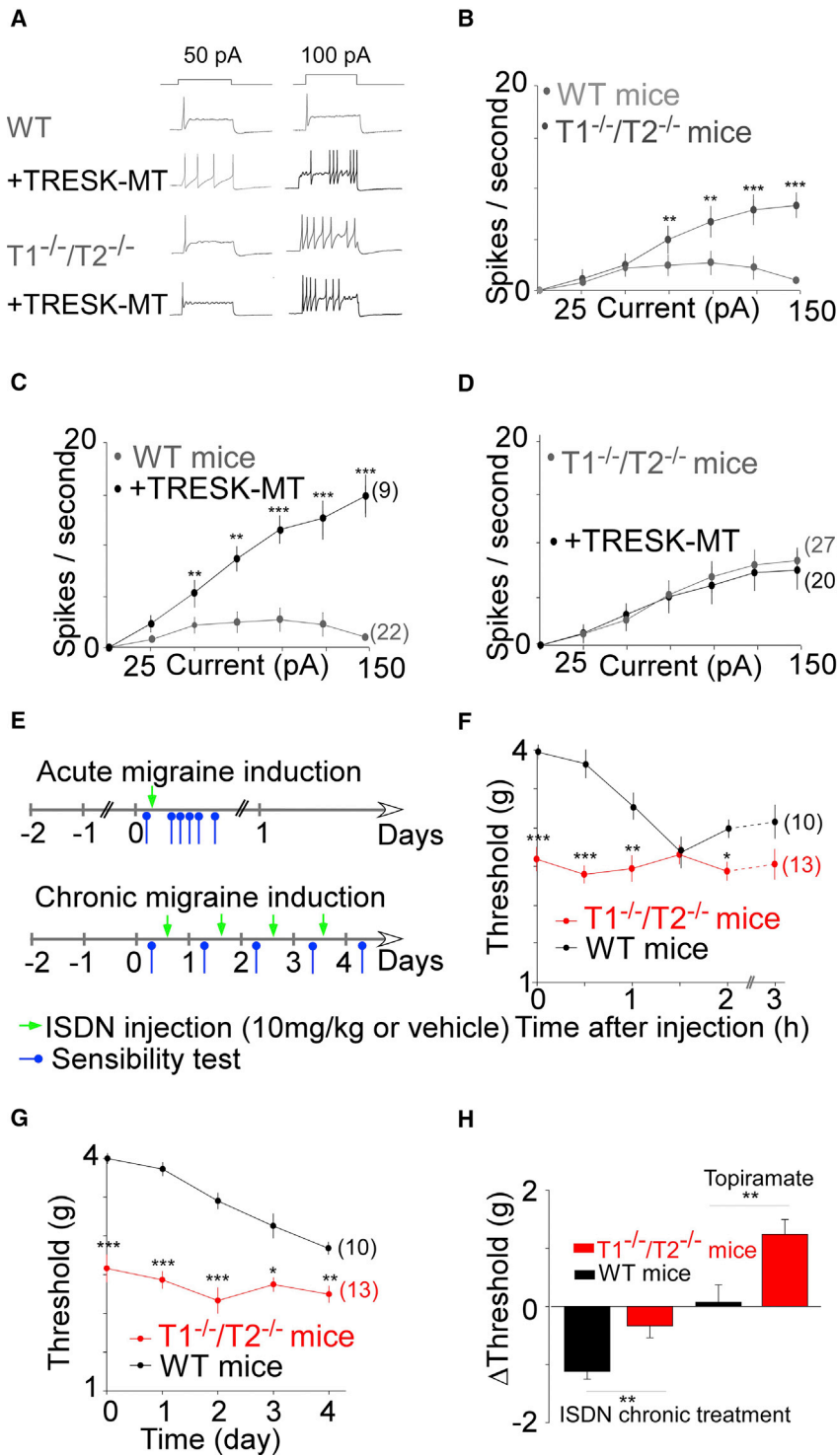


Figure 3. TREK1 and TREK2 Invalidation Increases Sensory Neuron Excitability and Mechanical Pain Perception

(A–D) *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} TG neurons are more excitable than WT TG neurons and are not sensitive to TRESK-MT overexpression.

(A) Representative traces of action potentials (spikes) generated by incremental depolarizing current injections in small-diameter TG neurons.

(B) Input-output plots of spike frequency in response to 1-s depolarizing current injection in untransfected, small TG neurons from WT and *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} double-KO mice.

(C and D) TRESK-MT acts as a dominant negative on TREK1 and TREK2 channels to increase excitability of TG neurons.

(E) Input-output plots of the spike frequency in response to 1-s depolarizing current injection in transfected small TG neurons from WT (C) and *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} double-KO mice (D) show that an increase in excitability elicited by TRESK-MT is observed in WT, but not *T1*^{-/-}/*T2*^{-/-} neurons.

The numbers of tested cells are indicated in parentheses on the plots and come from at least 4 different animals. Student's t test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

(E–H) *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} double-knockout animals present a migraine-like hypersensitivity to mechanical stimuli.

(E) Schematic of experimental behavioral paradigms. Green arrows represent the injection of ISDN, a known migraine trigger. Blue arrows represent the measurement of mechanical sensitivity.

(F) Paw withdrawal mechanical threshold, assessed after the first ISDN injection, were significantly decreased in double-knockout animals and remained less than WT for the first 1.5 hr following ISDN injection.

(G) Mechanical responses, assessed prior to and after chronic ISDN injections, were significantly decreased in double-knockout animals.

(H) Variation (ΔThreshold (g)) of the paw withdrawal mechanical threshold induced by ISDN chronic treatment or by topiramate injection. Mechanical responses were assessed before and after ISDN chronic (4 days) treatment (left bars) and before and 2 hr after topiramate injection (right bars) in WT and *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} double-knockout ISDN-nontreated mice. Numbers of mice tested are indicated in parentheses on the plots; Student's t test to compare WT versus *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). Data are represented as mean ± SEM.

See also Figure S6.

by intraperitoneally injecting ISDN every day for four days as a model of chronic migraine-associated pain (Figure 3E). We found that, at rest, *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice showed a decreased mechanical threshold compared to WT mice (2.6 ± 0.1 g versus 3.9 ± 0.1 g; p < 0.001). Notably, the basal mechanical threshold of

the injection of ISDN in *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice does not induce any modification of the mechanical threshold, which remained significantly lower than in wild-type controls during the first 1.5 hr following ISDN injection (Figure 3F; p < 0.001 after 30 min and p < 0.01 after 1 hr with a linear mixed-effects model).

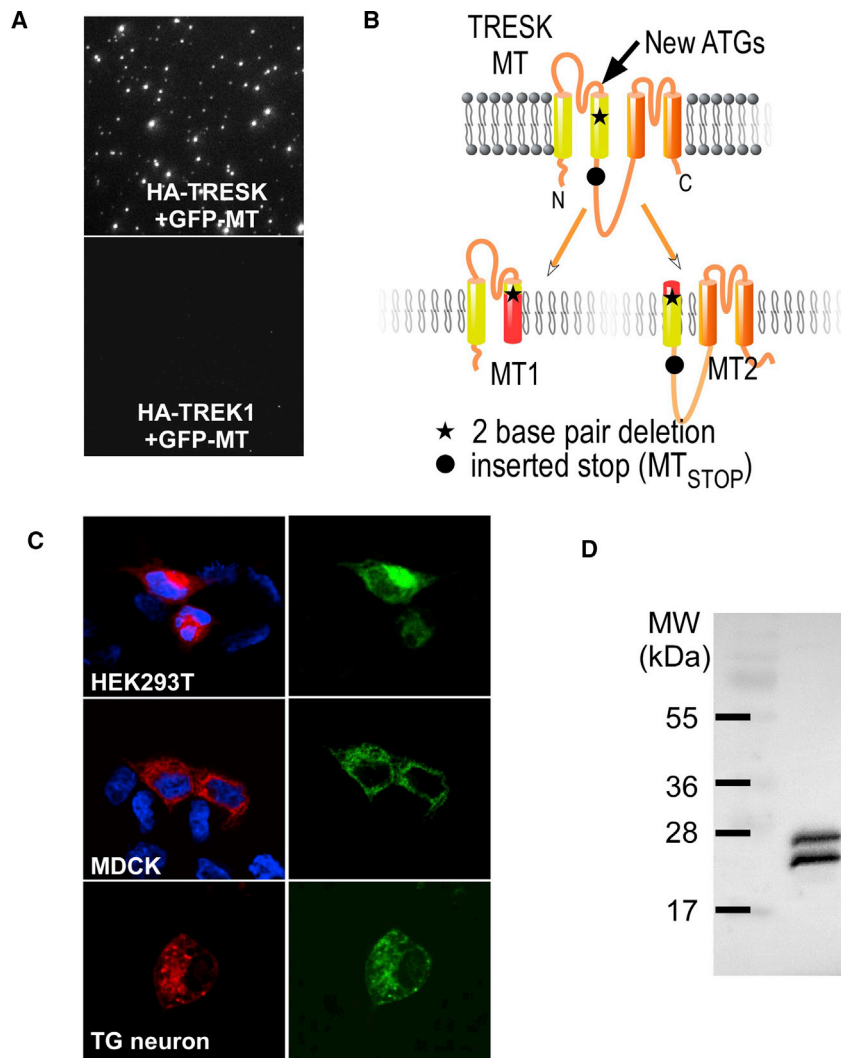


Figure 4. TRESK-MT Induces the Translation of a Second Protein, MT2

(A) Representative images from SiMPull experiments showing that GFP-TRESK-MT can be pulled down by HA-TRESK, but not by HA-TREK1.

(B) Cartoon showing the membrane topology of TRESK and the expected products induced by ATI in the TRESK-MT mutation. The region corresponding to aberrant sequences is shown in red.

(C) Co-synthesis of mCherry-MT1 and MT2-GFP products from the mCherry-TRESK-MT-GFP cDNA in HEK293T cells (top), MDCK (middle), and TG neurons (bottom). DAPI nuclear stain is shown in blue.

(D) Western blot against HA-TRESK-MT-HA probed with anti-HA antibodies from HEK293T cells lysate. See also [Figure S10](#).

In the chronic migraine-associated pain assay, the mechanical thresholds remained significantly lower for *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice compared to wild-type controls, but the difference was strongly reduced (Δ mechanical threshold induced by 4 days ISDN treatment 0.33 ± 0.2 g in *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} versus 1.12 ± 0.1 g in WT mice; [Figure 3G](#)).

Having found that *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice show basal mechanical allodynia that cannot be further increased by an ISDN injection, we wondered whether a treatment used in prophylaxis in migraine patient, topiramate, could reverse this observed migraine-like phenotype as was observed in models of nitroglycerin (NO) donor-induced migraine ([Pradhan et al., 2014](#)) and in a model of ISDN-induced migraine in rats ([Verkest et al., 2018](#)). We assessed the mechanical nociception threshold in *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice before and 2 hr following the intraperitoneal injection of 30 mg/kg of topiramate. Treatment with topiramate reversed partially the chronic basal allodynia seen in *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice (Δ mechanical threshold of 1.2 ± 0.2 g; [Figure 3H](#)), as was previously observed for a nitroglycerin-evoked form of al-

lodynia ([Pradhan et al., 2014](#)). As a control, we tested non-treated ISDN WT mice and did not observe any significant shift of the mechanical threshold following topiramate treatment ([Figure 3H](#)).

These data demonstrate that, at rest, the *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice present an allodynia phenotype, which is similar to the phenotype observed in ISDN-treated WT animals. This is consistent with a role of TREK1/TREK2 in trigeminal sensory neuron hypersensitivity that is relevant to migraine, which is also supported by the reversion induced by topiramate, a drug used in the clinic to treat chronic migraine.

TRESK-MT Mutation Induces the Translation of a Second Protein, MT2

We next explored how TRESK-MT exerts its effects on TREK channels at the molecular level. The F139WfsX24 frameshift mutation

of TRESK-MT results in the premature truncation of the human TRESK protein from 384 amino acids (aas) to 162 aas. The truncated TRESK includes the first 138 aas of wild-type TRESK followed by a 24-aa aberrant sequence. The corresponding mutation has very similar effects on the mouse TRESK gene, generating a truncated protein with the first 149 aas of wild-type TRESK and followed by a 50-aa aberrant sequence at the C terminus ([Figure 4B](#)). We fused a GFP tag to the N terminus of the mouse TRESK-MT and tested its ability to be immobilized by HA-TRESK, HA-TREK1, or HA-TREK2 in the SiMPull assay. Surprisingly, only HA-TRESK was able to colIP GFP-TRESK-MT via an anti-HA antibody ([Figure 4A](#)). This result confirms that TRESK-MT associates with TRESK to induce its dominant-negative effect but raises the question of how TRESK-MT is able to inhibit TREK1 and TREK2 without direct association.

It has been hypothesized that ATI of eukaryotic mRNAs, including those that encode K_{2P} channels ([Thomas et al., 2008](#)), may provide a method to expand the proteome ([Kochetov, 2008](#)). A close examination of the nucleotide sequence of

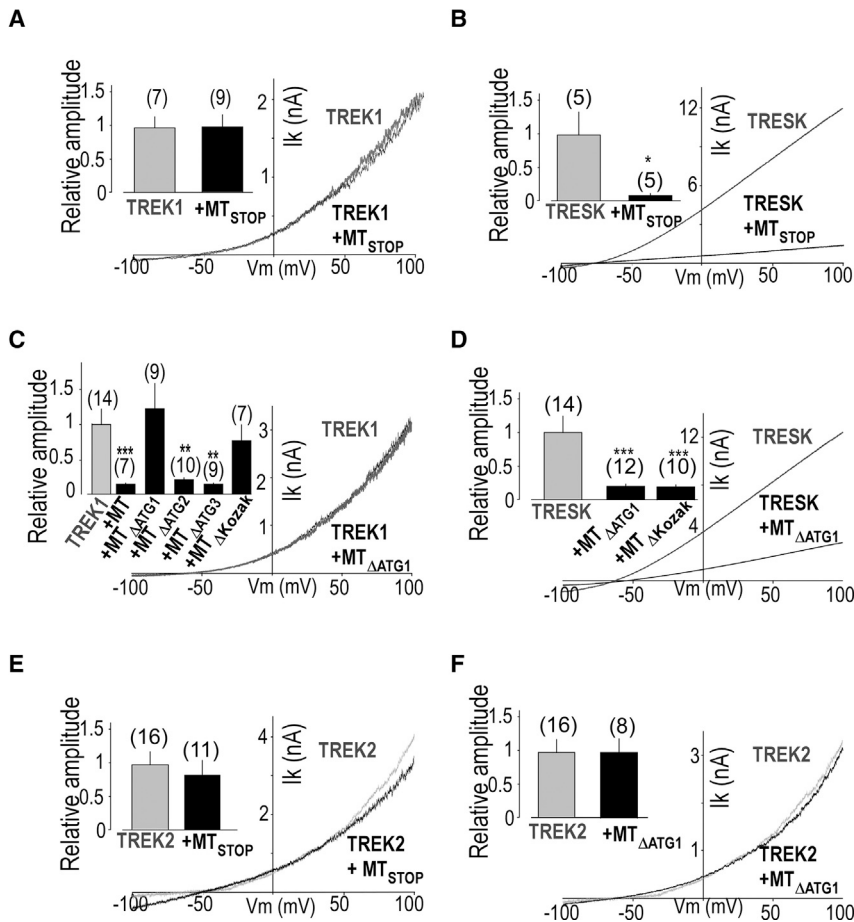


Figure 5. MT2 Mediates TREK1 Inhibition

(A) Representative traces showing the effect of introduction of a STOP codon at the beginning of the MT2 ORF within the 2-3 loop (TRESK-MT_{STOP}) on TREK1 current in HEK293T cells. Inset shows a summary of TREK1 relative current densities when TRESK-MT_{STOP} is co-expressed.

(B) Representative traces showing the effect of TRESK-MT_{STOP} on TRESK current. (Insets) TRESK relative current densities when TRESK-MT_{STOP} is co-expressed are shown.

(C) Representative traces showing the effect of introduction of a mutation of ATG at position +356 (Δ ATG1) on TREK1 current and summary bar graph showing the effect of mutation of candidate alternative start codons (Δ ATG1, Δ ATG2, or Δ ATG3) and mutation of the Kozak sequence surrounding ATG1 (Δ Kozak) in TRESK-MT. Currents were elicited by voltage ramps (from -100 to 100 mV; 1 s duration). (D) Representative traces showing the effect of TRESK-MT Δ ATG1 on TRESK current. (Insets) TRESK relative current densities when TRESK-MT Δ ATG1 is co-expressed are shown.

(E and F) same as (A) and (C) for TREK2. The numbers of cells tested are indicated in parentheses on the graphs. Cells come from at least two experimental days. Student's t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$) shows the difference between TREK1, TRESK, or TREK2 and TREK1, TRESK, or TREK2 when co-expressed with different TRESK-MT constructs. Data are represented as mean \pm SEM.

See also Figures S7 and S11.

TRESK-MT revealed that the F139WfsX24 frameshift mutation places two new ATG codons in frame with the reference open reading frame of TRESK (ATGs at position +356 and +407 for the human TRESK cDNA and +389 and +490 for the mouse cDNA). We hypothesized that one of these codons may serve as an AT1 site that can lead to the formation of a second truncated TRESK protein, termed "MT2," that would include a short (either 2 or 19 aas) N-terminal aberrant sequence followed by the C-terminal part of TM2, including the 2-3 intracellular loop, TM3, P2 loop, TM4, and the C-terminal domains (Figure 4B). To test whether MT2 is co-translated with MT1, we introduced an N-terminal mCherry tag in frame with MT1 and a C-terminal GFP in frame with MT2 within the mouse TRESK-MT cDNA ("mCherry-TRESK-MT-GFP"). Expression of this construct led to HEK293T cells with both mCherry and GFP fluorescence, showing the co-translation of mCherry-MT1 and MT2-GFP (Figure 4C). This co-translation was observed in other cell lines, including MDCK cells (Figure 4C), as well as in primary TG neurons (Figure 4C). Next, we introduced an N-terminal HA tag in frame with MT1 and another one in frame with MT2 within the mouse TRESK-MT cDNA ("HA-TRESK-MT-HA"). Lysate from cells transfected with HA-TRESK-MT-HA was probed in a western blot with anti-HA antibodies, and 2 bands, with a similar intensity, corresponding to the expected molecular weights for

MT1 (~23 kDa) and MT2 (~29 kDa) were detected (Figure 4D). Together, these data clearly show that TRESK-MT leads to the production of two distinct fragments of TRESK.

To probe the function of MT2, we introduced a stop codon into the MT2 open reading frame (ORF) of TRESK-MT at the beginning of the 2-3 loop (Figure 4B), inducing the loss of expression of MT2 (Figure S7A). As shown in Figure 5, whereas the introduction of the stop codon in the MT2 ORF did not change the ability of TRESK-MT to inhibit TRESK current (Figure 5B), this stop codon abolished the ability of TRESK-MT to produce a dominant-negative functional effect on TREK1 (Figure 5A). We next confirmed the importance of this second ORF by mutating, in TRESK-MT, the putative AT1 start codons one by one. Mutation of the first ATG abolished the ability of TRESK-MT to inhibit TREK1 (Figure 5C), but not TRESK (Figure 5D), whereas mutation of the second ATG did not alter the ability of TRESK-MT to inhibit TREK1 current (Figures 5C and S7B). These data indicate that the AT1 site is the first internal ATG. As a control, we mutated a third ATG, which is also present in the WT-TRESK sequence, and found that it did not change the ability of TRESK-MT to inhibit both TRESK and TREK1 currents (Figures 5C and S7C). Similar to TREK1, introduction of a stop codon into the MT2 ORF or mutation of the first ATG also abolished the inhibition of TREK2 by TRESK-MT (Figures 5E and 5F). To further

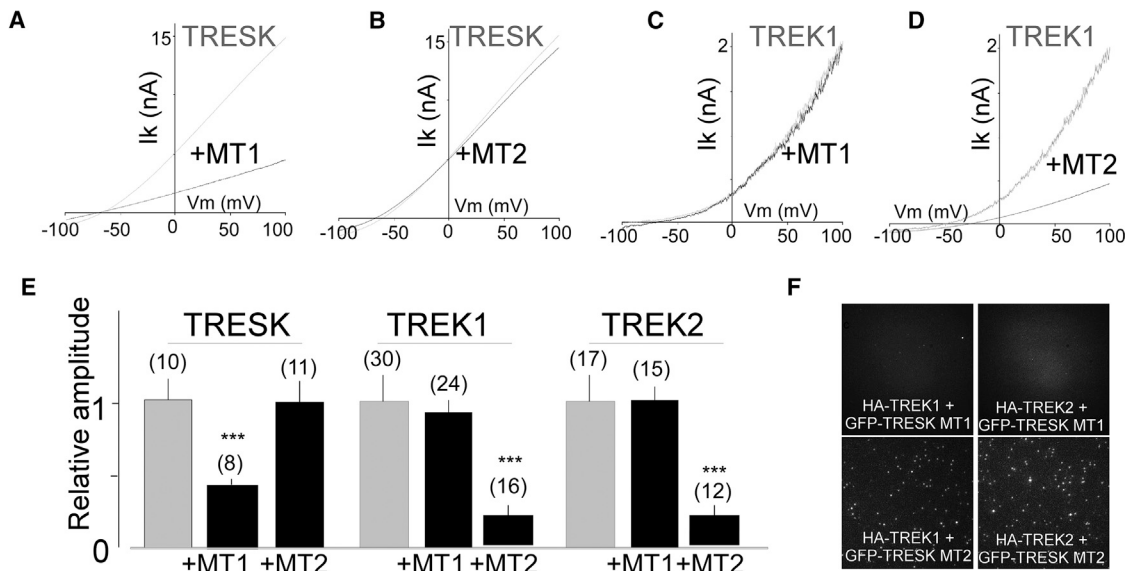


Figure 6. MT1 Acts as Dominant Negative on TRESK, whereas MT2 Acts as a Dominant Negative on TREK1 and TREK2 Channels

(A–D) Representative traces showing the effect of TRESK-MT1 (A and C) or TRESK-MT2 (B and D) co-expression on TRESK (A and B) or TREK1 (C and D) currents in HEK293T cells. Currents were elicited by voltage ramps (from -100 to 100 mV; 1 s duration).

(E) Bar graph summarizing the relative TRESK, TREK1, and TREK2 current amplitudes at 0 mV when MT1 or MT2 are co-expressed. The numbers of cells tested are indicated in parentheses on the graphs. Cells come from at least two experimental days. Student's *t* test (** $p < 0.001$). Data are represented as mean \pm SEM. (F) Representative images showing that GFP-MT2, but not GFP-MT1, can be pulled down by HA-TREK1 and HA-TREK2 via an anti-HA antibody in the SiMPull assay with HEK293T cells.

See also Figures S7, S8, and S11.

demonstrate that the first ATG serves as a start codon, we mutated the potential Kozak sequence GCTATGG to CCTATGC and found that alteration of the Kozak sequence strongly reduced the inhibitory effect of TRESK-MT on TREK1 current (Figures 5C and S7D) without affecting the effect on TRESK (Figures 5D and S7E).

MT2, but Not MT1, by Acting as a Dominant Negative on TREK1 and TREK2 Channels, Increases Neuronal Excitability of WT Small TG Neurons, Leading to Facial Allodynia

To independently express MT1 and MT2 for functional characterization, we sub-cloned both ORFs into separate mammalian expression vectors. Co-expression of MT2 with TRESK did not modify TRESK current (Figures 6B and 6E), and MT1 co-expression induced a ~ 3 -fold decrease of the current, which was similar to what was observed for the co-expression of the full TRESK-MT construct (Figures 6A and 6E). On the contrary, co-expression of MT1 did not modify TREK1 current (Figures 6C and 6E), but co-expression of MT2 induced a ~ 4 -fold decrease of the current, similar to what was observed with co-expression of the full TRESK-MT construct (Figures 6D and 6E). Similar results were obtained for TREK2 (Figures 6E and S8). Consistent with the functional data, we found that GFP-MT2 is colPed with HA-TREK1 or HA-TREK2 in the SiMPull assay (Figure 6F).

To validate the physiological role of interaction between TREK1, TREK2, and MT2, we tested the functional effect of MT2 in TG neurons. Whereas MT1 expression did not alter the excitability of WT TG neurons (Figures 7A and 7B), MT2

increased it significantly (Figures 7A and 7C). In fact, MT1 did not modify the rheobase (74 ± 11 pA versus 79 ± 5 pA; $p > 0.5$ for TG neurons expressing GFP or MT1, respectively) and did not modify the number of APs evoked by suprathreshold current injections compared to control. Conversely, MT2 expression in WT TG neurons led to an increase in excitability (Figure 7), which included a decrease in the rheobase (74 ± 11 pA versus 55 ± 5 pA; $p < 0.05$ for TG neurons expressing GFP or MT2, respectively; $p < 0.05$) and an increase in the number of APs evoked by suprathreshold current injections compared to control (Figures 7A and 7C). We confirmed that this effect is linked to TREK1 and TREK2 because MT2 overexpression failed to increase the excitability of *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} TG neurons (Figure 7D).

Having found that MT2, by inhibiting TREK1 and TREK2, is sufficient to increase TG excitability, we asked whether MT2 expression in TG ganglia would induce a migraine-related phenotype. We conducted behavioral experiments in rats in which MT2 was virally overexpressed within the trigeminal ganglia. Rats allowed to test the mechanical pain threshold on the face, which is directly linked to TG excitability, constituting a relatively direct, reliable, and quantifiable marker of migraine disorder in clinical contexts as well as in NO-induced migraine (Pradhan et al., 2014; Kopruszinski et al., 2017; Harris et al., 2017). As shown in Figure 7F, MT2 expression in TG ganglia (Figure S9) significantly increased the facial mechanical threshold (3.3 ± 0.4 g versus 7.7 ± 0.4 g; $p < 0.001$). Furthermore, as was seen for the *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice, the basal mechanical facial threshold of MT2-expressing rats is similar to the threshold

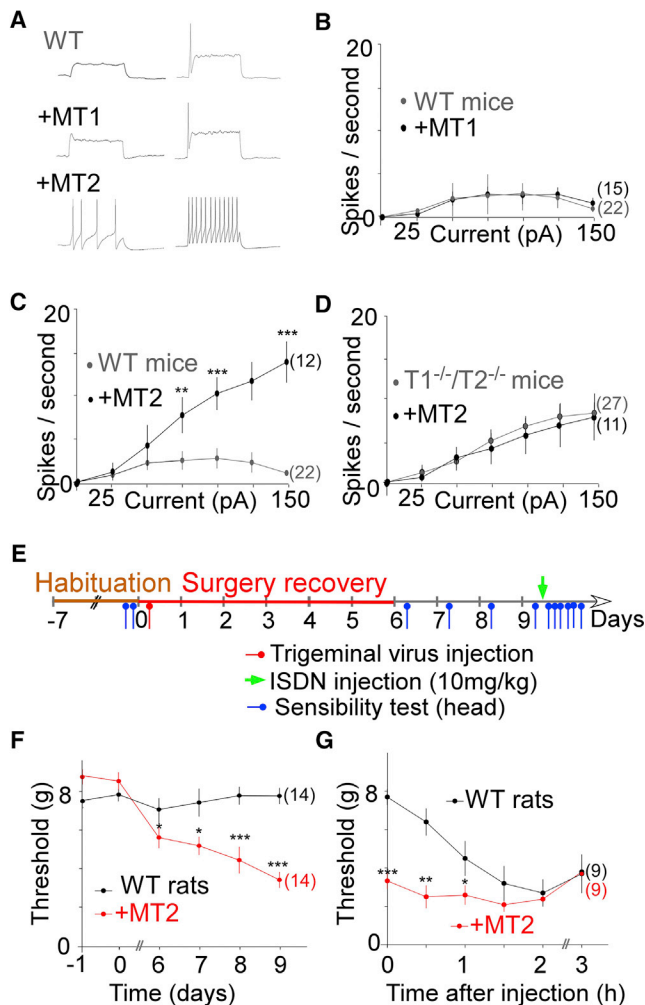


Figure 7. MT2, but Not MT1, Increases Neuronal Excitability of WT Small TG Neurons through TREK1 and TREK2 Inhibition

(A) Representative traces showing spikes generated by incremental depolarizing current injections (+50 pA and +100 pA) in small-diameter TG neurons. (B and C) Input-output plots of spike frequency in response to 1-s depolarizing current injections in WT small-diameter TG neurons transfected with either GFP (“WT”), the GFP-tagged MT1 subunit (“MT1”; B), or the GFP-tagged MT2 subunit (“MT2”; C).

(D) Input-output plots of spike frequency show a lack of effect of GFP-MT2 expression on TG neurons from *TREK1/TREK2* double-KO mice (*T1^{-/-}/T2^{-/-}*).

(E–G) MT2 overexpression in TG leads to facial mechanical allodynia in rats. (E) Schematic of experimental behavioral paradigms. After a week of habituation, rats were injected with 10 μ L of AAV2 encoding for either MT2 + GFP or GFP.

(F) Face withdrawal mechanical threshold assessed after trigeminal virus infection encoding either GFP (WT rat condition) or MT2.

(G) Face withdrawal mechanical threshold, assessed after the first ISDN injection. The threshold for MT2-expressing rats was significantly decreased before the injection and remained less than WT for the first 1.5 hr following ISDN injection. The numbers of tested cells and rats are indicated in parentheses on the plots. Mice neurons come from at least 5 different animals. Student’s *t* test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001). Data are represented as mean \pm SEM.

See also Figure S9.

observed 1.5, 2, and 3 hr after acute ISDN injection in WT rats. Having found that MT2 overexpression induced allodynia, we quantified ISDN-evoked mechanical allodynia and found that MT2 overexpression in TG neurons prevents any further effect of ISDN on facial allodynia. This loss of effect of NO donors may be due to the fact that the “ceiling” level of allodynia has already been reached.

Together, these data demonstrate that, at rest, the overexpression of MT2 leads to an increase in TG excitability and a chronic cutaneous allodynia to a similar level to what is observed following NO-donor injection. This is also similar to the allodynia observed in *TREK1^{-/-}/TREK2^{-/-}* double-KO mice (Figure 3).

MT2-Producing Alternative Translation Initiation Is Found in Other Migraine-Associated TRESK Mutants

Having found that MT2 is responsible for the migraine-associated increase in TG excitability and induction of a migraine-like phenotype through the inhibition of TREK1 and TREK2, we anticipated that other frameshift mutations may exist that place the ATG at position +356 in frame with the reference open reading frame of TRESK. Such mutations would lead to the formation of MT2. This mutation could be either a 2-bp deletion or 1-bp insertion in the region between the ATG at position +356 and the ATG at position +427 (Figure S10). We used the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database (Lek et al., 2016) and found one variant (Y121LfsX44) with a T duplication (+1 pb; c.361dupT) that places the AT1 site in frame with the TRESK ORF (Figure S9). We introduced this insertion into the mCherry-TRESK-GFP (mCherry-TRESK-c.361dupT-GFP) sequence and found, similar to mCherry-TRESK-MT-GFP (Figure 4C), that this construct led to HEK293T cells with both mCherry and GFP fluorescence (Figure 8A) due to the co-translation of both MT1 and MT2 proteins. Similar to TRESK-MT, this mutant is able to inhibit TREK, TREK1, and TREK2 (Figure 8). As was seen for TRESK-MT (Figure 5), introduction of a stop codon into the MT2 ORF (TRESK c.361dupT_{STOP}) of this mutant abolished its ability to inhibit TREK1 and TREK2 (Figure 8), but not TRESK. Because this Y121LfsX44 mutation leads to the same molecular effects as TRESK-MT on TREK function, we hypothesized that it may be associated with a migraine phenotype. To address this, we looked in the ClinVar database (Landrum et al., 2016) and found that this mutant has been correlated with a migraine phenotype (RCV000490385.1).

DISCUSSION

Although initial findings of migraine-associated mutations of TRESK represented a major breakthrough (Lafrenière et al., 2010), a direct relationship between TRESK channel disruption and migraine has been challenged based on the discovery of a TRESK mutation (C110R) that produces a dominant-negative form of TRESK but is found in a control cohort population (Andres-Enguix et al., 2012). The presence of this mutation in control individuals indicates that a single non-functional TRESK variant alone may not be sufficient to cause migraines, consistent with the genetic complexity of this disorder. In this study, we have addressed this controversy and found that the migraine-associated

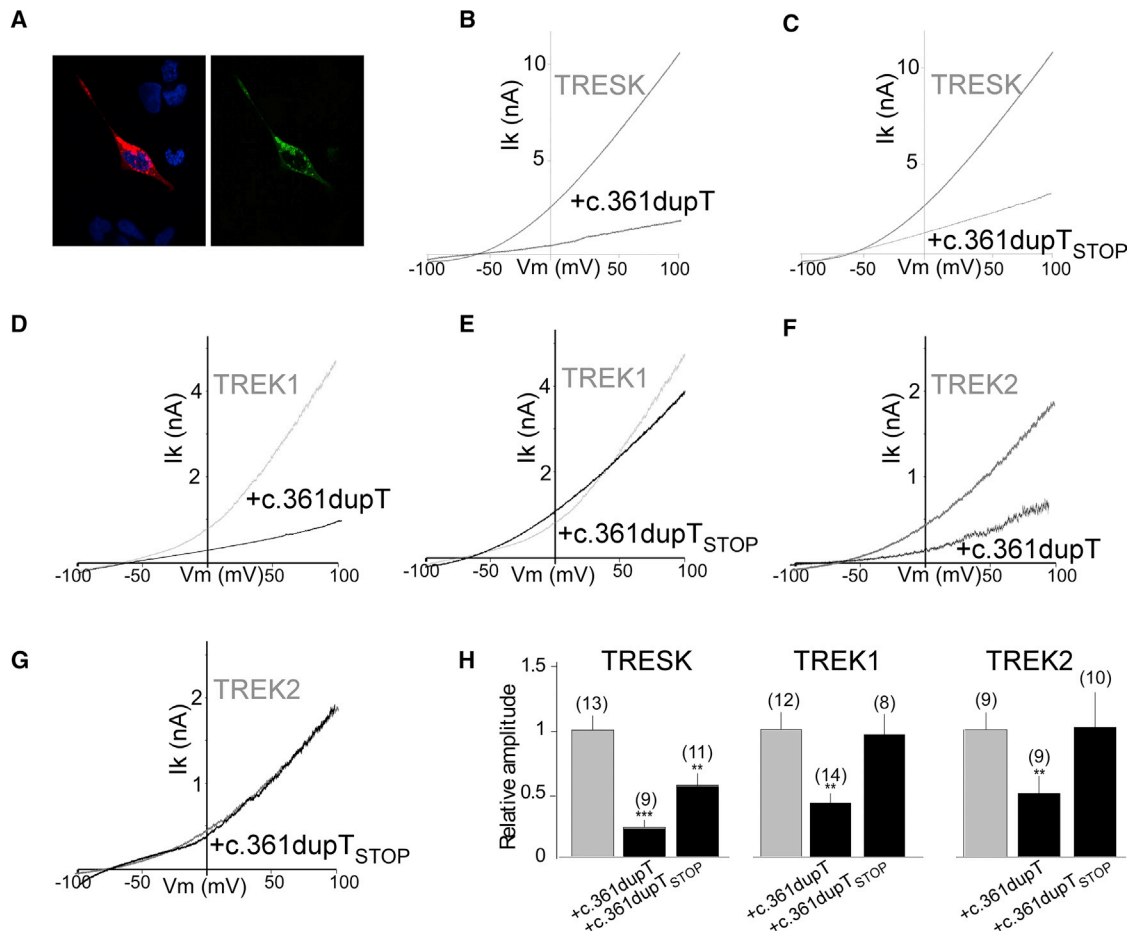


Figure 8. TRESK-c.361dupT (Y121LfsX44) Acts as a Dominant Negative to Reduce Both TRESK and TREK1 Current

(A) Co-synthesis of mCherry-MT1 and MT2-GFP products from the mCherry-TRESK-c.361dupT-GFP cDNA in HEK293T cells.

(B and C) Representative traces showing the effect of TRESK c.361dupT (B) and TRESK c.361dupT_{STOP} (C) co-expression on TRESK current. Currents were elicited by voltage ramps (from -100 to 100 mV; 1 s duration).

(D and E) Same as (B) and (C) for TREK1.

(F and G) same as (A) and (B) for TREK2.

(H) Bar graph summarizing the relative TRESK, TREK1, and TREK2 current amplitudes at 0 mV for TRESK, TREK1, and TREK2 when TRESK c.361dupT and TRESK c.361dupT_{STOP} are co-expressed. The numbers of cells tested are indicated in parentheses on the graphs. Cells come from at least two experimental days. Student's t test (**p < 0.01 and ***p < 0.001). Data are represented as mean ± SEM.

See also [Figure S10](#).

mutation of TRESK exerts its effects on sensory neurons by associating and serving as a dominant negative not only for TRESK but also for TREK1 and TREK2 channels. In stark contrast, TRESK-C110R is not able to regulate TREK channels. Consistent with a function of TREK1 and TREK2 in TRESK-MT-induced migraine, the *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice show a migraine-like hypersensitivity to mechanical stimuli. Surprisingly, we find that migraine-associated frameshift mutations of TRESK induce alternative translation initiation that allows the formation of a second product, MT2, which mediates the dominant-negative action on TREK1 and TREK2 when overexpressed. This dominant-negative action on TREK1 and TREK2, ultimately, leads to an increase in TG neuron excitability and a migraine-like hypersensitivity to facial mechanical stimuli. Supporting

this phenomenon as a general mechanism, we found another migraine-associated frameshift mutation in TRESK that produces a similar ORF shift, which also leads to the formation of MT2. Together, these findings support a role of fsATI and for TREK potassium channels as a key part of sensory neuron excitability and the underlying cellular mechanism of migraine.

We and others ([Blin et al., 2016](#); [Hwang et al., 2014](#); [Lengyel et al., 2016](#); [Levitz et al., 2016](#)) have recently shown that K_{2P} channels are able to form both homodimeric and heterodimeric potassium channels. In this study, we show that TREK and TRESK readily assemble as heteromers. To co-assemble natively, TRESK and TREK must be expressed in the same cells. We and others have found that TG neurons from mice can co-express TREK1, TREK2, and TRESK ([Bautista et al., 2008](#)), and it

has been confirmed that TREK1 and TRESK are also co-expressed in human TG neurons (Flegel et al., 2015). Recent single-cell RNA sequencing data on dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons from mice have also shown that co-expression of TRESK with TREK-2 and/or TREK-1 occurs in some subtypes of sensory neurons involved in pain signaling, including peptidergic and non-peptidergic subtypes (Usoskin et al., 2015; Zeisel et al., 2018). Single-channel recordings also identified these channels in medium- and small-sized sensory neurons of the DRG, which are likely involved in nociception (Kang et al., 2005). In this study, we have supported these previous findings by using immunohistochemistry and single-cell RT-PCR (Figure S1), as well as pharmacology (Figure S6), to confirm the co-expression of TRESK and TREK channels in sensory neurons. Nevertheless, the relative expression levels of TREK and TRESK in TG neurons are, as is the case for the DRG, likely variable, and therefore, we expect a differential population of homo and heteromers from cell to cell. Expression studies with single-cell precision are ultimately needed to precisely determine which subpopulations co-express different relative amounts of each channel. We show that this TRESK-TREK heteromer is a functional dimer because one TRESK is able to co-assemble with one TREK subunit to form a heterodimeric channel with a common pore using a photoswitchable conditional TREK1 (Sandoz et al., 2012). This is quite surprising given that TREK1/2 and TRESK are in different K_{2P} channel subfamilies and only show low sequence identity of ~19.7% (Sano et al., 2003). We previously found that all members of the TREK channel subfamily (TREK1, TREK2, and TRAAK) can co-assemble but that TREK was unable to interact with TASK channels. Similar to the other reported heteromers, TREK1-TRESK heterodimers show unique biophysical behavior that blends the properties of the parent subunits. Notably, TREK1-TRESK is both arachidonic-acid- and calcium-sensitive. In this study, we also show that TRESK does not heteromerize with three other K_{2P} channels, one from the TREK subfamily, TRAAK, and two from the TASK subfamily, TASK1 and TASK3. Together, this indicates that not all pairs of K_{2P} channel subunits are able to interact and that there are indeed rules of interaction that remain to be deciphered. Future work will be needed to determine the molecular mechanisms and structural interfaces that mediate specific K_{2P} heteromer assembly and the associated functional consequences of heteromerization.

TRESK channels are expressed in the DRG and show their highest expression levels in TG. In DRG and TG, TRESK is most abundant in the small- and medium-size sensory neurons (Dobler et al., 2007; Lafrenière et al., 2010). In TG neurons, introduction of TRESK-MT has been shown to reduce the lamotrigine-sensitive K^+ current, leading to an increase in excitability (Guo et al., 2014; Liu et al., 2013). This increase of TG excitability cannot be explained by TRESK inhibition because TRESK-C110R, which also strongly inhibits wild-type TRESK, does not inhibit the lamotrigine-sensitive K^+ current and does not increase TG excitability, explaining its lack of involvement in migraine (Guo et al., 2014). TREK1 and TREK2 are also expressed in DRG and show high expression levels in TG (Blin et al., 2016; Yamamoto et al., 2009). Furthermore, TREK1 and TREK2 have recently been shown to also be lamotrigine sensi-

tive (Walsh et al., 2016; Figure S6). We found that TRESK-MT inhibits TREK1 and TREK2 to increase TG excitability, showing that TREK1 and TREK2 control TG neuron excitability. To address the impact of this sensory neuron excitability increase, linked to TREK1 and TREK2 inhibition, we tested *TREK1^{-/-}/TREK2^{-/-}* mice for their susceptibility to a migraine-like phenotype. Migraine is associated with increased sensitivity to all sensory modalities, and it appears that cutaneous allodynia can be used as a quantifiable marker of migraine disorder (Bates et al., 2010). Increase of basal mechanical hyperalgesia induced by TREK1 and TREK2 invalidation, to a similar level compared to WT animals after ISDN injection, is in agreement with a KO-induced increase of sensory neuron excitability that is relevant to migraine (Brennan et al., 2013). Furthermore, trigeminal overexpression of MT2 in rats also induced a chronic facial allodynia. This facial allodynia can be a facial hypersensitivity without migraine; however, orbitofacial allodynia is clearly accepted as a reflection of the activity of TG neurons and therefore relevant to migraine (Pradhan et al., 2014; Kopruszinski et al., 2017; Harris et al., 2017). Nevertheless, inhibition of TREK1/TREK2 by TRESK-MT2 fragments will depend on its physiological expression and remains to be demonstrated without overexpression. Topiramate was previously shown to inhibit NO-donor-induced acute or basal chronic allodynia (Pradhan et al., 2014). We found that topiramate was able to partially reverse TREK1-TREK2 invalidation-induced allodynia, which is consistent with its action as a prophylactic migraine therapy (Pradhan et al., 2014). Therefore, these results seem to indicate that the dysfunction of TREK1 and TREK2, and not of TRESK alone, contributes to the increase of TG excitability, which may lead to an alteration of pain processing like during migraine, suggesting that TREK1, TREK2, and TREK-TRESK heterodimers should be considered as new targets for migraine treatment.

An important remaining question is: how can TREK1 and TREK2 dysfunction lead to migraine phenotypes? Importantly, the TRESK-MT mutant has been found in migraine with aura phenotype (Lafrenière et al., 2010). Aura has been linked to CSD, which precedes the activation of TG neurons (Noseda and Burstein, 2013). TREK1 and TREK2 channel activity, by reducing TG excitability, may serve as a brake to prevent the pathological activation of TG neurons during the early stages of CSD. In patients expressing TRESK-MT, this mechanism may be reduced or eliminated, enhancing the activation of TG neurons, thus leading to migraines. Fitting the model in which an increase in TG excitability is the primary underlying cause of headaches, the TRESK-MT proband described in the original Lafrenière paper (Lafrenière et al., 2010; OMIM no. 613656) also showed migraine headaches in isolation without a preceding aura.

Most importantly, this study led us to uncover an undescribed mechanism involving alternative translation initiation. We provide evidence that the 2-bp deletion observed for TRESK-MT introduces an in-frame start codon with the reference open reading frame of TRESK, allowing the formation of MT2, the TRESK fragment responsible for the increase in TG excitability. Translation initiation of most eukaryotic mRNAs follows a linear scanning mechanism where the 40S ribosome is recruited to the

5' cap structure of the mRNA followed by downstream movement until an initiation codon is encountered (Kozak, 1999). In these cases, the translation initiation site is the first cap-proximal start codon for methionine (AUG). In most eukaryotic mRNA, this first AUG is embedded into the Kozak consensus sequence [A/G]-XX-ATGG (Kozak, 1984a, 1984b; Jackson et al., 2010). However, if the first AUG is used inefficiently, some ribosomes read through the site without recognition; this leaky scanning can result in translation initiation at a downstream position (Thomas et al., 2008). This has been observed for TREK1, where the second strong ATI site allows the physiological formation of a TREK1 channel with a shorter N terminus that leads to altered TREK1 ion selectivity (Thomas et al., 2008). Similar to what was seen with TREK1, the TRESK ATG at position +356 is embedded into the Kozak consensus sequence (GCTATGG), which may explain why this ATG can serve as an ATI. To further determine why the ATG at position +356 is able to serve as an ATI, we submitted the TRESK-MT sequence to TIS Miner and the ATGpr algorithms (Nishikawa et al., 2000), and both algorithms predicted that the ATG at position +356 is a strong start codon and it is the second possible start codon after ATG at position +1. Furthermore, we found that Kozak sequence mutation significantly reduced the TRESK-MT effect on TREK1 current. This indicates that leaky scanning may explain the generation of TRESK-MT2.

At the physiological level, ATI is thought to increase protein functional diversity, as is also the case with RNA splicing. For example, it was recently shown in osteogenesis imperfecta (OI) disease, that a causative missense mutation of c.-14C > T of the cDNA encoding IFITM5 creates an upstream ATG (ACG at position -15 was mutated to give ATG) in the 5' UTR in frame with IFITM5, which can serve as an ATI site, resulting in addition of an N-terminal 15-aa sequence (Lazarus et al., 2014). Here, we find that an ATG embedded by a strong Kozak sequence, downstream of the ATG at position +1, can be put in frame by a frameshift mutation to induce the translation of a second truncated protein. In the present work, this second product was found to target TREK1 and TREK2 to increase TG neuron excitability and to produce mechanical allodynia, linking this mutant to migraine. This represents the first example where a frameshift mutation downstream of an ATG start codon at position +1 creates a new ORF, allowing the production of a second product that is at the origin of a physiological disturbance. To see whether this fsATI is a general phenomenon in TRESK, we predicted that any mutations before the stop codon ATG at position +427 that put the ATG at position +356 in frame would induce the formation of an MT2 that would lead to disease. Indeed, we demonstrate that another frameshift mutation, c.361dupT (Y121LfsX44), also leads to the formation of MT2 and is correlated to migraine (Clinvar, RCV000490385.1). It is not possible to make any causal statements from this observation, but it is worth noting that this is the only other TRESK mutation that has been linked to a migraine phenotype. Together, this work shows that different frameshift mutations downstream of the first start codon can lead to ATI to produce a second protein that can carry the physiological function, suggesting that this mechanism may be widespread in nature and therefore needs to be

considered when analyzing frameshift mutations linked to human disorders.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Knock-out mice
 - HEK cells
 - *Xenopus* oocytes
 - Rats
 - WT mice
- METHOD DETAILS
 - Behavioral experiments
 - Electrophysiology
 - Immunocytochemistry
 - Molecular Biology, Cell Culture and Gene Expression
 - PCR amplification and quantification
 - Primary cultures of mouse TG neurons
 - Single Molecule Pulldown (SiMPull)
 - Single cell reverse transcription
 - Trigeminal neurons RNA extraction and reverse transcription
 - Vector preparation
 - Western blot analysis
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Single Molecule Pulldown
 - Electrophysiology
 - Animal experiment
 - Quantitative PCR

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes eleven figures and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.039>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Vivaudou, Rainer Waldman, Bernard Mari, Kevin Le Brigand, Eric Lingueglia, Michel Lanteri-Minet, Emile Piquet, and Maximilian Furthauer for helpful discussion. The work was supported by a grant to G.S. by the ATP-AVENIR funds and the Fondation pour la Recherche Medicale (Equipe labellisée FRM 2017, FRM DEQ20170336753 and ANR AT2R-TRAAK-Bioanalgesics ANR-17-CE18-0001 and ANR-17-ERC2-0023) as well as grants to G.S. and F.L. from the Agence Nationale de la Recherche (Laboratory of Excellence "Ion Channel Science and Therapeutics," grant ANR-11-LABX-0015-01 and ANR Dynaselect, grant ANR-14-CE13-0010). The work was also supported by grants from Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades and Instituto de Salud Carlos III of Spain FIS PI14/00141 and FIS PI17/00296 (to X.G.), RETIC RD16/0008/0014 (to X.G.), and Generalitat de Catalunya 2017SGR737 (to X.G.). We thank A. Monteil and C. Lemmers from the Vectorology facility, PVM, Biocampus Montpellier, CNRS UMS3426 for virus production. The microscopy was done in the Prism facility, "Plateforme PRISM - IBV-CNRS UMR 7277- INSERM U1091-UNS." The help of Magali Mondin is acknowledged. Histopathological analyses were performed on the Experimental Histopathology Platform of iBV, CNRS UMR7277-INSERM U1091-UNS. The help of Samah REKIMA is acknowledged.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, P.R., X.G., J.L., and G.S.; Methodology, P.R., A.B., A.A.-B., C.V., F.L., J.L., X.G., and G.S.; Investigation, P.R., A.A.-B., P.A.P., C.V., B.W., J.L., and G.S.; Writing – Original Draft, J.L. and G.S.; Writing – Review and Editing, P.R., A.B., F.L., X.G., J.L., and G.S.; Funding Acquisition, G.S.; Project Administration, G.S.

DECLARATION OF INTERESTS

Patent applications have been filed on TREK1/2 as potential targets to treat migraine (application with InsermTransfert).

Received: April 16, 2018

Revised: October 3, 2018

Accepted: November 20, 2018

Published: December 17, 2018

REFERENCES

- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* *25*, 2368–2376.
- Andres-Enguix, I., Shang, L., Stansfeld, P.J., Morahan, J.M., Sansom, M.S., Lafrenière, R.G., Roy, B., Griffiths, L.R., Rouleau, G.A., Ebers, G.C., et al. (2012). Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. *Sci. Rep.* *2*, 237.
- Bates, E.A., Nikai, T., Brennan, K.C., Fu, Y.H., Charles, A.C., Basbaum, A.I., Ptáček, L.J., and Ahn, A.H. (2010). Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia* *30*, 170–178.
- Bautista, D.M., Sigal, Y.M., Milstein, A.D., Garrison, J.L., Zorn, J.A., Tsuruda, P.R., Nicoll, R.A., and Julius, D. (2008). Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* *11*, 772–779.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K₂P channels with unique properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *113*, 4200–4205.
- Brennan, K.C., Bates, E.A., Shapiro, R.E., Zyuzin, J., Hallows, W.C., Huang, Y., Lee, H.-Y., Jones, C.R., Fu, Y.-H., Charles, A.C., et al. (2013). Casein kinase II mutations in familial migraine and advanced sleep phase. *Sci. Transl. Med.* *5*, 183ra156, 1–11.
- Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., and Döring, F. (2007). TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* *585*, 867–879.
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., and Gisselmann, G. (2015). RNA-seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS ONE* *10*, e0128951.
- Guo, Z., Liu, P., Ren, F., and Cao, Y.Q. (2014). Nonmigraine-associated TRESK K⁺ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* *112*, 568–579.
- Guyon, A., Tardy, M.P., Rovère, C., Nahon, J.L., Barhanin, J., and Lesage, F. (2009). Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K⁺ channels. *J. Neurosci.* *29*, 2528–2533.
- Harris, H.M., Carpenter, J.M., Black, J.R., Smitherman, T.A., and Sufka, K.J. (2017). The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J. Neurosci. Methods* *284*, 63–70.
- Hwang, E.M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D.H., Han, K.S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., et al. (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat. Commun.* *5*, 3227.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 113–127.
- Jain, A., Liu, R., Xiang, Y.K., and Ha, T. (2012). Single-molecule pull-down for studying protein interactions. *Nat. Protoc.* *7*, 445–452.
- Johansen, F.F., Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., and Rossier, J. (1995). Single cell RT-PCR proceeds without the risk of genomic DNA amplification. *Neurochem. Int.* *26*, 239–243.
- Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* *564*, 103–116.
- Kochetov, A.V. (2008). Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *BioEssays* *30*, 683–691.
- Kopruszinski, C.M., Xie, J.Y., Eyde, N.M., Remeniuk, B., Walter, S., Stratton, J., Bigal, M., Chichorro, J.G., Dodick, D., and Porreca, F. (2017). Prevention of stress- or nitric oxide donor-induced medication overuse headache by a calcitonin gene-related peptide antibody in rodents. *Cephalalgia* *37*, 560–570.
- Kozak, M. (1984a). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* *12*, 857–872.
- Kozak, M. (1984b). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* *308*, 241–246.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* *234*, 187–208.
- Lafrenière, R.G., Cader, M.Z., Poulin, J.F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafrenière, F., McLaughlan, S., Dubé, M.P., et al. (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med.* *16*, 1157–1160.
- Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Hoover, J., et al. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* *44* (D1), D862–D868.
- Lazarus, S., McInerney-Leo, A.M., McKenzie, F.A., Baynam, G., Broley, S., Cavan, B.V., Munns, C.F., Puijts, J.E., Sillence, D., Terhal, P.A., et al. (2014). The IFITM5 mutation c.-14C > T results in an elongated transcript expressed in human bone; and causes varying phenotypic severity of osteogenesis imperfecta type V. *BMC Musculoskelet. Disord.* *15*, 107.
- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., et al.; Exome Aggregation Consortium (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* *536*, 285–291.
- Lengyel, M., Cziráj, G., and Enyedi, P. (2016). Formation of functional heterodimers by TREK-1 and TREK-2 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* *291*, 13649–13661.
- Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D.M., Isacoff, E.Y., and Sandoz, G. (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *113*, 4194–4199.
- Liu, P., Xiao, Z., Ren, F., Guo, Z., Chen, Z., Zhao, H., and Cao, Y.Q. (2013). Functional analysis of a migraine-associated TRESK K⁺ channel mutation. *J. Neurosci.* *33*, 12810–12824.
- Long, H., Liao, L., Zhou, Y., Shan, D., Gao, M., Huang, R., Yang, X., and Lai, W. (2017). A novel technique of delivering viral vectors to trigeminal ganglia in rats. *Eur. J. Oral Sci.* *125*, 1–7.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep.* *8*, 1571–1582.
- Nishikawa, T., Ota, T., and Isogai, T. (2000). Prediction whether a human cDNA sequence contains initiation codon by combining statistical information and similarity with protein sequences. *Bioinformatics* *16*, 960–967.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., and Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* *28*, 1308–1318.

- Nosedá, R., and Burstein, R. (2013). Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain* 154, S44–S53.
- Pradhan, A.A., Smith, M.L., McGuire, B., Tarash, I., Evans, C.J., and Charles, A. (2014). Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain* 155, 269–274.
- Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., and Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling. *Neuron* 74, 1005–1014.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2003). A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* 278, 27406–27412.
- Thomas, D., Plant, L.D., Wilkens, C.M., McCrossan, Z.A., and Goldstein, S.A. (2008). Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* 58, 859–870.
- Ulbrich, M.H., and Isacoff, E.Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 4, 319–321.
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P.V., et al. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* 18, 145–153.
- Verkest, C., Piquet, E., Diochot, S., Dauvois, M., Lanteri-Minet, M., Lingueglia, E., and Baron, A. (2018). Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine. *Br. J. Pharmacol.* 175, 4154–4166.
- Walsh, Y., Leach, M.J., Veale, E.L., and Mathie, A. (2016). Identified regions of TREK and TRESK two pore domain potassium channels critical for inhibition by sipatragine and lamotrigine. *Proc. Physiol Soc.* 37, PCB259.
- Wood, H. (2010). Migraine: familial migraine with aura is associated with a mutation in the TRESK potassium channel. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 643.
- Yamamoto, Y., Hatakeyama, T., and Taniguchi, K. (2009). Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 454, 129–133.
- Yan, J., and Dussor, G. (2014). Ion channels and migraine. *Headache* 54, 619–639.
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell* 174, 999–1014.e22.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-HA-7 (western)	Sigma	Cat# H9658
anti-TRESK	abcam	Cat# ab96868; RRID:AB_10863722
Atto 488	Sigma-Aldrich	Cat# 41051; RRID:AB_260092
Biotinylated anti-HA clone 16B12	BioLegend	Cat# 901501; RRID:AB_901501
Cy3	abcam	Cat# ab146452
Cy5	abcam	Cat# ab146454
TREK1	Blin et al., 2016	N/A
TREK2	Blin et al., 2016	N/A
Bacterial and Virus Strains		
MT2-IRES2EGFP in pAAV	This paper	Vectorology facility, PVM, Biocampus Montpellier
IRES2EGFP in pAAV	This paper	Vectorology facility, PVM, Biocampus Montpellier
Biological Samples		
Mice trigeminal ganglia	This paper	N/A
Rat trigeminal ganglia	This paper	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Biotin-PEG	Laysan Bio	Item# Biotin-PEG-SVA-3400
Collagenase type II	ThermoFisher	Cat#17101015
Dako Fluorescent Mounting medium	Dako Corporation	Code S3023
DMEM media	ThermoFisher	Cat# 10566-016
FBS	Sigma-Aldrich	Cat# F9665
ISDN Risordan®	Sanofi	N/A
Laminin	Sigma-Aldrich	Cat# L2020
Lipofectamine 2000	Invitrogen	Cat#11668027
Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase	Invitrogen	Cat# 28025013
NeutrAvidin	ThermoFisher	Cat# 31000
PEG	Laysan Bio	Item# MPEG-SVA-5000
Polybrene	Sigma-Aldrich	Cat# TR-1003
Poly-L-lysine	Sigma-Aldrich	Cat#P4707
Protease inhibitors	Roche Diagnostics	Cat#4693116001
Random hexamers	ThermoFisher	Cat# N8080127
SuperScript II	ThermoFisher	Cat# 18064014
Topiramate	Sigma-Aldrich	Cat# T0575
Trypsin	Sigma-Aldrich	Cat# T1763
Critical Commercial Assays		
mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit	Invitrogen	Cat # AM1344
Nucleospin RNA Plus XS kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	Cat# 740990.50
PowerUp SYBR Green Master Mix	ThermoFisher	Cat# A25742
Experimental Models: Cell Lines		
HEK293T	ATCC	Cat#CRL11268
Mouse primary neurons	This paper	N/A
<i>X. laevis</i> oocytes	This paper	N/A

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J	Charles River Laboratories	Strain Code 027
Mouse: TREK1/TREK2 dKO	Guyon et al., 2009	N/A
Rat: Sprague Dawley	Janvier Labs	Strain RjHan:SD
Oligonucleotides		
GAPDH sens cctggagaaacctgccaagtatga	This paper	N/A
GAPDH reverse tgctgttgaagtgcaggaga	This paper	N/A
TREK1 forward catcttcacctgttggctg	This paper	N/A
TREK1 reverse atcatgctcagaacagctgc	This paper	N/A
TREK2 forward aacagtggtgccatctcg	This paper	N/A
TREK2 reverse ccagcaaagaagaaggcact	This paper	N/A
TRESK forward ctgcttccttgctgcctg	This paper	N/A
TRESK reverse aagaagagagcgtcaggaa	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pcDNA3.1-GFP-X	This paper	N/A
pCMV-HA-X	This paper	N/A
pIRES2eGFP	Clontech	Cat#6029-1
Software and Algorithms		
Fiji/ImageJ	NIH	https://imagej.net/Fiji/Downloads
pClamp	Molecular Devices	http://mdc.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/20260/~/axon%E2%84%A2-pclamp%E2%84%A2-11-electrophysiology-data-acquisition-%26-analysis-software
SigmaPlot	Systat Software Inc.	https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/
Other		
Axioplan 2 Imaging Microscope	Zeiss	https://www.micro-shop.zeiss.com/?s=16103145829fcb6&l=en&p=us&f=a&i=10027
Axopatch 200A amplifier	Molecular Devices	https://fr.moleculardevices.com/products/axon-patch-clamp-system/amplifiers/axon-instruments-patch-clamp-amplifiers#ref
Camera EMCCD iXon	Andor	https://andor.oxinst.com/products/ixon-emccd-cameras
Dagan TEV-200A	Cornerstone	http://www.dagan.com/tev-200a.htm
Dynamic plantar aesthesiometer	Ugo Basil	Cat#: 37450
von Frey filaments	Bioseb	Modèle: Bio-VF-M

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Guillaume Sandoz (sandoz@unice.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Knock-out mice

Mice lacking TREK1 and TREK2 were generated as described ([Guyon et al., 2009](#)). Null mutations were backcrossed against the C57BL/6J inbred strain for 10+ generations prior to establishing the breeding cages to generate subjects for this study. Age- and sex-matched C57BL/6J WT mice, aged 9-12 weeks, were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

HEK cells

HEK (human embryonic kidney) 293T cells were purchased from ATCC and maintained at 37°C, in 5% CO₂ in high glucose DMEM containing 10% fetal bovine serum and used from passage 10 to 40. One splitting per week was made on 35 mm diameter dishes.

Xenopus oocytes

Xenopus leavis oocytes were collected from female *Xenopus leavis* (agreement # 35382015121816318324V7) and dissociated using collagenase type IV (Levitz et al., 2016). Oocytes were injected with 50 nL of a cRNA at a concentration of 1 μg/μL and maintained at 18°C in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5mM HEPES, pH 7.4). Oocytes were used 1 to 3 days after injections.

Rats

Experiments were performed on male Sprague Dawley rats (Janvier Labs) weighing 250 to 400 g (mean weight: 337 ± 16 g, 6 to 9 weeks old), and on male knock-out mice for TREK1 and TREK2 (weighting 20-25 g 7- to 13-weeks-old). Animals were housed in a 12 hour light-dark cycle with food and water available *ad libitum*. Animal procedures were approved by the Institutional Local Ethical Committee and authorized by the French Ministry of Research and the Spanish Ministry of Research according to the European Union regulations and the Directive 2010/63/EU (Agreements C061525 and 01550.03). Animals were sacrificed at experimental end points by CO₂ euthanasia.

WT mice

All mouse experiments were conducted according to national and international guidelines and have been approved by the local ethical committee (CIEPAL NCE). The C57BL/6J breeders were maintained on a 12 h light/dark cycle with constant temperature (23–24°C), humidity (45%–50%), and food and water *ad libitum* at the animal facility of Valrose.

METHOD DETAILS

Behavioral experiments

Drug administration and virus injection

For the topiramate experiment, mice were injected intraperitoneally with topiramate once at a dose of 30 mg/kg and mechanical nociception thresholds were assessed every 30 minutes for two hours after the injection.

The procedures of virus trigeminal injections are described by Long et al. (Long et al., 2017). Briefly, following general anesthesia with a cocktail of ketamine and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg respectively *i.p.*), rats were shaved on the right side, which is the injected side, and placed on a warmed surgical plate. The site of injection was determined using a notch between the condylar process and the ipsilateral angular process. The depth of injection was 9 mm. Antibiotics were used 5 days following injections. Viral vector suspension (10 μL, 10¹¹ transduction unit) containing 6 μg/mL of Polybrene was injected slowly over 1 min. Rats in the experimental group (randomly selected, n = 14) received 10 μL of viral vector containing the MT2 protein sequence, while those in the control group (randomly selected, n = 14) received the same amount of EGFP viral vector. Injections were made in a blind way for the behavior experimenter. Epifluorescence imaging and qPCR were performed to verify successful transduction of trigeminal ganglia by viral vector.

Mechanical sensitivity measurements

The face mechanical sensitivity was measured using calibrated von Frey filaments (Bioseb, France). Unrestrained rats placed in individual plastic boxes on top of a wire surface were trained over one week to stimulation on the periorbital area, following a progressive protocol, starting with non-noxious filaments during the first 3 days of training. The face withdrawal force threshold (g) was determined by the filament evoking at least three responses over five trials, starting with lower force filaments. Basal values were determined 2 days before experiments. Animals showing an outlier threshold for the basal value were excluded from the study.

The hindpaw mechanical sensitivity was evaluated with a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Italy). Unrestrained mice were placed in 10 individual plastic boxes on top of a wire surface. The mouse hindpaw was submitted to a force ramp up to 7.5 g during 10 s, the paw withdrawal force threshold (g) was assessed in three consecutive trials with at least 3–5 min between the trials and averaged to select animals. Basal values were determined 2 days before experiments. Animals showing an outlier threshold for the basal value were excluded from the study.

Migraine rodent models

The rodent model of NO-induced migraine was induced by intraperitoneal (*i.p.*) injection of ISDN (Risordan®, Sanofi) at 10mg/kg, a long-lasting NO donor. The vehicle control used in these experiments was 0.9% saline. The acute mechanical allodynia induced by a single ISDN injection was followed on the hindpaw for mice and on the face for rats before (basal value) and for 3 hours after injection, every 30 minutes. Animals showing an outlier threshold for the basal value were excluded from the study. Chronic mechanical allodynia was induced by a single daily injection of ISDN during 4 days. The hindpaw extra-cephalic mechanical sensitivity was measured each day before the ISDN *i.p.* injection for mice. Topiramate was tested on chronic mechanical allodynia on the 5th day and effects were followed every 30 min during 2 hours after injection in mice. Experiments were made on two batches of animals in duplicate.

Electrophysiology

HEK293T cell electrophysiology was performed 24–72 h after Lipofectamine transfection (with 1 to 1.6 μg DNA) in solution containing (in mM): 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 and 10 mM HEPES. For co-expression of K2P channels and mutant channels, a DNA ratio of 1:1 was used. Glass pipettes of resistance between 3 and 6 $\text{M}\Omega$ were filled with intracellular solution containing (in mM): 140 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 3 MgCl_2 , pH 7.4. Cells were patch clamped using an Axopatch 200A (Molecular Devices) amplifier in the whole cell mode. Currents were elicited by voltage-ramps (from -100 to 100 mV, 1 s in duration) and the current density was calculated at 0 mV.

Oocyte two-electrode voltage clamp electrophysiology was performed in a 0.3-mL perfusion chamber; a single oocyte was impaled with two standard microelectrodes (1–2.5 $\text{M}\Omega$ resistance) filled with 3 M KCl, and maintained under voltage clamp using a Dagan TEV 200 amplifier in standard ND96 solution [96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES pH 7.4 with NaOH]. For the high K^+ solution contained 80 mM K^+ , 78 mM NaCl was replaced by KCl. Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Molecular Devices).

Neuronal excitability was studied in small-diameter TG neurons transfected with 1 μg of the pIRES2EGFP vector containing the X insert in which there is no N-terminal tag on the insert and EGFP is co-translated as a transfection marker or the pIRES2EGFP control plasmid with Lipofectamine 2000. Extracellular solution contained (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 with NaOH, 310 mOsm. The pipette solution contained the following (in mM): 140 K-gluconate, 10 NaCl, 2 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES, 2 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na, 1 CaCl_2 pH 7.3 with KOH, 290 mOsm. Recording pipettes had < 4.5 $\text{M}\Omega$ resistance. Series resistance (< 20 $\text{M}\Omega$) was not compensated. Signals were filtered at 10 kHz and digitized at 20 kHz. After establishing whole-cell access, membrane capacitance was determined with amplifier circuitry. The amplifier was then switched to current-clamp mode to measure resting membrane potential (V_{rest}). Neurons were excluded from analysis if the V_{rest} was higher than -40 mV or if the input resistance was smaller than 200 $\text{M}\Omega$. To test neuronal excitability, neurons were held at V_{rest} and injected with 1 s depolarizing currents in 25 pA incremental steps until at least 1 action potential (AP) was elicited.

Immunocytochemistry

Transfected neurons on coverslips were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature (RT), then permeabilized with PBS and 0.1% Triton X-100 (PBST) and blocked for 1h with 5% horse serum (HS) in PBST. Primary and secondary antibodies were diluted in PBST and 5% HS and incubated for 1h at RT. Three 5-min washes with PBST were carried out between each incubation step and at the end of the procedure. Coverslips were mounted in Dako Fluorescent Mounting medium (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). The following antibodies were used: rabbit anti-TREK1 and TREK2 (Blin et al., 2016), anti-TRESK (ab96868, abcam) conjugated with Cy3 (ab146452, abcam), Cy5 (ab146454, abcam) and Atto 488 (Sigma) respectively. Microscopy analysis and data acquisition were carried out with an Axioplan 2 Imaging Microscope (Zeiss®).

Molecular Biology, Cell Culture and Gene Expression

Channel DNA was used in the pIRES2eGFP, pcDNA3.1 and pCMV-HA vectors. HEK293T cells were maintained in DMEM with 5% FBS on poly-L-lysine-coated glass coverslips in 12 well plates. Cells were transiently co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with a total of 1–1.6 μg of DNA total per 35 mm dish. When two genes were co expressed, a ratio of 1:1 DNA was used.

PCR amplification and quantification

Semiquantitative PCR were performed to determine the relative levels of TREK1, TREK2, and TRESK after RNA extraction and reverse transcription using primers described below. qPCR (10 μL) was performed using the aforementioned reverse-transcribed cDNA (4 μL) and the primers for TREK1 (forward: catcttcacacctgttgctg, reverse: atcatgctcagaacagctgc, 240 pb), TREK2 (forward: aacagtgggtgccatcttcg, reverse: ccagcaaagaagaaggcact, 276 pb), TRESK (forward: ctgcttccttgctgcctg, reverse: aagaagagagcgctcaggaa, 256 pb) and GAPDH (forward: cctggagaaacctgccaagtatga, reverse: tgctgtgaagtcgcaggaga) as a reference. After initial denaturation at 95°C for 15 s, 40 cycles of amplification (95°C for 15 s and 60°C for 1 minute) were performed.

Quantitative PCR were performed to determine the levels of GFP after inoculation of adenovirus vectors containing GFP MT2 sequences into trigeminal ganglia using the same protocol with specific primers for the GFP (forward: aagctgaccctgaagttcatctgc, reverse: cttgtagtgccctgccttgaa).

Analysis were made using the GAPDH as the housekeeping gene along with the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Calculation Method.

Primary cultures of mouse TG neurons

Trigeminal ganglion tissues were collected from postnatal day 8 mice of either sex and treated with 2 mg/ml collagenase type II (Worthington) for ~ 2 hours, followed by 2.5 mg/ml trypsin for 15 min. Neurons were dissociated by triturating with fire-polished glass pipettes and seeded on polylysine/laminin coated coverslips. The DMEM-based culture medium contained 10% fetal bovine serum and 2mM GlutaMAX (Invitrogen). Neurons were transfected at 1 *d in vitro* (DIV) with 1 μg of DNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfected neurons were identified by the green fluorescence and patch clamp recordings were performed between DIV 3 and 5.

Single Molecule Pulldown (SiMPull)

For SiMPull experiments, a DNA ratio of 1:1 was used, with a total quantity of 1 μg . 24 hours after transfection, HEK 293T cells were harvested from coverslips by incubating with Ca^{2+} -free PBS buffer for 20–30 minutes followed by gentle pipetting. Cells were lysed in buffer containing (in mM): 150 NaCl, 10 Tris pH 7.5, 1 EDTA, protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific) and 1.5% IGEPAL (Sigma) or 1% DDM (Sigma). After 30–60 minute incubation at 4°, lysate was centrifuged for 20 minutes at 12,500 g and the supernatant was collected. Coverslips passivated with PEG (~99%)/ biotin-PEG (~1%) and treated with NeutrAvidin (Pierce) were prepared as described (Jain et al., 2012). 15 nM biotinylated anti-HA antibody (clone 16B12, BioLegend) was applied for 20 minutes and then washed out. Antibody dilutions and washes were done in T50 buffer with BSA containing (in mM): 50 NaCl, 10 Tris pH 7.5, and 0.1 mg/mL BSA. Lysate, diluted in lysis buffer containing 0.04% IGEPAL, was then applied to the chamber and washed away following brief incubation (~2 minutes). Single molecules were imaged using a 488 nm Argon laser on a total internal reflection fluorescence microscope with a 60x objective (Olympus). We recorded the emission light after an additional 3x magnification and passage through a double dichroic mirror and an emission filter (525/50 for GFP) with a back-illuminated EMCCD camera (Andor iXon DV-897 BV). Recordings were made in blind for the experimenter before being analyzed.

Single cell reverse transcription

The procedures of single cell RT-PCR are adapted from Johansen et al. (Johansen et al., 1995). The content of each cell was aspirated into the patch pipette by applying negative pressure. The flow of the cytosol in the pipette as well as the aspiration of the nucleus was controlled under the microscope. Only cell samples which included the nucleus were investigated in the present study.

The pipette was then released from the holder and mounted on a syringe to expel its content into a test tube. To the ~6.5 μL of the pipette-content expelled into the test tube was added 3.5 μL of a solution containing random hexamers (Invitrogen, 5 μM final concentration), dithiothreitol (DTT, final concentration 10 mM), the four deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP, Thermo Fisher, final 0.5 mM each), 20 U ribonuclease inhibitor (Promega), and 100 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen).

The total 10 μL reaction was incubated for 1 h at 35°C for synthesis of single stranded cDNA, and then kept on ice until PCR.

Trigeminal neurons RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from trigeminal neurons in suspension using a Nucleospin RNA Plus XS kit (from MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) according to the manufacturer's protocols and 1 μg of RNA was reverse transcribed (with 10 nM random hexamers for 5 min at 65°C, then with 10 mM DTT, 0.5 mM each dNTP, 100 U SuperScript II (Invitrogen) 42°C for 50 min). Subsequently, the cDNA was quantified by qPCR with PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher).

Vector preparation

Adenovirus vector (DJ) encoding an IRES2EGFP or MT2-IRES2EGFP were used. Following linearization, this vector was recombined with the mouse version of the MT2 protein. The recombinant was amplified with PCR, and DNA sequencing was performed to verify the DNA sequence. Viral vectors were packaged and harvested by transfection of HEK293T cells, followed by quantification of the viral titer through quantitative PCR. In addition, as a control, an adenovirus vector containing only the IRES2EGFP sequence was used.

Western blot analysis

24 to 48 hours after transfection using 1 μg DNA with Lipofectamine 2000, HEK293T cells were homogenized in PBS containing saponin (0.5% w/v), Triton X-100 (0.5% w/v) and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Lysates were clarified by centrifugation at 20 000 g for 30 min. Proteins were separated on 10% SDS polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose membrane (Hybond-C extra, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Detection was carried out using mouse monoclonal antibody clone HA-7 against the HA epitope (Sigma-Aldrich).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Single Molecule Pulldown

Movies of 250–500 frames were acquired at frame rates of 10–30 Hz. The imaged area was $13 \times 13 \mu\text{m}^2$. At least 5 movies were recorded for each condition and data was analyzed using custom software. Multiple independent experiments (at least 3 times) were performed for each condition. Representative datasets are presented to quantitatively compare conditions tested on the same day.

Electrophysiology

The numbers of cells tested are indicated in parentheses on top of graphs in each figure. Cells come from at least 3 batches of experiment. Student's t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) are performed between the different conditions tested (indicated in each figure's legend). For neurons, the cells come from at least 4 different animals. When the data did not follow a normal distribution, Mann-Whitney U test were assessed.

Animal experiment

Numbers of mice and rats tested are indicated in parentheses in each figure. Student's t test to compare WT versus *TREK1*^{-/-}/*TREK2*^{-/-} mice (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Quantitative PCR

Analysis were made using the GAPDH as the housekeeping gene along with the 2- $\Delta\Delta$ Ct Calculation Method. n represents the number of single cells tested.

Neuron, Volume 101

Supplemental Information

Migraine-Associated TRESK Mutations Increase

Neuronal Excitability through Alternative

Translation Initiation and Inhibition of TREK

Perrine Royal, Alba Andres-Bilbe, Pablo Ávalos Prado, Clément Verkest, Brigitte Wdziekonski, Sébastien Schaub, Anne Baron, Florian Lesage, Xavier Gasull, Joshua Levitz, and Guillaume Sandoz

Supplementary Materials for

Migraine-associated TRESK mutations increase neuronal excitability through alternative translation initiation and inhibition of TREK

Perrine Royal, Alba Andres-Bilbe, Pablo Ávalos Prado, Clément Verkest, Brigitte Wdziekonski, Sébastien Schaub, Anne Baron, Florian Lesage, Xavier Gasull, Joshua Levitz, Guillaume Sandoz*

Correspondence to: sandoz@unice.fr

*Lead contact

This file includes:
Figures S1 to S11

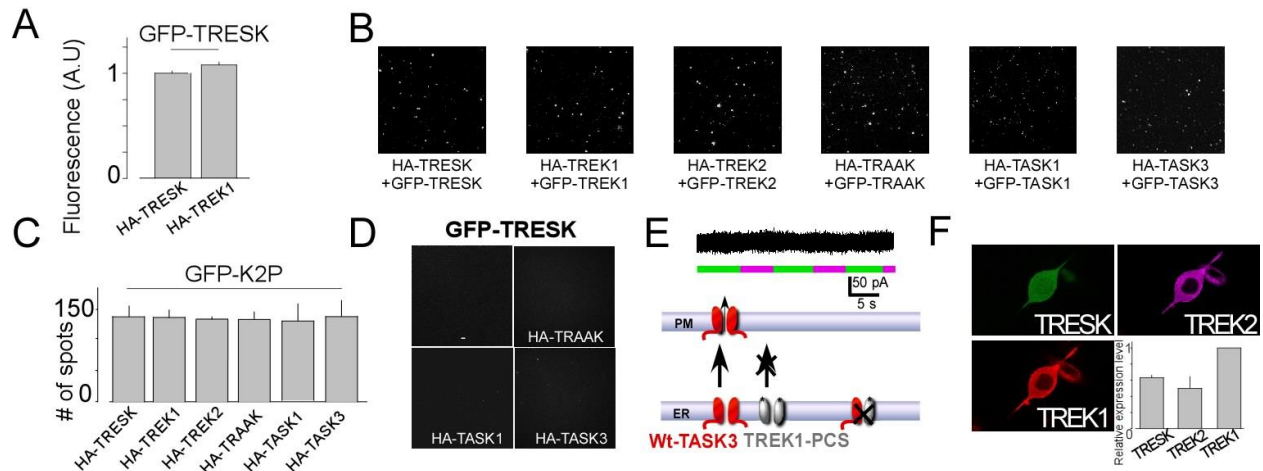


Figure S1 (Related to Figure 1). **SiMPull assay controls.** (A) GFP-fluorescence intensity of lysates from cells expressing HA-TRESK + GFP-TRESK or HA-TREK1 + GFP-TRESK. (B-C) Representative images and summary bar graph showing that HA-TREK1 pull down GFP-TREK1, HA-TREK2 pull down GFP-TREK2, HA-TRESK pull down GFP-TRESK, HA-TRAAK pull down GFP-TRAAK, HA-TASK1 pull down GFP-TASK1 and HA-TASK3 pull down GFP-TASK3. (D) Representative images showing that HA-TRAAK or HA-TASK1 or HA-TASK3 are not able to pull down GFP-TRESK and the control (-) showing that there are no fluorescent spots in the absence of antibody. (E) TREK1-PCS expression with TASK3 does not lead to photocurrent, indicating that TREK1 and TASK3 do not physically or functionally interact. (F) TREK1, TREK2 and TRESK are co-expressed in TG neurons. Immuno-detection of TREK1, TREK2 and TRESK. Inset, bar graph representing the average relative mRNA expression of TREK1, TREK2, TRESK obtained from 4 single cell semi-quantitative RT-PCR.

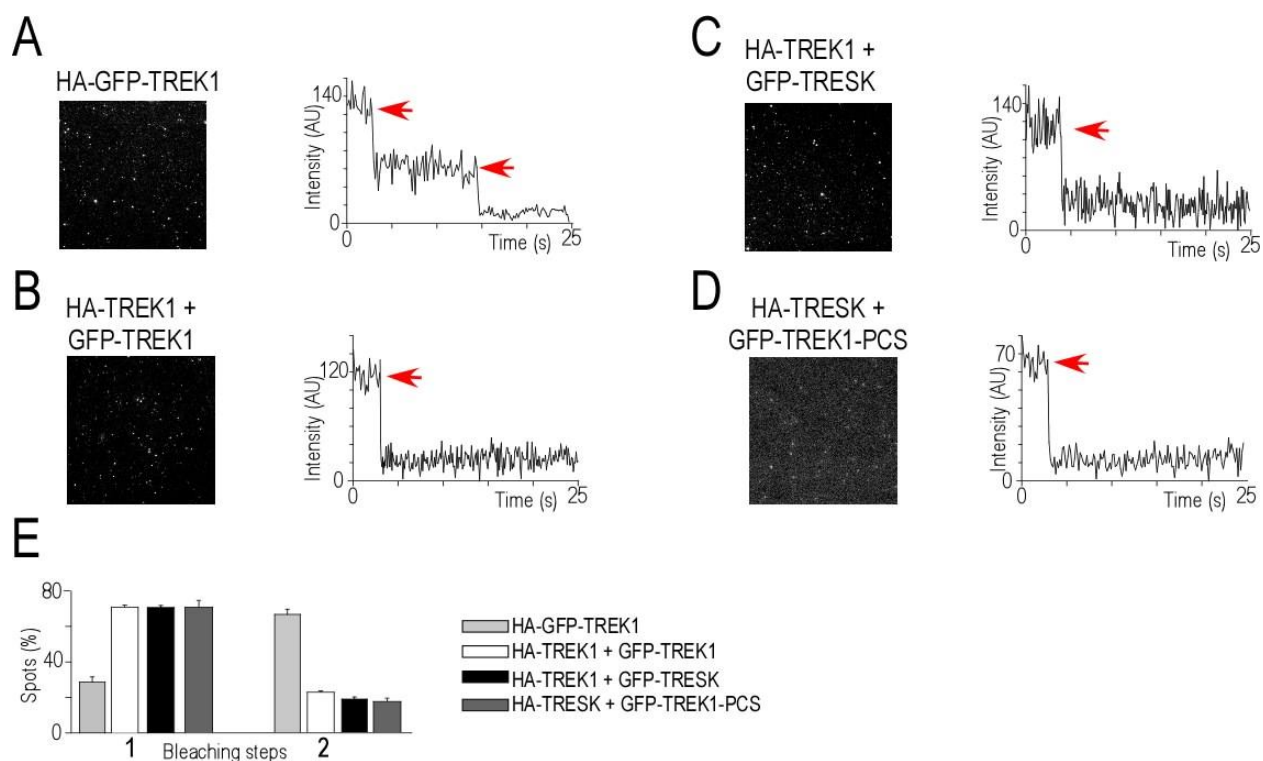


Figure S2 (Related to Figure 1). **TRESK-TREK1 forms a dimer.** (A) SiMPull assay for dimer control, left, TIRF images of HA-GFP-TREK1 single molecules, right, representative trace showing two-step photobleaching of HA- GFP-TREK1. (B) Same as in (A) for monomer control, HA-TREK1 pulldown of GFP-TREK1. (C) Same as in (A) for HA-TREK1 pulldown of GFP-TRESK. (D) Same as in (A) for HA-TRESK pulldown of GFP-TREK1-PCS. (E) Summary of photobleaching step distribution for HA-GFP-TREK1, HA-TREK1 pulldown of GFP-TREK1 and HA-TREK1 pulldown of GFP-TRESK and HA-TRESK pulldown of GFP-TREK1-PCS. AU, Arbitrary Unit.

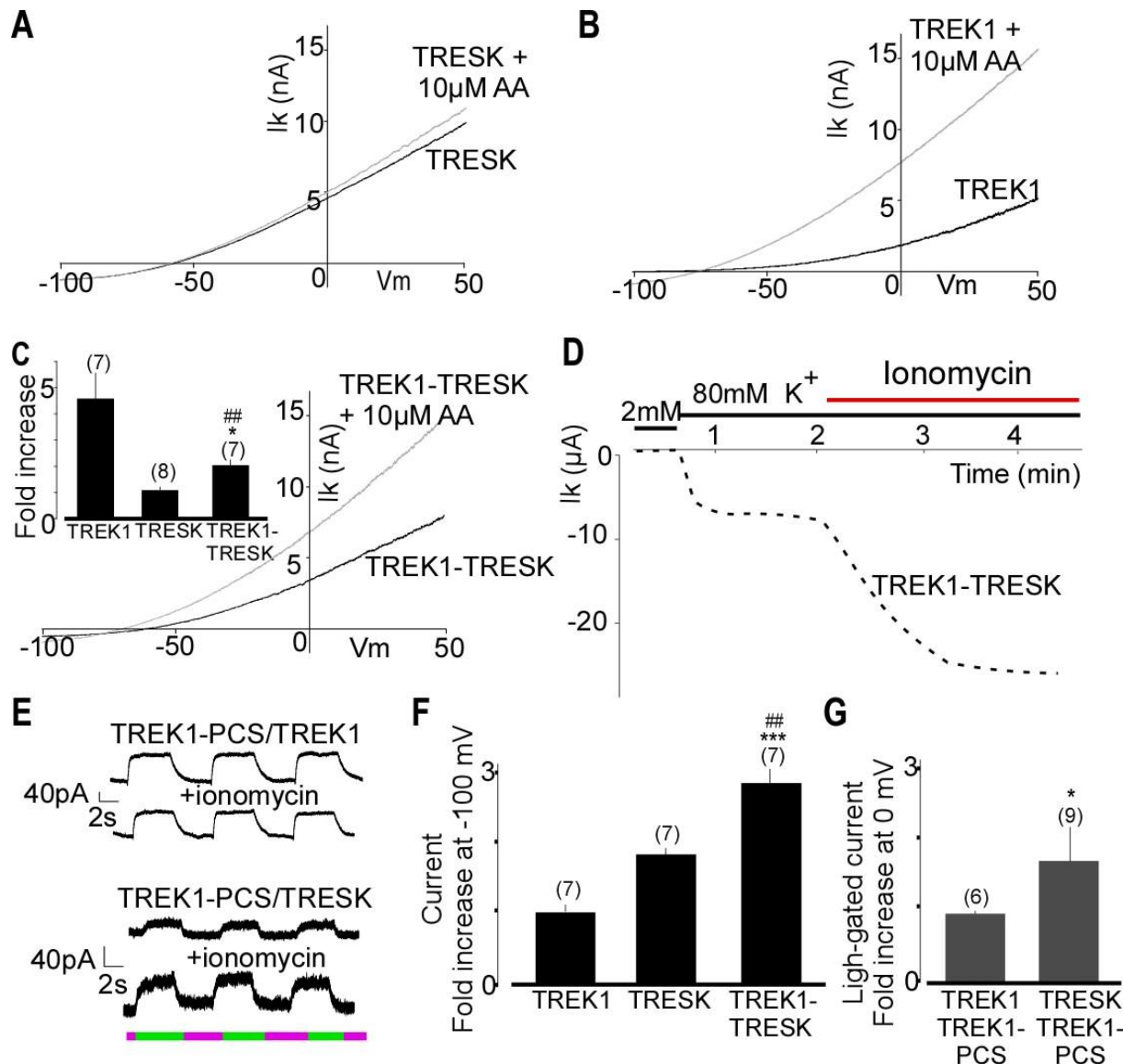


Figure S3 (Related to Figure 1). **Functional characterization of TREK1-TRESK heterodimers.** (A-C) Representative traces of TRESK (A) and TREK1 (B) and TREK1-TRESK (C) currents showing the effect of 10 μ M arachidonic acid application. Inset, summary of relative current amplitudes in HEK293T cells. (D) Representative TREK1-TRESK current amplitude modification induced by application of 0.5 μ M ionomycin, in *Xenopus oocytes* (E) Representative example of the effect of ionomycin on the light-gated currents of TREK1/TREK1PCS and TREK1-PCS/TRESK. Alternating illumination at 500 nm (green) and 380 nm (magenta) reversibly blocks and unblocks, respectively, the constant outward current, both with or without ionomycin, but the amplitude of the photomodulation for TRESK/TREK1PCS is bigger in the presence of ionomycin, in HEK293T cells.. (F) Summary of relative current amplitudes and their response

to ionomycin in *Xenopus* oocytes. (G) Summary of relative light-gated current amplitudes and their response to ionomycin, in HEK193T cells. Student's *t* test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for TREK1-TRESK vs TREK1 and ## $P < 0.01$ for TREK1-TRESK vs TRESK).

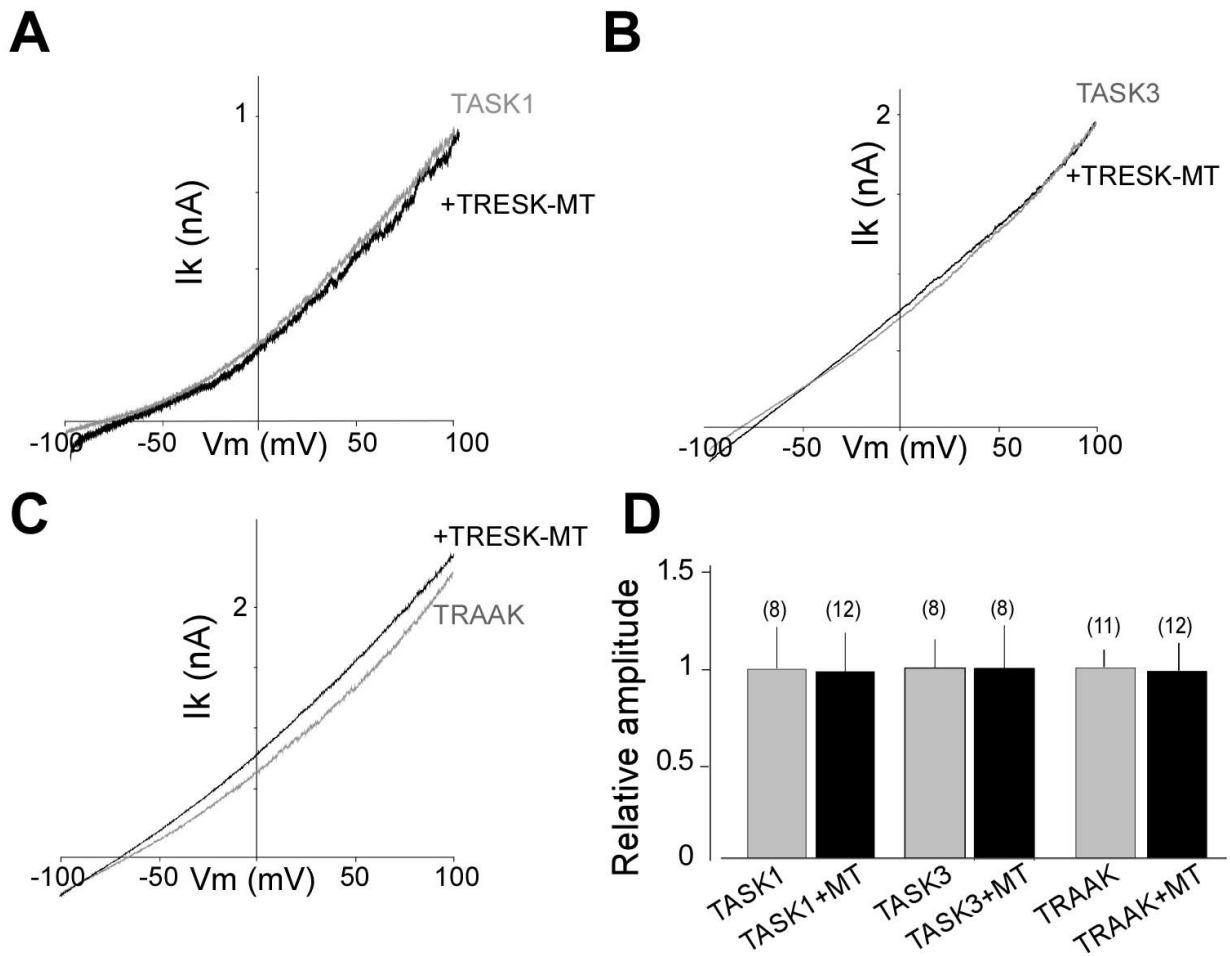


Figure S4 (Related to Figure 2). **TRESK-MT does not inhibit TRAAK, TASK1 or TASK3 in HEK293T cells.** (A to C) Representative traces showing the effect of TRESK-MT co-expression TASK1 (A), TASK3 (B) or TRAAK (C) currents. Currents were elicited by voltage-ramps (from -100 to 100 mV, 1s duration). (D) Bar graph summarizing the relative TASK1, TASK3, or TRAAK current amplitudes at 0 mV with or without TRESK-MT co-expression.

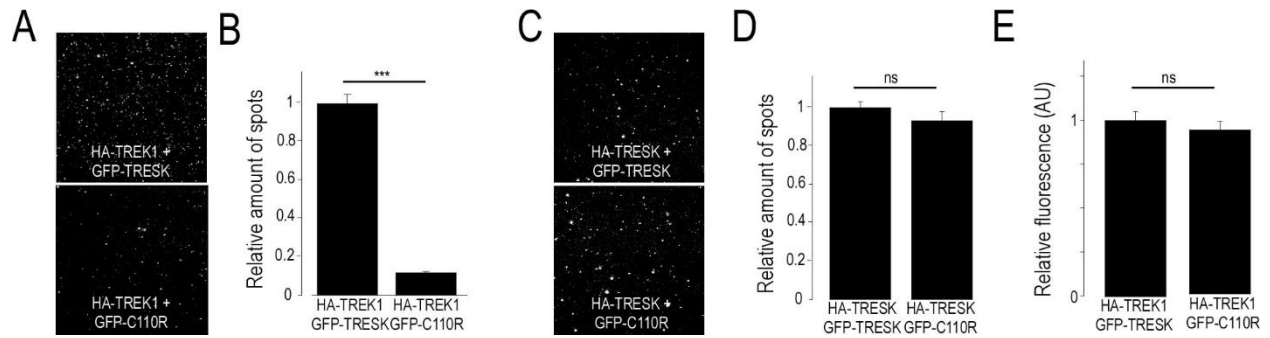


Figure S5 (Related to Figure 2). TRESK-C110R mutation inhibits TRESK-TREK1 association.

Representative images showing HA-TREK1 pull down of GFP-TRESK and GFP-TRESK-C110R via an anti-HA antibody. **(B)** Bar graph showing the relative pulldown of GFP-TRESK and GFP-TRESK-C110R by HA-TREK1. Both conditions were done on the same day at the same dilution. **(C and D)** Same as **(A and B)** for HA-TRESK pull down of GFP-TRESK and GFP-TRESK-C110R. Student's *t* test (***) $P < 0.001$. **(E)** GFP-fluorescence intensity of lysate from HA-TREK1 + GFP-TRESK and HA-TREK1 + GFP-TRESK-C110R cells showing that GFP-TRESK and GFP-TRESK-C110R are expressed at similar levels in HEK 293T cells.

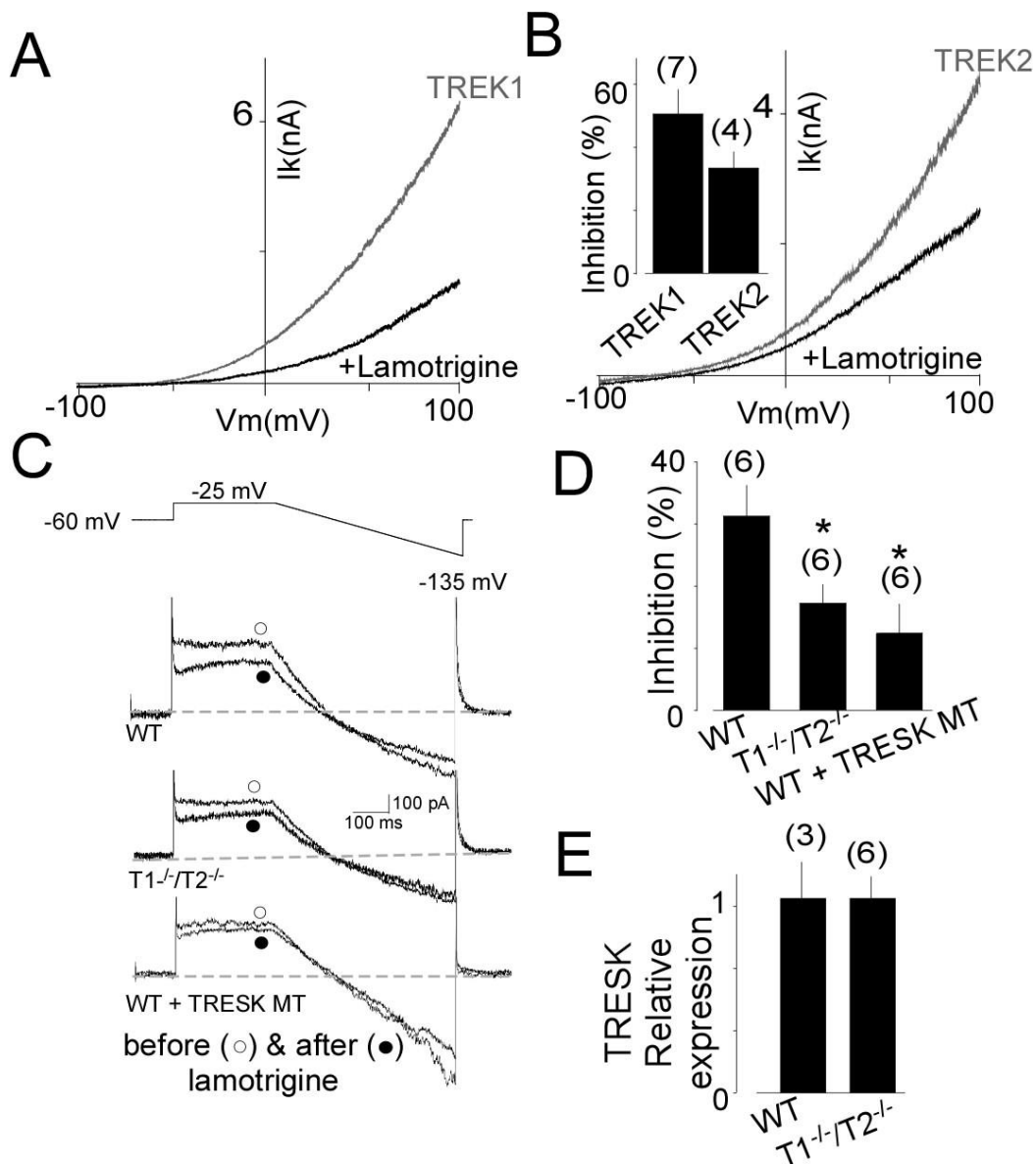


Figure S6 (Related to Figure 3). **The lamotrigine sensitive leak current is reduced in TG neuron from TREK1^{-/-}/TREK2^{-/-} KO mice.** (A) Representative traces of TREK1 (A) and TREK2 (B) showing the effect of 30 μ M lamotrigine application in HEK293T cells. Inset, summary of inhibition induced by lamotrigine application. (C) Representative current traces from WT TG neurons expressing GFP (WT) or TRESK-MT (WT + TRESK-MT) and from TREK1^{-/-}/TREK2^{-/-} (T1^{-/-}/T2^{-/-}) TG neuron expressing GFP (T1^{-/-}/T2^{-/-}). (D) Percentage of outward current (measured at the end of the depolarizing step) inhibited by lamotrigine. (E) Relative expression of TRESK in WT and T1^{-/-}/T2^{-/-} mice.

Relative TRESK expression. TREK1 and 2 invalidation did not change the expression of TRESK. The numbers of tested cells or tissues are indicated in parentheses.

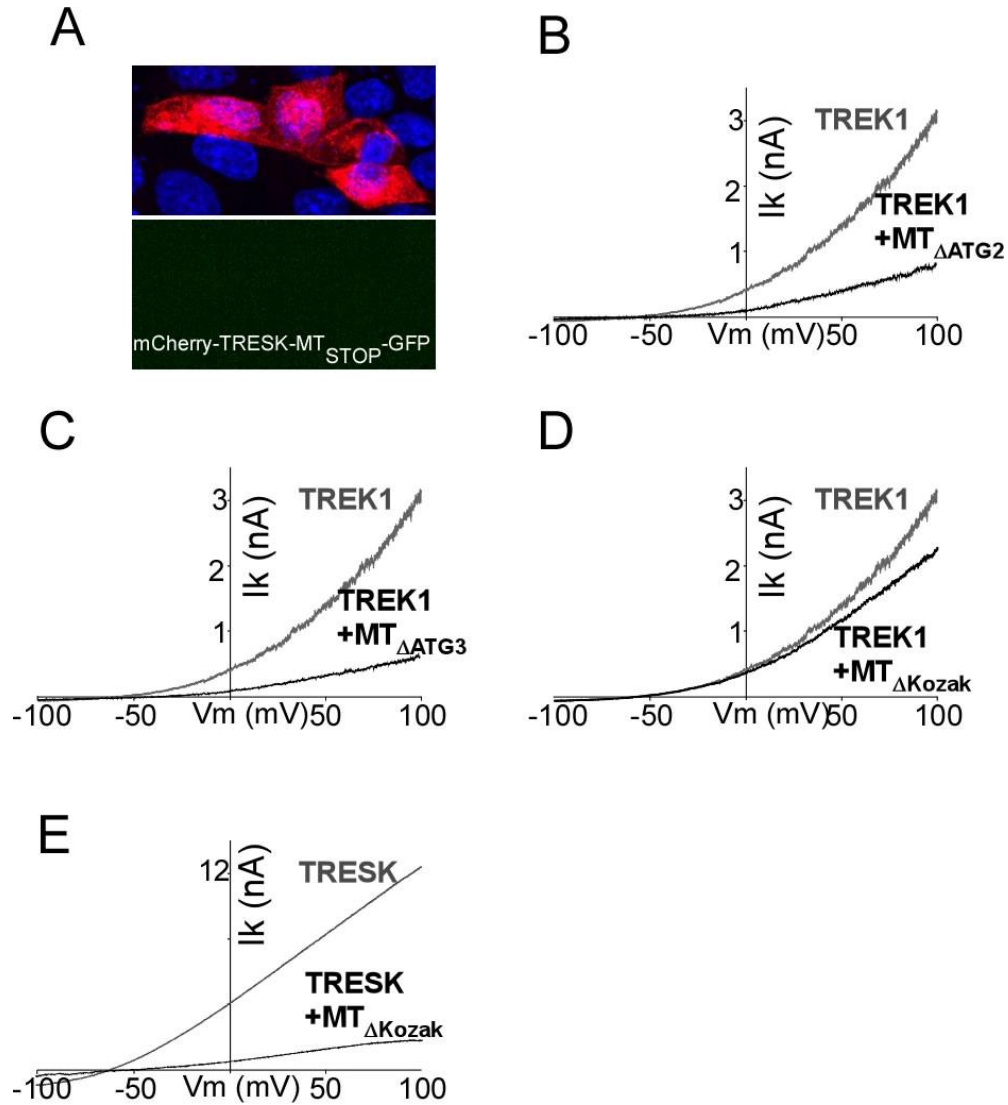


Figure S7 (Related to Figure 5 and Figure 6). **MT2 is co-translated with MT1 and mediates TREK1 inhibition.** (A) Introduction of a stop codon into the MT2 ORF of mCherry-TRESK-MT-GFP (mCherry-TRESK-MT_{STOP}-GFP) induces a loss of the GFP fluorescence in HEK 293T cells (B-D) Representative traces showing the effect of introduction of a mutation of ATG2 (MT_{ΔATG2}) (B), ATG3 (MT_{ΔATG3}) (C) and Δ Kozak (MT_{ΔKozak}) (D) on TRESK-MT on TREK1 current in HEK 293 T cells. (E) Representative traces showing the effect of TRESK-MT_{ΔKozak} on TRESK current.

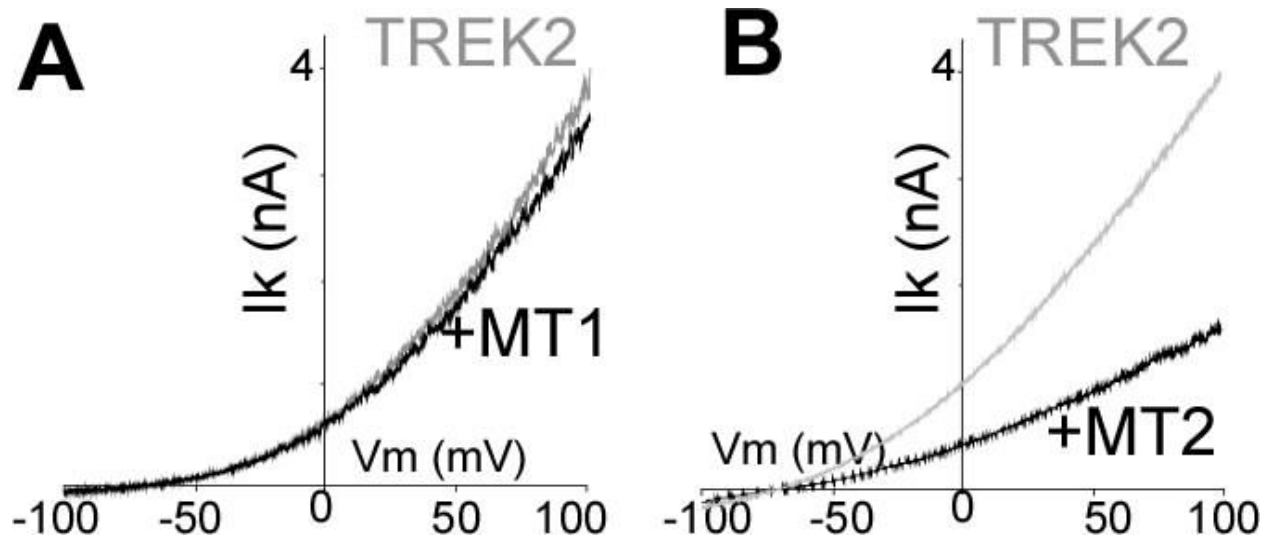


Figure S8 (Related to Figure 6). **MT2, but not MT1, acts as a dominant negative on TREK2 channels.**

(A and B) Representative traces showing the effect of TREK-MT1 (**A**) or TREK-MT2 (**B**) co-expression on TREK2 current.

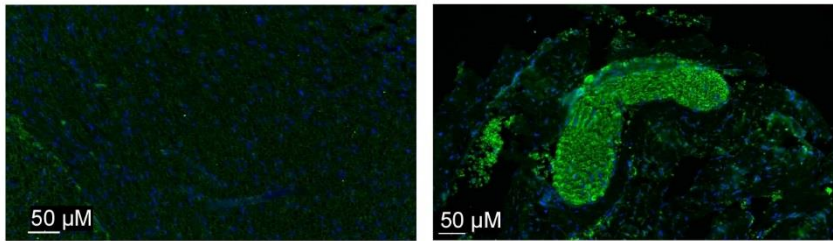
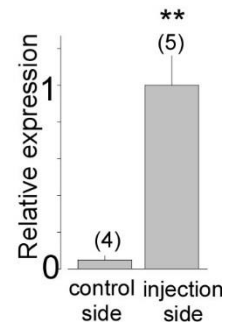
A**B**

Figure S9 (Related to Figure 7). **Viral expression of TRESK-MT2 pIRES 2 EGFP into trigeminal neurons.** (A) The viral expression into trigeminal ganglia marked by the coexpressed-EGFP protein labelled in green (right). (B) Quantification of the viral infection through quantitative PCR 9 days post injection.

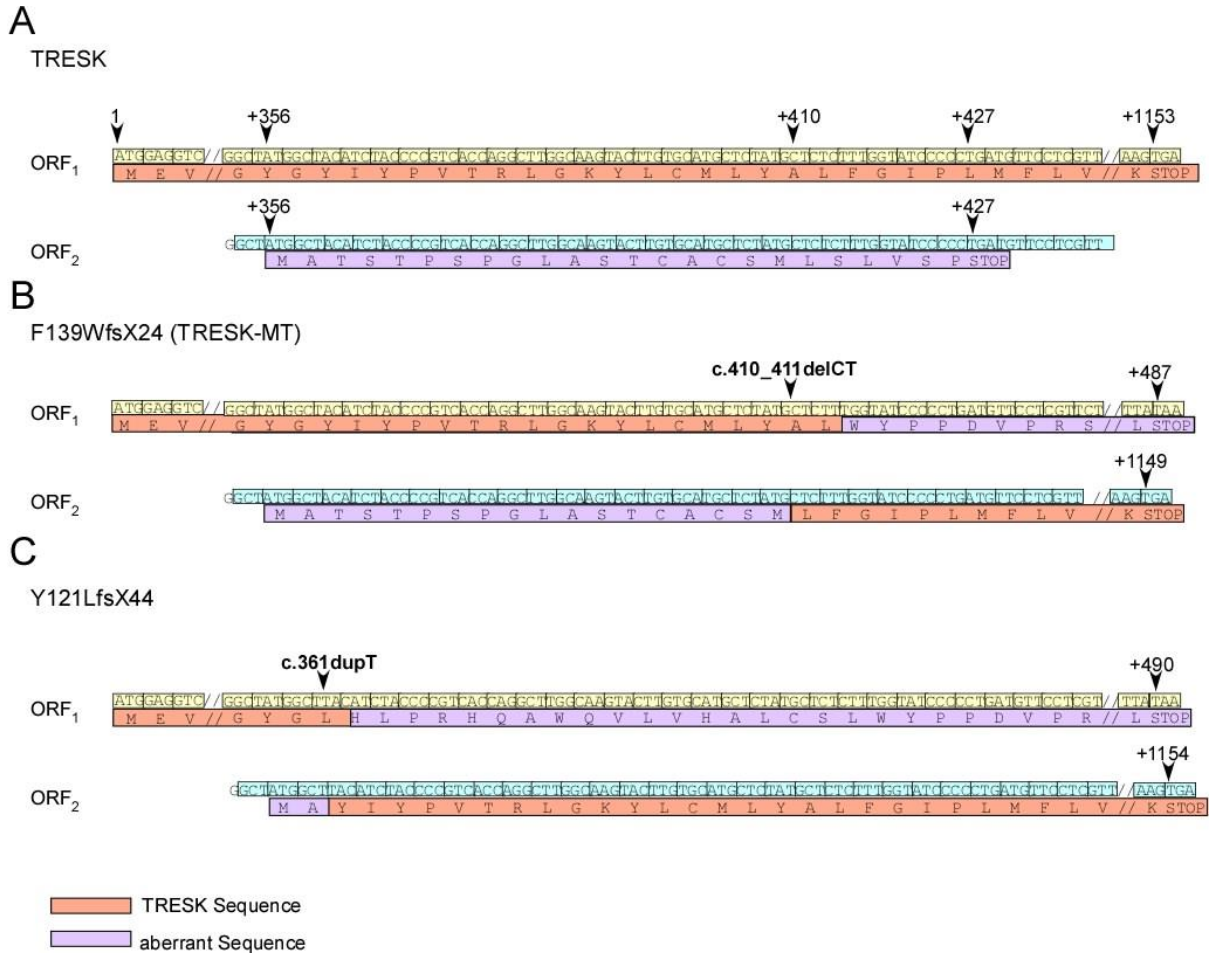


Figure S10 (Related to Figure 4 and Figure 8). **Sequence organization of TRESK, TRESK-F139WfsX24 and TRESK-Y121LfsX44.** (A) cDNA sequence of TRESK and deduced amino acid sequence for ORF1 and ORF2, (B) 2 pb deletion c.410_411delCT resulting in the change of reading frame leading to a premature stop codon in ORF1 at position +427 (MT1) and putting the ATG +356 in frame with the reference open reading frame of TRESK inducing the production of MT2. (C) 1 pb insertion c.361dupT resulting, as c.410_411delCT, in the change of reading frame leading to a premature stop codon in ORF1 at position +490 (MT1) and putting the ATG +356 in frame with the reference open reading frame of TRESK inducing the production of MT2.

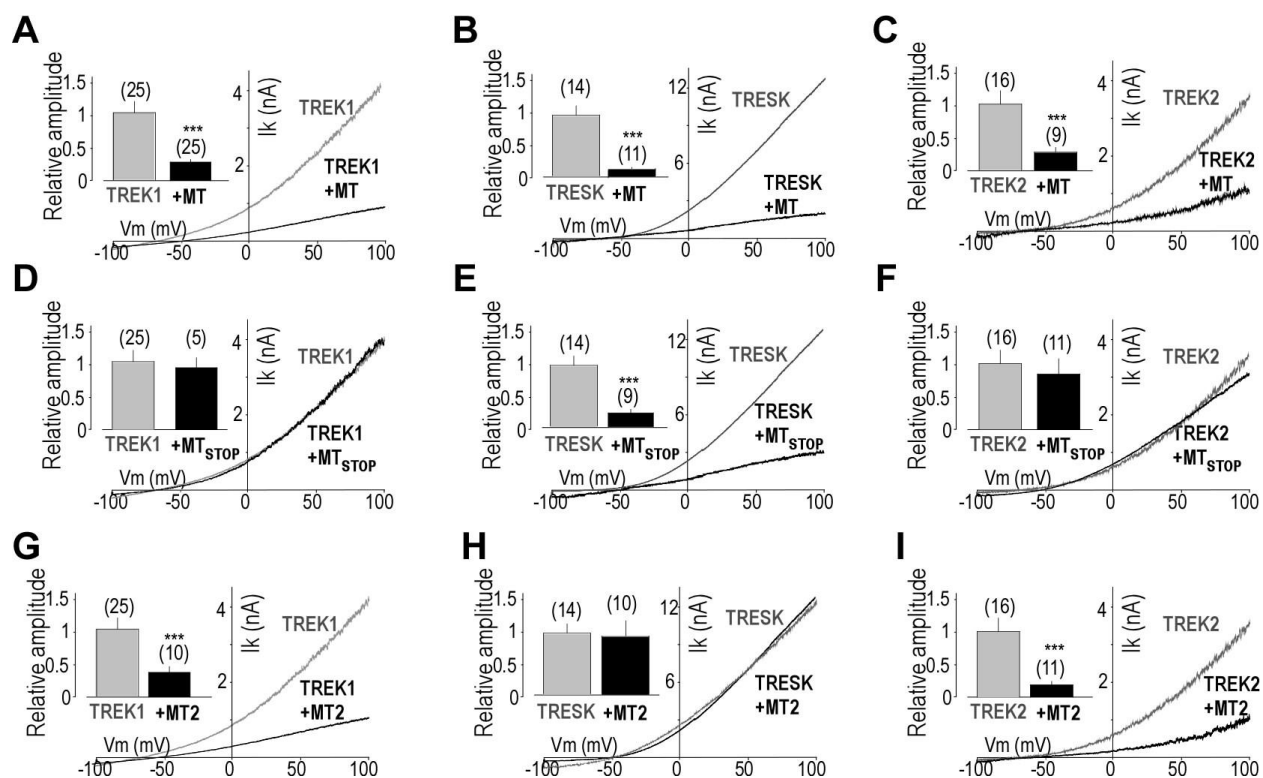


Figure S11 (Related to Figure 5 and Figure 6). **Regulation of the hTRESK, hTREK1 and hTREK2 by hTRESK-MT, hTRESK-MT_{STOP} and hMT2.** (A-C) Representative traces and insets showing the effect of co-expression of hTRESK-MT on hTREK1 (A) hTRESK (B) and hTREK2 (C) currents HEK 293T cells. (D-F) Representative traces and insets showing the effect of hTRESK-MT_{STOP} on hTREK1 (D), hTRESK (E), and hTREK2 (F) currents. (G-I) Representative traces and insets showing the effect of hTRESK-MT2 co-expression on hTREK1 (G), hTRESK (H), and hTREK2 (I) currents in HEK293T cells. Currents were elicited by voltage-ramps (from -100 to 100 mV, 1s duration. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. Student's *t* test (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) shows the difference between hTREK1 or hTRESK or hTREK2 and hTREK1 or TRESK or TREK2 when co-expressed with different TRESK-MT constructs.

Annexe 2 : Table détaillant les études précliniques utilisant les donneurs de NO comme modèle de migraine

(Actualisée le 30/04/2019)

NO donor and mode of administration	Observed outcomes	References
GTN 0,25 µg/kg/min (20min) iv (cat)	Increase pial artery diameter and cerebral blood flow, increase in NO concentration	(Read et al., 1997)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	c-fos activation : brainstem (TNC, PAG, LC...), hypothalamus, forebrain	(Tassorelli and Joseph, 1995a)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	c-fos + NADPH colocalisation (hypothalamus, TNC, LC most notably)	(Tassorelli and Joseph, 1995b)
GTN 2 µg/kg/min (30min) iv (rat)	Increase blood flow and NO concentration, decrease in superoxide. Reverse by Sumatriptan	(Read et al., 1999)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Increase c-fos and nNOS in TNC and C1/C2	(Pardutz et al., 2000)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Decrease CGRP-Immunoreactivity in TNC, increase in 5HT immunoreactivity in TNC	(Pardutz et al., 2002)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Increase in CamKII expression in TNC	(Pardutz et al., 2007)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Kynurenine + probenidine decrease c-fos expression in TNC	(Knyihár-Csillik et al., 2007)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Analog of kynurenine decrease c-fos expression in TNC	(Knyihár-Csillik et al., 2008)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Decrease in c-fos by : L-Name, 7-NI, Ephedrine, Indomethacin, Capsaicin depletion	(Tassorelli et al., 2000)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Increase cGMP expression in TNC lamina I/II and cortical arteriols	(Tassorelli et al., 2004)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Decrease in c-fos expression in TNC, LC, hypothalamus among others, and inhibition of NF-KB by parthenolide	(Tassorelli et al., 2005b)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Anandamide (CB agonist) decrease c-fos expression in TNC. Alteration in CB-R expression by GTN	(Greco et al., 2010)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Decrease in CamKII expression in TNC by COX2-II but not COX-I	(Varga et al., 2009)
GTN 4 µg/kg/min (20min) iv (rat, awake)	Increase c-fos expression in TNC, decrease by Sumatriptan	(Ramachandran et al., 2012)
GTN 4 µg/kg/min (20min) iv (rat, awake)	Increase in c-fos in TNC, decrease by L-name, olcegepant, NK1 antagonist	(Ramachandran et al., 2014)
GTN 4 µg/kg/min (20min) iv (rat, awake)	Increase in mast cells degranulation, prevented by l-name and sumaT but not by olcegepant and SP antagonist. Direct application of GTN on mast cells has no effect in vitro	(Pedersen et al., 2015)
GTN 0,5 µg/kg/min (20min : same as human) iv (rat)	No effect on c-Fos in TNC	(Martin and Martin, 2001)
GTN 10mg/kg s.c (mice)	Increase c-fos in TNC, dose dependant thermal (Hargreaves) and mechanical allodynia (vF-paw), block by sumatriptan IP or i.t, no effect on CSD	(Bates et al., 2010)

	threshold	
GTN 2 µg/kg/min (30min) iv (rat)	Increase in IL1b, IL6 and iNOS expression, macrophage activation, mast cell degranulation	(Reuter et al., 2001)
GTN 2 µg/kg/min (30min) iv (rat)	Increase iNOS expression, NF-KB activation, block by parthenolide	(Reuter et al., 2002)
GTN 100 µg/kg/min (15min max) iv (cat)	Increase discharge rate of TNC neurons, not affected by the fall in blood pressure	(Lambert et al., 2000)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Brainstem auditory evoked potentials prolonged 2h after GTN (similar in human)	(Arakaki et al., 2014)
GTN 10% - 0,5ml/kg i.p (rat)	Small changes in social behavior and conditioned aversion test (saccharine preference) in favor of headache like behavior	(Silverman, 1976)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Increase expression of CCK and CGRP in PAG, reverse by rizatriptan	(Yao et al., 2015)
SNP 1 µg/kg/min iv (10min) (rat)	Transient increase activity of TNC neurons during infusion of SNP and 50min after. Block by L-Name	(Koulchitsky et al., 2004)
GTN 2 µg/kg/min iv (30min) (rat)	No increase in c-fos expression in TNC lamina 1	(Offenhauser et al., 2005)
GTN 1mg/kg iv (4h infusion) (rat)	Small increase in RAMP1 immunoreactivity in TG, small decrease of sGC	(Seiler et al., 2013)
GTN 0,5/1/5/10 mg/kg i.p (rat) SNP 4mg/kg i.p L-Arg 400mg/kg i.p	Dose-dependent increase in c-fos in hypothalamus, TNC, PAG... Little or no effect at doses below 10mg/kg. No effect of SNP/L-Arg in c-fos in TNC. Only 10mg/kg GTN produce a decrease in blood pressure (20-30%), lasting 60min	(Tassorelli et al., 2005a)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Increase in neurons NOS immunoreactive in the dura mater	(Knyihár-Csillik and Vécsei, 1999)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Increase of blood CGRP level, decrease of B-endorphin. Reverse by Qilongtutong (Chinese traditional medicine)	(Wu et al., 2014)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia 2h and 4h after GTN (tail flick). Acute stress (90min immobilization) prevent GTN hyper algesia, chronic stress (7 days repeated immobilization) potentiate GTN effects	(Costa et al., 2005)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Asymmetric dimethylarginine (ADMA, endogenous NOS inhibitor) and nNOS expression increase in hypothalamus and medulla. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase, which regulates ADMA level, is decreased.	(Greco et al., 2015a)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Increase NOS immunoreactivity in the dura mater	(Knyihár-Csillik et al., 2001)
GTN 8 µg/kg/min (20min) iv (rat, awake)	No effect on burrowing behavior and running wheel activity. Some rats display light hypersensitivity (not significant overall though).	(Christensen et al., 2016)

GTN 10mg/kg i.p (mice, Swiss) SNP 1mg/kg i.p (mice, Swiss)	Thermal hyperalgesia (cold plate 4°C, hot plate 50°C) of both GTN and SNP, same amplitude, 4h hyperalgesia. No effect on motor tests (exploratory, rotarod). Upregulation of IL1b (1-2h and 6h), iNOS (4-6h) and NF-KB (1-2-4h). Increase of PKCε and γ, pSTAT1, pCREB (1-2-4h). Reversion of all those effects by ICV PKC blocker (Calphostin C)	(Galeotti and Ghelardini, 2013)
GTN 3mg/kg i.p (rat) after chronic treatment of sumatriptan or morphine or vehicle (7d)	GTN low dose induce little effect on facial withdrawal threshold (FWT, 8g →7g, 2h after GTN) and nothing on the paw (PWT) after chronic vehicle treatment. Significant effect on FWT/PWT was seen after morphine or sumatriptan pretreatment + GTN low dose. CGRP antibody reverses the effect. Same results with two exposure of 1h bright light instead of GTN	(Kopruszinski et al., 2016)
SNP 1- 0.01mM topical application (dura receptive field, rat)	Electrophysiological recording of single unit in the TG. Different neurons can be sensitized or inhibited, or not affected by SNP (same proportion for all) using mechanical stimulation. cGMP mediates the inhibitory effect.	(Levy and Strassman, 2004)
GTN 2-2.25 µg/kg/min (30min) iv (rat)	Electrophysiological recording of single unit in the TG. GTN potentiated the response and decreased the threshold of activation of TG neurons (electrical stimulation of their periorbital receptive field). No effect on c-fos. GTN increase c-fos after periorbital s.c capsaicin compared to capsaicin alone	(Jones et al., 2001)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Decrease in 5HT level in pons and medulla 4h after GTN. Increase in noradrenaline in pons 1h after GTN. Upregulation of dopamine and noradrenaline in plasma after 1h, decrease after 2h.	(Tassorelli et al., 2002)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia (tail flick) 2 and 4h after GTN. Potentiation of phase 1 and 2 in formalin when injected 2h after GTN.	(Tassorelli et al., 2003a)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Constriction of meningeal arterioles, dilatation of cortical arterioles. No effects on veins. L-Name only constricted cortical arterioles. Drop in systolic blood pressure (30%)	(Pryazhnikov et al., 2014)
GTN 20 µg/kg iv (rat)	GTN causes dilatation of dural AND pial arteries. A K ⁺ _{ATP} channel blocker has no effect.	(Gozalov et al., 2008)

GTN 10mg/kg iv 5 min infusion (rat)	Transient changes in cerebral blood flow : decrease during infusion and increase for 30min. Upregulation of nNOS in perivascular nerves, TG and TNC.	(Srikiatkhachorn et al., 2002)
GTN 15mg/kg i.p (mice, P2X7-/-and +/+)	Thermal hyperalgesia (hot plate, ramp protocol 30°C, 6°C/min) (1-2h after GTN) in KO and WT, reversed by sumatriptan but not P2X7 antagonist (5min after NTG). P2X7 antagonist was effective in pretreatment (30min before GTN), but not for KO. KO have to a less extent than WT an upregulation of c-fos in C1-C2 after GTN, but not in TNC. Small reduction of c-fos in TNC in WT treated with P2X7 antagonist	(Göloncsér and Sperlág, 2014)
GTN 10mg/kg i.p (mice, PACAP-/- and +/+)	Photophobia (0-30 and 90-120min after GTN), reduced in KO. Increased in meningeal blood flow in WT and to a lesser extent in KO. Increased in c-fos in TG and TNC for WT, not for KO. No change in PAC (receptor) in both group. PACAP injection mimics GTN effect.	(Markovics et al., 2012)
GTN 10mg/kg i.p (mice), 1-4 injections, every 2 day.	Mechanical allodynia (von Frey, paw), dose dependent. Sumatriptan (i.p post-GTN, no effect of i.t) and topiramate (pre and post GTN) reverse the allodynia. Only topiramate had an effect on the progression of allodynia	(Pradhan et al., 2014a)
GTN 10mg/kg i.p (mice) 1-4 injections, every 2 day	Delta agonist reverse mechanical and thermal allodynia induce by 1 injection or after each of the 4 injections of GTN. Delta agonist reversed the GTN induced conditioned place aversion and the KCl-induced CSD in-vivo	(Pradhan et al., 2014b)
GTN 10mg/kg i.p (mice) 4 injections, every 2 day	Chronic treatment (11 consecutive days, 30min before GTN): propranolol and amiloride has an effect pre and post GTN. Memantine has little/no effect, so as valproate.	(Tipton et al., 2015)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Mechanical allodynia (face+paw, achieved in 30min, long lasting: 240min), partial reversion by pregabalin. Reversion by pregabalin of GTN induce c-fos upregulation in TNC	(Di et al., 2015)
GTN 4 µg/kg/min (20min) iv (rat, awake)	RNA sequencing of TG 30 or 90min after GTN. 6 genes only showed transient response at 30min. More robust response associated with the 90min time point. Enrichment of genes involved in immune response, signal transduction and neuroplasticity (P2X3, glutamate homeostasis, MHC class1...)	(Hougaard Pedersen et al., 2016)
GTN 10mg/kg s.c (rat), 5 injections, 1 per week	Upregulation of p-ERK, CGRP, COX2 in dura mater, TG and TNC 30min, 1h or 3h after the last GTN injection.	(Dong et al., 2015)

GTN 10mg/kg i.p (mice)	Mechanical allodynia (von Frey paw only, no difference in von Frey face GTN vs vehicle) at 75 and 120min, reversed by a valproate derivative.	(Kaufmann et al., 2015)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Mechanical allodynia (vF, paw), max effect at 60min, last 3h after GTN. Display facial expression related to pain at 45min. c-fos up regulation in TNC. MRI and ²³ Na imaging before and after GTN induce sensitization: increased of 7,5%-17% in Na ⁺ level in CSF, brain and vitreous humor. Mathematical modeling of such elevation in Na ⁺ _{ext} on exposed neurons lead to more frequent and earlier spontaneous action potentials	(Harrington et al., 2011)
GTN 250 µg/kg/h (2h, about 4µg/kg/min) iv (rat)	Electrophysiological recording of TNC neurons with meningeal receptive field: increase in neuronal activity during the first 1h of perfusion, decrease during the last 1h or 30min, small increase 30 min after the end of the perfusion. Prevent by pretreatment with CGRP antagonist	(Feistel et al., 2013)
GTN 10mg/kg i.p (mice), from 2 formulations : sublingual and spray (with respective vehicle for control)	Photophobia induced by sublingual GTN, strong vehicle effect, no effect for the other form. Increase in cerebral blood flow by sublingual GTN and its vehicle, not by the spray. GTN upregulates c-fos in TNC (reduced by topiramate and not sumatriptan), TG (reduced by sumatriptan but not by topiramate), no change in nNOS. Thermal hyperalgesia (hot plate, 60 and 120 min, return at 180) and mechanical allodynia (vF, paw, 60, 120min, increase at 180min). Increase in orofacial pain score, reversed by sumatriptan	(Farkas et al., 2015)
GTN 10mg/kg 2 ml i.p (rat), (250g-330g), 1 injection or 5 injections over 2 weeks (every 3 days)	Single injection: small but non significant effect on rat grimace scale, photophobic behavior, and thermal pain test (tail flick at 15°C and 46°C), significant increase in locomotor activity. Repeated injections : no effect on pain behavior (grimace scale	(Sufka et al., 2016)

	and thermal test), elevated plus maze, forced swim test. Photophobia and increase locomotor activity occurred (reversed by sumatriptan for the later).	
GTN 250 µg/kg/h iv (2h) (rat) SNP 25 µg/kg/h (2h)	Electrophysiological recording in TNC with afferent in dura. Increase in neuronal activity and no reduction in blood pressure during the 2h. Reversed by CGRP antagonist	(Koulchitsky et al., 2009)
GTN 10mg/kg s.c (rat, female)	Increase in plasma CGRP level and c-fos in TNC, reduced by coagulation of the middle meningeal artery	(Zhu et al., 2011)
S-nitrosoglutathione 30mM, iontophoresis (cat), in the receptive field	Electrophysiological recording in TNC, stimulation of facial receptive field or superior sagittal sinus. Increased neuronal transmission (glutamate and 5HT involved)	(Lambert et al., 2004)
SNP 2 µg/kg/min (5min) i.art (rat)	Decrease of dural blood pressure, indomethacin reduced this event.	(Summ et al., 2010)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Increase activity of delta and theta in EEG 4hs after GTN, reduce level of antioxidant enzyme (GSH) and vitamin in brain (Vit A, C and E), increase in serum level of CGRP and c-fos and NF-KB in TNC, partial reverse by valproate	(Li et al., 2016d)
GTN 2 µg/kg/min iv (30min) (rat), SNAP 10 µM topical	Increase in mechanosensitivity of TG (starting at 2h post infusion), same effect with topical application. Increase in pERK in meningeal arteries. Blockade of pERK in arteries reduced TG sensitization	(Zhang et al., 2013a)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Atorvastatin reduced the GTN induced NF-KB activation in TNC	(Yin et al., 2009)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia (tail flick), potentiation of formalin effect by GTN, both reversed by CGRP antagonist	(Greco et al., 2014)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Biphasic response of dura vessel : first a decrease then an increase in blood flow. Cerebral vessels only show an increase	(Greco et al., 2011)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia (tail flick), potentiation of formalin effect by GTN, both reversed by a fatty acid amide hydrolase (degrades endogenous cannabinoid) blocker. Reduce c-fos in TNC and LC	(Greco et al., 2015b)

GTN 10mg/kg i.p (rat, male and female)	Reduced expression of c-fos in TNC, hypothalamus and thalamus in male vs female. Castrated females have a global reduce of c-fos in many brain areas, which can be restored by oestrogen. Castrated males have only a reduction in the TNC.	(Greco et al., 2013)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia (tail flick), potentiation of formalin effect by GTN, both reduced by nimesulide (COX-2 inhibitor). C-fos expression in brain areas (TNC, PAG, LC, hypothalamus...)	(Tassorelli et al., 2003b)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Thermal hyperalgesia (tail flick), potentiation of formalin effect by GTN, small reduction by central dopamine denervation by ICV 6-OHDA BUT prolonged formaline+GTN response. 6-OHDA also reduces c-fos in TNC, hypothalamus...	(Greco et al., 2008)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	4h following GTN, c-fos increase in brain stem in noradrenergic neurons and to a lesser extent in 5HT neurons. Increase in c-fos in hypothalamus in oxytocin, vasopressin and CRF neurons, and also in amygdala for CRF.	(Tassorelli and Joseph, 1996)
GTN 250 µg/kg/h iv (2h) (rat)	4h after the end of infusion, increase of TG neurons positive for CGRP, nNOS and both. nNOS increase is restricted to ophthalmic part of the TG	(Dieterle et al., 2011)
GTN 1-10mg/kg i.p (mice WT and casein kinase delta KO)	Thermal and mechanical allodynia induced by GTN, more pronounced in KO, c-fos in TNC and C1-C2 upregulated in KO. KO have lower CSD threshold	(Brennan et al., 2013)
GTN 10mg/kg i.p (mice), KO CB1, CB2, MAGL and FAAH	Mechanical allodynia (paw, vF, max effect 30min already after i.p.) for WT, KO CB1, CB2, MAGL but not FAAH. Confirmed by injection of FAAH inhibitors. Prevent c-fos in TNC by FAAH-Inhibitor and KO FAAH. Reversion of antinociceptive of KO FAAH by CB1 agonist.	(Nozaki et al., 2015)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	Increase of scratching behavior following GTN (during 240min), decrease in 5HT level, increase in plasma NO, variations of different markers in TNC (increase in ROS...). Attenuation by high dose of valproate	(Li et al., 2016b)
GTN 10mg/kg s.c (rat)	Nrf2, HO1, NQO1 protein level increase in TNC, prevention by sulforaphane and prevention of c-fos and nNOS upregulation in TNC, and prevention of mechanical allodynia (Face + Paw)	(Di et al., 2016)
GTN 10mg/kg s.c (rat and ICR mice)	Gastrodin (ASIC inhibitor notably) reduces head-scratching, reduces plasma level of NO and CGRP, c-fos in TNC. Increase the thermal pain threshold in experiment done without the NO donor	(Wang et al., 2016a)
GTN 10mg/kg i.p, 1 per week, 5 weeks (rat, male and female)	5 th injection induces migraine behavior (scratching...). Serum level, IHC, PCR and Western-blot of whole brain : upregulation of BDNF, TrkB, p-	(Guo et al., 2016)

	CREB, p-ERK with sex differences and differences between migraine and migraine-free period	
SNP 3mg/kg i.p, (rat, both sexes)	BDNF and IL-6 priming potentiates low dose GTN effects on facial and extra-facial mechanical threshold	(Burgos-Vega et al., 2016)
GTN 10mg/kg, i.p, 1 inj, (rat)	Ghrelin, (orexineric stomach peptide, with its receptors likely in the CNS) attenuates NTG induced pain behavior (von Frey and Tail flick), photophobia, anxiety and elevated cortisol level induced by GTN	(Farajdokht et al., 2016a)
GTN 10mg/kg, i.p, 1 every 2 days, 4 injection (Pradhan model), (rat, male and female)	Repeated ghrelin injections attenuate photophobia and anxiety, reduce elevated PACAP and cortisol level and satellite glial cell invasion in TG. Repeated NTG increase white blood cell and affect platelets (volume up but number down)	(Farajdokht et al., 2016b)
ISDN 10mg/kg i.p or iv (rat)	ISDN sensitizes face formalin 1 st phase (2-4h post ISDN not 1h) but not paw formalin (2h after ISDN), do not directly activates neuron, increases WDR activity through C-fiber stimulation	(Ramos et al., 2017)
GTN 10mg/kg i.p (rat)	GTN or GTN +orofacial/ plantar formalin increase mRNA CGRP nNOS and cytokines in TG and CNS and NTC, prevented by kynurenic analog (regulator of glutamate activity)	(Greco et al., 2016)
GTN, rat, unknown dose (low dose, no effect in sham animal)	Traumatic head injury, following resolution of the trauma-allodynia, GTN injection produced a renewed cephalic pain (von Frey, place preference) blocked by sumatriptan and CGRP antibody	(Bree and Levy, 2016)
GTN, 10mg/kg, s.c (rat)	GTN upregulates in C1-C2 cervical cord TRPV1, nNOS, NF-kB and COX2, downregulates kynurenic aminotransferase II. Reversed by CBs modulators	(Nagy-Grócz et al., 2015)
GTN, 10mg/kg s.c (rat)	NTG induces pain behavior (scratching head), upregulates TNC c-fos and blood CGRP and NO, not in baicalein (flavonoid molecule) chronic treatment group	(Zhang et al., 2017)
GTN, 10mg/kg – i.p - 5 inj, 1 every 3days (rat)	GTN induces photophobia (5 th inj), pain behavior (Rat Grimace Scale from Sotocinal, start after 1 st inj) and reduces spontaneous activity (5 th inj)	(Harris et al., 2017)
GTN, 10mg/kg s.c, (rat)	GTN induces pain behavior (scratching head...), upregulation of serum CGRP, NO and downregulation of endothelin. Reversion by several traditional Chinese compound and ibuprofen.	(Cui et al., 2017)
GTN, 10mg/kg i.p (rat)	Downregulation of several enzymes involved in the synthesis of kynurenic acid (endogenous GLU antagonist) in the TNC, with WB	(Nagy-Grócz et al., 2017)
GTN, infusion iv 4µg/kg/min for 20min (rat)	GTN induces upregulation of ERK in TNC, dura mater (at t+30min) and in TG (t+2h), but not in DRG. CamKII and pCREB are also upregulated in TNC but not in thoracic or spinal dorsal horn	(Ramachandran et al., 2017)
GTN, s.c injection 10mg/kg (rat)	Upregulation of PI3K, p-AKT 6-24h after GTN. Decrease of PTEN and GSK3b 1h-12h after GTN, return to baseline after 24h.	(Liu et al., 2017)
GTN, i.p injection	Anti hyperalgesic effect of TRPA1 antagonist against	(Demartini et al.,

10mg/kg (rat)	orofacial formalin with GTN (2 nd phase), downregulation of TRPA1, cFos and neuropeptides mRNA in TNC and TG. No changes in CGRP and SP at the protein level	2017)
GTN, i.p injection, 10mg/kg (rat)	GTN induces metabolic changes : elevated lactate, decreased creatine, glycine increased	(Abad et al., 2017)
GTN, i.p, 10mg/kg (mice)	GTN induces pain behavior (hot, cold plate), increased serum levels of NO, CGRP and NPY, increased level of I11B and iNOS, increased phosphorylation of PKC (many subtypes), CREB and STAT1 : attenuated by valproate	(Yi et al., 2017)
GTN, i.p 10 mg/kg or sGC activator (mice)	sGC activator causes facial and extra facial mechanical allodynia (blocked by Topiramate, sumatriptan and propranolol), increased cFos and CGRP in TG and TNC, ODQ (sGC blocker) blocks acute and chronic NTG allodynia	(Ben Aissa et al., 2017)
GTN, s.c 10mg/kg, (rat)	GTN induces paw mechanical allodynia, upregulation of s100b (inflammatory protein, found in astrocytes surrounding blood vessels, marker of brain damage) both at mRNA and protein, GFAP, ERK, downregulated by Tetrandrine	(Qin et al., 2017)
GTN, mice 10mg/kg, C57 and TRPV1 KO (Pradhan chronic model)	GTN induces acute and chronic mechanical and heat allodynia but not cold (paw), cold but not mechanical facial allodynia. Resineferatoxin pretreatment does not change GTN effect on paw (except heat sensitivity), but induced GTN-induced mechanical allodynia on face (not found in TRPV1 KO). TRPV1 KO does not change basal heat sensitivity (and still development of small heat hyperalgesia), mechanical and cold response in acute and chronic GTN	(Kim et al., 2017)
GTN, 10mg/kg i.p (Pradhan model) (rat)	GTN induces thermal and mechanical allodynia, conditioned place aversion, increase of blood CGRP, increase of CGRP and TRPV1 mRNA in the TG. Effects attenuated by chronic injection of ghrelin	(Farajdokht et al., 2017)
GTN, 10mg/kg i.p (rat)	increase in CGRP levels in plasma, trigeminal ganglion neurons and ex-vivo meningeal preparations, GTN induced c-fos expression in TNC, in vivo but not ex vivo mast cells degranulation. Salmon calcitonin ameliorates all these parameters	(Kilinc et al., 2018)
GTN, 10mg/kg i.p (mice)	AMPA GluA1 Phosphorylation in Ser831 is critical for GTN migraine effects. This phosphorylation is enhanced in caudalis, mutation prevents migraine like pain (face (with partial restraint) + paw), GTN induced Ca ⁺⁺ rise in brainstem neurons (Ca imaging) which was reduced by this mutation. All these effects were partially reproduced with pharmacological tools. Little (genetic) to no effect (pharmacology) on photophobia	(Tang et al., 2018)

GTN, 10mg/kg i.p, 4inj, one every 2 days (rat)	Cerebrolysin (mix of peptide, BDNF, NGF etc.) improves GTN symptoms, partial reversal of extrafacial thermal and mechanical allodynia, head grooming, photophobia and biochemical changes (increases in plasma CGRP and TNF/IL1b and total white blood cells)	(Mahmoudi et al., 2018)
GTN, 0.1mg/kg i.p with and without mild brain injury (mice)	GTN evoked mechanical allodynia (face+paw) in both sham and injured mice. Only injured mice developed chronic allodynia. Reversed by sumatriptan, topiramate and SNC80 (DOR agonist). Increase in CGRP in injured mice	(Moye et al., 2018a)
GTN, 10mg/kg i.p 1 inj (mice)	Sodium MRI Imaging in-vivo. GTN induces sodium increases in specific location : brainstem, CSF, cisterna magna and cerebellum (around 35-45min post inj to start being significant)	(Abad et al., 2018)
GTN, 1-10mg/kg i.p & s.c, (mice)	TRPA1 mediates NO effects (allodynia, not vasodilatation)	(Marone et al., 2018)
GTN, 10mg/kg i.p, 5 injections (mice, male and female)	GTN injections do not change burrowing behavior, neither CFA. SNI did.	(Shepherd et al., 2018)
GTN, 5mg/kg i.p, 5 injections (every two day) (rat)	GTN injections decrease von Frey and tail-flick thresholds, increase CGRP mRNA in TG, cervical SC and medulla/pons. All GTN effects blocked by chronic topiramate (30mg/kg i.p, every day)	(Greco et al., 2018)
GTN, 10mg/kg, 5 i.p injections every two day, (mice)	Chronic GTN injections decrease paw von Frey thresholds, activate microglia and upregulate P2X4R. Minocycline reduces basal mechanical allodynia, but not acute GTN effects. P2X4R antagonist blocks acute and chronic GTN effects.	(Long et al., 2018)
ISDN, 10mg/kg, i.p, 1 to 4 injections, 1 per day, (rat and mice)	Acute/chronic ISDN induces mechanical allodynia (face/paw). Mambalgin reverses facial and partly extra-facial allodynia (acute and chronic), similar to reference treatments (sumatriptan or topiramate). Repeated mambalgin injections reduce chronic allodynia. Effects of mambalgin conserved in ASIC1a KO mice	(Verkest et al., 2018)
GTN, 10mg/kg, 1 i.p inj (rat)	Liposomal curcumin reduces serum level markers of oxidative stress and pain behavior (formalin in the paw, 4h after NTG)	(Bulboacă et al., 2018)
GTN, 10mg/kg, 1 i.p inj (rat)	Pretreatment of curcumin reduces serum level markers of oxidative stress and pain behavior (formalin in the paw, 4h after NTG) compare to propranolol and indomethacin	(Bulboacă et al., 2017)
GTN, 10mg/kg, s.c (rat)	Half of human participants develop cranial allodynia. Increased spontaneous firing of TNC neurons and sensitization of dural and cutaneous stimulation, aborted by triptan	(Akerman et al., 2019)
GTN, 10mg/kg, 5 inj i.p every two day (mice)	RNAseq in TG and Nucl Acc. Several dysregulated genes and pathways and in a treatment and/or region specific manner	(Jeong et al., 2018)
GTN, 10mg/kg, 5 inj i.p	DOR agonist SNC80 effective against facial and extra-	(Moye et al.,

every two day (mice) 0,1mg/kg for traumatic headache	facial allodynia chronic GTN, post traumatic headache, triptan and morphine induced hyperalgesia	2018b)
GTN, 10mg/kg, , 5 inj i.p every two day (mice)	Chronic GTN induces facial and extra-facial allodynia, increases TNC c-Fos, CGRP, pERK, Il1b, NLRP3. Increases staining in Iba1. Blocked by NLRP3 or Il1b	(He et al., 2019)
GTN, 10mg/kg, i.p 1 injection (rat)	GTN increases artemin, GFRA3 in dura mater (mRNA, protein), increase staining for both in dura mater, and for GFRA3 in TG	(Shang et al., 2016)
GTN, 10mg/kg, 1 injection (rat)	GTN induces head scratches and metabolic changes (plasma NO, CGRP, endothlein), reduced by coumarin, and coumarin potentiates anti-migraine effect of lingustrazine through pharmacokinetic effect	(Feng et al., 2018)
SNP, 0.1mg/kg, i.p (rat, female)	Dural injection of CGRP in female primed them toward low dose SNP (facial mechanical sensitivity	(Avona et al., 2019)
ISDN, 10mg/kg, i.p, 1 to 4 injections (rat, mice WT and TREK1/2 -/-)	ISDN induces extra-facial mechanical allodynia in WT but not TREK1/2 KO. MT2 TRESK TG transfection in rat induces facial allodynia that couldn't be increased by ISDN	(Royal et al., 2018)
ISDN, 5-10mg/kg, i.p, 1 to 5 inj, (rat)	Single or repeated ISDN differentially induces facial and extra-facial mechanical allodynia, reversed/prevented by appropriate treatment (sumatriptan, olcegepant and propranolol)	(Dallel et al., 2017)
GTN, 10mg/kg, s.c, 1 injection (rat)	Metabolite profiling of monoamine by HPLC after traditional Chinese medicine treatment or GTN. Small changes in 5HT, Norepinephrine or NO- derivates in GTN and treatment groups	(Xu et al., 2019)
GTN, 0.1mg/kg i.p (rat)	Functional imaging on rat receiving low (1 every 4d) or high frequency (daily) injection of inflammatory soup. GTN was then injected and imaging performed 1h after: ACC show increase connectivity with cerebellum, with the medulla (low frequency group) and others regions (midbrain, thalamus...) for the high frequency	(Jia et al., 2019)
GTN, 10mg/kg, s.c (rat)	Chinese traditional medicine prevented and cured changes in metabolite profile (5HT and derivates) associated to GTN. Upregulation of 5HT1B and downregulation of c-jun in PAG in treated rats	(Pu et al., 2019)

Annexe3 : Notes supplémentaires sur la pharmacologie des canaux ASIC

Les informations complémentaires présentées dans cette partie sont liées au Tableau 9.

1. Ions

a. Cations métalliques

De nombreux cations métalliques ont été testés sur les canaux ASIC et se sont révélés être des modulateurs potentiels (bloqueurs). On peut citer le gadolinium (Gd^{3+}) (Allen and Attwell, 2002; Babinski et al., 2000), le plomb (Pb^{++}) (Wang et al., 2006), le cuivre (Cu^{++}) (Wang et al., 2007), le cadmium (Cd^{++}) et le nickel (Ni^{++}) (Staruschenko et al., 2007). Ces ions vont tous inhiber les ASIC, avec des affinités allant de quelques micromolaires (exemple Pb^{++} et ASIC1b: $IC_{50}= 1,5\mu M$) au millimolaire (Cd^{++} et ASIC2a : $IC_{50}= 1mM$). Ces résultats ont été obtenus à la fois sur des canaux recombinants ou natifs, avec des différences d'affinité entre les sous-unités ASIC (par exemple ASIC3 est moins sensible au Pb^{++} , $IC_{50} : 100\mu M$). La perfusion d'un chélateur de ces métaux permet à l'inverse de potentialiser les courants ASIC (Cho and Askwith, 2007).

b. Cations divalents : Calcium et Zinc

Les canaux ASIC sont également bien connus pour être modulés par des cations divalents, avec le zinc (Zn^{++}), le magnésium (Mg^{++}) et surtout le calcium (Ca^{++}). Le Zn^{++} a un double effet sur les canaux ASIC : il potentialise les canaux contenant la sous-unité ASIC2a à forte concentration lorsqu'il est coappliqué avec le pH acide ($EC_{50} : 120\mu M$) (Baron et al., 2001, 2002b, 2008) et inhibe à des concentrations plus faibles ASIC1a et ASIC1a+2a (Chu et al., 2004), ainsi qu'ASIC1b et ASIC3 (Poirot et al., 2006). L'affinité pour obtenir une inhibition d'ASIC1a et ASIC1a+ASIC2a est de l'ordre de la dizaine de nanomole contre plusieurs dizaines de micromoles pour ASIC1b et ASIC3. Le calcium et son effet sur les ASIC a fait l'objet de nombreuses études. Des effets inhibiteurs ont été retrouvés : une augmentation de Ca^{++} extracellulaire (0.1mM à 10mM) peut inhiber les canaux ASIC1a, 1b, 2a et 3 et natifs dans les neurones sensoriels (Davies et al., 1988; Immke and McCleskey, 2003; Paukert et al., 2004; Sutherland et al., 2001; de Weille and Bassilana, 2001). Le calcium agit en décalant les courbes d'activation et également d'inactivation vers des pH plus acides, ainsi qu'en augmentant la vitesse de réactivation (Babini et al., 2002; Immke and McCleskey, 2003). Un effet de blocage du pore a aussi été avancé (Paukert et al., 2004). Plusieurs sites potentiels ont été proposés : l'un dans la poche acide, supposant une compétition avec les protons et permettant une stabilisation de l'état fermé (Jasti et al., 2007) et un autre au niveau du TM2 (Immke and McCleskey, 2003; Paukert et al., 2004; Zuo et al., 2018), bien que pour ce dernier une étude ne retrouve pas ce résultat (Yoder and

Gouaux, 2018). Le magnésium aurait un effet similaire au calcium, du moins sur ASIC1a et ASIC1b (Babini et al., 2002).

c. Anions

Le chlore (Cl⁻) a également un effet sur les canaux, en particulier ASIC1a. Dès la première étude cristallographique, un ion Cl⁻ a été identifié au sein du domaine pouce. Un résultat confirmé et retrouvé dans les configurations ouvertes et inactivées et dont le site de liaison a été récemment affiné (Bacongus et al., 2014; Gonzales et al., 2009; Jasti et al., 2007; Yoder and Gouaux, 2018). Cet ion n'est pas présent dans le canal à l'état fermé. La substitution du Cl⁻ extracellulaire accélère la vitesse d'inactivation d'ASIC1a et limite également sa désensibilisation progressive liée à des stimulations acides répétées (Kusama et al., 2010).

2. Molécules synthétiques

a. GMQ

Une autre molécule de la même famille que l'amiloride a été développée et testée sur les canaux ASIC. Il s'agit du GMQ (2-guanidine-4-méthylquinazoline). A forte concentration (autour du mM), cette molécule est capable d'activer directement ASIC3 à pH7.4, produisant un courant soutenu non inactivant. Le GMQ a permis de mettre en évidence la présence du site proton-indépendant (Yu et al., 2010). Cependant, le GMQ a également des effets modulateurs complexes sur les autres sous-unités ASIC (changement des courbes d'activation et d'inactivation dépendant de la sous-unité ASIC), suggérant d'autres sites d'interactions possibles (Alijevic and Kellenberger, 2012; Besson et al., 2017). D'autres molécules dérivés du GMQ ont été développées récemment (Alijevic et al., 2018).

b. AINS

En plus de leur effet bien connu sur les COX, un certain nombre d'AINS sont capables de bloquer directement certains canaux ASIC, à savoir ASIC1a et ASIC3 et dans une moindre mesure ASIC2a. ASIC1a est bloqué par l'ibuprofène (IC₅₀ autour de 350µM), le courant d'ASIC3 et en particulier la phase soutenu est bloqué par l'acide salicylique, l'aspirine et le diclofénac (IC₅₀ 90-260µM) (Dorofeeva et al., 2008; Voilley, 2004; Voilley et al., 2001). Ces molécules sont capables d'agir sur les courants ASIC natifs, que ce soit dans les neurones sensoriels (Jiang et al., 2006; Lin et al., 2008; Voilley et al., 2001) ou centraux (Wang et al., 2012).

c. Autres composés

Certains groupes et plusieurs entreprises pharmaceutiques ont essayé de produire des petites molécules synthétiques ciblant les canaux ASIC. On peut citer le composé A-317567 (Abbot), bloquant de façon non discriminante les canaux ASIC des neurones sensoriels ou centraux (IC_{50} 2-30 μ M) et ayant des effets analgésiques in vivo dans différents modèles de douleur (Coryell et al., 2009; Dubé et al., 2005). Ce composé est néanmoins très complexe à synthétiser et des effets sédatifs et hors-cibles (certains récepteurs de neurotransmetteurs) ont été décrits (Kuduk et al., 2010). Le composé CHF5074, développé en tant que modulateur de l'enzyme gamma-sécrétase pour la maladie d'Alzheimer et dérivé du flubiprofène (Imbimbo et al., 2009), peut bloquer les courants natif ASIC centraux avec un IC_{50} autour de 50nM (Mango et al., 2014). Le NS383, un bloqueur des canaux ASIC1a et ASIC3 et de certains hétéromères, dispose d'une affinité relativement bonne (IC_{50} 600nM-2 μ M) et a produit des effets analgésiques dans différents modèles de douleur, inflammatoire (Complete Freund Adjuvant, CFA, et formaline) et neuropathique (Chronic Constriction Injury, CCI) (Munro et al., 2016). Ces différentes molécules ciblent principalement ASIC1a et ASIC3.

D'autres petites molécules ont été identifiées et méritent d'être mentionnées : certaines de la famille des diarylamidines (antiparasitaires) avec comme évoqué précédemment le diminazène (DA) ainsi que certaines monoamines hydrophobiques (blocage d'ASIC1a et ASIC1b avec des affinités de l'ordre du micro/millimolaire) (Nagaeva et al., 2015; Shteinikov et al., 2018). Le DA s'avère un bloqueur de tous les canaux ASIC, avec la meilleure affinité pour ASIC1b (IC_{50} autour de 200nM, 300nM-2 μ M pour les autres ASIC) (Chen et al., 2010; Krauson et al., 2018; Lee et al., 2017). A forte concentration (1 μ M), il parvient à bloquer la quasi-intégralité du courant ASIC1b, contrairement à ASIC1a et ASIC2a. Le site d'action sur le canal est différent selon les études : initialement, une région du domaine pouce en contact avec celui β balle fut proposée (Chen et al., 2010). Une autre étude a proposé un mécanisme de type pore bloqueur et dépendant du potentiel de membrane (Lee et al., 2017; Mazzocchi et al., 2019; Schmidt et al., 2017). L'application du diminazène en même temps que la perfusion d'acide suffit à bloquer les ASIC. Ce composé a démontré des effets analgésiques chez le rat dans le modèle CFA (Lee et al., 2017). Récemment, il a été montré que certains dérivés des diminazènes, connus pour bloquer les canaux ASIC (Krauson et al., 2018; Lee et al., 2017; Schmidt et al., 2017), pouvaient agir sur ASIC2a, cible disposant de peu d'outils pharmacologiques spécifiques comparée aux autres ASIC (Bencheva et al., 2019).

Enfin, une étude récente a permis le développement d'un anticorps sélectif contre ASIC1a (IC_{50} 85nM, effet maximal autour de 300nM). Il permet un blocage de l'ouverture du canal, de façon longue et irréversible. Cet anticorps n'agit pas sur l'inactivation, comme la toxine PcTx1 et démontre

des effets *in vivo* intéressants suite à une injection *icv* (modèle d'ischémie cérébrale) (Qiang et al., 2018).

3. Molécules endogènes

Un nombre important de modulateurs endogènes ont été identifiés comme régulateurs des canaux ASIC. La plupart d'entre eux a également un lien avec la douleur, étant retrouvés et produits lors d'une inflammation par exemple (Ortega-Ramírez et al., 2017).

a. Amines et polyamines

Différentes molécules de cette famille sont capables de moduler l'activité des canaux ASIC. La spermine, une polyamine notamment produite dans le SNC suite à des traumatismes crâniens par exemple et présente dans des vésicules synaptiques, est capable de déplacer la courbe d'inactivation des canaux ASIC1a et ASIC1b vers des pH plus acides, pouvant de ce fait augmenter le nombre de canaux disponibles pour activation lors d'acidose modérée. La spermine permet donc de potentialiser les canaux ASIC1a et ASIC1b, avec une EC_{50} autour de $500\mu\text{M}$, une valeur retrouvée dans les vésicules la contenant.

Suite à la découverte du site proton-indépendant d'ASIC3, il a été prouvé que plusieurs polyamines (agmatine, arcaïne, métabolites de l'arginine retrouvés dans l'inflammation ou les infections) ainsi que la sérotonine (EC_{50} : $40\mu\text{M}$) pouvaient potentialiser les canaux ASIC3, ASIC3+1a (pour la sérotonine uniquement) et ASIC3+1b via ce site de liaison (Li et al., 2010; Yu et al., 2010). Les concentrations nécessaires d'agmatine et des autres dérivés pour produire ces effets sont de l'ordre du millimolaire (1-10mM). Bien qu'il soit peu probable que de telles concentrations soient retrouvées *in situ*, l'étude de (Li et al., 2010) ainsi que des travaux précédents de l'équipe (Deval et al., 2008), montrent que plusieurs médiateurs peuvent agir de façon synergique sur l'activité du canal ASIC3, pouvant nécessiter de ce fait des concentrations moindres de chacun d'entre eux. L'injection de ces molécules produit un comportement douloureux chez l'animal, un effet en partie estompé chez des souris KO ASIC3. La sérotonine peut aussi agir sur les ASIC *via* l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Qiu et al., 2012b).

Il a été récemment montré que l'histamine à haute concentration ($200\mu\text{M}$ -1mM) était capable de potentialiser fortement et sélectivement ASIC1a (Nagaeva et al., 2016). L'histamine induit un changement de la sensibilité aux protons d'ASIC1a (activation pour des pH plus basique), résultant en une potentialisation plus forte pour des pH proches de celui de demi-activation d'ASIC1a. Cette augmentation fut observée récemment au niveau des neurones centraux dans les courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) et ASIC1a-dépendant (González-Inchauspe et al., 2019).

b. Neuropeptides

Deux grandes familles de neuropeptides ont été décrites à ce jour comme pouvant moduler les canaux ASIC. On retrouve les peptides FMRFamide et ses dérivés RFamide (comme les neuropeptides FF et SF) agissant sur ASIC1a, ASIC1b et ASIC3 ainsi que sur les courants ASIC des neurones sensoriels (Askwith et al., 2000; Deval et al., 2003). La deuxième famille est celle des peptides opioïdes endogènes avec la dynorphine et les endomorphines qui vont agir sur ASIC1a et ASIC1b et les ASIC des neurones centraux (dynorphine) ainsi que sur ASIC3 et les ASIC des neurones sensoriels (endomorphine) (Farrag et al., 2017; Sherwood and Askwith, 2009; Vick and Askwith, 2015). Un criblage récent sur plus de 100 peptides (petite taille, <20 acides aminés) et testés sur ASIC1a, ASIC1b, ASIC3, ASIC4 et BASIC n'a pas permis d'identifier de nouveaux modulateurs, mais a confirmé les effets de la dynorphine et des endomorphines. Seul un autre peptide apparenté au FMRFamide, le YFMRFamide (non retrouvé chez les mammifères), a été identifié (inhibition d'ASIC1b et ralentissement de l'inactivation d'ASIC1b et ASIC3) (Vyvers et al., 2018).

Les mécanismes d'action sont globalement similaires pour les deux familles : un changement de la courbe d'inactivation des canaux ASIC vers des pH plus acides, limitant le nombre de canaux dans un état désensibilisé. Les peptides FMRFamide peuvent aussi ralentir l'inactivation, résultant en une augmentation des courants soutenus (Askwith et al., 2000; Chen et al., 2006c; Deval et al., 2003). Les endomorphines ont en plus une action sur les courbes d'activation (changement vers des pH plus basiques) augmentant aussi sensiblement les courants soutenus (Farrag et al., 2017). Les sites d'actions sur le canal de ces deux types de peptide semblent différents cependant (Bargeton et al., 2019; Frey et al., 2013; Sherwood and Askwith, 2009). La gamme de concentration effective de ces neuropeptides est assez similaire (EC_{50} 10-50 μ M, à l'exception du peptide « big dynorphin » correspondant à la fusion de la dynorphine a et b, ayant une EC_{50} de 26nM). Ces neuropeptides vont être retrouvés en particulier dans le SNC (par exemple dans la moelle dorsale pour le NPFF, et la dynorphine dans une moindre mesure). Leur libération dans des modèles de douleur chez l'animal et dans des situations cliniques chez l'homme est également bien établie (Podvin et al., 2016; Yang and Iadarola, 2006). En plus de leur action sur leur récepteur respectif, un effet sur les canaux ASIC est donc à considérer.

c. NO et composés oxydants/réducteurs

Le NO est un médiateur gazeux aux fonctions biologiques multiples, régulant un nombre important de phénomènes (vasculaires, neuronaux, immunologiques etc.) et agissant principalement *via* l'activation de la sGC et la voie GMPc/PKG ou *via* une action directe (nitrosylation de résidues cystéine) (Ahern et al., 2002; MacMicking et al., 1997; Miclescu and Gordh, 2009; Moncada et al.,

1991; Palmer et al., 1988). Le NO est capable de potentialiser les courants ASIC natifs des neurones sensoriels, ainsi que tous les canaux ASIC recombinants de façon réversible, sauf pour ASIC1b. Un effet similaire a été obtenu avec l'H₂O₂. L'effet du NO passe par un changement subtil des courbes d'activations vers des pH plus basiques. L'effet sur les ASIC est indépendant de la voie GMPc/PKG et serait localisé au sein de la boucle extracellulaire, du moins pour ASIC2a. Il convient de noter qu'ASIC1b est le seul à avoir deux cystéines intracellulaires localisées en N-ter, pouvant potentiellement expliquer la potentialisation beaucoup plus longue par rapport aux autres ASIC. L'effet du NO est retrouvé pour des concentrations de 10µM. Une telle concentration peut être potentiellement atteinte lors de l'activation de l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase, principalement localisée dans des cellules immunitaires comme les macrophages) (Ahern et al., 2002). Chez l'homme (volontaires sains), le prétraitement de la peau par un donneur de NO potentialise la douleur acide induite par iontophorèse (Cadiou et al., 2007).

D'autres études se sont intéressées aux effets de molécules oxydantes ou réductrices sur les canaux ASIC, avec des conclusions parfois différentes (Andrey et al., 2005; Cho and Askwith, 2007; Chu et al., 2006). Toutes les études ont retrouvé un effet potentialisateur du dithiothreitol (DTT), un agent réducteur, avec parfois des différences dans les sous-unités impliquées (ASIC1a uniquement versus tous les ASIC). Contrairement à Cadiou et al., 2007, les autres études utilisant un agent oxydant différent du NO, comme le 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid (DTNB) ou le H₂O₂, ont observé une inhibition des courants ASIC (Chu et al., 2006; Zha et al., 2009b).

d. Lipides

Différents lipides ont été identifiés comme régulateurs des canaux ASIC. L'acide arachidonique (AA) et la lysophosphatidylcholine (LPC) par exemple font partis des nombreux métabolites produits par la dégradation des phospholipides membranaires, notamment en cas d'inflammation. L'AA (1-10µM) potentialise les canaux ASIC1a, ASIC2a et ASIC3, ainsi que les courants ASIC natifs dans les neurones sensoriels et centraux. Un effet similaire a été observé avec l'anandamide, un ligand endogène des récepteurs canabinoïdes et ayant la même chaîne carbonée que l'AA (Allen and Attwell, 2002; Smith et al., 2007). L'AA induit un décalage de la courbe d'activation des canaux ASIC vers des valeurs de pH plus basiques, *via* potentiellement une action directe (interface membrane-canal) (Deval et al., 2008). Récemment, la LPC, un lipide retrouvé en quantité abondante dans des exsudats articulaires humains, a été identifiée au laboratoire comme étant un activateur direct du canal ASIC3 à pH physiologique, en plus de pouvoir potentialiser son activation par des pH acides (1-10µM, 5-10µM pour activation). L'injection intraplantaire de ce lipide produit une douleur spontanée chez l'animal qui est ASIC3-dépendante (Marra et al., 2016). Par

contre, les phosphatidylinositol 3/4/5-phosphate (PIP-PIP3) ne régulent pas ASIC1a, ASIC2a et ASIC3 (Kweon et al., 2015).

e. Lactate et ATP

Ces deux médiateurs sont produits notamment lors d'ischémie et d'effort intense au niveau musculaire. Une activité cellulaire importante ou une inflammation peuvent également être à l'origine de leur production (Huang et al.; Wright et al., 2018). Le lactate potentialise les courants ASIC1a et ASIC3, ainsi que les courants ASIC natifs des neurones sensoriels, en particulier ceux innervant le cœur (Immke and McCleskey, 2001; Sutherland et al., 2001). Cet effet potentialisateur serait indirect et passerait par une chélation du calcium extracellulaire, supprimant donc le blocage de ce dernier sur les ASIC. Un effet du lactate dans l'activation des canaux ASIC1a du SNC a également été décrite récemment (Nomura et al., 2018).

L'ATP a un effet dichotomique : il potentialise les courants ASIC natifs des neurones sensoriels innervant les muscles, *via* la formation d'un complexe ASIC-P2X5 (réalisé avec ASIC1a et ASIC3), résultant en une augmentation de la sensibilité des ASIC pour les protons (changement de la courbe d'activation vers des pH plus basiques) (Birdsong et al., 2010; Light et al., 2008) ; à l'inverse il a été récemment montré qu'une association étroite entre ASIC3 (mais aussi ASIC1a et ASIC2a) et P2X3 existait: la coexpression des deux canaux réduit fortement le courant des ASIC en réponse aux protons ainsi que celle des P2X3 à l'ATP. En particulier, l'application d'un agoniste spécifique de P2X3 en solution acide réduit le courant P2X3 uniquement quand ASIC3 est présent dans la cellule. L'inverse pour ASIC3 n'est pas observé. De façon surprenante, cette association change aussi la sélectivité ionique des deux canaux. Un effet synergique de l'acide et d'un agoniste P2X3 sur le développement d'une allodynie mécanique est aussi observé chez le rat (Stephan et al., 2018).

f. Protéases

Différentes protéases ont été identifiées comme modulatrices des canaux ASIC. Ces enzymes peuvent être sécrétées par des mastocytes (trypsine et apparenté) ou produites lors de lésions tissulaires (kallikréine). Les enzymes de la famille des sérines protéases (trypsine, chymotrypsine...) ainsi que la kallikréine vont agir sur les canaux ASIC1a et dans une moindre mesure sur ASIC1b, modifiant les courbes d'activation (changement vers des pH plus acides) et/ou d'inactivation (décalage vers des pH plus basiques ou acides, selon la protéase et le canal ASIC) et les vitesses d'inactivation et de réactivation (Poirot et al., 2004; Su et al., 2011; Vukicevic et al., 2006). Ces enzymes peuvent avoir un double effet sur les ASIC : direct ou indirect via les récepteurs PAR2.

4. Autres toxines peptidiques

Deux autres toxines d'araignée proches de PcTx1 furent identifiées. La toxine Hm3a, extraite du venin de l'araignée *Heteroscodra maculata* originaire du Togo. Elle compte 37 acides aminés et une haute similarité à PcTx1 (5 acides aminés de différence). Ses effets sur ASIC1a et ASIC1b semblent similaires, cependant elle a une meilleure stabilité *in vivo* (Er et al., 2017). L'autre toxine est Hi1a, extraite du venin de l'araignée d'*Hadronyche infensa* (Australie), composée de 75 acides aminés et formée par deux peptides semblables à PcTx1 en tandem (62% et 50% de similitude à PcTx1 pour chaque partie) (Chassagnon et al., 2017). Son IC50 sur ASIC1a est de 0.4nM et à forte concentration (1µM) elle est capable de potentialiser ASIC1b. Elle n'a pas d'effet sur ASIC2a et ASIC3. Son intérêt réside dans son mode d'action : son effet inhibiteur est extrêmement long à laver, à l'inverse de PcTx1 ou des mambalgines. Son effet passerait par une stabilisation de l'état fermé du canal, contrairement à PcTx1 qui se lie à l'état inactivé.

Trois autres toxines ciblant ASIC3 ont été caractérisées. Ugr9-1, provenant du venin d'une anémone de mer également (*Urticina greblnyi*). Elle bloque les canaux ASIC3 (IC50 10µM) et est efficace *in vivo* (modèles CFA et douleur chimique) (Osmakov et al., 2013). Une toxine provenant du venin d'une autre anémone, *Heteractis crispa*, inhibe également ASIC1a et ASIC3 (IC50 autour de 10µM) (Kalina et al., 2018). La troisième identifiée fut extraite d'un cône marin (*Conus textile*) et est apparentée à la famille des peptides FMRFamide. La toxine RPRFamide potentialise ASIC3 et les hétéromères contenant ASIC3, en particulier le courant soutenu (test à 10-100µM). Co-injectée avec de l'acide chez l'animal, elle potentialise fortement les effets douloureux de ce dernier ; effet qui est perdu chez les souris KO ASIC3 (Reimers et al., 2017).

Enfin, deux autres toxines moins bien caractérisées ont été testées sur des canaux ASIC natifs des neurones sensoriels. Il s'agit de PhcrTx1, provenant de *Phymanthus crucifer*, une anémone de mer. Elle peut bloquer jusqu'à 40% du courant ASIC, avec une IC50 de 100nM (effet maximal pour 1µM) (Rodriguez et al., 2014). La dernière identifiée est l' α -dendrotoxine, issue du mamba vert et connue pour bloquer certains Kv (les Kv1.x). Elle est assez similaire à la sous-unité α de la MitTx, ayant 55% d'homologie avec elle. Elle se lie sur l'état fermé des canaux et peut bloquer jusqu'à 80% des courants, avec une affinité proche du micromolaire (Báez et al., 2015).

En plus des toxines animales détaillées ci-dessus, d'autres composés naturels, extraits de végétaux notamment, se sont aussi avérés être des modulateurs potentiels des canaux ASIC. On peut brièvement mentionner la gastrodine (extraite d'une plante asiatique), bloqueur non sélectif des canaux ASIC des neurones sensoriels (IC₅₀ supérieur à 1-10µM) et efficace dans différents modèles de douleur (injection d'acide, inflammation, migraine) (Qiu et al., 2014b; Wang et al., 2016a; Xiao et al.,

2016) ainsi que la lindholdamine, extraite du laurier, et capable d'activer ASIC3 sans acidification à des concentrations de 0.1 à 1mM (Osmakov et al., 2017).

Annexe 4 : Communications orales et affichées

- 2^{ème} Congrès « Jeunes chercheurs » Labex ICST, Nice, 2016 / Communication orale : « *Analgesic effects of mambalgin, an inhibitor of ASIC channels, in a rat model of migraine* » (**Prix** de la meilleure présentation orale)

- 13^{ème} Symposium national du réseau français de recherche sur la douleur INSERM, Marseille, 2017 / Communication orale : « *Analgesic effects of ASIC channels inhibitors in a rat model of migraine* »

- Congrès NeuroFrance, Société des Neurosciences, Bordeaux, 2017 / Communication affichée : « *Inhibition of ASIC channels in a rat model of migraine results in potent analgesic effects* » (**Lauréat** « travel grant » étudiant)

- 28^{ème} Colloque des canaux ioniques, Sète, 2017 / Communication orale : « *Inhibition of ASIC1 channels in a rat model of migraine induces potent analgesic effects* » (**Prix** de la meilleure présentation orale)

- 17^{ème} Congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement de la douleur (SFETD), Nice, 2017 / Communication orale : « *Les canaux ASIC, nouvelles cibles thérapeutiques contre la douleur migraineuse ?* »

- 3^{ème} Congrès du Labex ICST (canaux ioniques d'intérêt thérapeutique), Lille, 2017 / Communication orale: « *Inhibition of ASIC1 channels in a rat model of migraine induces potent analgesic effects*»

- Congrès Pain Mechanisms And Therapeutics, Taormina (Italie), 2018 / Communication orale: « *Analgesic effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels in a rodent model of migraine* »

- 3^{ème} Congrès « Jeunes chercheurs » Labex ICST, Montpellier, 2019 / Communication orale: « *Roles and regulations of Acid-Sensing Ion Channel 1b in pain perception* »

Références bibliographiques

- Abad, N., Rosenberg, J.T., Roussel, T., Grice, D.C., Harrington, M.G., and Grant, S.C. (2017). Metabolic assessment of a migraine model using relaxation-enhanced (1) H spectroscopy at ultrahigh field. *Magn. Reson. Med.*
- Abad, N., Rosenberg, J.T., Hike, D.C., Harrington, M.G., and Grant, S.C. (2018). Dynamic Sodium Imaging at Ultra-High Field Reveals Progression in a Preclinical Migraine Model. *Pain.*
- Abraira, V.E., and Ginty, D.D. (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron* 79, 618–639.
- Abraira, V.E., Kuehn, E.D., Chirila, A.M., Springel, M.W., Toliver, A.A., Zimmerman, A.L., Orefice, L.L., Boyle, K.A., Bai, L., Song, B.J., et al. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168, 295-310.e19.
- Adams, A.M., Serrano, D., Buse, D.C., Reed, M.L., Marske, V., Fanning, K.M., and Lipton, R.B. (2015). The impact of chronic migraine: The Chronic Migraine Epidemiology and Outcomes (CaMEO) Study methods and baseline results. *Cephalalgia Int. J. Headache* 35, 563–578.
- Adelman, P., Baumbauer, K., Friedman, R., Shah, M., Wright, M., Young, E., Jankowski, M.P., Albers, K.M., and Koerber, H.R. (2019). Single cell q-PCR derived expression profiles of identified sensory neurons. *BioRxiv* 560672.
- Afridi, S.K., Kaube, H., and Goadsby, P.J. (2004). Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain* 110, 675–680.
- Afridi, S.K., Matharu, M.S., Lee, L., Kaube, H., Friston, K.J., Frackowiak, R.S.J., and Goadsby, P.J. (2005). A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain J. Neurol.* 128, 932–939.
- Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S., and Raftery, M.A. (1978). Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2606–2610.
- Ahern, G.P., Klyachko, V.A., and Jackson, M.B. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 25, 510–517.
- Aissouni, Y., Guerrab, A.E., Hamieh, A.M., Ferrier, J., Chalus, M., Lemaire, D., Grégoire, S., Etienne, M., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2017). Acid-Sensing Ion Channel 1a in the amygdala is involved in pain and anxiety-related behaviours associated with arthritis. *Sci. Rep.* 7, 43617.
- Akcali, D., Sayin, A., Sara, Y., and Bolay, H. (2010). Does single cortical spreading depression elicit pain behaviour in freely moving rats? *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 1195–1206.
- Akerman, S., and Goadsby, P.J. (2015). Neuronal PAC1 receptors mediate delayed activation and sensitization of trigeminocervical neurons: Relevance to migraine. *Sci. Transl. Med.* 7, 308ra157.
- Akerman, S., Holland, P.R., and Goadsby, P.J. (2011). Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 570–584.
- Akerman, S., Karsan, N., Bose, P., Hoffmann, J.R., Holland, P.R., Romero-Reyes, M., and Goadsby, P.J. (2019). Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain J. Neurol.* 142, 103–119.

- Akopian, A.N., Chen, C.C., Ding, Y., Cesare, P., and Wood, J.N. (2000). A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* *11*, 2217–2222.
- Albers, K.M., Woodbury, C.J., Ritter, A.M., Davis, B.M., and Koerber, H.R. (2006). Glial cell-line-derived neurotrophic factor expression in skin alters the mechanical sensitivity of cutaneous nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 2981–2990.
- Ali, A., Ahmad, F.J., Pillai, K.K., and Vohora, D. (2004). Evidence of the antiepileptic potential of amiloride with neuropharmacological benefits in rodent models of epilepsy and behavior. *Epilepsy Behav.* *EB 5*, 322–328.
- Ali, A., Ahmad, F.J., Pillai, K.K., and Vohora, D. (2005). Amiloride protects against pentylentetrazole-induced kindling in mice. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 880–884.
- Ali, A., Kolappa Pillai, K., Jalees Ahmad, F., Dua, Y., Iqbal Khan, Z., and Vohora, D. (2007). Comparative efficacy of liposome-entrapped amiloride and free amiloride in animal models of seizures and serum potassium in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *17*, 227–229.
- Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2012). Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline. *J Biol Chem* *287*, 36059–36070.
- Alijevic, O., Hammoud, H., Vaithia, A., Trendafilov, V., Bollenbach, M., Schmitt, M., Bihel, F., and Kellenberger, S. (2018). Heteroarylguanidines as Allosteric Modulators of ASIC1a and ASIC3 Channels. *ACS Chem. Neurosci.*
- Allen, N.J., and Attwell, D. (2002). Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* *543*, 521–529.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* *25*, 2368–2376.
- Alvarez de la Rosa, D., Zhang, P., Shao, D., White, F., and Canessa, C.M. (2002). Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 2326–2331.
- Alves, D.P., da Motta, P.G., Lima, P.P., Queiroz-Junior, C.M., Caliari, M.V., Pacheco, D.F., Pacheco, C.F., Francischi, J.N., and Duarte, I.D.G. (2012). Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: the role of endogenous opioid peptides. *Pharmacology* *89*, 22–28.
- Amaya, F., Izumi, Y., Matsuda, M., and Sasaki, M. (2013). Tissue Injury and Related Mediators of Pain Exacerbation. *Curr. Neuropharmacol.* *11*, 592–597.
- Amin, F.M., Hougaard, A., Cramer, S.P., Christensen, C.E., Wolfram, F., Larsson, H.B.W., and Ashina, M. (2017). Intact blood-brain barrier during spontaneous attacks of migraine without aura: a 3T DCE-MRI study. *Eur. J. Neurol.*
- Andreev, Y.A., Osmakov, D.I., Koshelev, S.G., Maleeva, E.E., Logashina, Y.A., Palikov, V.A., Palikova, Y.A., Dyachenko, I.A., and Kozlov, S.A. (2018). Analgesic Activity of Acid-Sensing Ion Channel 3 (ASIC3) Inhibitors: Sea Anemones Peptides Ugr9-1 and APETx2 versus Low Molecular Weight Compounds. *Mar. Drugs* *16*.

- Andreou, A.P., and Oshinsky, M.L. (2015). Animal Models of Migraine. In Pathophysiology of Headaches, M. Ashina, and P. Geppetti, eds. (Springer International Publishing), pp. 31–66.
- Andres, K.H., von Düring, M., Muszynski, K., and Schmidt, R.F. (1987). Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* 175, 289–301.
- Andres-Enguix, I., Shang, L., Stansfeld, P.J., Morahan, J.M., Sansom, M.S.P., Lafrenière, R.G., Roy, B., Griffiths, L.R., Rouleau, G.A., Ebers, G.C., et al. (2012). Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. *Sci. Rep.* 2, 237.
- Andrey, F., Tsintsadze, T., Volkova, T., Lozovaya, N., and Krishtal, O. (2005). Acid sensing ionic channels: modulation by redox reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 1–6.
- Anzai, N., Deval, E., Schaefer, L., Friend, V., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2002). The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 16655–16661.
- Arakaki, X., Galbraith, G., Pikov, V., Fonteh, A.N., and Harrington, M.G. (2014). Altered brainstem auditory evoked potentials in a rat central sensitization model are similar to those in migraine. *Brain Res.* 1563, 110–121.
- Arcourt, A., Gorham, L., Dhandapani, R., Prato, V., Taberner, F.J., Wende, H., Gangadharan, V., Birchmeier, C., Heppenstall, P.A., and Lechner, S.G. (2017). Touch Receptor-Derived Sensory Information Alleviates Acute Pain Signaling and Fine-Tunes Nociceptive Reflex Coordination. *Neuron* 93, 179–193.
- Arias, R.L., Sung, M.-L.A., Vasylyev, D., Zhang, M.-Y., Albinson, K., Kubek, K., Kagan, N., Beyer, C., Lin, Q., Dwyer, J.M., et al. (2008). Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 31, 334–341.
- Arteaga, M.F., Coric, T., Straub, C., and Canessa, C.M. (2008). A brain-specific SGK1 splice isoform regulates expression of ASIC1 in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4459–4464.
- Ashina, M., Bendtsen, L., Jensen, R., Schifter, S., and Olesen, J. (2001). Calcitonin gene-related peptide levels during nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache. *Eur. J. Neurol.* 8, 173–178.
- Ashina, M., Hansen, J.M., and Olesen, J. (2013). Pearls and pitfalls in human pharmacological models of migraine: 30 years' experience. *Cephalalgia Int. J. Headache* 33, 540–553.
- Ashina, M., Hansen, J.M., Á Dunga, B.O., and Olesen, J. (2017). Human models of migraine - short-term pain for long-term gain. *Nat. Rev. Neurol.*
- Ashina, M., Hansen, J.M., Do, T.P., Melo-Carrillo, A., Burstein, R., and Moskowitz, M.A. (2019). Migraine and the trigeminovascular system-40 years and counting. *Lancet Neurol.*
- Askwith, C.C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26, 133–141.
- Askwith, C.C., Benson, C.J., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2001). DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6459–6463.

- Askwith, C.C., Wemmie, J.A., Price, M.P., Rokhlina, T., and Welsh, M.J. (2004). Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 18296–18305.
- Athie, M.C.P., Vieira, A.S., Teixeira, J.M., Dos Santos, G.G., Dias, E.V., Tambeli, C.H., Sartori, C.R., and Parada, C.A. (2018). Transcriptome analysis of dorsal root ganglia's diabetic neuropathy reveals mechanisms involved in pain and regeneration. *Life Sci.*
- Averbeck, B., and Reeh, P.W. (2001). Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E(2) from isolated rat skin. *Neuropharmacology* 40, 416–423.
- Avona, A., Burgos-Vega, C., Burton, M.D., Akopian, A., Price, T.J., and Dussor, G. (2019). Dural calcitonin gene-related peptide produces female-specific responses in rodent migraine models. *J. Neurosci.* 0364–19.
- Ayata, C., Jin, H., Kudo, C., Dalkara, T., and Moskowitz, M.A. (2006). Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann. Neurol.* 59, 652–661.
- Babini, E., Paukert, M., Geisler, H.-S., and Grunder, S. (2002). Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J. Biol. Chem.* 277, 41597–41603.
- Babinski, K., Le, K.T., and Seguela, P. (1999). Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 72, 51–57.
- Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G., and Séguéla, P. (2000). Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. *J. Biol. Chem.* 275, 28519–28525.
- Baconguis, I., and Gouaux, E. (2012). Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* 489, 400–405.
- Baconguis, I., Bohlen, C.J., Goehring, A., Julius, D., and Gouaux, E. (2014). X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁺-selective channel. *Cell* 156, 717–729.
- Báez, A., Salceda, E., Fló, M., Graña, M., Fernández, C., Vega, R., and Soto, E. (2015). α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. *Neurosci. Lett.* 606, 42–47.
- Bagdy, G., Riba, P., Kecskeméti, V., Chase, D., and Juhász, G. (2010). Headache-type adverse effects of NO donors: vasodilation and beyond. *Br. J. Pharmacol.* 160, 20–35.
- Bai, L., Lehnert, B.P., Liu, J., Neubarth, N.L., Dickendesher, T.L., Nwe, P.H., Cassidy, C., Woodbury, C.J., and Ginty, D.D. (2015). Genetic Identification of an Expansive Mechanoreceptor Sensitive to Skin Stroking. *Cell* 163, 1783–1795.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.
- Baliki, M.N., and Apkarian, A.V. (2015). Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron* 87, 474–491.

- Bangash, M.A., Alles, S.R.A., Santana-Varela, S., Millet, Q., Sikandar, S., de Clauser, L., ter Heegde, F., Habib, A.M., Pereira, V., Sexton, J.E., et al. (2018). Distinct transcriptional responses of mouse sensory neurons in models of human chronic pain conditions. *Wellcome Open Res.* *3*, 78.
- Banzi, R., Cusi, C., Randazzo, C., Sterzi, R., Tedesco, D., and Moja, L. (2015). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) for the prevention of migraine in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* *4*, CD002919.
- Baral, P., Udit, S., and Chiu, I.M. (2019). Pain and immunity: implications for host defence. *Nat. Rev. Immunol.*
- Bardoni, R., Takazawa, T., Tong, C.-K., Choudhury, P., Scherrer, G., and Macdermott, A.B. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1279*, 90–96.
- Bardoni, R., Tawfik, V.L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S.A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., et al. (2014). Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* *81*, 1312–1327.
- Bardwell, A.J., Frankson, E., and Bardwell, L. (2009). Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J. Biol. Chem.* *284*, 13165–13173.
- Bargeton, B., Iwaszkiewicz, J., Bonifacio, G., Roy, S., Zoete, V., and Kellenberger, S. (2019). Mutations in the palm domain disrupt modulation of acid-sensing ion channel 1a currents by neuropeptides. *Sci. Rep.* *9*, 2599.
- Baron, A., and Lingueglia, E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* *94*, 19–35.
- Baron, A., Schaefer, L., Lingueglia, E., Champigny, G., and Lazdunski, M. (2001). Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J. Biol. Chem.* *276*, 35361–35367.
- Baron, A., Deval, E., Salinas, M., Lingueglia, E., Voilley, N., and Lazdunski, M. (2002a). Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *J. Biol. Chem.* *277*, 50463–50468.
- Baron, A., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (2002b). ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* *539*, 485–494.
- Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). Acid Sensing Ion Channels in Dorsal Spinal Cord Neurons. *J. Neurosci.* *28*, 1498–1508.
- Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noël, J., and Lingueglia, E. (2013). Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *75*, 187–204.
- Baron, R., Schattschneider, J., Binder, A., Siebrecht, D., and Wasner, G. (2002c). Relation between sympathetic vasoconstrictor activity and pain and hyperalgesia in complex regional pain syndromes: a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* *359*, 1655–1660.
- Bartoi, T., Augustinowski, K., Polleichtner, G., Gründer, S., and Ulbrich, M.H. (2014). Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2:1/1:2 stoichiometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8281–8286.

- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.
- Bashari, E., Qadri, Y.J., Zhou, Z.-H., Kapoor, N., Anderson, S.J., Meltzer, R.H., Fuller, C.M., and Benos, D.J. (2009). Two PKC consensus sites on human acid-sensing ion channel 1b differentially regulate its function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C372-384.
- Bassilana, F., Champigny, G., Waldmann, R., de Weille, J.R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. *J. Biol. Chem.* 272, 28819–28822.
- Bässler, E.L., Ngo-Anh, T.J., Geisler, H.S., Ruppertsberg, J.P., and Gründer, S. (2001). Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J. Biol. Chem.* 276, 33782–33787.
- Basso, L., Aboushousha, R., Fan, C.Y., Iftinca, M., Melo, H., Flynn, R., Agosti, F., Hollenberg, M.D., Thompson, R., Bourinet, E., et al. (2019). TRPV1 promotes opioid analgesia during inflammation. *Sci Signal* 12, eaav0711.
- Bates, E.A., Nikai, T., Brennan, K.C., Fu, Y.-H., Charles, A.C., Basbaum, A.I., Ptáček, L.J., and Ahn, A.H. (2010). Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 170–178.
- Baumann, T.K., Burchiel, K.J., Ingram, S.L., and Martenson, M.E. (1996). Responses of adult human dorsal root ganglion neurons in culture to capsaicin and low pH. *Pain* 65, 31–38.
- Baumann, T.K., Chaudhary, P., and Martenson, M.E. (2004). Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1343–1351.
- Baumbauer, K.M., DeBerry, J.J., Adelman, P.C., Miller, R.H., Hachisuka, J., Lee, K.H., Ross, S.E., Koerber, H.R., Davis, B.M., and Albers, K.M. (2015). Keratinocytes can modulate and directly initiate nociceptive responses. *ELife* 4.
- Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269–1282.
- Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.-E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204–208.
- Bautista, D.M., Sigal, Y.M., Milstein, A.D., Garrison, J.L., Zorn, J.A., Tsuruda, P.R., Nicoll, R.A., and Julius, D. (2008). Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* 11, 772–779.
- Bautista, D.M., Wilson, S.R., and Hoon, M.A. (2014). Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat. Neurosci.* 17, 175–182.
- Beaulieu-Laroche, L., Christin, M., Donoghue, A., Agosti, F., Yousefpour, N., Petitjean, H., Davidova, A., Stanton, C., Khan, U., Dietz, C., et al. (2018). TACAN is an essential component of the mechanosensitive ion channel responsible for pain sensing. *BioRxiv* 338673.

- Bellantonio, P., Micieli, G., Buzzi, M.G., Marcheselli, S., Castellano, A.E., Rossi, F., and Nappi, G. (1997). Haemodynamic correlates of early and delayed responses to sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraine patients: a transcranial Doppler study. *Cephalalgia Int. J. Headache* 17, 183–187.
- Ben Aissa, M., Tipton, A.F., Bertels, Z., Gandhi, R., Moye, L.S., Novack, M., Bennett, B.M., Wang, Y., Litosh, V., Lee, S.H., et al. (2017). Soluble guanylyl cyclase is a critical regulator of migraine-associated pain. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417737778.
- Benatto, M.T., Florencio, L.L., Carvalho, G.F., Dach, F., Bigal, M.E., Chaves, T.C., and Bevilacqua-Grossi, D. (2017). Cutaneous allodynia is more frequent in chronic migraine, and its presence and severity seems to be more associated with the duration of the disease. *Arq. Neuropsiquiatr.* 75, 153–159.
- Bencheva, L.I., De Matteo, M., Ferrante, L., Ferrara, M., Prandi, A., Randazzo, P., Ronzoni, S., Sinisi, R., Seneci, P., Summa, V., et al. (2019). Identification of Isoform 2 Acid-Sensing Ion Channel Inhibitors as Tool Compounds for Target Validation Studies in CNS. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 627–632.
- Bennett, D.L., Clark, A.J., Huang, J., Waxman, S.G., and Dib-Hajj, S.D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol. Rev.* 99, 1079–1151.
- Benson, C.J., Eckert, S.P., and McCleskey, E.W. (1999). Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ. Res.* 84, 921–928.
- Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2002). Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2338–2343.
- Berdiev, B.K., Xia, J., Jovov, B., Markert, J.M., Mapstone, T.B., Gillespie, G.Y., Fuller, C.M., Bubien, J.K., and Benos, D.J. (2002). Protein kinase C isoform antagonism controls BNaC2 (ASIC1) function. *J. Biol. Chem.* 277, 45734–45740.
- Berdiev, B.K., Xia, J., McLean, L.A., Markert, J.M., Gillespie, G.Y., Mapstone, T.B., Naren, A.P., Jovov, B., Bubien, J.K., Ji, H.L., et al. (2003). Acid-sensing ion channels in malignant gliomas. *J Biol Chem* 278, 15023–15034.
- Bernstein, C.A., Nir, R.-R., Nosedá, R., Fulton, A.B., Huntington, S., Lee, A.J., Bertisch, S.M., Hovaguimian, A., Buettner, C., Borsook, D., et al. (2019). The migraine eye: distinct rod-driven retinal pathways' response to dim light challenges the visual cortex hyperexcitability theory. *Pain* 160, 569–578.
- Berta, T., Perrin, F.E., Pertin, M., Tonello, R., Liu, Y.-C., Chamesian, A., Kato, A.C., Ji, R.-R., and Decosterd, I. (2017). Gene Expression Profiling of Cutaneous Injured and Non-Injured Nociceptors in SNI Animal Model of Neuropathic Pain. *Sci. Rep.* 7, 9367.
- Besson, T., Lingueglia, E., and Salinas, M. (2017). Pharmacological modulation of Acid-Sensing Ion Channels 1a and 3 by amiloride and 2-guanidine-4-methylquinazoline (GMQ). *Neuropharmacology*.
- Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* 32, 1025–1043.
- Bessou, P., Joffroy, M., and Pagès, B. (1981). Efferents and afferents in an intact muscle nerve: background activity and effects of sural nerve stimulation in the cat. *J. Physiol.* 320, 81–102.

- Bhave, G., Hu, H.-J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12480–12485.
- Bigal, M.E., and Lipton, R.B. (2008). Excessive acute migraine medication use and migraine progression. *Neurology* *71*, 1821–1828.
- Bigal, M.E., Ashina, S., Burstein, R., Reed, M.L., Buse, D., Serrano, D., Lipton, R.B., and AMPP Group (2008). Prevalence and characteristics of allodynia in headache sufferers: a population study. *Neurology* *70*, 1525–1533.
- Birdsong, W.T., Fierro, L., Williams, F.G., Spelta, V., Naves, L.A., Knowles, M., Marsh-Haffner, J., Adelman, J.P., Almers, W., Elde, R.P., et al. (2010). Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. *Neuron* *68*, 739–749.
- Blair, N.T., and Bean, B.P. (2002). Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 10277–10290.
- Blanchard, M.G., and Kellenberger, S. (2011). Effect of a temperature increase in the non-noxious range on proton-evoked ASIC and TRPV1 activity. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* *461*, 123–139.
- Blanchard, M.G., Rash, L.D., and Kellenberger, S. (2012). Inhibition of voltage-gated Na⁽⁺⁾ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br J Pharmacol* *165*, 2167–2177.
- Blandini, F., Rinaldi, L., Tassorelli, C., Sances, G., Motta, M., Samuele, A., Fancellu, R., Nappi, G., and Leon, A. (2006). Peripheral levels of BDNF and NGF in primary headaches. *Cephalalgia Int. J. Headache* *26*, 136–142.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W., and Brenner, D. (2016). TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* *26*, 249–261.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.-J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K₂P channels with unique properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4200–4205.
- de Boer, I., van den Maagdenberg, A.M.J.M., and Terwindt, G.M. (2019). Advance in genetics of migraine. *Curr. Opin. Neurol.*
- Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Chu, C., Gear, R.W., and Levine, J.D. (2012). Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKC ϵ activation of CPEB. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 2018–2026.
- Bohlen, C.J., Chesler, A.T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzky, K.F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E.E., Burlingame, A.L., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* *479*, 410–414.
- Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Peppel, K., Caron, M.G., and Lin, F.T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* *286*, 2495–2498.
- Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F.T., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* *408*, 720–723.

- Boillat, A., Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2014). Calcium entry via TRPV1 but not ASICs induces neuropeptide release from sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *61*, 13–22.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., and Moskowitz, M.A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* *8*, 136–142.
- Bonica, J.J. (1991). History of pain concepts and pain therapy. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* *58*, 191–202.
- Borsook, D., Maleki, N., Becerra, L., and McEwen, B. (2012). Understanding migraine through the lens of maladaptive stress responses: a model disease of allostatic load. *Neuron* *73*, 219–234.
- Borsook, D., Hargreaves, R., Bountra, C., and Porreca, F. (2014). Lost but making progress--Where will new analgesic drugs come from? *Sci. Transl. Med.* *6*, 249sr3.
- Boscardin, E., Alijevic, O., Hummler, E., Frateschi, S., and Kellenberger, S. (2016). The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC): IUPHAR Review 19. *Br J Pharmacol* *173*, 2671–2701.
- Bose, P., Karsan, N., and Goadsby, P.J. (2018). The Migraine Postdrome. *Contin. Minneap. Minn* *24*, 1023–1031.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., and Zamponi, G.W. (2014). Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* *94*, 81–140.
- Bove, G.M., and Moskowitz, M.A. (1997). Primary Afferent Neurons Innervating Guinea Pig Dura. *J. Neurophysiol.* *77*, 299–308.
- Boyer, N., Dallel, R., Artola, A., and Monconduit, L. (2014). General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain* *155*, 1196–1205.
- Brackley, A.D., Gomez, R., Akopian, A.N., Henry, M.A., and Jeske, N.A. (2016). GRK2 Constitutively Governs Peripheral Delta Opioid Receptor Activity. *Cell Rep.* *16*, 2686–2698.
- Brainstorm Consortium, Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H.K., Walters, R.K., Bras, J., Duncan, L., Escott-Price, V., Falcone, G.J., Gormley, P., et al. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science* *360*.
- Brand, J., Smith, E.S.J., Schwefel, D., Lapatsina, L., Poole, K., Omerbašić, D., Kozlenkov, A., Behlke, J., Lewin, G.R., and Daumke, O. (2012). A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. *EMBO J.* *31*, 3635–3646.
- Bray, G.E., Ying, Z., Baillie, L.D., Zhai, R., Mulligan, S.J., and Verge, V.M.K. (2013). Extracellular pH and neuronal depolarization serve as dynamic switches to rapidly mobilize trkA to the membrane of adult sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 8202–8215.
- Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., and Basbaum, A.I. (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* *82*, 522–536.
- Bree, D., and Levy, D. (2016). Development of CGRP-dependent pain and headache related behaviours in a rat model of concussion: Implications for mechanisms of post-traumatic headache. *Cephalalgia Int. J. Headache.*

- Brennan, K.C., Bates, E.A., Shapiro, R.E., Zyuzin, J., Hallows, W.C., Huang, Y., Lee, H.-Y., Jones, C.R., Fu, Y.-H., Charles, A.C., et al. (2013). Casein kinase δ mutations in familial migraine and advanced sleep phase. *Sci. Transl. Med.* 5, 183ra56, 1–11.
- Brierley, S.M., Jones, R.C.W., Gebhart, G.F., and Blackshaw, L.A. (2004). Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology* 127, 166–178.
- Brown, H., Newman, C., Noad, R., and Weatherby, S. (2012). Behavioural management of migraine. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 15, S78–S82.
- Bulboacă, A.E., Bolboacă, S.D., Stănescu, I.C., Sfrângeu, C.A., and Bulboacă, A.C. (2017). Preemptive Analgesic and Antioxidative Effect of Curcumin for Experimental Migraine. *BioMed Res. Int.* 2017, 4754701.
- Bulboacă, A.E., Bolboacă, S.D., Stănescu, I.C., Sfrângeu, C.A., Porfire, A., Tefas, L., and Bulboacă, A.C. (2018). The effect of intravenous administration of liposomal curcumin in addition to sumatriptan treatment in an experimental migraine model in rats. *Int. J. Nanomedicine* 13, 3093–3103.
- Buonvicino, D., Urru, M., Muzzi, M., Ranieri, G., Luceri, C., Oteri, C., Lapucci, A., and Chiarugi, A. (2018). Trigeminal ganglion transcriptome analysis in 2 rat models of medication-overuse headache reveals coherent and widespread induction of pronociceptive gene expression patterns. *Pain* 159, 1980–1988.
- Burch, R. (2019). Antidepressants for Preventive Treatment of Migraine. *Curr. Treat. Options Neurol.* 21, 18.
- Burch, R.C., Loder, S., Loder, E., and Smitherman, T.A. (2015). The prevalence and burden of migraine and severe headache in the United States: updated statistics from government health surveillance studies. *Headache* 55, 21–34.
- Burgess, G., and Williams, D. (2010). The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J. Clin. Invest.* 120, 3753–3759.
- Burgos-Vega, C.C., Quigley, L.D., Avona, A., Price, T., and Dussor, G. (2016). Dural stimulation in rats causes brain-derived neurotrophic factor-dependent priming to subthreshold stimuli including a migraine trigger. *Pain* 157, 2722–2730.
- Burgos-Vega, C.C., Quigley, L.D., Trevisan Dos Santos, G., Yan, F., Asiedu, M., Jacobs, B., Motina, M., Safdar, N., Yousuf, H., Avona, A., et al. (2018). Non-invasive dural stimulation in mice: A novel preclinical model of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102418779557.
- Burstein, R. (2001). Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. *Pain* 89, 107–110.
- Burstein, R., Yamamura, H., Malick, A., and Strassman, A.M. (1998). Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J. Neurophysiol.* 79, 964–982.
- Burstein, R., Cutrer, M.F., and Yarnitsky, D. (2000). The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain J. Neurol.* 123 (Pt 8), 1703–1709.

- Burstein, R., Jakubowski, M., Garcia-Nicas, E., Kainz, V., Bajwa, Z., Hargreaves, R., Becerra, L., and Borsook, D. (2010). Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann. Neurol.* *68*, 81–91.
- Burstein, R., Jakubowski, M., and Rauch, S.D. (2011). The science of migraine. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* *21*, 305–314.
- Bushnell, M.C., Ceko, M., and Low, L.A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 502–511.
- Busserolles, J., Tsantoulas, C., Eschalier, A., and López García, J.A. (2016). Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain* *157 Suppl 1*, S7-14.
- Cabo, R., Gálvez, M.A., San José, I., Laurà, R., López-Muñiz, A., García-Suárez, O., Cobo, T., Insausti, R., and Vega, J.A. (2012). Immunohistochemical localization of acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) in cutaneous Meissner and Pacinian corpuscles of *Macaca fascicularis*. *Neurosci. Lett.* *516*, 197–201.
- Cabo, R., Alonso, P., Viña, E., Vázquez, G., Gago, A., Feito, J., Pérez-Moltó, F.J., García-Suárez, O., and Vega, J.A. (2015). ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem. Cell Biol.* *143*, 267–276.
- Cadiou, H., Studer, M., Jones, N.G., Smith, E.S.J., Ballard, A., McMahon, S.B., and McNaughton, P.A. (2007). Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 13251–13260.
- Cai, Q., Qiu, C.-Y., Qiu, F., Liu, T.-T., Qu, Z.-W., Liu, Y.-M., and Hu, W.-P. (2014). Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* *1554*, 12–20.
- Cai, R., Pan, C., Ghasemigharagoz, A., Todorov, M.I., Förstera, B., Zhao, S., Bhatia, H.S., Parra-Damas, A., Mrowka, L., Theodorou, D., et al. (2019). Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nat. Neurosci.* *22*, 317.
- Calavia, M.G., Montañó, J.A., García-Suárez, O., Feito, J., Guervós, M.A., Germanà, A., Del Valle, M., Pérez-Piñera, P., Cobo, J., and Vega, J.A. (2010). Differential localization of Acid-sensing ion channels 1 and 2 in human cutaneous pacinian corpuscles. *Cell. Mol. Neurobiol.* *30*, 841–848.
- Callejo, G., Castellanos, A., Castany, M., Gual, A., Luna, C., Acosta, M.C., Gallar, J., Giblin, J.P., and Gasull, X. (2015). Acid-sensing ion channels detect moderate acidifications to induce ocular pain. *Pain* *156*, 483–495.
- Campero, M., Serra, J., Bostock, H., and Ochoa, J.L. (2001). Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J. Physiol.* *535*, 855–865.
- Carattino, M.D., and Vecchia, M.C.D. (2012). Contribution of Residues in Second Transmembrane Domain of ASIC1a Protein to Ion Selectivity. *J. Biol. Chem.* *287*, 12927–12934.
- Carlsen, L.N., Munksgaard, S.B., Jensen, R.H., and Bendtsen, L. (2017). Complete detoxification is the most effective treatment of medication-overuse headache: A randomized controlled open-label trial. *Cephalalgia Int. J. Headache* [333102417737779](https://doi.org/10.1177/333102417737779).
- Carnally, S.M., Dev, H.S., Stewart, A.P., Barrera, N.P., Van Bemmelen, M.X., Schild, L., Henderson, R.M., and Edwardson, J.M. (2008). Direct visualization of the trimeric structure of the ASIC1a channel, using AFM imaging. *Biochem Biophys Res Commun* *372*, 752–755.

Castellano, A.E., Micieli, G., Bellantonio, P., Buzzi, M.G., Marcheselli, S., Pompeo, F., Rossi, F., and Nappi, G. (1998). Indomethacin increases the effect of isosorbide dinitrate on cerebral hemodynamic in migraine patients: pathogenetic and therapeutic implications. *Cephalalgia Int. J. Headache* *18*, 622–630.

Castellanos, A., Pujol-Coma, A., Andres-Bilbe, A., Negm, A., Callejo, G., Soto, D., Noël, J., Comes, N., and Gasull, X. (2019). TRESK background K⁺ channel deletion selectively uncovers enhanced mechanical and cold sensitivity. *BioRxiv* 636829.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816–824.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* *398*, 436–441.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* *288*, 306–313.

Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9075–9080.

Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., O'Donnell, D., Nicoll, R.A., Shah, N.M., Julius, D., et al. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 5067–5077.

Cervero, F. (1994). Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol. Rev.* *74*, 95–138.

Cestèle, S., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2013). Nonfunctional Nav1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 17546–17551.

Chai, S., Li, M., Lan, J., Xiong, Z.-G., Saugstad, J.A., and Simon, R.P. (2007). A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J. Biol. Chem.* *282*, 22668–22677.

Chakrabarti, S., Pattison, L.A., Singhal, K., Hockley, J.R.F., Callejo, G., and Smith, E.S.J. (2018). Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a TRPV1-dependent manner. *Neuropharmacology* *143*, 49–62.

Chalfie, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 44–52.

Chamessian, A., Young, M., Qadri, Y., Berta, T., Ji, R.-R., and Ven, T.V. de (2018). Transcriptional Profiling of Somatostatin Interneurons in the Spinal Dorsal Horn. *Sci. Rep.* *8*, 6809.

Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.-L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., et al. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* *20*, 1172–1179.

- Changeux, J.-P., Kasai, M., and Lee, C.-Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *67*, 1241–1247.
- Charles, A.C., and Baca, S.M. (2013). Cortical spreading depression and migraine. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 637–644.
- Chassagnon, I.R., McCarthy, C.A., Chin, Y.K.-Y., Pineda, S.S., Keramidas, A., Mobli, M., Pham, V., De Silva, T.M., Lynch, J.W., Widdop, R.E., et al. (2017). Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Chen, C.-C., and Wong, C.-W. (2013). Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 337–349.
- Chen, Q., and Heinricher, M.M. (2019). Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. *Curr. Rheumatol. Rep.* *21*, 13.
- Chen, S.-T., and Chen, C.C. (2018). A role of ASIC1b in proprioception. *Fed. Eur. Neurosci. Soc. 11th Forum Neurosci. Berl.*
- Chen, X., and Gründer, S. (2007). Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *J. Physiol.* *579*, 657–670.
- Chen, B., Liu, J., Ho, T.-T., Ding, X., and Mo, Y.-Y. (2016a). ERK-mediated NF- κ B activation through ASIC1 in response to acidosis. *Oncogenesis* *5*, e279.
- Chen, C.C., England, S., Akopian, A.N., and Wood, J.N. (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 10240–10245.
- Chen, C.-C., Zimmer, A., Sun, W.-H., Hall, J., Brownstein, M.J., and Zimmer, A. (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 8992–8997.
- Chen, C.-H., Hsu, Y.-T., Chen, C.-C., and Huang, R.-C. (2009). Acid-sensing ion channels in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Physiol.* *587*, 1727–1737.
- Chen, C.-L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., and Ma, Q. (2006a). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* *49*, 365–377.
- Chen, G., Zhang, Y.-Q., Qadri, Y.J., Serhan, C.N., and Ji, R.-R. (2018). Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron* *100*, 1292–1311.
- Chen, M., Tang, W., Hou, L., Liu, R., Dong, Z., Han, X., Zhang, X., Wan, D., and Yu, S. (2015). Tumor Necrosis Factor (TNF) -308G>A, Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) +894G>T Polymorphisms and Migraine Risk: A Meta-Analysis. *PLoS One* *10*, e0129372.
- Chen, S.-P., Tolner, E.A., and Eikermann-Haerter, K. (2016b). Animal models of monogenic migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* *36*, 704–721.
- Chen, S.-P., Qin, T., Seidel, J.L., Zheng, Y., Eikermann, M., Ferrari, M.D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Moskowitz, M.A., Ayata, C., and Eikermann-Haerter, K. (2017). Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain J. Neurol.*

- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* *499*, 295–300.
- Chen, W.-N., Lee, C.-H., Lin, S.-H., Wong, C.-W., Sun, W.-H., Wood, J.N., and Chen, C.-C. (2014). Roles of ASIC3, TRPV1, and Nav1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Mol. Pain* *10*, 40.
- Chen, X., Kalbacher, H., and Gründer, S. (2006b). Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. *J. Gen. Physiol.* *127*, 267–276.
- Chen, X., Paukert, M., Kadurin, I., Pusch, M., and Gründer, S. (2006c). Strong modulation by RFamide neuropeptides of the ASIC1b/3 heteromer in competition with extracellular calcium. *Neuropharmacology* *50*, 964–974.
- Chen, X., Qiu, L., Li, M., Dürrnagel, S., Orser, B.A., Xiong, Z.-G., and MacDonald, J.F. (2010). Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* *58*, 1045–1053.
- Cheng, L., Duan, B., Huang, T., Zhang, Y., Chen, Y., Britz, O., Garcia-Campmany, L., Ren, X., Vong, L., Lowell, B.B., et al. (2017). Identification of spinal circuits involved in touch-evoked dynamic mechanical pain. *Nat. Neurosci.* *20*, 804–814.
- Chergui, K., Svenningsson, P., and Greengard, P. (2005). Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6601–6609.
- Chesler, A.T., Szczot, M., Bharucha-Goebel, D., Čeko, M., Donkervoort, S., Laubacher, C., Hayes, L.H., Alter, K., Zampieri, C., Stanley, C., et al. (2016). The Role of PIEZO2 in Human Mechanosensation. *N. Engl. J. Med.* *375*, 1355–1364.
- Chiang, P.-H., Chien, T.-C., Chen, C.-C., Yanagawa, Y., and Lien, C.-C. (2015). ASIC-dependent LTP at multiple glutamatergic synapses in amygdala network is required for fear memory. *Sci. Rep.* *5*, 10143.
- Chisholm, K.I., Khovanov, N., Lopes, D.M., Russa, F.L., and McMahon, S.B. (2018). Large Scale In Vivo Recording of Sensory Neuron Activity with GCaMP6. *ENeuro* *5*, ENEURO.0417-17.2018.
- Chiu, I.M., Heesters, B.A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C.A., Zhao, F., Tran, J., Wainger, B., Strominger, A., Muralidharan, S., Horswill, A.R., et al. (2013). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* *501*, 52–57.
- Chiu, I.M., Barrett, L.B., Williams, E.K., Strohlic, D.E., Lee, S., Weyer, A.D., Lou, S., Bryman, G.S., Roberson, D.P., Ghasemlou, N., et al. (2014). Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *ELife* *3*.
- Chiurchiù, V., Leuti, A., and Maccarrone, M. (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front. Immunol.* *9*.
- Chizh, B., Palmer, J., Lai, R., Guillard, F., Bullman, J., Baines, A., Napolitano, A., and Appleby, J. (2009). 702 a Randomised, Two-Period Cross-Over Study to Investigate the Efficacy of the Trpv1 Antagonist Sb-705498 in Acute Migraine. *Eur. J. Pain* *13*, S202a–S2202.
- Cho, J.-H., and Askwith, C.C. (2007). Potentiation of acid-sensing ion channels by sulfhydryl compounds. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *292*, C2161-2174.

- Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., et al. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat. Neurosci.* *15*, 1015–1021.
- Cho, J.-H., Choi, I.-S., Nakamura, M., Lee, S.-H., Lee, M.-G., and Jang, I.-S. (2015). Proton-induced currents in substantia gelatinosa neurons of the rat trigeminal subnucleus caudalis. *Eur. J. Pharmacol.* *762*, 18–25.
- Christensen, S.L.T., Petersen, S., Sørensen, D.B., Olesen, J., and Jansen-Olesen, I. (2016). Infusion of low dose glyceryl trinitrate has no consistent effect on burrowing behavior, running wheel activity and light sensitivity in female rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *80*, 43–50.
- Chu, X.-P., Wemmie, J.A., Wang, W.-Z., Zhu, X.-M., Saugstad, J.A., Price, M.P., Simon, R.P., and Xiong, Z.-G. (2004). Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8678–8689.
- Chu, X.-P., Close, N., Saugstad, J.A., and Xiong, Z.-G. (2006). ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 5329–5339.
- Ciabatti, E., González-Rueda, A., Mariotti, L., Morgese, F., and Tripodi, M. (2017). Life-Long Genetic and Functional Access to Neural Circuits Using Self-Inactivating Rabies Virus. *Cell* *170*, 382-392.e14.
- Clark, A.J., Menendez, G., AlQatari, M., Patel, N., Arstad, E., Schiavo, G., and Koltzenburg, M. (2018). Functional imaging in microfluidic chambers reveal sensory neuron sensitivity is differentially regulated between neuronal regions. *Pain*.
- Cobos, E.J., Nickerson, C.A., Gao, F., Chandran, V., Bravo-Caparrós, I., González-Cano, R., Riva, P., Andrews, N.A., Latremoliere, A., Seehus, C.R., et al. (2018). Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling. *Cell Rep.* *22*, 1301–1312.
- Coffey, E.T. (2014). Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 285–299.
- Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Wang, Y., Lawrence, D., D’Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* *54*, 379–386.
- Coles, J.A., Myburgh, E., Brewer, J.M., and McMenamin, P.G. (2017). Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog. Neurobiol.* *156*, 107–148.
- Comalada, M., Xaus, J., Valledor, A.F., López-López, C., Pennington, D.J., and Celada, A. (2003). PKC epsilon is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF-alpha, which induces apoptosis in macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C1235-1245.
- Constantin, C.E., Mair, N., Sailer, C.A., Andratsch, M., Xu, Z.-Z., Blumer, M.J.F., Scherbakov, N., Davis, J.B., Bluethmann, H., Ji, R.-R., et al. (2008). Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 5072–5081.
- Cook, A.D., Christensen, A.D., Tewari, D., McMahon, S.B., and Hamilton, J.A. (2018). Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends Immunol.* *39*, 240–255.

Corder, G., Doolen, S., Donahue, R.R., Winter, M.K., Jutras, B.L., He, Y., Hu, X., Wieskopf, J.S., Mogil, J.S., Storm, D.R., et al. (2013). Constitutive μ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science* 341, 1394–1399.

Corder, G., Tawfik, V.L., Wang, D., Sypek, E.I., Low, S.A., Dickinson, J.R., Sotoudeh, C., Clark, J.D., Barres, B.A., Bohlen, C.J., et al. (2017). Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nat. Med.* 23, 164–173.

Corder, G., Ahanonu, B., Grewe, B.F., Wang, D., Schnitzer, M.J., and Scherrer, G. (2019). An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. *Science* 363, 276–281.

Coric, T., Zheng, D., Gerstein, M., and Canessa, C.M. (2005). Proton sensitivity of ASIC1 appeared with the rise of fishes by changes of residues in the region that follows TM1 in the ectodomain of the channel. *J. Physiol.* 568, 725–735.

Coryell, M.W., Ziemann, A.E., Westmoreland, P.J., Haenfler, J.M., Kurjakovic, Z., Zha, X., Price, M., Schnizler, M.K., and Wemmie, J.A. (2007). Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. *Biol. Psychiatry* 62, 1140–1148.

Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Haenfler, J.M., Allen, J.E., Schnizler, M., Ziemann, A.E., Cook, M.N., Dunning, J.P., Price, M.P., Rainier, J.D., et al. (2009). Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 5381–5388.

Coscoy, S., de Weille, J.R., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (1999). The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *J. Biol. Chem.* 274, 10129–10132.

Costa, A., Smeraldi, A., Tassorelli, C., Greco, R., and Nappi, G. (2005). Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neurosci. Lett.* 383, 7–11.

Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330, 55–60.

Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., et al. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483, 176–181.

Covelli, V., Massari, F., Fallacara, C., Munno, I., Pellegrino, N.M., Jirillo, E., Savastano, S., Ghiggi, M.R., Tommaselli, A.P., and Lombardi, G. (1991). Increased spontaneous release of tumor necrosis factor- α /cachectin in headache patients. A possible correlation with plasma endotoxin and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. J. Neurosci.* 61, 53–60.

Covelli, V., Munno, I., Pellegrino, N.M., Marinaro, M.R., Gesario, A., Massari, F., Savastano, S., and Jirillo, E. (1992). In vivo administration of propranolol decreases exaggerated amounts of serum TNF- α in patients with migraine without aura. Possible mechanism of action. *Acta Neurol. (Napoli)* 14, 313–319.

Cristofori-Armstrong, B., Saez, N.J., Chassagnon, I.R., King, G.F., and Rash, L.D. (2019). The modulation of acid-sensing ion channel 1 by PcTx1 is pH-, subtype- and species-dependent: importance of interactions at the channel subunit interface and potential for engineering selective analogues. *Biochem. Pharmacol.*

- Cuesta, A., Viña, E., Cabo, R., Vázquez, G., Cobo, R., García-Suárez, O., García-Cosamalón, J., and Vega, J.A. (2015). Acid-sensing ion channel 2 (ASIC 2) and TrkB interrelationships within the intervertebral disc. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 10305–10314.
- Cui, C.-L., He, X., Dong, C.-L., Song, Z.-J., Ji, J., Wang, X., Wang, L., Wang, J.-Y., Du, W.-J., Wang, C.-Z., et al. (2017). The enhancement mechanism of wine-processed *Radix Scutellaria* on NTG-induced migraine rats. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *91*, 138–146.
- Cummins, T.R., Waxman, S.G., and Wood, J.N. (2018). Sodium Channels and Pain. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain*.
- Dachez, R. (2012). *Histoire de la médecine - De l'Antiquité à nos jours* (Paris: Tallandier).
- Daiber, A., and Münzel, T. (2015). Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* *23*, 899–942.
- Dalle, R., Descheemaeker, A., and Luccarini, P. (2017). Recurrent administration of the nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a persistent cephalic cutaneous hypersensitivity: A model for migraine progression. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417714032.
- D'Amico, D., Sansone, E., Grazi, L., Giovannetti, A.M., Leonardi, M., Schiavolin, S., and Raggi, A. (2018). Multimorbidity in patients with chronic migraine and medication overuse headache. *Acta Neurol. Scand.*
- Dani, N., Herbst, R., Habib, N., Head, J., Dionne, D., Nguyen, L., McCabe, C., Cui, J., Shipley, F.B., Jang, A., et al. (2019). A cellular and spatial map of the choroid plexus across brain ventricles and ages. *BioRxiv* 627539.
- Davies, N.W., Lux, H.D., and Morad, M. (1988). Site and mechanism of activation of proton-induced sodium current in chick dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* *400*, 159–187.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* *405*, 183–187.
- Dawson, R.J.P., Benz, J., Stohler, P., Tetaz, T., Joseph, C., Huber, S., Schmid, G., Hügin, D., Pflimlin, P., Trube, G., et al. (2012). Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1. *Nat. Commun.* *3*, 936.
- De Felice, M., and Porreca, F. (2009). Opiate-induced persistent pronociceptive trigeminal neural adaptations: potential relevance to opiate-induced medication overuse headache. *Cephalalgia Int. J. Headache* *29*, 1277–1284.
- De Felice, M., Ossipov, M.H., Wang, R., Lai, J., Chichorro, J., Meng, I., Dodick, D.W., Vanderah, T.W., Dussor, G., and Porreca, F. (2010). Triptan-induced latent sensitization: a possible basis for medication overuse headache. *Ann. Neurol.* *67*, 325–337.
- De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., and Casari, G. (2003). Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.* *33*, 192–196.

- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* *385*, 446–450.
- Delaunay, A., Gasull, X., Salinas, M., Noël, J., Friend, V., Lingueglia, E., and Deval, E. (2012). Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13124–13129.
- Delmas, P., Hao, J., and Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 139–153.
- Demartini, C., Tassorelli, C., Zanaboni, A.M., Tonsi, G., Francesconi, O., Nativi, C., and Greco, R. (2017). The role of the transient receptor potential ankyrin type-1 (TRPA1) channel in migraine pain: evaluation in an animal model. *J. Headache Pain* *18*, 94.
- Demartini, C., Greco, R., Zanaboni, A.M., Sances, G., De Icco, R., Borsook, D., and Tassorelli, C. (2019). Nitroglycerin as a comparative experimental model of migraine pain: From animal to human and back. *Prog. Neurobiol.*
- Deng, M., Chen, S.-R., Chen, H., Luo, Y., Dong, Y., and Pan, H.-L. (2019). Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. *J. Neurochem.* *148*, 275–290.
- Denk, F., Bennett, D.L., and McMahon, S.B. (2017). Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* *40*, 307–325.
- Dennis, E.A., and Norris, P.C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 511–523.
- Denuelle, M., Fabre, N., Payoux, P., Chollet, F., and Geraud, G. (2007). Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache* *47*, 1418–1426.
- Deuis, J.R., Dekan, Z., Wingerd, J.S., Smith, J.J., Munasinghe, N.R., Bhola, R.F., Imlach, W.L., Herzig, V., Armstrong, D.A., Rosengren, K.J., et al. (2017). Pharmacological characterisation of the highly NaV1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Sci. Rep.* *7*, 40883.
- Deval, E., and Lingueglia, E. (2015). Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* *94*, 49–57.
- Deval, E., Baron, A., Lingueglia, E., Mazarguil, H., Zajac, J.M., and Lazdunski, M. (2003). Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* *44*, 662–671.
- Deval, E., Salinas, M., Baron, A., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2004). ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *J. Biol. Chem.* *279*, 19531–19539.
- Deval, E., Friend, V., Thirant, C., Salinas, M., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2006). Regulation of sensory neuron-specific acid-sensing ion channel 3 by the adaptor protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1. *J. Biol. Chem.* *281*, 1796–1807.
- Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.* *27*, 3047–3055.

- Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., and Lingueglia, E. (2010). Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol. Ther.* *128*, 549–558.
- Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalié, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2011). Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6059–6066.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lolignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., Christin, M., Mazet, B., Delmas, P., Noel, J., et al. (2013). Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* *4*, 2941.
- Devor, M. (1999). Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Suppl 6*, S27-35.
- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* *54*, 371–378.
- Dhifallah, S., Lancaster, E., Merrill, S., Leroudier, N., Mantegazza, M., and Cestèle, S. (2018). Gain of Function for the SCN1A/hNav1.1-L1670W Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 232.
- Di, W., Zheng, Z.-Y., Xiao, Z.-J., Qi, W.-W., Shi, X.-L., Luo, N., Lin, J.-W., Ding, M.-H., Zhang, A.-W., and Fang, Y.-N. (2015). Pregabalin alleviates the nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience* *284*, 11–17.
- Di, W., Shi, X., Lv, H., Liu, J., Zhang, H., Li, Z., and Fang, Y. (2016). Activation of the nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element alleviates the nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *J. Headache Pain* *17*, 99.
- Di Clemente, L., Coppola, G., Magis, D., Gérardy, P.-Y., Fumal, A., De Pasqua, V., Di Piero, V., and Schoenen, J. (2009). Nitroglycerin sensitises in healthy subjects CNS structures involved in migraine pathophysiology: evidence from a study of nociceptive blink reflexes and visual evoked potentials. *Pain* *144*, 156–161.
- Dichgans, M., Freilinger, T., Eckstein, G., Babini, E., Lorenz-Depiereux, B., Biskup, S., Ferrari, M.D., Herzog, J., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Pusch, M., et al. (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet Lond. Engl.* *366*, 371–377.
- Diener, H.-C., and RPR100893 Study Group (2003). RPR100893, a substance-P antagonist, is not effective in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia Int. J. Headache* *23*, 183–185.
- Diener, H.-C., Charles, A., Goadsby, P.J., and Holle, D. (2015). New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine. *Lancet Neurol.* *14*, 1010–1022.
- Dieterle, A., Fischer, M.J.M., Link, A.S., Neuhuber, W.L., and Messlinger, K. (2011). Increase in CGRP- and nNOS-immunoreactive neurons in the rat trigeminal ganglion after infusion of an NO donor. *Cephalalgia Int. J. Headache* *31*, 31–42.
- Dinkel, H., Michael, S., Weatheritt, R.J., Davey, N.E., Van Roey, K., Altenberg, B., Toedt, G., Uyar, B., Seiler, M., Budd, A., et al. (2012). ELM--the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Res.* *40*, D242-251.

- Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* *23*, 1516–1525.
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* *490*, 552–555.
- Diochot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschalier, A., Lingueglia, E., and Baron, A. (2016). Analgesic effects of mambalgins peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* *157*, 552–559.
- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklický, L., Zimmermann, K., Reeh, P.W., and Vlachová, V. (2006). Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J. Neurosci. Methods* *151*, 178–185.
- Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *46*, 131–145.
- Do, T.P., Guo, S., and Ashina, M. (2019). Therapeutic novelties in migraine: new drugs, new hope? *J. Headache Pain* *20*, 37.
- Dodick, D.W. (2018a). A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. *Headache* *58 Suppl 1*, 4–16.
- Dodick, D.W. (2018b). Migraine. *Lancet Lond. Engl.*
- Dong, X., and Dong, X. (2018). Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* *98*, 482–494.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* *106*, 619–632.
- Dong, X., Hu, Y., Jing, L., and Chen, J. (2015). Role of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, calcitonin gene-related peptide and cyclooxygenase-2 in experimental rat models of migraine. *Mol. Med. Rep.* *12*, 1803–1809.
- van Dongen, R.M., Zielman, R., Noga, M., Dekkers, O.M., Hankemeier, T., van den Maagdenberg, A.M., Terwindt, G.M., and Ferrari, M.D. (2017). Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: A systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia Int. J. Headache* *37*, 49–63.
- Donier, E., Rugiero, F., Okuse, K., and Wood, J.N. (2005). Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a. *J. Biol. Chem.* *280*, 38666–38672.
- Donier, E., Rugiero, F., Jacob, C., and Wood, J.N. (2008). Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 74–86.
- Dorofeeva, N.A., Barygin, O.I., Staruschenko, A., Bolshakov, K.V., and Magazanik, L.G. (2008). Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* *106*, 429–441.

- DosSantos, M.F., Holanda-Afonso, R.C., Lima, R.L., DaSilva, A.F., and Moura-Neto, V. (2014). The role of the blood-brain barrier in the development and treatment of migraine and other pain disorders. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 302.
- Dostrovsky, J.O., Davis, K.D., and Kawakita, K. (1991). Central mechanisms of vascular headaches. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *69*, 652–658.
- Doya, H., Ohtori, S., Fujitani, M., Saito, T., Hata, K., Ino, H., Takahashi, K., Moriya, H., and Yamashita, T. (2005). c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *335*, 132–138.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* *280*, 69–77.
- Drew, L.J., Rohrer, D.K., Price, M.P., Blaver, K.E., Cockayne, D.A., Cesare, P., and Wood, J.N. (2004). Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J. Physiol.* *556*, 691–710.
- Du, J., Reznikov, L.R., Price, M.P., Zha, X., Lu, Y., Moninger, T.O., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2014a). Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8961–8966.
- Du, J., Reznikov, L.R., and Welsh, M.J. (2014b). Expression and activity of acid-sensing ion channels in the mouse anterior pituitary. *PLoS One* *9*, e115310.
- Du, X., Hao, H., Yang, Y., Huang, S., Wang, C., Gigout, S., Ramli, R., Li, X., Jaworska, E., Edwards, I., et al. (2017). Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission. *J. Clin. Invest.* *127*, 1741–1756.
- Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., and Xu, T.-L. (2007). Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 11139–11148.
- Duan, B., Liu, D.-S., Huang, Y., Zeng, W.-Z., Wang, X., Yu, H., Zhu, M.X., Chen, Z.-Y., and Xu, T.-L. (2012). PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 6351–6363.
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* *159*, 1417–1432.
- Dubé, G.R., Lehto, S.G., Breese, N.M., Baker, S.J., Wang, X., Matulenko, M.A., Honoré, P., Stewart, A.O., Moreland, R.B., and Brioni, J.D. (2005). Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* *117*, 88–96.
- Dubin, A.E., Schmidt, M., Mathur, J., Petrus, M.J., Xiao, B., Coste, B., and Patapoutian, A. (2012). Inflammatory signals enhance piezo2-mediated mechanosensitive currents. *Cell Rep.* *2*, 511–517.
- Dubner, R., Sumino, R., and Wood, W.I. (1975). A peripheral “cold” fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey’s face. *J. Neurophysiol.* *38*, 1373–1389.
- Ducros, A. (2013). Génétique de la migraine. *Rev. Neurol. (Paris)* *169*, 360–371.

Duggan, A., Garcia-Anoveros, J., and Corey, D.P. (2002). The PDZ domain protein PICK1 and the sodium channel BNaC1 interact and localize at mechanosensory terminals of dorsal root ganglion neurons and dendrites of central neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 5203–5208.

Durham, P.L., and Masterson, C.G. (2013). Two Mechanisms Involved in Trigeminal CGRP Release: Implications for Migraine Treatment. *Headache* 53, 67–80.

Durham-Lee, J.C., Mokkaapati, V.U.L., Johnson, K.M., and Nestic, O. (2011). Amiloride Improves Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* 28, 1319–1326.

Dusenkova, S., Ru, F., Surdenikova, L., Nassenstein, C., Hatok, J., Dusenka, R., Banovcin, P., Kliment, J., Tatar, M., and Kollarik, M. (2014). The expression profile of acid-sensing ion channel (ASIC) subunits ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, and ASIC3 in the esophageal vagal afferent nerve subtypes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G922-930.

Edelmayer, R.M., Vanderah, T.W., Majuta, L., Zhang, E.-T., Fioravanti, B., De Felice, M., Chichorro, J.G., Ossipov, M.H., King, T., Lai, J., et al. (2009). Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann. Neurol.* 65, 184–193.

Edelmayer, R.M., Le, L.N., Yan, J., Wei, X., Nassini, R., Materazzi, S., Preti, D., Appendino, G., Geppetti, P., Dodick, D.W., et al. (2012). Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *Pain* 153, 1949–1958.

Edvinsson, L., Haanes, K.A., Warfvinge, K., and Krause, D.N. (2018). CGRP as the target of new migraine therapies - successful translation from bench to clinic. *Nat. Rev. Neurol.*

Eftekhari, S., Warfvinge, K., Blixt, F.W., and Edvinsson, L. (2013). Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 14, 1289–1303.

Ehrlich, A.T., Semache, M., Gross, F., Da Fonte, D.F., Runtz, L., Colley, C., Mezni, A., Le Gouill, C., Lukasheva, V., Hogue, M., et al. (2019). Biased Signaling of the Mu Opioid Receptor Revealed in Native Neurons. *IScience* 14, 47–57.

Eigenbrod, O., Debus, K.Y., Reznick, J., Bennett, N.C., Sánchez-Carranza, O., Omerbašić, D., Hart, D.W., Barker, A.J., Zhong, W., Lutermann, H., et al. (2019). Rapid molecular evolution of pain insensitivity in multiple African rodents. *Science* 364, 852–859.

Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Torres, J.M., Bee, L., Dickenson, A.H., Gringhuis, M., Minett, M.S., Hong, G.S., Lee, E., Oh, U., et al. (2013). A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nat. Commun.* 4, 1682.

Eikermann-Haerter, K., and Moskowitz, M.A. (2008). Animal models of migraine headache and aura. *Curr. Opin. Neurol.* 21, 294–300.

Elitt, C.M., McIlwrath, S.L., Lawson, J.J., Malin, S.A., Molliver, D.C., Cornuet, P.K., Koerber, H.R., Davis, B.M., and Albers, K.M. (2006). Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 8578–8587.

Emery, E.C., and Ernfors, P. (2018). Dorsal Root Ganglion Neuron Types and Their Functional Specialization. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain.*

- Emery, E.C., Young, G.T., and McNaughton, P.A. (2012). HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 456–463.
- Emery, E.C., Luiz, A.P., Sikandar, S., Magnúsdóttir, R., Dong, X., and Wood, J.N. (2016). In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci. Adv.* 2, e1600990.
- Er, S.Y., Cristofori-Armstrong, B., Escoubas, P., and Rash, L.D. (2017). Discovery and molecular interaction studies of a highly stable, tarantula peptide modulator of acid-sensing ion channel 1. *Neuropharmacology*.
- Ergonul, Z., Yang, L., and Palmer, L.G. (2016). Properties of acid-induced currents in mouse dorsal root ganglia neurons. *Physiol. Rep.* 4.
- Escoubas, P., De Weille, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., and Lazdunski, M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 275, 25116–25121.
- Escurat, M., Djabali, K., Gumpel, M., Gros, F., and Portier, M.M. (1990). Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 10, 764–784.
- Eshcol, J.O., Harding, A.M.S., Hattori, T., Costa, V., Welsh, M.J., and Benson, C.J. (2008). Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) cell surface expression is modulated by PSD-95 within lipid rafts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C732-739.
- Fang, X., McMullan, S., Lawson, S.N., and Djouhri, L. (2005). Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J. Physiol.* 565, 927–943.
- Farajdokht, F., Babri, S., Karimi, P., and Mohaddes, G. (2016a). Ghrelin attenuates hyperalgesia and light aversion-induced by nitroglycerin in male rats. *Neurosci. Lett.* 630, 30–37.
- Farajdokht, F., Babri, S., Karimi, P., Alipour, M.R., Bughchechi, R., and Mohaddes, G. (2016b). Chronic ghrelin treatment reduced photophobia and anxiety-like behaviors in NTG- induced migraine: Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.*
- Farajdokht, F., Mohaddes, G., Shanebandi, D., Karimi, P., and Babri, S. (2017). Ghrelin attenuated hyperalgesia induced by chronic nitroglycerin: CGRP and TRPV1 as targets for migraine management. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417748563.
- Farkas, S., Bölcskei, K., Markovics, A., Varga, A., Kis-Varga, Á., Kormos, V., Gaszner, B., Horváth, C., Tuka, B., Tajti, J., et al. (2015). Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 77, 33–44.
- Farrag, M., Drobish, J.K., Puhl, H.L., Kim, J.S., Herold, P.B., Kaufman, M.P., and Ruiz-Velasco, V. (2017). Endomorphins potentiate ASIC currents and enhance the lactic acid-mediated increase in arterial blood pressure-effects amplified in hindlimb ischemia. *J. Physiol.*
- Favoni, V., Giani, L., Al-Hassany, L., Asioli, G.M., Butera, C., de Boer, I., Guglielmetti, M., Koniari, C., Mavridis, T., Vaikjärv, M., et al. (2019). CGRP and migraine from a cardiovascular point of view: what do we expect from blocking CGRP? *J. Headache Pain* 20, 27.

- Feistel, S., Albrecht, S., and Messlinger, K. (2013). The calcitonin gene-related peptide receptor antagonist MK-8825 decreases spinal trigeminal activity during nitroglycerin infusion. *J. Headache Pain* *14*, 93.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D., and Lesage, F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J. Physiol.* *593*, 2587–2603.
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.-P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., and Stevens, R.C. (2014). Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature* *506*, 191–196.
- Feng, S., He, X., Zhong, P., Zhao, J., Huang, C., and Hu, Z. (2018). A Metabolism-Based Synergy for Total Coumarin Extract of Radix Angelicae Dahuricae and Ligustrazine on Migraine Treatment in Rats. *Mol. Basel Switz.* *23*.
- Ferrari, L.F., Levine, J.D., and Green, P.G. (2016). Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* *317*, 121–129.
- Ferrari, M.D., Goadsby, P.J., Roon, K.I., and Lipton, R.B. (2002). Triptans (serotonin, 5-HT_{1B/1D} agonists) in migraine: detailed results and methods of a meta-analysis of 53 trials. *Cephalalgia Int. J. Headache* *22*, 633–658.
- Ferrari, M.D., Klever, R.R., Terwindt, G.M., Ayata, C., and van den Maagdenberg, A.M.J.M. (2015). Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol.* *14*, 65–80.
- Ferreira, J., Santos, A.R., and Calixto, J.B. (1999). Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal administration of amiloride in mice. *Life Sci.* *65*, 1059–1066.
- Ferroni, P., Barbanti, P., Spila, A., Fratangeli, F., Aurilia, C., Fofi, L., Egeo, G., and Guadagni, F. (2018). Circulating Biomarkers In Migraine. *New Opportunities For Precision Medicine. Curr. Med. Chem.*
- Finucane, H.K., Reshef, Y.A., Anttila, V., Slowikowski, K., Gusev, A., Byrnes, A., Gazal, S., Loh, P.-R., Lareau, C., Shores, N., et al. (2018). Heritability enrichment of specifically expressed genes identifies disease-relevant tissues and cell types. *Nat. Genet.* *50*, 621–629.
- Fioravanti, B., Kasasbeh, A., Edelmayer, R., Skinner, D.P., Hartings, J.A., Burklund, R.D., De Felice, M., French, E.D., Dussor, G.O., Dodick, D.W., et al. (2011). Evaluation of cutaneous allodynia following induction of cortical spreading depression in freely moving rats. *Cephalalgia Int. J. Headache* *31*, 1090–1100.
- Fischer, M.J.M., and McNaughton, P.A. (2014). How anchoring proteins shape pain. *Pharmacol. Ther.* *143*, 316–322.
- Fisher, J.L. (2002). Amiloride inhibition of gamma-aminobutyric acid(A) receptors depends upon the alpha subunit subtype. *Mol. Pharmacol.* *61*, 1322–1328.
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., and Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS One* *10*, e0128951.
- Florez-Paz, D., Bali, K.K., Kuner, R., and Gomis, A. (2016). A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Sci. Rep.* *6*, 25923.

- Fontaine, D., Almairac, F., Santucci, S., Fernandez, C., Dallel, R., Pallud, J., and Lanteri-Minet, M. (2018). Dural and pial pain-sensitive structures in humans: new inputs from awake craniotomies. *Brain J. Neurol.*
- Foulkes, T., Nassar, M.A., Lane, T., Matthews, E.A., Baker, M.D., Gerke, V., Okuse, K., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2006). Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10499–10507.
- Franck, M.C.M., Stenqvist, A., Li, L., Hao, J., Usoskin, D., Xu, X., Wiesenfeld-Hallin, Z., and Ernfors, P. (2011). Essential role of Ret for defining non-peptidergic nociceptor phenotypes and functions in the adult mouse. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1385–1400.
- Francois, A., Kerckhove, N., Meleine, M., Alloui, A., Barrere, C., Gelot, A., Uebele, V.N., Renger, J.J., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2013). State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* 154, 283–293.
- François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noël, J., Wood, J.N., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep.*
- François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., et al. (2017). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* 93, 822-839.e6.
- Frederiksen, S.D., Warfvinge, K., Ohlsson, L., and Edvinsson, L. (2018). Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide, Calcitonin Gene-related Peptide and Headache Targets in the Trigeminal Ganglia of Rats and Humans. *Neuroscience* 393, 319–332.
- Frelin, C., Barbry, P., Vigne, P., Chassande, O., Cragoe Jr., E.J., and Lazdunski, M. (1988). Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie* 70, 1285–1290.
- Frey, E.N., Pavlovicz, R.E., Wegman, C.J., Li, C., and Askwith, C.C. (2013). Conformational changes in the lower palm domain of ASIC1a contribute to desensitization and RFamide modulation. *PLoS One* 8, e71733.
- Frey Law, L.A., Sluka, K.A., McMullen, T., Lee, J., Arendt-Nielsen, L., and Graven-Nielsen, T. (2008). Acidic buffer induced muscle pain evokes referred pain and mechanical hyperalgesia in humans. *Pain* 140, 254–264.
- Fried, N.T., Maxwell, C.R., Elliott, M.B., and Oshinsky, M.L. (2017). Region-specific disruption of the blood-brain barrier following repeated inflammatory dural stimulation in a rat model of chronic trigeminal allodynia. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417703764.
- Friese, M.A., Craner, M.J., Etzensperger, R., Vergo, S., Wemmie, J.A., Welsh, M.J., Vincent, A., and Fugger, L. (2007). Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat. Med.* 13, 1483–1489.
- Fromy, B., Lingueglia, E., Sigauco-Roussel, D., Saumet, J.L., and Lazdunski, M. (2012). Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat. Med.* 18, 1205–1207.

- Fu, H., Fang, P., Zhou, H.-Y., Zhou, J., Yu, X.-W., Ni, M., Zheng, J.-Y., Jin, Y., Chen, J.-G., Wang, F., et al. (2016). Acid-sensing ion channels in trigeminal ganglion neurons innervating the orofacial region contribute to orofacial inflammatory pain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *43*, 193–202.
- Fumal, A., and Schoenen, J. (2008). Tension-type headache: current research and clinical management. *Lancet Neurol.* *7*, 70–83.
- Furlan, A., Manno, G.L., Lübke, M., Häring, M., Abdo, H., Hochgerner, H., Kupari, J., Usoskin, D., Airaksinen, M.S., Oliver, G., et al. (2016). Visceral motor neuron diversity delineates a cellular basis for nipple- and pilo-erection muscle control. *Nat. Neurosci.* *19*, 1331–1340.
- Galeotti, N., and Ghelardini, C. (2013). Inhibition of the PKC γ - ϵ pathway relieves from meningeal nociception in an animal model: an innovative perspective for migraine therapy? *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *10*, 329–339.
- Gallagher, F.A., Kettunen, M.I., Day, S.E., Hu, D.E., Ardenkjaer-Larsen, J.H., Zandt, R., Jensen, P.R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M.H., et al. (2008). Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate. *Nature* *453*, 940–943.
- Gan, X., Wu, J., Ren, C., Qiu, C.-Y., Li, Y.-K., and Hu, W.-P. (2016). Potentiation of acid-sensing ion channel activity by peripheral group I metabotropic glutamate receptor signaling. *Pharmacol. Res.*
- Gao, Z.-G., and Ijzerman, A.P. (2000). Allosteric modulation of A2A adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 669–676.
- Gao, J., Duan, B., Wang, D.-G., Deng, X.-H., Zhang, G.-Y., Xu, L., and Xu, T.-L. (2005). Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* *48*, 635–646.
- Garai, Á., Zeke, A., Gógl, G., Törő, I., Fördős, F., Blankenburg, H., Bárkai, T., Varga, J., Alexa, A., Emig, D., et al. (2012). Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Sci. Signal.* *5*, ra74.
- García, G., Gutiérrez-Lara, E.J., Centurión, D., Granados-Soto, V., and Murbartián, J. (2019). Fructose-Induced Insulin Resistance as a Model of Neuropathic Pain in Rats. *Neuroscience* *404*, 233–245.
- García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., and Corey, D.P. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1459–1464.
- García-Añoveros, J., Samad, T.A., Zúvela-Jelaska, L., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2001). Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1 α to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2678–2686.
- García-Larrea, L., and Peyron, R. (2013). Pain matrices and neuropathic pain matrices: A review. *PAIN®* *154, Supplement 1*, S29–S43.
- Gasser, H.S. (1941). The classification of nerve fibers. *Ohio J. Sci.* *41*, 145–159.
- Gatto, G., Smith, K.M., Ross, S.E., and Goulding, M. (2019). Neuronal diversity in the somatosensory system: bridging the gap between cell type and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* *56*, 167–174.

Gautam, M., and Benson, C.J. (2013). Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 793–802.

Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., et al. (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3366–3374.

Gavva, N.R., Treanor, J.J.S., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., et al. (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136, 202–210.

GBD 2016 Neurology Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.*

Gebhart, G.F., and Bielefeldt, K. (2016). Physiology of Visceral Pain. *Compr. Physiol.* 6, 1609–1633.

George, C.F., Breckenridge, A.M., and Dollery, C.T. (1973). Comparison of the potassium- retaining effects of amiloride and spironolactone in hypertensive patients with thiazide-induced hypokalaemia. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1288–1291.

Ghitani, N., Barik, A., Szczot, M., Thompson, J.H., Li, C., Le Pichon, C.E., Krashes, M.J., and Chesler, A.T. (2017). Specialized Mechanosensory Nociceptors Mediating Rapid Responses to Hair Pull. *Neuron* 95, 944-954.e4.

Gibbins, I. (2013). Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis* 9, 169–175.

Gibbons, D.D., Kutschke, W.J., Weiss, R.M., and Benson, C.J. (2015). Heart failure induces changes in acid-sensing ion channels in sensory neurons innervating skeletal muscle. *J. Physiol.* 593, 4575–4587.

Giffin, N.J., Ruggiero, L., Lipton, R.B., Silberstein, S.D., Tvedskov, J.F., Olesen, J., Altman, J., Goadsby, P.J., and Macrae, A. (2003). Premonitory symptoms in migraine: an electronic diary study. *Neurology* 60, 935–940.

Gilbert, H.T.J., Hodson, N., Baird, P., Richardson, S.M., and Hoyland, J.A. (2016). Acidic pH promotes intervertebral disc degeneration: Acid-sensing ion channel -3 as a potential therapeutic target. *Sci. Rep.* 6, 37360.

Goadsby, P.J. (2009). The vascular theory of migraine--a great story wrecked by the facts. *Brain J. Neurol.* 132, 6–7.

Goadsby, P.J., Lipton, R.B., and Ferrari, M.D. (2002). Migraine--current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* 346, 257–270.

Goadsby, P.J., Holland, P.R., Martins-Oliveira, M., Hoffmann, J., Schankin, C., and Akerman, S. (2017a). Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol. Rev.* 97, 553–622.

Goadsby, P.J., Reuter, U., Hallström, Y., Broessner, G., Bonner, J.H., Zhang, F., Sapra, S., Picard, H., Mikol, D.D., and Lenz, R.A. (2017b). A Controlled Trial of Erenumab for Episodic Migraine. *N. Engl. J. Med.* 377, 2123–2132.

- Göloncsér, F., and Sperlág, B. (2014). Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *J. Headache Pain* 15, 24.
- Gonzales, E.B., Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460, 599–604.
- Gonzalez Bosc, L.V., Plomaritas, D.R., Herbert, L.M., Giermakowska, W., Browning, C., and Jernigan, N.L. (2016). ASIC1-mediated calcium entry stimulates NFATc3 nuclear translocation via PICK1 coupling in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 311, L48–58.
- González-Inchauspe, C., Gobetto, M.N., and Uchitel, O.D. (2019). Modulation of acid sensing ion channel dependent protonergic neurotransmission at the mouse calyx of Held. *Neuroscience*.
- Gormley, P., Anttila, V., Winsvold, B.S., Palta, P., Esko, T., Pers, T.H., Farh, K.-H., Cuenca-Leon, E., Muona, M., Furlotte, N.A., et al. (2016). Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat. Genet.* 48, 856–866.
- Gormley, P., Kurki, M.I., Hiekkala, M.E., Veerapen, K., Häppölä, P., Mitchell, A.A., Lal, D., Palta, P., Surakka, I., Kaunisto, M.A., et al. (2018). Common Variant Burden Contributes to the Familial Aggregation of Migraine in 1,589 Families. *Neuron*.
- Goswami, S.C., Mishra, S.K., Maric, D., Kaszas, K., Gonnella, G.L., Clokie, S.J., Kominsky, H.D., Gross, J.R., Keller, J.M., Mannes, A.J., et al. (2014). Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-Seq transcriptome analysis. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 15, 1338–1359.
- Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., et al. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch.* 455, 1097–1103.
- Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The Enteric Nervous System. *N. Engl. J. Med.* 334, 1106–1115.
- Gozalov, A., Jansen-Olesen, I., Klaerke, D., and Olesen, J. (2008). Role of K ATP channels in cephalic vasodilatation induced by calcitonin gene-related peptide, nitric oxide, and transcranial electrical stimulation in the rat. *Headache* 48, 1202–1213.
- Greco, R., Tassorelli, C., Armentero, M.T., Sandrini, G., Nappi, G., and Blandini, F. (2008). Role of central dopaminergic circuitry in pain processing and nitroglycerin-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 1238, 215–223.
- Greco, R., Gasperi, V., Sandrini, G., Bagetta, G., Nappi, G., Maccarrone, M., and Tassorelli, C. (2010). Alterations of the endocannabinoid system in an animal model of migraine: evaluation in cerebral areas of rat. *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 296–302.
- Greco, R., Meazza, C., Mangione, A.S., Allena, M., Bolla, M., Amantea, D., Mizoguchi, H., Sandrini, G., Nappi, G., and Tassorelli, C. (2011). Temporal profile of vascular changes induced by systemic nitroglycerin in the meningeal and cortical districts. *Cephalalgia Int. J. Headache* 31, 190–198.
- Greco, R., Tassorelli, C., Mangione, A.S., Smeraldi, A., Allena, M., Sandrini, G., Nappi, G., and Nappi, R.E. (2013). Effect of sex and estrogens on neuronal activation in an animal model of migraine. *Headache* 53, 288–296.

- Greco, R., Mangione, A.S., Siani, F., Blandini, F., Vairetti, M., Nappi, G., Sandrini, G., Buzzi, M.G., and Tassorelli, C. (2014). Effects of CGRP receptor antagonism in nitroglycerin-induced hyperalgesia. *Cephalalgia Int. J. Headache* 34, 594–604.
- Greco, R., Ferrigno, A., Demartini, C., Zanaboni, A., Mangione, A.S., Blandini, F., Nappi, G., Vairetti, M., and Tassorelli, C. (2015a). Evaluation of ADMA-DDAH-NOS axis in specific brain areas following nitroglycerin administration: study in an animal model of migraine. *J. Headache Pain* 16, 560.
- Greco, R., Bandiera, T., Mangione, A.S., Demartini, C., Siani, F., Nappi, G., Sandrini, G., Guijarro, A., Armirotti, A., Piomelli, D., et al. (2015b). Effects of peripheral FAAH blockade on NTG-induced hyperalgesia-evaluation of URB937 in an animal model of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 35, 1065–1076.
- Greco, R., Demartini, C., Zanaboni, A.M., Redavide, E., Pampalone, S., Toldi, J., Fülöp, F., Blandini, F., Nappi, G., Sandrini, G., et al. (2016). Effects of kynurenic acid analogue 1 (KYNA-A1) in nitroglycerin-induced hyperalgesia: Targets and anti-migraine mechanisms. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Greco, R., Demartini, C., Zanaboni, A.M., and Tassorelli, C. (2018). Chronic and intermittent administration of systemic nitroglycerin in the rat induces an increase in the gene expression of CGRP in central areas: potential contribution to pain processing. *J. Headache Pain* 19, 51.
- Green, D.P., Limjunyawong, N., Gour, N., Pundir, P., and Dong, X. (2019). A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. *Neuron* 0.
- Gregory, N.S., Brito, R.G., Fusaro, M.C.G.O., and Sluka, K.A. (2016). ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Mol. Neurobiol.* 53, 1020–1030.
- Gregory, N.S., Gautam, M., Benson, C.J., and Sluka, K.A. (2018). Acid Sensing Ion Channel 1a (ASIC1z) mediates activity-induced pain by modulation of heteromeric ASIC channel kinetics. *Neuroscience*.
- Grunder, S., and Pusch, M. (2015). Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology* 94, 9–18.
- Gründer, S., Geissler, H.S., Bässler, E.L., and Ruppertsberg, J.P. (2000). A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 11, 1607–1611.
- Grundy, L., Erickson, A., and Brierley, S.M. (2018). Visceral Pain. *Annu. Rev. Physiol.*
- Gsponer, J., and Madan Babu, M. (2009). The rules of disorder or why disorder rules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 99, 94–103.
- Gu, Q., and Lee, L.-Y. (2006). Characterization of acid signaling in rat vagal pulmonary sensory neurons. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L58-65.
- Güler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6408–6414.
- Guo, J.-Q., Deng, H.-H., Bo, X., and Yang, X.-S. (2016). Involvement of BDNF/TrkB and ERK/CREB axes in nitroglycerin-induced rat migraine and effects of estrogen on these signals in the migraine. *Biol. Open*.

- Guo, Z., Liu, P., Ren, F., and Cao, Y.-Q. (2014). Nonmigraine-associated TRESK K⁺ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* *112*, 568–579.
- Gupta, K., and Harvima, I.T. (2018). Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol. Rev.* *282*, 168–187.
- Gupta, S., and Villalón, C.M. (2010). The relevance of preclinical research models for the development of antimigraine drugs: focus on 5-HT(1B/1D) and CGRP receptors. *Pharmacol. Ther.* *128*, 170–190.
- Gupta, R.M., Hadaya, J., Trehan, A., Zekavat, S.M., Roselli, C., Klarin, D., Emdin, C.A., Hilvering, C.R.E., Bianchi, V., Mueller, C., et al. (2017). A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. *Cell* *170*, 522-533.e15.
- Gutman, A.L., Cosme, C.V., Noterman, M.F., Worth, W.R., Wemmie, J.A., and LaLumiere, R.T. (2018). Overexpression of ASIC1A in the nucleus accumbens of rats potentiates cocaine-seeking behavior. *Addict. Biol.*
- Güven, H., Çilliler, A.E., and Çomoğlu, S.S. (2013). Cutaneous allodynia in patients with episodic migraine. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* *34*, 1397–1402.
- Hamill, O.P., and Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* *81*, 685–740.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* *391*, 85–100.
- Han, Q., Liu, D., Convertino, M., Wang, Z., Jiang, C., Kim, Y.H., Luo, X., Zhang, X., Nackley, A., Dokholyan, N.V., et al. (2018). miRNA-711 Binds and Activates TRPA1 Extracellularly to Evoke Acute and Chronic Pruritus. *Neuron* *99*, 449-463.e6.
- Hanaka, M., Iba, K., Dohke, T., Kanaya, K., Okazaki, S., and Yamashita, T. (2018). Antagonists to TRPV1, ASICs and P2X have a potential role to prevent the triggering of regional bone metabolic disorder and pain-like behavior in tail-suspended mice. *Bone* *110*, 284–294.
- Hansen, E.K., and Olesen, J. (2016). Towards a pragmatic human migraine model for drug testing: 2. Isosorbide-5-mononitrate in healthy individuals. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Hansen, J.M., Thomsen, L.L., Olesen, J., and Ashina, M. (2008a). Calcitonin gene-related peptide does not cause the familial hemiplegic migraine phenotype. *Neurology* *71*, 841–847.
- Hansen, J.M., Thomsen, L.L., Olesen, J., and Ashina, M. (2008b). Familial hemiplegic migraine type 1 shows no hypersensitivity to nitric oxide. *Cephalalgia Int. J. Headache* *28*, 496–505.
- Hansen, J.M., Thomsen, L.L., Marconi, R., Casari, G., Olesen, J., and Ashina, M. (2008c). Familial hemiplegic migraine type 2 does not share hypersensitivity to nitric oxide with common types of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* *28*, 367–375.
- Hao, J., Padilla, F., Dandonneau, M., Lavebratt, C., Lesage, F., Noël, J., and Delmas, P. (2013). Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* *77*, 899–914.

- Häring, M., Zeisel, A., Hochgerner, H., Rinwa, P., Jakobsson, J.E.T., Lönnerberg, P., Manno, G., Sharma, N., Borgius, L., Kiehn, O., et al. (2018). Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat. Neurosci.* 1.
- Harrington, M.G., Chekmenev, E.Y., Schepkin, V., Fonteh, A.N., and Arakaki, X. (2011). Sodium MRI in a rat migraine model and a NEURON simulation study support a role for sodium in migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 31, 1254–1265.
- Harriott, A.M., and Gold, M.S. (2009). Electrophysiological properties of dural afferents in the absence and presence of inflammatory mediators. *J. Neurophysiol.* 101, 3126–3134.
- Harris, H.M., Carpenter, J.M., Black, J.R., Smitherman, T.A., and Sufka, K.J. (2017). The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J. Neurosci. Methods.*
- Hassler, S.N., Ahmad, F.B., Burgos-Vega, C.C., Boitano, S., Vagner, J., Price, T.J., and Dussor, G. (2018). Protease activated receptor 2 (PAR2) activation causes migraine-like pain behaviors in mice. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102418779548.
- Hattori, T., Chen, J., Harding, A.M., Price, M.P., Lu, Y., Abboud, F.M., and Benson, C.J. (2009). ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circ Res* 105, 279–286.
- Hawkins, J.L., Moore, N.J., Miley, D., and Durham, P.L. (2018). Secondary traumatic stress increases expression of proteins implicated in peripheral and central sensitization of trigeminal neurons. *Brain Res.* 1687, 162–172.
- He, W., Long, T., Pan, Q., Zhang, S., Zhang, Y., Zhang, D., Qin, G., Chen, L., and Zhou, J. (2019). Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β release and contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced migraine model. *J. Neuroinflammation* 16, 78.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) (2013). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia Int. J. Headache* 33, 629–808.
- Heppelmann, B., Heuss, C., and Schmidt, R.F. (1988). Fiber size distribution of myelinated and unmyelinated axons in the medial and posterior articular nerves of the cat's knee joint. *Somatosens. Res.* 5, 273–281.
- Herbert, L.M., Nitta, C.H., Yellowhair, T.R., Browning, C., Gonzalez Bosc, L.V., Resta, T.C., and Jernigan, N.L. (2015). PICK1/Calcineurin Suppress ASIC1-mediated Ca²⁺ Entry in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpcell.00091.2015.
- Hesselager, M., Timmermann, D.B., and Ahring, P.K. (2004). pH Dependency and Desensitization Kinetics of Heterologously Expressed Combinations of Acid-sensing Ion Channel Subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 11006–11015.
- Hiasa, M., Okui, T., Allette, Y.M., Ripsch, M.S., Sun-Wada, G.-H., Wakabayashi, H., Roodman, G.D., White, F.A., and Yoneda, T. (2017). Bone Pain Induced by Multiple Myeloma Is Reduced by Targeting V-ATPase and ASIC3. *Cancer Res.*
- Hill, R.Z., Hoffman, B.U., Morita, T., Campos, S.M., Lumpkin, E.A., Brem, R.B., and Bautista, D.M. (2018). The signaling lipid sphingosine 1-phosphate regulates mechanical pain. *ELife* 7.

- Hines, A.E., Birn, H., Teglbjaerg, P.S., and Sinkjaer, T. (1996). Fiber type composition of articular branches of the tibial nerve at the knee joint in man. *Anat. Rec.* 246, 573–578.
- Hinman, A., Chuang, H.-H., Bautista, D.M., and Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19564–19568.
- Hirai, T., Mulpuri, Y., Cheng, Y., Xia, Z., Li, W., Ruangsri, S., Spigelman, I., and Nishimura, I. (2017). Aberrant plasticity of peripheral sensory axons in a painful neuropathy. *Sci. Rep.* 7, 3407.
- Hoagland, E.N., Sherwood, T.W., Lee, K.G., Walker, C.J., and Askwith, C.C. (2010). Identification of a calcium permeable human acid-sensing ion channel 1 transcript variant. *J. Biol. Chem.* 285, 41852–41862.
- Hockley, J.R.F., Taylor, T.S., Callejo, G., Wilbrey, A.L., Gutteridge, A., Bach, K., Winchester, W.J., Bulmer, D.C., McMurray, G., and Smith, E.S.J. (2018). Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut*.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 710–711.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.
- Hoffman, B.U., Baba, Y., Griffith, T.N., Mosharov, E.V., Woo, S.-H., Roybal, D.D., Karsenty, G., Patapoutian, A., Sulzer, D., and Lumpkin, E.A. (2018). Merkel Cells Activate Sensory Neural Pathways through Adrenergic Synapses. *Neuron* 0.
- Hoffmann, J., Baca, S.M., and Akerman, S. (2017). Neurovascular mechanisms of migraine and cluster headache. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 271678X17733655.
- Hoheisel, U., Unger, T., and Mense, S. (2005). Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain* 114, 168–176.
- Holland, P.R., and Goadsby, P.J. (2018). Targeted CGRP Small Molecule Antagonists for Acute Migraine Therapy. *Neurotherapeutics* 15, 304–312.
- Holland, P.R., Akerman, S., Andreou, A.P., Karsan, N., Wemmie, J.A., and Goadsby, P.J. (2012). Acid-sensing ion channel 1: a novel therapeutic target for migraine with aura. *Ann. Neurol.* 72, 559–563.
- Holthusen, H., and Arndt, J.O. (1994). Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett* 165, 71–74.
- Holton, C., Goadsby, P.J., and Holland, P.R. (2016). Acid Sensing Ion Channel 3 inhibitors reduce trigeminovascular activation. *Cephalalgia* 15, 141.
- Holzer, P. (2011). Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 201, 63–75.
- Hougaard, A., Amin, F.M., Amin, F., Hauge, A.W., Ashina, M., and Olesen, J. (2013). Provocation of migraine with aura using natural trigger factors. *Neurology* 80, 428–431.
- Hougaard Pedersen, S., Maretty, L., Ramachandran, R., Sibbesen, J.A., Yakimov, V., Elgaard-Christensen, R., Hansen, T.F., Krogh, A., Olesen, J., and Jansen-Olesen, I. (2016). RNA Sequencing of

Trigeminal Ganglia in *Rattus Norvegicus* after Glyceryl Trinitrate Infusion with Relevance to Migraine. *PLoS One* 11, e0155039.

Hove, H.V., Martens, L., Scheyltjens, I., Vlaminck, K.D., Antunes, A.R.P., Prijck, S.D., Vandamme, N., Schepper, S.D., Isterdael, G.V., Scott, C.L., et al. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat. Neurosci.* 1.

Hruska-Hageman, A.M., Wemmie, J.A., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2002). Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel). *Biochem. J.* 361, 443–450.

Hruska-Hageman, A.M., Benson, C.J., Leonard, A.S., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2004). PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H⁺-gated current. *J. Biol. Chem.* 279, 46962–46968.

Hsieh, W.-S., Kung, C.-C., Huang, S.-L., Lin, S.-C., and Sun, W.-H. (2017). TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* 7, 8870.

Hu, G., Huang, K., Hu, Y., Du, G., Xue, Z., Zhu, X., and Fan, G. (2016). Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. *Sci. Rep.* 6, 31851.

Hu, Z.-L., Huang, C., Fu, H., Jin, Y., Wu, W.-N., Xiong, Q.-J., Xie, N., Long, L.-H., Chen, J.-G., and Wang, F. (2010). Disruption of PICK1 attenuates the function of ASICs and PKC regulation of ASICs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C1355-1362.

Huang, D., Li, S., Dhaka, A., Story, G.M., and Cao, Y.-Q. (2012). Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol. Pain* 8, 66.

Huang, D., Ren, L., Qiu, C.-S., Liu, P., Peterson, J., Yanagawa, Y., and Cao, Y.-Q. (2016). Characterization of a mouse model of headache. *Pain*.

Huang, Y., Jiang, N., Li, J., Ji, Y.-H., Xiong, Z.-G., and Zha, X. Two aspects of ASIC function: Synaptic plasticity and neuronal injury. *Neuropharmacology*.

Hucho, T., and Levine, J.D. (2007). Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. *Neuron* 55, 365–376.

Hughes, P.A., Brierley, S.M., Young, R.L., and Blackshaw, L.A. (2007). Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 500, 863–875.

Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M.P., Parzen, H., et al. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 545, 505–509.

Iakoucheva, L.M., Radivojac, P., Brown, C.J., O'Connor, T.R., Sikes, J.G., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 32, 1037–1049.

Ikeuchi, M., Kolker, S.J., Burnes, L.A., Walder, R.Y., and Sluka, K.A. (2008). Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* 137, 662–669.

- Imbimbo, B.P., Hutter-Paier, B., Villetti, G., Facchinetti, F., Cenacchi, V., Volta, R., Lanzillotta, A., Pizzi, M., and Windisch, M. (2009). CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 982–993.
- Immke, D.C., and McCleskey, E.W. (2001). Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat. Neurosci.* *4*, 869–870.
- Immke, D.C., and McCleskey, E.W. (2003). Protons Open Acid-Sensing Ion Channels by Catalyzing Relief of Ca²⁺ Blockade. *Neuron* *37*, 75–84.
- Isensee, J., Krahé, L., Moeller, K., Pereira, V., Sexton, J.E., Sun, X., Emery, E., Wood, J.N., and Hucho, T. (2017). Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Nav1.7 knockout mice. *Sci. Signal.* *10*.
- Ishibashi, K., and Marumo, F. (1998). Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* *245*, 589–593.
- Iversen, H.K., and Olesen, J. (1996). Headache induced by a nitric oxide donor (nitroglycerin) responds to sumatriptan. A human model for development of migraine drugs. *Cephalalgia Int. J. Headache* *16*, 412–418.
- Iversen, H.K., Olesen, J., and Tfelt-Hansen, P. (1989). Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain* *38*, 17–24.
- Iversen, H.K., Nielsen, T.H., Garre, K., Tfelt-Hansen, P., and Olesen, J. (1992). Dose-dependent headache response and dilatation of limb and extracranial arteries after three doses of 5-isosorbide-mononitrate. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *42*, 31–35.
- Iversen, H.K., Nielsen, T.H., Tfelt-Hansen, P., and Olesen, J. (1993). Lack of tolerance of headache and radial artery diameter during a 7 hour intravenous infusion of nitroglycerin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *44*, 47–50.
- Izumi, M., Ikeuchi, M., Ji, Q., and Tani, T. (2012). Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J. Biomed. Sci.* *19*, 77.
- Jackson, J.L., Kuriyama, A., Kuwatsuka, Y., Nickoloff, S., Storch, D., Jackson, W., Zhang, Z.-J., and Hayashino, Y. (2019). Beta-blockers for the prevention of headache in adults, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* *14*, e0212785.
- Jacobs, B., and Dussor, G. (2016). Neurovascular contributions to migraine: Moving beyond vasodilation. *Neuroscience*.
- Jakubowski, M., Levy, D., Goor-Aryeh, I., Collins, B., Bajwa, Z., and Burstein, R. (2005). Terminating migraine with allodynia and ongoing central sensitization using parenteral administration of COX1/COX2 inhibitors. *Headache* *45*, 850–861.
- Jänig, W., and Levine, J.D. (2013). Autonomic, Endocrine, and Immune Interactions in Acute and Chronic Pain. In: McMahon SB, Koltzenburg M and Editors, Wall & Melzack's Textbook of Pain, 6th Edition (Philadelphia: Elsevier Saunders).
- Jansen-Olesen, I., Tfelt-Hansen, P., and Olesen, J. (2013). Animal migraine models for drug development: status and future perspectives. *CNS Drugs* *27*, 1049–1068.

- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316–323.
- Jensen, D.D., Lieu, T., Halls, M.L., Veldhuis, N.A., Imlach, W.L., Mai, Q.N., Poole, D.P., Quach, T., Aurelio, L., Conner, J., et al. (2017). Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief. *Sci. Transl. Med.* 9.
- Jensen, J.E., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., Rosengren, K.J., Lau, C.H.Y., Mobli, M., Brust, A., Alewood, P.F., King, G.F., and Rash, L.D. (2014). Understanding the Molecular Basis of Toxin Promiscuity: The Analgesic Sea Anemone Peptide APETx2 Interacts with Acid-Sensing Ion Channel 3 and hERG Channels via Overlapping Pharmacophores. *J. Med. Chem.* 57, 9195–9203.
- Jeong, H., Moye, L.S., Southey, B.R., Hernandez, A.G., Dripps, I., Romanova, E.V., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V., Pradhan, A.A., and Rodriguez-Zas, S.L. (2018). Gene Network Dysregulation in the Trigeminal Ganglia and Nucleus Accumbens of a Model of Chronic Migraine-Associated Hyperalgesia. *Front. Syst. Neurosci.* 12.
- Jeong, S., Lee, S.H., Kim, Y.O., and Yoon, M.H. (2013). Antinociceptive effects of amiloride and benzamil in neuropathic pain model rats. *J. Korean Med. Sci.* 28, 1238–1243.
- Ji, R.-R., Samad, T.A., Jin, S.-X., Schmoll, R., and Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. *Neuron* 36, 57–68.
- Jia, Z., Chen, X., Tang, W., Zhao, D., and Yu, S. (2019). Atypical functional connectivity between the anterior cingulate cortex and other brain regions in a rat model of recurrent headache. *Mol. Pain* 15, 1744806919842483.
- Jiang, N., Rau, K.K., Johnson, R.D., and Cooper, B.Y. (2006). Proton sensitivity Ca²⁺ permeability and molecular basis of acid-sensing ion channels expressed in glabrous and hairy skin afferents. *J. Neurophysiol.* 95, 2466–2478.
- Jimenez-Vargas, N.N., Pattison, L.A., Zhao, P., Lieu, T., Latorre, R., Jensen, D.D., Castro, J., Aurelio, L., Le, G.T., Flynn, B., et al. (2018). Protease-activated receptor-2 in endosomes signals persistent pain of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Jin, W., Shen, C., Jing, L., Zha, X., and Xia, J. (2010). PICK1 regulates the trafficking of ASIC1a and acidotoxicity in a BAR domain lipid binding-dependent manner. *Mol. Brain* 3, 39.
- Jing, L., Chu, X.-P., Jiang, Y.-Q., Collier, D.M., Wang, B., Jiang, Q., Snyder, P.M., and Zha, X.-M. (2012). N-glycosylation of acid-sensing ion channel 1a regulates its trafficking and acidosis-induced spine remodeling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4080–4091.
- Joeres, N., Augustinowski, K., Neuhof, A., Assmann, M., and Gründer, S. (2016). Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin Pctx1. *Sci. Rep.* 6, 27647.
- Jones, M.G., Lever, I., Bingham, S., Read, S., McMahon, S.B., and Parsons, A. (2001). Nitric oxide potentiates response of trigeminal neurones to dural or facial stimulation in the rat. *Cephalalgia Int. J. Headache* 21, 643–655.
- Jones, N.G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., and McMahon, S.B. (2004). Acid-induced pain and its modulation in humans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10974–10979.

- Jones, R.C.W., Xu, L., and Gebhart, G.F. (2005). The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 10981–10989.
- Joulia, R., Gaudenzio, N., Rodrigues, M., Lopez, J., Blanchard, N., Valitutti, S., and Espinosa, E. (2015). Mast cells form antibody-dependent degranulatory synapse for dedicated secretion and defence. *Nat. Commun.* *6*, 6174.
- Juhasz, G., Zsombok, T., Modos, E.A., Olajos, S., Jakab, B., Nemeth, J., Szolcsanyi, J., Vitrai, J., and Bagdy, G. (2003). NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain* *106*, 461–470.
- Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 355–384.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* *413*, 203–210.
- Kaczmarek, L.K. (2006). Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 761–771.
- Kadurin, I., Golubovic, A., Leisle, L., Schindelin, H., and Gründer, S. (2008). Differential effects of N-glycans on surface expression suggest structural differences between the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a and ASIC1b. *Biochem. J.* *412*, 469–475.
- Kalina, R., Gladkikh, I., Dmitrenok, P., Chernikov, O., Koshelev, S., Kvetkina, A., Kozlov, S., Kozlovskaya, E., and Monastyrnaya, M. (2018). New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels. *Peptides*.
- Kanaya, K., Iba, K., Abe, Y., Dohke, T., Okazaki, S., Matsumura, T., and Yamashita, T. (2015). Acid-sensing ion channel 3 or P2X2/3 is involved in the pain-like behavior under a high bone turnover state in ovariectomized mice. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*
- Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (2013). *Principles of Neural Science, Fifth Edition* (New York: McGraw-Hill).
- Kanellopoulos, A.H., Zhao, J., Emery, E.C., and Wood, J.N. (2017). Intracellular Sodium Regulates Opioid Signalling in Peripheral Neurons. *BioRxiv* 117952.
- Kanellopoulos, A.H., Koenig, J., Huang, H., Pyrski, M., Millet, Q., Lolignier, S., Morohashi, T., Gossage, S.J., Jay, M., Linley, J.E., et al. (2018). Mapping protein interactions of sodium channel NaV1.7 using epitope-tagged gene-targeted mice. *EMBO J.*
- Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* *564*, 103–116.
- Kang, S., Jang, J.H., Price, M.P., Gautam, M., Benson, C.J., Gong, H., Welsh, M.J., and Brennan, T.J. (2012). Simultaneous disruption of mouse ASIC1a, ASIC2 and ASIC3 genes enhances cutaneous mechanosensitivity. *PLoS One* *7*, e35225.
- Karatas, H., Erdener, S.E., Gursoy-Ozdemir, Y., Lule, S., Eren-Koçak, E., Sen, Z.D., and Dalkara, T. (2013). Spreading Depression Triggers Headache by Activating Neuronal Panx1 Channels. *Science* *339*, 1092–1095.

- Karczewski, J., Spencer, R.H., Garsky, V.M., Liang, A., Leitzl, M.D., Cato, M.J., Cook, S.P., Kane, S., and Urban, M.O. (2010). Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br. J. Pharmacol.* *161*, 950–960.
- Karsan, N., and Goadsby, P.J. (2018). Biological insights from the premonitory symptoms of migraine. *Nat. Rev. Neurol.*
- Karsan, N., Gonzales, E.B., and Dussor, G. (2018). Targeted Acid-Sensing Ion Channel Therapies for Migraine. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E.E., Roth, B.L., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2014). Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 233–244.
- Kaufmann, D., and Brennan, K.C. (2018). The Effects of Chronic Stress on Migraine Relevant Phenotypes in Male Mice. *Front. Cell. Neurosci.* *12*, 294.
- Kaufmann, D., Bates, E.A., Yagen, B., Bialer, M., Saunders, G.H., Wilcox, K., White, H.S., and Brennan, K.C. (2015). sec-Butylpropylacetamide (SPD) has antimigraine properties. *Cephalalgia Int. J. Headache.*
- Kawashima, Y., Géléoc, G.S.G., Kurima, K., Labay, V., Lelli, A., Asai, Y., Makishima, T., Wu, D.K., Santana, C.C.D., Holt, J.R., et al. (2011). Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J. Clin. Invest.* *121*, 4796–4809.
- Kellenberger, S., and Schild, L. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. *Pharmacol. Rev.* *67*, 1–35.
- Kellgren, J.H., and Samuel, E.P. (1950). The sensitivity and innervation of the articular capsule. *J. Bone Joint Surg. Br.* *32-B*, 84–92.
- Kenney, A.M., and Kocsis, J.D. (1998). Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 1318–1328.
- Khalefa, B.I., Shaqura, M., Al-Khrasani, M., Fürst, S., Mousa, S.A., and Schäfer, M. (2012). Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *16*, 690–705.
- Khan, S., Mohammad Amin, F., Emil Christensen, C., Ghanizada, H., Younis, S., Olinger, A.C.R., de Koning, P.J.H., Larsson, H.B.W., and Ashina, M. (2019a). Meningeal contribution to migraine pain: a magnetic resonance angiography study. *Brain J. Neurol.* *142*, 93–102.
- Khan, S., Mohammad Amin, F., Petrine Fliedner, F., Emil Christensen, C., Tolnai, D., Younis, S., Christine Rye Olinger, A., Birgens, H., Daldrup-Link, H., Kjær, A., et al. (2019b). Investigating macrophage-mediated inflammation in migraine using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced 3T magnetic resonance imaging. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102419848122.
- Kilinc, E., Guerrero-Toro, C., Zakharov, A., Vitale, C., Gubert-Olive, M., Koroleva, K., Timonina, A., Luz, L.L., Shelukhina, I., Giniatullina, R., et al. (2017). Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: Implications for migraine pain. *Neuropharmacology* *116*, 160–173.

- Kilinc, E., Dagistan, Y., Kukner, A., Yilmaz, B., Agus, S., Soyler, G., and Tore, F. (2018). Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*
- Kim, S.-J., Yeo, J.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Lee, J.-H., Beitz, A.J., and Roh, D.-H. (2017). Differential Development of Facial and Hind Paw Allodynia in a Nitroglycerin-Induced Mouse Model of Chronic Migraine; Role of Capsaicin Sensitive Primary Afferents. *Biol. Pharm. Bull.*
- Kim, Y.S., Anderson, M., Park, K., Zheng, Q., Agarwal, A., Gong, C., Saijilafu, null, Young, L., He, S., LaVinka, P.C., et al. (2016). Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain. *Neuron* 91, 1085–1096.
- Kingwell, K. (2019). Nav1.7 withholds its pain potential. *Nat. Rev. Drug Discov.*
- Kirthi, V., Derry, S., and Moore, R.A. (2013). Aspirin with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., and Stöter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.* 17, 675–689.
- Knyihár-Csillik, E., and Vécsei, L. (1999). Effect of a nitric oxide donor on nitroergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosci. Lett.* 260, 97–100.
- Knyihár-Csillik, E., Tajti, J., Chadaide, Z., Csillik, B., and Vécsei, L. (2001). Functional immunohistochemistry of neuropeptides and nitric oxide synthase in the nerve fibers of the supratentorial dura mater in an experimental migraine model. *Microsc. Res. Tech.* 53, 193–211.
- Knyihár-Csillik, E., Toldi, J., Mihály, A., Krisztin-Péva, B., Chadaide, Z., Németh, H., Fenyó, R., and Vécsei, L. (2007). Kynurenine in combination with probenecid mitigates the stimulation-induced increase of c-fos immunoreactivity of the rat caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 114, 417–421.
- Knyihar-Csillik, E., Mihaly, A., Krisztin-Peva, B., Robotka, H., Szatmari, I., Fulop, F., Toldi, J., Csillik, B., and Vecsei, L. (2008). The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neurosci. Res.* 61, 429–432.
- Koch, S.C., Acton, D., and Goulding, M. (2017). Spinal Circuits for Touch, Pain, and Itch. *Annu. Rev. Physiol.*
- Kogelman, L.J.A., Christensen, R.E., Pedersen, S.H., Bertalan, M., Hansen, T.F., Jansen-Olesen, I., and Olesen, J. (2017). Whole transcriptome expression of Trigeminal Ganglia compared to Dorsal Root Ganglia in *Rattus Norvegicus*. *Neuroscience*.
- Kogelman, L.J.A., Elgaard-Christensen, R., Olesen, J., Jansen-Olesen, I., and Hansen, T.F. (2018). Transcriptomic Profiling of Trigeminal Nucleus Caudalis and Spinal Cord Dorsal Horn. *Brain Res.*
- Kong, X., Tang, X., Du, W., Tong, J., Yan, Y., Zheng, F., Fang, M., Gong, F., and Tan, Z. (2013). Extracellular acidosis modulates the endocytosis and maturation of macrophages. *Cell. Immunol.* 281, 44–50.
- Kopruszinski, C.M., Xie, J.Y., Eyde, N.M., Remeniuk, B., Walter, S., Stratton, J., Bigal, M., Chichorro, J.G., Dodick, D., and Porreca, F. (2016). Prevention of stress- or nitric oxide donor-induced medication

overuse headache by a calcitonin gene-related peptide antibody in rodents. *Cephalalgia Int. J. Headache*.

Korkushko, A.O., and Kryshchal, O.A. (1984). [Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations]. *Neirofiziologiya* 16, 557–561.

Koulchitsky, S., Fischer, M.J.M., De Col, R., Schlechtweg, P.M., and Messlinger, K. (2004). Biphasic response to nitric oxide of spinal trigeminal neurons with meningeal input in rat--possible implications for the pathophysiology of headaches. *J. Neurophysiol.* 92, 1320–1328.

Koulchitsky, S., Fischer, M.J.M., and Messlinger, K. (2009). Calcitonin gene-related peptide receptor inhibition reduces neuronal activity induced by prolonged increase in nitric oxide in the rat spinal trigeminal nucleus. *Cephalalgia Int. J. Headache* 29, 408–417.

Kozlenkov, A., Lapatsina, L., Lewin, G.R., and Smith, E.S.J. (2014). Subunit-specific inhibition of acid sensing ion channels by stomatin-like protein 1. *J. Physiol.* 592, 557–569.

Krauson, A.J., Rooney, J.G., and Carattino, M.D. (2018). Molecular basis of inhibition of acid sensing ion channel 1A by diminazene. *PLoS One* 13, e0196894.

Kreple, C.J., Dlouhy, B.J., Zenner, K., Marquez De Prado, B., Hammond, D., and Wemmie, J.A. (2011). Disrupting ASIC1a increases met-enkephalin and alters opioid-dependant behavior. *Soc. Neurosci. Meet.* 2011.

Kreple, C.J., Lu, Y., Taugher, R.J., Schwager-Gutman, A.L., Du, J., Stump, M., Wang, Y., Ghobbeh, A., Fan, R., Cosme, C.V., et al. (2014). Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. *Nat. Neurosci.* 17, 1083–1091.

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 5, 2325–2327.

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981a). A “receptor” for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neurosci. Lett.* 24, 243–246.

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981b). A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 6, 2599–2601.

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981c). Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Res.* 214, 150–154.

Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N., and Smirnoff, S.V. (1987). Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 436, 352–356.

Kristiansen, K.A., and Edvinsson, L. (2010). Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion. *J. Headache Pain* 11, 485–495.

Kruise, C., Thomsen, L.L., Jacobsen, T.B., and Olesen, J. (2002). The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil has no effect on cerebral blood flow or blood velocity, but nevertheless induces headache in healthy subjects. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 1124–1131.

- Kruuse, C., Thomsen, L.L., Birk, S., and Olesen, J. (2003). Migraine can be induced by sildenafil without changes in middle cerebral artery diameter. *Brain J. Neurol.* *126*, 241–247.
- Kuca, B., Silberstein, S.D., Wietecha, L., Berg, P.H., Dozier, G., Lipton, R.B., and COL MIG-301 Study Group (2018). Lasmiditan is an effective acute treatment for migraine: A phase 3 randomized study. *Neurology* *91*, e2222–e2232.
- Kucharczyk, M.W., Chisholm, K.I., Lopes, D.M., Derrien, D., Denk, F., Bannister, K., Dickenson, A.H., and McMahon, S.B. (2018). Novel mechanisms of bone cancer pain revealed with in vivo GCaMP6s imaging. *BioRxiv* 498980.
- Kuduk, S.D., Di Marco, C.N., Bodmer-Narkevitch, V., Cook, S.P., Cato, M.J., Jovanovska, A., Urban, M.O., Leidl, M., Sain, N., Liang, A., et al. (2010). Synthesis, structure-activity relationship, and pharmacological profile of analogs of the ASIC-3 inhibitor A-317567. *ACS Chem. Neurosci.* *1*, 19–24.
- Kuhr, F.K., Zhang, Y., Brovkovich, V., and Skidgel, R.A. (2010). Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 2475–2483.
- Kuner, R., and Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* *18*, 20–30.
- Kupari, J., Häring, M., Agirre, E., Castelo-Branco, G., and Ernfors, P. (2019). An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization. *Cell Rep.* *27*, 2508-2523.e4.
- Kurima, K., Peters, L.M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., et al. (2002). Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function. *Nat. Genet.* *30*, 277–284.
- Kusama, N., Harding, A.M.S., and Benson, C.J. (2010). Extracellular Chloride Modulates the Desensitization Kinetics of Acid-sensing Ion Channel 1a (ASIC1a). *J. Biol. Chem.* *285*, 17425–17431.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* *50*, 277–289.
- Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., and Stucky, C.L. (2009). TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 4808–4819.
- Kweon, H.-J., Yu, S.-Y., Kim, D.-I., and Suh, B.-C. (2015). Differential regulation of proton-sensitive ion channels by phospholipids: a comparative study between ASICs and TRPV1. *PLoS One* *10*, e0122014.
- Kweon, H.-J., Kim, D.-I., Bae, Y., Park, J.-Y., and Suh, B.-C. (2016). Acid-Sensing Ion Channel 2a (ASIC2a) Promotes Surface Trafficking of ASIC2b via Heteromeric Assembly. *Sci. Rep.* *6*, 30684.
- Kwiatkowski, K., and Mika, J. (2018). The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol. Rep. PR* *70*, 821–830.
- Kwon, S.-G., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Moon, J.-Y., Choi, S.-R., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., Oh, S.B., et al. (2014). Acid evoked thermal hyperalgesia involves peripheral P2Y1 receptor mediated TRPV1 phosphorylation in a rodent model of thrombus induced ischemic pain. *Mol. Pain* *10*, 2.

- Lafrenière, R.G., Cader, M.Z., Poulin, J.-F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafrenière, F., McLaughlan, S., Dubé, M.-P., et al. (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med.* *16*, 1157–1160.
- Lake, B.B., Ai, R., Kaeser, G.E., Salathia, N.S., Yung, Y.C., Liu, R., Wildberg, A., Gao, D., Fung, H.-L., Chen, S., et al. (2016). Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* *352*, 1586–1590.
- Lallemend, F., and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.* *35*, 373–381.
- Lalo, U., Pankratov, Y., North, R.A., and Verkhratsky, A. (2007). Spontaneous autocrine release of protons activates ASIC-mediated currents in HEK293 cells. *J. Cell. Physiol.* *212*, 473–480.
- Lambert, G.A., Donaldson, C., Boers, P.M., and Zagami, A.S. (2000). Activation of trigeminovascular neurons by glyceryl trinitrate¹. *Brain Res.* *887*, 203–210.
- Lambert, G.A., Hoskin, K.L., and Zagami, A.S. (2004). Nitrergic and glutamatergic neuronal mechanisms at the trigeminovascular first-order synapse. *Neuropharmacology* *47*, 92–105.
- LaMotte, R.H., Dong, X., and Ringkamp, M. (2014). Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 19–31.
- Lang, W., Wang, H., Ding, L., and Xiao, L. (2004). Cooperation between PKC-alpha and PKC-epsilon in the regulation of JNK activation in human lung cancer cells. *Cell. Signal.* *16*, 457–467.
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., et al. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* *7*, 447–449.
- LaPaglia, D.M., Sapio, M.R., Burbelo, P.D., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Raithel, S.J., Ramsden, C.E., Iadarola, M.J., and Mannes, A.J. (2017). RNA-Seq investigations of human post-mortem trigeminal ganglia. *Cephalalgia Int. J. Headache* *33*3102417720216.
- Lapatsina, L., Jira, J.A., Smith, E.S.J., Poole, K., Kozlenkov, A., Bilbao, D., Lewin, G.R., and Heppenstall, P.A. (2012). Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons. *Open Biol.* *2*, 120096.
- Lattanzi, R., Maftei, D., Marconi, V., Florenzano, F., Franchi, S., Borsani, E., Rodella, L.F., Balboni, G., Salvadori, S., Sacerdote, P., et al. (2015). Prokineticin 2 upregulation in the peripheral nervous system has a major role in triggering and maintaining neuropathic pain in the chronic constriction injury model. *BioMed Res. Int.* *2015*, 301292.
- Le Pichon, C.E., and Chesler, A.T. (2014). The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Front. Neuroanat.* *8*.
- Leao, A.A.P. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* *7*, 359–390.
- Lechner, S.G., Frenzel, H., Wang, R., and Lewin, G.R. (2009). Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development. *EMBO J.* *28*, 1479–1491.

Lechner, S.G., Markworth, S., Poole, K., Smith, E.S.J., Lapatsina, L., Frahm, S., May, M., Pischke, S., Suzuki, M., Ibañez-Tallon, I., et al. (2011). The molecular and cellular identity of peripheral osmoreceptors. *Neuron* 69, 332–344.

Lee, J.Y.P., Saez, N.J., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., King, G.F., Smith, M.T., and Rash, L.D. (2017). Inhibition of acid-sensing ion channels by diminazene and APETx2 evoke partial and highly variable antihyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.*

Lee, M.C., Nahorski, M., Hockley, J.R.F., Lu, V.B., Stouffer, K., Fletcher, E., Ison, G., Brown, C., Wheeler, D., Ernfors, P., et al. (2018). Human labor pain is influenced by the voltage-gated potassium channel KV6.4 subunit. *BioRxiv* 489310.

Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.-H., Feder, J.N., Janovitz, E.B., et al. (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J. Biol. Chem.* 278, 20890–20897.

Leffler, A., Mönter, B., and Koltzenburg, M. (2006). The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139, 699–709.

Lei, L., Yuan, X., Wang, S., Zhang, F., Han, Y., Ning, Q., Luo, G., and Lu, S. (2012). Mitogen-activated protein kinase pathways are involved in the upregulation of calcitonin gene-related peptide of rat trigeminal ganglion after organ culture. *J. Mol. Neurosci.* MN 48, 53–65.

Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176.

Leonard, A.S., Yermolaieva, O., Hruska-Hageman, A., Askwith, C.C., Price, M.P., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2003). cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2029–2034.

Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D.M., Isacoff, E.Y., and Sandoz, G. (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4194–4199.

Levy, D. (2009). Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr. Pain Headache Rep.* 13, 237–240.

Levy, D., and Strassman, A.M. (2002). Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *J. Neurophysiol.* 88, 3021–3031.

Levy, D., and Strassman, A.M. (2004). Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J. Neurophysiol.* 92, 766–772.

Levy, D., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2004). Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4274–4279.

Levy, D., Burstein, R., Kainz, V., Jakubowski, M., and Strassman, A.M. (2007). Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain* 130, 166–176.

- Levy, D., Kainz, V., Burstein, R., and Strassman, A.M. (2012). Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity. *Brain. Behav. Immun.* *26*, 311–317.
- Li, J., and Baccei, M.L. (2017). Functional Organization of Cutaneous and Muscle Afferent Synapses onto Immature Spinal Lamina I Projection Neurons. *J. Neurosci.* *37*, 1505–1517.
- Li, C.-L., Li, K.-C., Wu, D., Chen, Y., Luo, H., Zhao, J.-R., Wang, S.-S., Sun, M.-M., Lu, Y.-J., Zhong, Y.-Q., et al. (2016a). Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res.* *26*, 83–102.
- Li, H.-S., Su, X.-Y., Song, X.-L., Qi, X., Li, Y., Wang, R.-Q., Maximyuk, O., Krishtal, O., Wang, T., Fang, H., et al. (2019a). Protein kinase C lambda mediates acid-sensing ion channel 1a-dependent cortical synaptic plasticity and pain hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*
- Li, L., Rutlin, M., Abraira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011a). The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. *Cell* *147*, 1615–1627.
- Li, M.-M., Zhou, P., Chen, X.-D., Xu, H.-S., Wang, J., Chen, L., Zhang, N., and Liu, N. (2019b). NO in the dPAG modulates panic-like responses and ASIC1a expression in the prefrontal cortex and hippocampus in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Li, R., Liu, Y., Chen, N., Zhang, Y., Song, G., and Zhang, Z. (2016b). Valproate Attenuates Nitroglycerin-Induced Trigeminovascular Activation by Preserving Mitochondrial Function in a Rat Model of Migraine. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *22*, 3229–3237.
- Li, S., Xue, C., Yuan, Y., Zhang, R., Wang, Y., Wang, Y., Yu, B., Liu, J., Ding, F., Yang, Y., et al. (2015). The transcriptional landscape of dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *Sci. Rep.* *5*, 16888.
- Li, T., Yang, Y., and Canessa, C.M. (2012). Impact of recovery from desensitization on acid-sensing ion channel-1a (ASIC1a) current and response to high frequency stimulation. *J. Biol. Chem.* *287*, 40680–40689.
- Li, W.-G., Yu, Y., Zhang, Z.-D., Cao, H., and Xu, T.-L. (2010). ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Mol. Pain* *6*, 88.
- Li, W.-G., Yu, Y., Huang, C., Cao, H., and Xu, T.-L. (2011b). Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride. *J. Biol. Chem.* *286*, 42635–42646.
- Li, W.-G., Liu, M.-G., Deng, S., Liu, Y.-M., Shang, L., Ding, J., Hsu, T.-T., Jiang, Q., Li, Y., Li, F., et al. (2016c). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nat. Commun.* *7*, 13770.
- Li, X., Ye, J.-X., Xu, M.-H., Zhao, M.-D., and Yuan, F.-L. (2017). Evidence that activation of ASIC1a by acidosis increases osteoclast migration and adhesion by modulating integrin/Pyk2/Src signaling pathway. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA.*
- Li, Y., Zhang, Q., Qi, D., Zhang, L., Yi, L., Li, Q., and Zhang, Z. (2016d). Valproate ameliorates nitroglycerin-induced migraine in trigeminal nucleus caudalis in rats through inhibition of NF-κB. *J. Headache Pain* *17*, 49.

- Li, Y., Guan, J., Wang, W., Hou, C., Zhou, L., Ma, J., Cheng, Y., Jiao, S., and Zhou, Z. (2019c). TRAF3-interacting JNK-activating modulator promotes inflammation by stimulating translocation of Toll-like receptor 4 to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* *294*, 2744–2756.
- Light, A.R., Huguen, R.W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., and Lee, J. (2008). Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J. Neurophysiol.* *100*, 1184–1201.
- Lin, S.-H., Sun, W.-H., and Chen, C.-C. (2015). Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology*.
- Lin, S.-H., Cheng, Y.-R., Banks, R.W., Min, M.-Y., Bewick, G.S., and Chen, C.-C. (2016). Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors. *Nat. Commun.* *7*, 11460.
- Lin, Y.-W., Min, M.-Y., Lin, C.-C., Chen, W.-N., Wu, W.-L., Yu, H.-M., and Chen, C.-C. (2008). Identification and characterization of a subset of mouse sensory neurons that express acid-sensing ion channel 3. *Neuroscience* *151*, 544–557.
- Lindahl, O. (1974). Pain - a general chemical explanation. In: Bonica, J.J (Ed), Pain, *Advances in Neurology* (New York).
- Lindwall, C., Dahlin, L., Lundborg, G., and Kanje, M. (2004). Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *27*, 267–279.
- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J. Biol. Chem.* *282*, 17325–17329.
- Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., and Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* *378*, 730–733.
- Lingueglia, E., de Weille, J.R., Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1997). A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 29778–29783.
- Lipton, R.B., Bigal, M.E., Ashina, S., Burstein, R., Silberstein, S., Reed, M.L., Serrano, D., Stewart, W.F., and American Migraine Prevalence Prevention Advisory Group (2008). Cutaneous allodynia in the migraine population. *Ann. Neurol.* *63*, 148–158.
- Lipton, R.B., Munjal, S., Buse, D.C., Bennett, A., Fanning, K.M., Burstein, R., and Reed, M.L. (2017). Allodynia Is Associated With Initial and Sustained Response to Acute Migraine Treatment: Results from the American Migraine Prevalence and Prevention Study. *Headache*.
- Liu, L., and Simon, S.A. (2000). Capsaicin, acid and heat-evoked currents in rat trigeminal ganglion neurons: relationship to functional VR1 receptors. *Physiol. Behav.* *69*, 363–378.
- Liu, B., Tai, Y., Caceres, A.I., Achanta, S., Balakrishna, S., Shao, X., Fang, J., and Jordt, S.-E. (2016a). Oxidized Phospholipid OxPAPC Activates TRPA1 and Contributes to Chronic Inflammatory Pain in Mice. *PloS One* *11*, e0165200.
- Liu, M.-G., Li, H.-S., Li, W.-G., Wu, Y.-J., Deng, S.-N., Huang, C., Maximyuk, O., Sukach, V., Krishtal, O., Zhu, M.X., et al. (2016b). Acid-sensing ion channel 1a contributes to hippocampal LTP inducibility through multiple mechanisms. *Sci. Rep.* *6*, 23350.

- Liu, P., Xiao, Z., Ren, F., Guo, Z., Chen, Z., Zhao, H., and Cao, Y.-Q. (2013). Functional analysis of a migraine-associated TRESK K⁺ channel mutation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 12810–12824.
- Liu, Q., Tang, Z., Surdenikova, L., Kim, S., Patel, K.N., Kim, A., Ru, F., Guan, Y., Weng, H.-J., Geng, Y., et al. (2009). Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* *139*, 1353–1365.
- Liu, S., Liu, Y.-P., Huang, Z.-J., Zhang, Y.-K., Song, A.A., Ma, P.-C., and Song, X.-J. (2015). Wnt/Ryk signaling contributes to neuropathic pain by regulating sensory neuron excitability and spinal synaptic plasticity in rats. *Pain* *156*, 2572–2584.
- Liu, T.-T., Qu, Z.-W., Ren, C., Gan, X., Qiu, C.-Y., and Hu, W.-P. (2016c). Prolactin potentiates the activity of acid-sensing ion channels in female rat primary sensory neurons. *Neuropharmacology* *103*, 174–182.
- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., IJzerman, A.P., et al. (2012a). Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* *337*, 232–236.
- Liu, Y., Latremoliere, A., Li, X., Zhang, Z., Chen, M., Wang, X., Fang, C., Zhu, J., Alexandre, C., Gao, Z., et al. (2018a). Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections. *Nature*.
- Liu, Y., Hagan, R., and Schoellerman, J. (2018b). Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a). *Sci. Rep.* *8*, 7179.
- Liu, Y.-Q., Qiu, F., Qiu, C.-Y., Cai, Q., Zou, P., Wu, H., and Hu, W.-P. (2012b). Cannabinoids inhibit acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *PLoS One* *7*, e45531.
- Liu, Y.-Y., Jiao, Z.-Y., Li, W., and Tian, Q. (2017). PI3K/AKT signaling pathway activation in a rat model of migraine. *Mol. Med. Rep.*
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* *87*, 565–576.
- Livingston, K.E., and Traynor, J.R. (2014). Disruption of the Na⁺ ion binding site as a mechanism for positive allosteric modulation of the mu-opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 18369–18374.
- Lloyd, D.P.C. (1942). Stimulation of peripheral nerve terminations by active muscle. *J. Neurophysiol.* *5*, 153–165.
- Lloyd, D.P.C. (1943a). Conduction and synaptic transmission of the reflex response to stretch in spinal cats. *J. Neurophysiol.* *6*, 317–326.
- Lloyd, D.P.C. (1943b). Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat. *J. Neurophysiol.* *6*, 293–315.
- Lloyd, D.P.C. (1944). Functional organization of the spinal cord. *Physiol. Rev.* *24*, 1–17.

Lolignier, S., Bonnet, C., Gaudioso, C., Noël, J., Ruel, J., Amsalem, M., Ferrier, J., Rodat-Despoix, L., Bouvier, V., Aissouni, Y., et al. (2015). The Nav1.9 channel is a key determinant of cold pain sensation and cold allodynia. *Cell Rep.* *11*, 1067–1078.

Lolignier, S., Gkika, D., Andersson, D., Leipold, E., Vetter, I., Viana, F., Noël, J., and Busserolles, J. (2016). New Insight in Cold Pain: Role of Ion Channels, Modulation, and Clinical Perspectives. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 11435–11439.

Long, T., He, W., Pan, Q., Zhang, S., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Q., Qin, G., Chen, L., and Zhou, J. (2018). Microglia P2X4 receptor contributes to central sensitization following recurrent nitroglycerin stimulation. *J. Neuroinflammation* *15*, 245.

Lopes, D.M., Denk, F., and McMahon, S.B. (2017a). The Molecular Fingerprint of Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* *10*.

Lopes, D.M., Malek, N., Edey, M., Jager, S.B., McMurray, S., McMahon, S.B., and Denk, F. (2017b). Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. *Sci. Rep.* *7*, 16460.

López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.-H., and Ronai, Z. (2005). Receptor for RACK1 Mediates Activation of JNK by Protein Kinase C. *Mol. Cell* *19*, 309–320.

Lou, S., Duan, B., Vong, L., Lowell, B.B., and Ma, Q. (2013). Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 870–882.

Lourenço, C.F., Ledo, A., Gerhardt, G.A., Laranjinha, J., and Barbosa, R.M. (2017). Neurometabolic and electrophysiological changes during cortical spreading depolarization: multimodal approach based on a lactate-glucose dual microbiosensor arrays. *Sci. Rep.* *7*, 6764.

Louter, M.A., Bosker, J.E., van Oosterhout, W.P.J., van Zwet, E.W., Zitman, F.G., Ferrari, M.D., and Terwindt, G.M. (2013). Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain J. Neurol.* *136*, 3489–3496.

Lu, Y., Ma, X., Sabharwal, R., Snitsarev, V., Morgan, D., Rahmouni, K., Drummond, H.A., Whiteis, C.A., Costa, V., Price, M., et al. (2009). The ion channel ASIC2 is required for baroreceptor and autonomic control of the circulation. *Neuron* *64*, 885–897.

Luiz, A.P., MacDonald, D.I., Santana-Varela, S., Millet, Q., Sikandar, S., Wood, J.N., and Emery, E.C. (2019). Cold sensing by Nav1.8-positive and Nav1.8-negative sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 3811–3816.

Lumpkin, E.A., and Caterina, M.J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* *445*, 858–865.

Lundblad, C., Haanes, K.A., Grände, G., and Edvinsson, L. (2015). Experimental inflammation following dural application of complete Freund's adjuvant or inflammatory soup does not alter brain and trigeminal microvascular passage. *J. Headache Pain* *16*, 91.

Luo, C., Kuner, T., and Kuner, R. (2014). Synaptic plasticity in pathological pain. *Trends Neurosci.* *37*, 343–355.

Luo, J., Shen, W.L., and Montell, C. (2017). TRPA1 mediates sensation of the rate of temperature change in *Drosophila* larvae. *Nat. Neurosci.* *20*, 34–41.

- Lupi, C., Benemei, S., Guerzoni, S., Pellesi, L., and Negro, A. (2019). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of new acute treatments for migraine. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *15*, 189–198.
- Lynagh, T., Flood, E., Boiteux, C., Wulf, M., Komnatnyy, V.V., Colding, J.M., Allen, T.W., and Pless, S.A. (2017). A selectivity filter at the intracellular end of the acid-sensing ion channel pore. *ELife* *6*.
- Lynagh, T., Mikhaleva, Y., Colding, J.M., Glover, J.C., and Pless, S.A. (2018). Acid-sensing ion channels emerged over 600 Mya and are conserved throughout the deuterostomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Ma, C.-L., Sun, H., Yang, L., Wang, X.-T., Gao, S., Chen, X.-W., Ma, Z.-Y., Wang, G.-H., Shi, Z., and Zheng, Q.-Y. (2019). Acid-Sensing Ion Channel 1a Modulates NMDA Receptor Function through Targeting NR1/NR2A/NR2B Triheteromeric Receptors. *Neuroscience*.
- Ma, W., Zheng, W.H., Powell, K., Jhamandas, K., and Quirion, R. (2001). Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 1091–1104.
- van den Maagdenberg, A.M.J.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L.A.M., Cesetti, T., van de Ven, R.C.G., Tottene, A., van der Kaa, J., Plomp, J.J., et al. (2004). A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* *41*, 701–710.
- van den Maagdenberg, A.M.J.M., Nyholt, D.R., and Anttila, V. (2019). Novel hypotheses emerging from GWAS in migraine? *J. Headache Pain* *20*, 5.
- MaassenVanDenBrink, A., Meijer, J., Villalón, C.M., and Ferrari, M.D. (2016). Wiping Out CGRP: Potential Cardiovascular Risks. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 779–788.
- MacLean, D.M., and Jayaraman, V. (2016). Acid sensing ion channels are tuned to follow high frequency stimuli. *J. Physiol.*
- MacLean, D.M., and Jayaraman, V. (2017). Deactivation kinetics of acid-sensing ion channel 1a are strongly pH-sensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323–350.
- Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., and Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* *445*, 541–545.
- Mahmoudi, J., Mohaddes, G., Erfani, M., Sadigh-Eteghad, S., Karimi, P., Rajabi, M., Reyhani-Rad, S., and Farajdokht, F. (2018). Cerebrolysin attenuates hyperalgesia, photophobia, and neuroinflammation in a nitroglycerin-induced migraine model in rats. *Brain Res. Bull.*
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000). TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* *19*, 2483–2491.
- Makadia, P.A., Najjar, S.A., Saloman, J.L., Adelman, P., Feng, B., Margiotta, J.F., Albers, K.M., and Davis, B.M. (2018). Optogenetic activation of colon epithelium of the mouse produces high frequency bursting in extrinsic colon afferents and engages visceromotor responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*

- Malin, S.A., Davis, B.M., and Molliver, D.C. (2007). Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat. Protoc.* 2, 152–160.
- Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10662–10670.
- Mamet, J., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 48907–48913.
- Manassero, G., Repetto, I.E., Cobianchi, S., Valsecchi, V., Bonny, C., Rossi, F., and Vercelli, A. (2012). Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol. Pain* 8, 39.
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D.K., McCorvy, J.D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R.C., Bernat, V., Hübner, H., et al. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537, 185–190.
- Mango, D., Barbato, G., Piccirilli, S., Panico, M.B., Feligioni, M., Schepisi, C., Graziani, M., Porrini, V., Benarese, M., Lanzillotta, A., et al. (2014). Electrophysiological and metabolic effects of CHF5074 in the hippocampus: protection against in vitro ischemia. *Pharmacol. Res.* 81, 83–90.
- Maniyar, F.H., Sprenger, T., Monteith, T., Schankin, C., and Goadsby, P.J. (2014). Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain J. Neurol.* 137, 232–241.
- Manoukian, R., Sun, H., Miller, S., Shi, D., Chan, B., and Xu, C. (2019). Effects of monoclonal antagonist antibodies on calcitonin gene-related peptide receptor function and trafficking. *J. Headache Pain* 20, 44.
- Manteniotis, S., Lehmann, R., Flegel, C., Vogel, F., Hofreuter, A., Schreiner, B.S.P., Altmüller, J., Becker, C., Schöbel, N., Hatt, H., et al. (2013). Comprehensive RNA-Seq expression analysis of sensory ganglia with a focus on ion channels and GPCRs in Trigeminal ganglia. *PloS One* 8, e79523.
- Mantyh, P.W. (2014). The neurobiology of skeletal pain. *Eur. J. Neurosci.* 39, 508–519.
- Marani, E., and Lakke, E.A.J.F. (2012). Chapter 4 - Peripheral Nervous System Topics. In *The Human Nervous System (Third Edition)*, J.K. Mai, and G. Paxinos, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 82–140.
- Marciszewski, K.K., Meylakh, N., Pietro, F.D., Mills, E.P., Macefield, V.G., Macey, P.M., and Henderson, L.A. (2018). Changes in Brainstem Pain Modulation Circuitry Function over the Migraine Cycle. *J. Neurosci.* 38, 10479–10488.
- Marcus, R., Goadsby, P.J., Dodick, D., Stock, D., Manos, G., and Fischer, T.Z. (2014). BMS-927711 for the acute treatment of migraine: a double-blind, randomized, placebo controlled, dose-ranging trial. *Cephalalgia Int. J. Headache* 34, 114–125.
- Mari, Y., Katnik, C., and Cuevas, J. (2015). σ -1 Receptor Inhibition of ASIC1a Channels is Dependent on a Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein and an AKAP150/Calcineurin Complex. *Neurochem. Res.* 40, 2055–2067.

- Markovics, A., Kormos, V., Gaszner, B., Lashgarara, A., Szoke, E., Sandor, K., Szabadfi, K., Tuka, B., Tajti, J., Szolcsanyi, J., et al. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* *45*, 633–644.
- Marone, I.M., De Logu, F., Nassini, R., De Carvalho Goncalves, M., Benemei, S., Ferreira, J., Jain, P., Li Puma, S., Bunnnett, N.W., Geppetti, P., et al. (2018). TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain J. Neurol.*
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* *7*, 179–185.
- Marra, S., Ferru-Clement, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebille, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* *35*, 414–428.
- Martami, F., Razeghi Jahromi, S., Togha, M., Ghorbani, Z., Seifishahpar, M., and Saidpour, A. (2018). The serum level of inflammatory markers in chronic and episodic migraine: a case-control study. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*
- Martelletti, P., Stirparo, G., Rinaldi, C., and Fusco, B.M. (1994). Function of the peripheral serotonergic pathways in migraine: a proposal for an experimental model. *Cephalalgia Int. J. Headache* *14*, 11–15; discussion 4.
- Martelletti, P., Stirparo, G., Morrone, S., Rinaldi, C., and Giacobozzo, M. (1997). Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), soluble ICAM-1 and interleukin-4 by nitric oxide expression in migraine patients. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *75*, 448–453.
- Martin, R.S., and Martin, G.R. (2001). Investigations into migraine pathogenesis: time course for effects of m-CPP, BW723C86 or glyceryl trinitrate on appearance of Fos-like immunoreactivity in rat trigeminal nucleus caudalis (TNC). *Cephalalgia Int. J. Headache* *21*, 46–52.
- Martin, L.J., Smith, S.B., Khoutorsky, A., Magnussen, C.A., Samoshkin, A., Sorge, R.E., Cho, C., Yosefpour, N., Sivaselvachandran, S., Tohyama, S., et al. (2017). Epiregulin and EGFR interactions are involved in pain processing. *J. Clin. Invest.* *127*, 3353–3366.
- Martínez-Rojas, V.A., Barragán-Iglesias, P., Rocha-González, H.I., Murbartián, J., and Granados-Soto, V. (2014). Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacol. Rep. PR* *66*, 964–971.
- Martins, L.B., Duarte, H., Ferreira, A.V.M., Rocha, N.P., Teixeira, A.L., and Domingues, R.B. (2015). Migraine is associated with altered levels of neurotrophins. *Neurosci. Lett.* *587*, 6–10.
- Mason, B.N., Kaiser, E.A., Kuburas, A., Loomis, M.-C.M., Latham, J.A., Garcia-Martinez, L.F., and Russo, A.F. (2017). Induction of Migraine-Like Photophobic Behavior in Mice by Both Peripheral and Central CGRP Mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *37*, 204–216.
- Massari, F., D'Andrea, L., Cervo, M.A., Serra, F.P., Covelli, V., and Buscaino, G.A. (1994). Quantitative and qualitative modifications of lymphocyte subsets after sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraineurs. Preliminary report. *Acta Neurol. (Napoli)* *16*, 11–18.
- Mathew, P.G., Cutrer, F.M., and Garza, I. (2016). A touchy subject: an assessment of cutaneous allodynia in a chronic migraine population. *J. Pain Res.* *9*, 101–104.

Matricon, J., Gelot, A., Etienne, M., Lazdunski, M., Muller, E., and Ardid, D. (2011). Spinal cord plasticity and acid-sensing ion channels involvement in a rodent model of irritable bowel syndrome. *Eur J Pain* 15, 335–343.

Matricon, J., Muller, E., Accarie, A., Meleine, M., Etienne, M., Voilley, N., Busserolles, J., Eschaliere, A., Lazdunski, M., Bourdu, S., et al. (2013). Peripheral contribution of NGF and ASIC1a to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, e740–e754.

May, A. (2017). Understanding migraine as a cycling brain syndrome: reviewing the evidence from functional imaging. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 38, 125–130.

Mazzocchi, N., Grohovaz, F., Taverna, S., and Menegon, A. (2019). Membrane potential changes occurring upon acidification influence the binding of small-molecule inhibitors to ASIC1a. *Neuropharmacology* 148, 366–376.

Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., et al. (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* 10, 943–945.

McCormack, K., Santos, S., Chapman, M.L., Krafte, D.S., Marron, B.E., West, C.W., Krambis, M.J., Antonio, B.M., Zellmer, S.G., Printzenhoff, D., et al. (2013). Voltage sensor interaction site for selective small molecule inhibitors of voltage-gated sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2724-2732.

McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., Street, S.E., Pribisko, A.L., Zheng, J., and Zylka, M.J. (2013). Peptidergic CGRP α Primary Sensory Neurons Encode Heat and Itch and Tonicly Suppress Sensitivity to Cold. *Neuron* 78, 138–151.

McDermott, L.A., Weir, G.A., Themistocleous, A.C., Segerdahl, A.R., Blesneac, I., Baskozos, G., Clark, A.J., Millar, V., Peck, L.J., Ebner, D., et al. (2019). Defining the Functional Role of NaV1.7 in Human Nociception. *Neuron*.

McGlone, F., and Reilly, D. (2010). The cutaneous sensory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 148–159.

McIlwrath, S.L., Hu, J., Anirudhan, G., Shin, J.-B., and Lewin, G.R. (2005). The sensory mechanotransduction ion channel ASIC2 (acid sensitive ion channel 2) is regulated by neurotrophin availability. *Neuroscience* 131, 499–511.

McIlwrath, S.L., Lawson, J.J., Anderson, C.E., Albers, K.M., and Koerber, H.R. (2007). Overexpression of neurotrophin-3 enhances the mechanical response properties of slowly adapting type 1 afferents and myelinated nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1801–1812.

McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58.

McMahon, S.B., and Koltzenburg, M. (2013). *Wall & Melzack's Textbook of Pain*, 6th Edition (Philadelphia: Elsevier Saunders).

McMahon, S.B., and Wall, P.D. (1989). Changes in spinal cord reflexes after cross-anastomosis of cutaneous and muscle nerves in the adult rat. *Nature* 342, 272–274.

McMahon, S.B., Armanini, M.P., Ling, L.H., and Phillips, H.S. (1994). Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* 12, 1161–1171.

McMahon, S.B., La Russa, F., and Bennett, D.L.H. (2015). Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 389–402.

Mecheri, B., Paris, F., and Lübbert, H. (2018). Histological investigations on the dura mater vascular system of mice. *Acta Histochem.* 120, 846–857.

Megat, S., and Price, T.J. (2018). Therapeutic opportunities for pain medicines via targeting of specific translation signaling mechanisms. *Neurobiol. Pain Elsevier* 4, 8–19.

Megat, S., Ray, P.R., Moy, J.K., Lou, T.-F., Barragan-Iglesias, P., Li, Y., Pradhan, G., Wanghzou, A., Ahmad, A., Burton, M.D., et al. (2018). Nociceptor translational profiling reveals the Ragulator-Rag GTPase complex as a critical generator of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2661–18.

Mehta, S., Zhang, Y., Roth, R.H., Zhang, J., Mo, A., Tenner, B., Haganir, R.L., and Zhang, J. (2018). Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities. *Nat. Cell Biol.* 20, 1215.

Meixiong, J., and Dong, X. (2017). Mas-Related G Protein-Coupled Receptors and the Biology of Itch Sensation. *Annu. Rev. Genet.* 51, 103–121.

Melin, C., Jacquot, F., Dallel, R., and Artola, A. (2013). Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via the activation of GABAB receptors. *Eur. J. Neurosci.* 37, 417–428.

Melin, C., Jacquot, F., Vitello, N., Dallel, R., and Artola, A. (2016). Different processing of meningeal and cutaneous pain information in the spinal trigeminal nucleus caudalis. *Cephalalgia Int. J. Headache.*

Melo-Carrillo, A., Strassman, A.M., Nir, R.-R., Schain, A., Nosedá, R., Stratton, J., and Burstein, R. (2017a). Fremanezumab - a humanized monoclonal anti-CGRP antibody - inhibits thinly myelinated (A δ) but not unmyelinated (C) meningeal nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*

Melo-Carrillo, A., Nosedá, R., Nir, R.-R., Schain, A.J., Stratton, J., Strassman, A.M., and Burstein, R. (2017b). Selective Inhibition of Trigeminovascular Neurons by Fremanezumab: A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 7149–7163.

Meng, Q.Y., Wang, W., Chen, X.N., Xu, T.L., and Zhou, J.N. (2009). Distribution of acid-sensing ion channel 3 in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 159, 1126–1134.

Menna, G., Tong, C.K., and Chesler, M. (2000). Extracellular pH changes and accompanying cation shifts during ouabain-induced spreading depression. *J. Neurophysiol.* 83, 1338–1345.

Messlinger, K., Pawlak, M., Steinbach, H., Trost, B., and Schmidt, R.F. (1995). A new combination of methods for the localization, identification, and three-dimensional reconstruction of the sensory endings of articular afferents characterized by electrophysiology. *Cell Tissue Res.* 281, 283–294.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.

- Miclescu, A., and Gordh, T. (2009). Nitric oxide and pain: "Something old, something new." *Acta Anaesthesiol. Scand.* 53, 1107–1120.
- Middlemas, A.B., Agthong, S., and Tomlinson, D.R. (2006). Phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in sensory neurones of diabetic rats, with possible effects on nerve conduction and neuropathic pain: prevention with an aldose reductase inhibitor. *Diabetologia* 49, 580–587.
- Miesenböck, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192–195.
- Miglis, M.G. (2018). Migraine and Autonomic Dysfunction: Which Is the Horse and Which Is the Jockey? *Curr. Pain Headache Rep.* 22, 19.
- Mikhailov, N., Leskinen, J., Fagerlund, I., Poguzhelskaya, E., Giniatullina, R., Gafurov, O., Malm, T., Karjalainen, T., Gröhn, O., and Giniatullin, R. (2019). Mechanosensitive meningeal nociception via Piezo channels: Implications for pulsatile pain in migraine? *Neuropharmacology* 149, 113–123.
- Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Miller, S., Liu, H., Warfvinge, K., Shi, L., Dovlatyan, M., Xu, C., and Edvinsson, L. (2016). Immunohistochemical localization of the calcitonin gene-related peptide binding site in the primate trigeminovascular system using functional antagonist antibodies. *Neuroscience* 328, 165–183.
- Minett, M.S., Nassar, M.A., Clark, A.K., Passmore, G., Dickenson, A.H., Wang, F., Malcangio, M., and Wood, J.N. (2012). Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons. *Nat. Commun.* 3, 791.
- Minett, M.S., Pereira, V., Sikandar, S., Matsuyama, A., Lolignier, S., Kanellopoulos, A.H., Mancini, F., Iannetti, G.D., Bogdanov, Y.D., Santana-Varela, S., et al. (2015). Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. *Nat. Commun.* 6, 8967.
- Miracourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS One* 2, e1116.
- Miracourt, L.S., Moisset, X., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2009). Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 2519–2527.
- Miyamoto, T., Dubin, A.E., Petrus, M.J., and Patapoutian, A. (2009). TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. *PLoS ONE* 4.
- Moayed, M., and Davis, K.D. (2013). Theories of pain: from specificity to gate control. *J. Neurophysiol.* 109, 5–12.
- Moehring, F., Halder, P., Seal, R.P., and Stucky, C.L. (2018a). Uncovering the Cells and Circuits of Touch in Normal and Pathological Settings. *Neuron* 100, 349–360.
- Moehring, F., Cowie, A.M., Menzel, A.D., Weyer, A.D., Grzybowski, M., Arzua, T., Geurts, A.M., Palygin, O., and Stucky, C.L. (2018b). Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *ELife* 7.
- Moehring, F., Sadler, K., and Stucky, C. (2018c). Optogenetic Inhibition of Epidermal Cells Impairs Heat and Cold Sensation in Mice. *World Congr. Pain PSN107*.

- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., and Snider, W.D. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19, 849–861.
- Molliver, D.C., Immke, D.C., Fierro, L., Paré, M., Rice, F.L., and McCleskey, E.W. (2005). ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol. Pain* 1, 35.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Montalbetti, N., Rooney, J.G., Marciszyn, A.L., and Carattino, M.D. (2018). ASIC3 fine-tunes bladder sensory signaling. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.*
- Moparathi, L., Kichko, T.I., Eberhardt, M., Högestätt, E.D., Kjellbom, P., Johanson, U., Reeh, P.W., Leffler, A., Filipovic, M.R., and Zygmunt, P.M. (2016). Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci. Rep.* 6, 28763.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468–1472.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep.* 8, 1571–1582.
- Morrison, S.F., Nakamura, K., and Madden, C.J. (2008). Central control of thermogenesis in mammals. *Exp. Physiol.* 93, 773–797.
- Moshourab, R.A., Wetzel, C., Martinez-Salgado, C., and Lewin, G.R. (2013). Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity. *J. Physiol.* 591, 5555–5574.
- Mourier, G., Salinas, M., Kessler, P., Stura, E.A., Leblanc, M., Tepshi, L., Besson, T., Diochot, S., Baron, A., Douguet, D., et al. (2015). Mambalgin-1 pain-relieving peptide: stepwise solid-phase synthesis, crystal structure and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition. *J. Biol. Chem.*
- Moye, L.S., Novack, M.L., Tipton, A.F., Krishnan, H., Pandey, S.C., and Pradhan, A.A. (2018a). The development of a mouse model of mTBI-induced post-traumatic migraine, and identification of the delta opioid receptor as a novel therapeutic target. *Cephalalgia* 0333102418777507.
- Moye, L.S., Tipton, A.F., Dripps, I., Sheets, Z., Crombie, A., Violin, J.D., and Pradhan, A.A. (2018b). Delta opioid receptor agonists are effective for multiple types of headache disorders. *Neuropharmacology*.
- Muller, P.A., Kerner, Z., Pane, M.S., and Mucida, D. (2019). Microbiota imprint gut-intrinsic neuronal programming and sympathetic activity. *BioRxiv* 545806.
- Munro, G., Christensen, J.K., Erichsen, H.K., Dyhring, T., Demnitz, J., Dam, E., and Ahring, P.K. (2016). NS383 Selectively Inhibits Acid-Sensing Ion Channels Containing 1a and 3 Subunits to Reverse Inflammatory and Neuropathic Hyperalgesia in Rats. *CNS Neurosci. Ther.* 22, 135–145.

- Murthy, S.E., Loud, M.C., Daou, I., Marshall, K.L., Schwaller, F., Kühnemund, J., Francisco, A.G., Keenan, W.T., Dubin, A.E., Lewin, G.R., et al. (2018a). The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci. Transl. Med.* *10*, eaat9897.
- Murthy, S.E., Dubin, A.E., Whitwam, T., Jojoa-Cruz, S., Cahalan, S.M., Mousavi, S.A.R., Ward, A.B., and Patapoutian, A. (2018b). OSCA/TMEM63 are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels. *ELife* *7*.
- Muthuraman, A., Jaggi, A.S., Singh, N., and Singh, D. (2008). Ameliorative effects of amiloride and pralidoxime in chronic constriction injury and vincristine induced painful neuropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *587*, 104–111.
- Nagae, M., Hiraga, T., Wakabayashi, H., Wang, L., Iwata, K., and Yoneda, T. (2006). Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone* *39*, 1107–1115.
- Nagae, M., Hiraga, T., and Yoneda, T. (2007). Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *J. Bone Miner. Metab.* *25*, 99–104.
- Nagaeva, E.I., Potapieva, N.N., and Tikhonov, D.B. (2015). The Effect of Hydrophobic Monoamines on Acid-Sensing Ion Channels ASIC1B. *Acta Naturae* *7*, 95–101.
- Nagaeva, E.I., Tikhonova, T.B., Magazanik, L.G., and Tikhonov, D.B. (2016). Histamine selectively potentiates acid-sensing ion channel 1a. *Neurosci. Lett.* *632*, 136–140.
- Nagy-Grócz, G., Tar, L., Bohár, Z., Fejes-Szabó, A., Laborc, K.F., Spekker, E., Vécsei, L., and Párdutz, Á. (2015). The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Nagy-Grócz, G., Laborc, K.F., Veres, G., Bajtai, A., Bohár, Z., Zádori, D., Fejes-Szabó, A., Spekker, E., Vécsei, L., and Párdutz, Á. (2017). The Effect of Systemic Nitroglycerin Administration on the Kynurenine Pathway in the Rat. *Front. Neurol.* *8*, 278.
- Nahman-Averbuch, H., Shefi, T., Schneider, V.J., Li, D., Ding, L., King, C.D., and Coghill, R.C. (2018). Quantitative sensory testing in patients with migraine: a systemic review and meta-analysis. *Pain*.
- Nakamura, M., and Jang, I.-S. (2014). Characterization of proton-induced currents in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurons. *Brain Res.* *1583*, 12–22.
- Nakamura, M., and Jang, I.-S. (2018). Characterization of dural afferent neurons innervating cranial blood vessels within the dura in rats. *Brain Res.*
- Namer, B., Schick, M., Kleggetveit, I.P., Ørstavik, K., Schmidt, R., Jorum, E., Torebjörk, E., Handwerker, H., and Schmelz, M. (2015). Differential sensitization of silent nociceptors to low pH stimulation by prostaglandin E2 in human volunteers. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *19*, 159–166.
- Nation, K.M., Dodick, D.W., Navratilova, E., and Porreca, F. (2019). Sustained exposure to acute migraine medications combined with repeated noxious stimulation dysregulates descending pain modulatory circuits: Relevance to medication overuse headache. *Cephalalgia Int. J. Headache* *39*, 617–625.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF Receptor 1 Through a Noncytotoxic TRAF2-Dependent Pathway. *Science* *275*, 200–203.

- Natoli, J.L., Manack, A., Dean, B., Butler, Q., Turkel, C.C., Stovner, L., and Lipton, R.B. (2010). Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 599–609.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799.
- Nencini, S., Ringuet, M., Kim, D.-H., Greenhill, C., and Ivanusic, J.J. (2018). GDNF, Neurturin, and Artemin Activate and Sensitize Bone Afferent Neurons and Contribute to Inflammatory Bone Pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 4899–4911.
- Nguyen, M.Q., Wu, Y., Bonilla, L.S., Buchholtz, L.J. von, and Ryba, N.J.P. (2017). Diversity amongst trigeminal neurons revealed by high throughput single cell sequencing. *PLOS ONE* 12, e0185543.
- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299, 793–797.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., et al. (1983a). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301, 251–255.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., et al. (1983b). Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302, 528.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., et al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M., and Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322, 826.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalièr, A., et al. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28, 1308–1318.
- Noel, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels Austin* 5, 402–409.
- Nomura, K., Hiyama, T.Y., Sakuta, H., Matsuda, T., Lin, C.-H., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Kuwaki, T., Takahashi, K., Matsui, S., et al. (2018). [Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Na^x Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron* 0.
- North, R.Y., Li, Y., Ray, P., Rhines, L.D., Tatsui, C.E., Rao, G., Johansson, C.A., Zhang, H., Kim, Y.H., Zhang, B., et al. (2019). Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain* 142, 1215–1226.
- Nosedà, R., Kainz, V., Jakubowski, M., Gooley, J.J., Saper, C.B., Digre, K., and Burstein, R. (2010). A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nat. Neurosci.* 13, 239–245.

- Nosedá, R., Copenhagen, D., and Burstein, R. (2018). Current understanding of photophobia, visual networks and headaches. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102418784750.
- Nozaki, C., Markert, A., and Zimmer, A. (2015). Inhibition of FAAH reduces nitroglycerin-induced migraine-like pain and trigeminal neuronal hyperactivity in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 25, 1388–1396.
- Nyholt, D.R., LaForge, K.S., Kallela, M., Alakurtti, K., Anttila, V., Färkkilä, M., Hämaläinen, E., Kaprio, J., Kaunisto, M.A., Heath, A.C., et al. (2008). A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3318–3331.
- Nyholt, D.R., Borsook, D., and Griffiths, L.R. (2017). Migrainomics - identifying brain and genetic markers of migraine. *Nat. Rev. Neurol.*
- Obata, K., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Mizushima, T., Katsura, H., Fukuoka, T., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2004). Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10211–10222.
- Oehler, B., Kistner, K., Martin, C., Schiller, J., Mayer, R., Mohammadi, M., Sauer, R.-S., Filipovic, M.R., Nieto, F.R., Kloka, J., et al. (2017). Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation. *Sci. Rep.* 7, 5447.
- Offenhauser, N., Zinck, T., Hoffmann, J., Schiemann, K., Schuh-Hofer, S., Rohde, W., Arnold, G., Dirnagl, U., Jansen-Olesen, I., and Reuter, U. (2005). CGRP release and c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion. *Cephalalgia Int. J. Headache* 25, 225–236.
- O’Hagan, R., Chalfie, M., and Goodman, M.B. (2005). The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat. Neurosci.* 8, 43–50.
- Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., and Mori, Y. (1998). Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 273, 10279–10287.
- Okada-Ogawa, A., Porreca, F., and Meng, I.D. (2009). Sustained morphine-induced sensitization and loss of diffuse noxious inhibitory controls in dura-sensitive medullary dorsal horn neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 15828–15835.
- Olesen, J. (2008). The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol. Ther.* 120, 157–171.
- Olesen, J., and Ashina, M. (2015). Can nitric oxide induce migraine in normal individuals? *Cephalalgia Int. J. Headache* 35, 1125–1129.
- Olesen, J., Burstein, R., Ashina, M., and Tfelt-Hansen, P. (2009). Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol.* 8, 679–690.
- Oliveira, A.B., Bachi, A.L.L., Ribeiro, R.T., Mello, M.T., Tufik, S., and Peres, M.F.P. (2017). Unbalanced plasma TNF- α and IL-12/IL-10 profile in women with migraine is associated with psychological and physiological outcomes. *J. Neuroimmunol.*

- Olson, T.H., Riedl, M.S., Vulchanova, L., Ortiz-Gonzalez, X.R., and Elde, R. (1998). An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport* *9*, 1109–1113.
- Olson, W., Abdus-Saboor, I., Cui, L., Burdge, J., Raabe, T., Ma, M., and Luo, W. (2017). Sparse genetic tracing reveals regionally specific functional organization of mammalian nociceptors. *ELife* *6*.
- Omerbašić, D., Schuhmacher, L.-N., Bernal Sierra, Y.-A., Smith, E.S.J., and Lewin, G.R. (2015). ASICs and mammalian mechanoreceptor function. *Neuropharmacology* *94*, 80–86.
- Omerbašić, D., Smith, E.S.J., Moroni, M., Homfeld, J., Eigenbrod, O., Bennett, N.C., Reznick, J., Faulkes, C.G., Selbach, M., and Lewin, G.R. (2016). Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat. *Cell Rep.* *17*, 748–758.
- Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., van Eijk, R., Oefner, P.J., Hoffman, S.M.G., Lamerdin, J.E., Mohrenweiser, H.W., Bulman, D.E., Ferrari, M., et al. (1996). Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia Type-2 Are Caused by Mutations in the Ca²⁺ Channel Gene CACNL1A4. *Cell* *87*, 543–552.
- Ortega-Ramírez, A., Vega, R., and Soto, E. (2017). Acid-Sensing Ion Channels as Potential Therapeutic Targets in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* *2017*, 3728096.
- Oshinsky, M.L., and Gomonchareonsiri, S. (2007). Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache. *Headache* *47*, 1026–1036.
- Oshinsky, M.L., Sanghvi, M.M., Maxwell, C.R., Gonzalez, D., Spangenberg, R.J., Cooper, M., and Silberstein, S.D. (2012). Spontaneous trigeminal allodynia in rats: a model of primary headache. *Headache* *52*, 1336–1349.
- Osmakov, D.I., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Sanamyan, N.P., Sanamyan, K.E., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Murashev, A.N., Mineev, K.S., et al. (2013). Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *J. Biol. Chem.* *288*, 23116–23127.
- Osmakov, D.I., Koshelev, S.G., Andreev, Y.A., Dubinnyi, M.A., Kublitski, V.S., Efremov, R.G., Sobolevsky, A.I., and Kozlov, S.A. (2017). Proton-independent activation of acid-sensing ion channel ASIC3 by alkaloid lindoldhamine from *Laurus nobilis*. *Br. J. Pharmacol.*
- Ossipov, M.H., Dussor, G.O., and Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.* *120*, 3779–3787.
- Ouyang, H., Bai, X., Huang, W., Chen, D., Dohi, S., and Zeng, W. (2012). The antinociceptive activity of intrathecally administered amiloride and its interactions with morphine and clonidine in rats. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *13*, 41–48.
- Ouyang, H., Wang, P., Huang, W., Li, Q., Nie, B., and Zeng, W. (2015). Spinal antinociceptive action of amiloride and its interaction with tizanidine in the rat formalin test. *Pain Res. Manag.* *20*, 321–326.
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Martinez-Salgado, C., Wemmie, J.A., Brennan, T.J., Symonds, E., Omari, T., Lewin, G.R., Welsh, M.J., et al. (2004). The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous mechanoreceptor function. *Gastroenterology* *127*, 1739–1747.

- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Price, M.P., Symonds, E., Butler, R., Wemmie, J.A., and Blackshaw, L.A. (2005). Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54, 1408–1415.
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Hughes, P.A., and Blackshaw, L.A. (2007). Acid sensing ion channels 2 and 3 are required for inhibition of visceral nociceptors by benzamil. *Pain* 133, 150–160.
- Palmer, L.G. (1987). Ion selectivity of epithelial Na channels. *J. Membr. Biol.* 96, 97–106.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666.
- Palm-Meinders, I.H., Koppen, H., Terwindt, G.M., Launer, L.J., Konishi, J., Moonen, J.M.E., Bakkers, J.T.N., Hofman, P.A.M., van Lew, B., Middelkoop, H.A.M., et al. (2012). Structural brain changes in migraine. *JAMA* 308, 1889–1897.
- Pan, B., Akyuz, N., Liu, X.-P., Asai, Y., Nist-Lund, C., Kurima, K., Derfler, B.H., György, B., Limapichat, W., Walujkar, S., et al. (2018). TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99, 736-753.e6.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237, 749–753.
- Papke, D., Gonzalez-Gutierrez, G., and Grosman, C. (2011). Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: a comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors. *J. Physiol.* 589, 1571–1585.
- Pardutz, A., Krizbai, I., Multon, S., Vecsei, L., and Schoenen, J. (2000). Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport* 11, 3071–3075.
- Pardutz, A., Multon, S., Malgrange, B., Parducz, A., Vecsei, L., and Schoenen, J. (2002). Effect of systemic nitroglycerin on CGRP and 5-HT afferents to rat caudal spinal trigeminal nucleus and its modulation by estrogen. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1803–1809.
- Pardutz, A., Hoyk, Z., Varga, H., Vecsei, L., and Schoenen, J. (2007). Oestrogen-modulated increase of calmodulin-dependent protein kinase II (CamKII) in rat spinal trigeminal nucleus after systemic nitroglycerin. *Cephalalgia Int. J. Headache* 27, 46–53.
- Parikh, S.K., and Silberstein, S.D. (2019). Current Status of Antiepileptic Drugs as Preventive Migraine Therapy. *Curr. Treat. Options Neurol.* 21, 16.
- Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Berta, T., Han, Q., Chen, G., Liu, X.-J., and Ji, R.-R. (2014). Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron* 82, 47–54.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., and Caterina, M.J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 11425–11436.
- Parsons, C.G., Członkowski, A., Stein, C., and Herz, A. (1990). Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 41, 81–93.

- Patel, A.J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* *17*, 4283–4290.
- Paukert, M., Babini, E., Pusch, M., and Grunder, S. (2004). Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* *124*, 383–394.
- Paukert, M., Chen, X., Polleichtner, G., Schindelin, H., and Grunder, S. (2008). Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* *283*, 572–581.
- Pedersen, S.H., Ramachandran, R., Amrutkar, D.V., Petersen, S., Olesen, J., and Jansen-Olesen, I. (2015). Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., et al. (2002a). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* *296*, 2046–2049.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002b). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* *108*, 705–715.
- Peigneur, S., Beress, L., Moller, C., Mari, F., Forssmann, W.G., and Tytgat, J. (2012). A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J* *26*, 5141–5151.
- Peirs, C., and Seal, R.P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* *354*, 578–584.
- Peirs, C., Williams, S.-P.G., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* *87*, 797–812.
- Pellegrino, A.B.W., Davis-Martin, R.E., Houle, T.T., Turner, D.P., and Smitherman, T.A. (2017). Perceived triggers of primary headache disorders: A meta-analysis. *Cephalalgia Int. J. Headache* *333102417727535*.
- Penfield, W., and McNAUGHTON, F. (1940). DURAL HEADACHE AND INNERVATION OF THE DURA MATER. *Arch. Neurol. Psychiatry* *44*, 43–75.
- Peng, Z., Li, W.-G., Huang, C., Jiang, Y.-M., Wang, X., Zhu, M.X., Cheng, X., and Xu, T.-L. (2015). ASIC3 Mediates Itch Sensation in Response to Coincident Stimulation by Acid and Nonproton Ligand. *Cell Rep.* *13*, 387–398.
- Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., et al. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* *155*, 2534–2544.
- Pereira, V., Millet, Q., Aramburu, J., Lopez-Rodriguez, C., Gaveriaux-Ruff, C., and Wood, J.N. (2018). Analgesia linked to Nav1.7 loss of function requires μ - and δ -opioid receptors. *Wellcome Open Res.* *3*, 101.
- Perl, E.R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 71–80.

- Perrot, S., Guilbaud, G., and Kayser, V. (2001). Differential behavioral effects of peripheral and systemic morphine and naloxone in a rat model of repeated acute inflammation. *Anesthesiology* *94*, 870–875.
- Perry, C.J., Blake, P., Buettner, C., Papavassiliou, E., Schain, A.J., Bhasin, M.K., and Burstein, R. (2016). Upregulation of inflammatory gene transcripts in periosteum of chronic migraineurs: Implications for extracranial origin of headache. *Ann. Neurol.* *79*, 1000–1013.
- Pert, C.B., and Snyder, S.H. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* *179*, 1011–1014.
- Pert, C.B., Pasternak, G., and Snyder, S.H. (1973). Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* *182*, 1359–1361.
- Peterson, Y.K., and Luttrell, L.M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* *69*, 256–297.
- Petho, G., and Reeh, P.W. (2012). Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol. Rev.* *92*, 1699–1775.
- Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.-Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep.* *13*, 1246–1257.
- Petroff, E., Snitsarev, V., Gong, H., and Abboud, F.M. (2012). Acid sensing ion channels regulate neuronal excitability by inhibiting BK potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun* *426*, 511–515.
- Petroff, E.Y., Price, M.P., Snitsarev, V., Gong, H., Korovkina, V., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2008). Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3140–3144.
- Petruska, J.C., Napaporn, J., Johnson, R.D., Gu, J.G., and Cooper, B.Y. (2000). Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J. Neurophysiol.* *84*, 2365–2379.
- Petruska, J.C., Napaporn, J., Johnson, R.D., and Cooper, B.Y. (2002). Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience* *115*, 15–30.
- Pietrobon, D., and Moskowitz, M.A. (2014). Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 379–393.
- Pijpers, J.A., Kies, D.A., Louter, M.A., van Zwet, E.W., Ferrari, M.D., and Terwindt, G.M. (2019). Acute withdrawal and botulinum toxin A in chronic migraine with medication overuse: a double-blind randomized controlled trial. *Brain J. Neurol.*
- Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A., and Chiu, I.M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* *38*, 5–19.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., and Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* *69*, 200–235.

- Podvin, S., Yaksh, T., and Hook, V. (2016). The Emerging Role of Spinal Dynorphin in Chronic Pain: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *56*, 511–533.
- Poirot, O., Vukicevic, M., Boesch, A., and Kellenberger, S. (2004). Selective regulation of acid-sensing ion channel 1 by serine proteases. *J. Biol. Chem.* *279*, 38448–38457.
- Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I., and Kellenberger, S. (2006). Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J. Physiol.* *576*, 215–234.
- Pollock, J., McFarlane, S.M., Connell, M.C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J., and Scott, R.H. (2002). TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* *42*, 93–106.
- Polter, A.M., Barcomb, K., Chen, R.W., Dingess, P.M., Graziane, N.M., Brown, T.E., and Kauer, J.A. (2017). Constitutive activation of kappa opioid receptors at ventral tegmental area inhibitory synapses following acute stress. *ELife* *6*.
- Pradhan, A.A., Smith, M.L., McGuire, B., Tarash, I., Evans, C.J., and Charles, A. (2014a). Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain* *155*, 269–274.
- Pradhan, A.A., Smith, M.L., Zyuzin, J., and Charles, A. (2014b). δ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2375–2384.
- Pradier, B., Shin, H.B., Kim, D.S., St Laurent, R., Lipscombe, D., and Kauer, J.A. (2018). Long-term depression induced by optogenetically driven nociceptive inputs to trigeminal nucleus caudalis or headache triggers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*
- Prato, V., Taberner, F.J., Hockley, J.R.F., Callejo, G., Arcourt, A., Tazir, B., Hammer, L., Schad, P., Heppenstall, P.A., Smith, E.S., et al. (2017). Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors. *Cell Rep.* *21*, 3102–3115.
- Prescott, S.A., Ma, Q., and De Koninck, Y. (2014). Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. *Nat. Neurosci.* *17*, 183–191.
- Price, M.P., Snyder, P.M., and Welsh, M.J. (1996). Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* *271*, 7879–7882.
- Price, M.P., Lewin, G.R., McIlwrath, S.L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Mannsfeldt, A.G., Brennan, T.J., Drummond, H.A., et al. (2000). The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* *407*, 1007–1011.
- Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* *32*, 1071–1083.
- Price, M.P., Thompson, R.J., Eshcol, J.O., Wemmie, J.A., and Benson, C.J. (2004). Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels. *J. Biol. Chem.* *279*, 53886–53891.
- Price, M.P., Gong, H., Parsons, M.G., Kundert, J.R., Reznikov, L.R., Bernardinelli, L., Chaloner, K., Buchanan, G.F., Wemmie, J.A., Richerson, G.B., et al. (2014). Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli. *Genes Brain Behav.* *13*, 179–194.

- Pryazhnikov, E., Kislin, M., Tibeykina, M., Toptunov, D., Ptukha, A., Shatillo, A., Gröhn, O., Giniatullin, R., and Khiroug, L. (2014). Opposite reactivity of meningeal versus cortical microvessels to the nitric oxide donor glyceryl trinitrate evaluated in vivo with two-photon imaging. *PLoS One* *9*, e89699.
- Pu, Z.-H., Peng, C., Xie, X.-F., Luo, M., Zhu, H., Feng, R., and Xiong, L. (2019). Alkaloids from the rhizomes of *Ligusticum striatum* exert antimigraine effects through regulating 5-HT_{1B} receptor and c-Jun. *J. Ethnopharmacol.*
- Qi, Y., Yu, T., Xu, J., Wan, P., Ma, Y., Zhu, J., Li, Y., Gong, H., Luo, Q., and Zhu, D. (2019). FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Sci. Adv.* *5*, eaau8355.
- Qiang, M., Dong, X., Zha, Z., Zuo, X.-K., Song, X.-L., Zhao, L., Yuan, C., Huang, C., Tao, P., Hu, Q., et al. (2018). Selection of an ASIC1a-blocking combinatorial antibody that protects cells from ischemic death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E7469–E7477.
- Qin, G., Gui, B., Xie, J., Chen, L., Chen, L., Cui, Z., Zhou, J., and Tan, G. (2017). Tetrandrine Alleviates Nociception in a Rat Model of Migraine via Suppressing S100B and p-ERK Activation in Satellite Glial Cells of the Trigeminal Ganglia. *J. Mol. Neurosci. MN.*
- Qiu, C.-Y., Liu, Y.-Q., Qiu, F., Wu, J., Zhou, Q.-Y., and Hu, W.-P. (2012a). Prokineticin 2 potentiates acid-sensing ion channel activity in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neuroinflammation* *9*, 108.
- Qiu, F., Qiu, C.-Y., Liu, Y.-Q., Wu, D., Li, J.-D., and Hu, W.-P. (2012b). Potentiation of acid-sensing ion channel activity by the activation of 5-HT₂ receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* *63*, 494–500.
- Qiu, F., Wei, X., Zhang, S., Yuan, W., and Mi, W. (2014a). Increased expression of acid-sensing ion channel 3 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. *Neuroreport* *25*, 887–893.
- Qiu, F., Liu, T.-T., Qu, Z.-W., Qiu, C.-Y., Yang, Z., and Hu, W.-P. (2014b). Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons. *Eur. J. Pharmacol.* *731*, 50–57.
- Qu, Z.-W., Liu, T.-T., Ren, C., Gan, X., Qiu, C.-Y., Ren, P., Rao, Z., and Hu, W.-P. (2015). 17 β -Estradiol Enhances ASIC Activity in Primary Sensory Neurons to Produce Sex Difference in Acidosis-Induced Nociception. *Endocrinology* *156*, 4660–4671.
- Queme, L.F., Ross, J.L., Lu, P., Hudgins, R.C., and Jankowski, M.P. (2016). Dual Modulation of Nociception and Cardiovascular Reflexes during Peripheral Ischemia through P2Y₁ Receptor-Dependent Sensitization of Muscle Afferents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 19–30.
- Queme, L.F., Weyler, A.A., Cohen, E.R., Hudgins, R.C., and Jankowski, M.P. (2019). A role for peripheral GDNF signaling in ischemic myalgia development. *BioRxiv* 627521.
- Quick, K., Zhao, J., Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Rugiero, F., Cox, J.J., Raouf, R., Gringhuis, M., Sexton, J.E., Abramowitz, J., et al. (2012). TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biol.* *2*, 120068.
- Rabbie, R., Derry, S., and Moore, R.A. (2013). Ibuprofen with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Radtke, C., Vogt, P.M., Devor, M., and Kocsis, J.D. (2010). Keratinocytes acting on injured afferents induce extreme neuronal hyperexcitability and chronic pain. *Pain* *148*, 94–102.

- Radu, B.M., Dumitrescu, D.I., Marin, A., Banciu, D.D., Iancu, A.D., Selescu, T., and Radu, M. (2014). Advanced Type 1 Diabetes is Associated with ASIC Alterations in Mouse Lower Thoracic Dorsal Root Ganglia Neurons. *Cell Biochem. Biophys.* *68*, 9–23.
- Raferty, M.A., Hunkapiller, M.W., Strader, C.D., and Hood, L.E. (1980). Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* *208*, 1454–1456.
- Rahman, T., and Smith, E.S. (2014). In silico assessment of interaction of sea anemone toxin APETx2 and acid sensing ion channel 3. *Biochem Biophys Res Commun* *450*, 384–389.
- Rahman, M.H., Jha, M.K., Kim, J.-H., Nam, Y., Lee, M.G., Go, Y., Harris, R.A., Park, D.H., Kook, H., Lee, I.-K., et al. (2016). Pyruvate Dehydrogenase Kinase-mediated Glycolytic Metabolic Shift in the Dorsal Root Ganglion Drives Painful Diabetic Neuropathy. *J. Biol. Chem.* *291*, 6011–6025.
- Rahmann, A., Wienecke, T., Hansen, J.M., Fahrenkrug, J., Olesen, J., and Ashina, M. (2008). Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* *28*, 226–236.
- Ramachandran, R., Bhatt, D.K., Ploug, K.B., Olesen, J., Jansen-Olesen, I., Hay-Schmidt, A., and Gupta, S. (2012). A naturalistic glyceryl trinitrate infusion migraine model in the rat. *Cephalalgia Int. J. Headache* *32*, 73–84.
- Ramachandran, R., Bhatt, D.K., Ploug, K.B., Hay-Schmidt, A., Jansen-Olesen, I., Gupta, S., and Olesen, J. (2014). Nitric oxide synthase, calcitonin gene-related peptide and NK-1 receptor mechanisms are involved in GTN-induced neuronal activation. *Cephalalgia Int. J. Headache* *34*, 136–147.
- Ramachandran, R., Pedersen, S.H., Amrutkar, D.V., Petersen, S., Jacobsen, J.M., Hay-Schmidt, A., Olesen, J., and Jansen-Olesen, I. (2017). Selective cephalic upregulation of p-ERK, CamKII and p-CREB in response to glyceryl trinitrate infusion. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417722511.
- Ramos, J.M.F., Devoize, L., Descheemaeker, A., Molat, J.-L., Luccarini, P., and Dallel, R. (2017). The nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a cephalic cutaneous hypersensitivity, associated with sensitization of the medullary dorsal horn. *Neuroscience*.
- Ran, C., Hoon, M.A., and Chen, X. (2016). The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat. Neurosci.* *19*, nn.4350.
- Ranade, S.S., Woo, S.-H., Dubin, A.E., Moshourab, R.A., Wetzel, C., Petrus, M., Mathur, J., Bégay, V., Coste, B., Mainquist, J., et al. (2014). Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* *516*, 121–125.
- Ranade, S.S., Syeda, R., and Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* *87*, 1162–1179.
- Ranjan, R., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M., and Shukla, A.K. (2017). Novel Structural Insights into GPCR-β-Arrestin Interaction and Signaling. *Trends Cell Biol.* *27*, 851–862.
- Rau, J.C., and Dodick, D.W. (2019). Other Preventive Anti-Migraine Treatments: ACE Inhibitors, ARBs, Calcium Channel Blockers, Serotonin Antagonists, and NMDA Receptor Antagonists. *Curr. Treat. Options Neurol.* *21*, 17.

- Rau, K.K., Petruska, J.C., Cooper, B.Y., and Johnson, R.D. (2014). Distinct subclassification of DRG neurons innervating the distal colon and glans penis/distal urethra based on the electrophysiological current signature. *J. Neurophysiol.* *112*, 1392–1408.
- Ray, and Wolff (1940). Experimental studies on headache: Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch. Surg.* *41*, 813–856.
- Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, C., Lam, T., Kim, J.-Y., Kim, T.H., Zhang, M.Q., et al. (2018). Title: Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain*.
- Read, S.J., Smith, M.I., Hunter, A.J., and Parsons, A.A. (1997). Enhanced nitric oxide release during cortical spreading depression following infusion of glyceryl trinitrate in the anaesthetized cat. *Cephalalgia Int. J. Headache* *17*, 159–165.
- Read, S.J., Manning, P., McNeil, C.J., Hunter, A.J., and Parsons, A.A. (1999). Effects of sumatriptan on nitric oxide and superoxide balance during glyceryl trinitrate infusion in the rat. Implications for antimigraine mechanisms. *Brain Res.* *847*, 1–8.
- Reichling, D.B., and Levine, J.D. (2009). Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* *32*, 611–618.
- Reimers, C., Lee, C.-H., Kalbacher, H., Tian, Y., Hung, C.-H., Schmidt, A., Prokop, L., Kaufenstein, S., Mebs, D., Chen, C.-C., et al. (2017). Identification of a cono-RFamide from the venom of *Conus textile* that targets ASIC3 and enhances muscle pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L.T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* *16*, 1080–1092.
- Ren, K., and Torres, R. (2009). Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res. Rev.* *60*, 57–64.
- Ren, C., Gan, X., Wu, J., Qiu, C.-Y., and Hu, W.-P. (2016). Enhancement of acid-sensing ion channel activity by metabotropic P2Y UTP receptors in primary sensory neurons. *Purinergic Signal.* *12*, 69–78.
- Ren, C., Liu, J., Zhou, J., Liang, H., Wang, Y., Sun, Y., Ma, B., and Yin, Y. (2018a). Lipidomic analysis of serum samples from migraine patients. *Lipids Health Dis.* *17*, 22.
- Ren, P., Wang, W.-B., Pan, H.-H., Qiu, C.-Y., and Hu, W.-P. (2018b). Up-regulation of ASIC3 expression by β -estradiol. *Neurosci. Lett.* *684*, 200–204.
- Reuter, U., Bolay, H., Jansen-Olesen, I., Chiarugi, A., Sanchez del Rio, M., Letourneau, R., Theoharides, T.C., Waeber, C., and Moskowitz, M.A. (2001). Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain J. Neurol.* *124*, 2490–2502.
- Reuter, U., Chiarugi, A., Bolay, H., and Moskowitz, M.A. (2002). Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Ann. Neurol.* *51*, 507–516.
- Reuter, U., Goadsby, P.J., Lanteri-Minet, M., Wen, S., Hours-Zesiger, P., Ferrari, M.D., and Klatt, J. (2018). Efficacy and tolerability of erenumab in patients with episodic migraine in whom two-to-four previous preventive treatments were unsuccessful: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3b study. *Lancet Lond. Engl.* *392*, 2280–2287.

- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* *96*, 414–495.
- Rey, R. (1993). *Histoire de la douleur* (Paris: La Découverte).
- Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrigh, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell Rep.* *10*, 1007–1019.
- Reznikov, L.R., Meyerholz, D.K., Adam, R.J., Abou Alaiwa, M., Jaffer, O., Michalski, A.S., Powers, L.S., Price, M.P., Stoltz, D.A., and Welsh, M.J. (2016). Acid-Sensing Ion Channel 1a Contributes to Airway Hyperreactivity in Mice. *PLoS One* *11*, e0166089.
- Riant, F., Roze, E., Barbance, C., Méneret, A., Guyant-Maréchal, L., Lucas, C., Sabouraud, P., Trébuchon, A., Depienne, C., and Tournier-Lasserre, E. (2012). PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* *79*, 2122–2124.
- Rice, F.L., Xie, J.Y., Albrecht, P.J., Acker, E., Bourgeois, J., Navratilova, E., Dodick, D.W., and Porreca, F. (2016). Anatomy and immunochemical characterization of the non-arterial peptidergic diffuse dural innervation of the rat and Rhesus monkey: Implications for functional regulation and treatment in migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Rivara, M., and Zuliani, V. (2016). Novel sodium channel antagonists in the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin. Investig. Drugs* *25*, 215–226.
- Rodriguez, A.A., Salceda, E., Garateix, A.G., Zaharenko, A.J., Peigneur, S., Lopez, O., Pons, T., Richardson, M., Diaz, M., Hernandez, Y., et al. (2014). A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* *53*, 3–12.
- Rodriguez, E., Sakurai, K., Xu, J., Chen, Y., Toda, K., Zhao, S., Han, B.-X., Ryu, D., Yin, H., Liedtke, W., et al. (2017). A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. *Nat. Neurosci.* *20*, 1734.
- Ross, J.L., Queme, L.F., Shank, A.T., Hudgins, R.C., and Jankowski, M.P. (2014). Sensitization of group III and IV muscle afferents in the mouse after ischemia and reperfusion injury. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *15*, 1257–1270.
- Ross, J.L., Queme, L.F., Cohen, E.R., Green, K.J., Lu, P., Shank, A.T., An, S., Hudgins, R.C., and Jankowski, M.P. (2016). Muscle IL1 β Drives Ischemic Myalgia via ASIC3-Mediated Sensory Neuron Sensitization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 6857–6871.
- Rowe, A.H., Xiao, Y., Rowe, M.P., Cummins, T.R., and Zakon, H.H. (2013). Voltage-gated sodium channel in grasshopper mice defends against bark scorpion toxin. *Science* *342*, 441–446.
- Royal, P., Andres-Bilbe, A., Prado, P.Á., Verkest, C., Wdziekonski, B., Schaub, S., Baron, A., Lesage, F., Gasull, X., Levitz, J., et al. (2018). Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* *0*.
- Roza, C., Puel, J.-L., Kress, M., Baron, A., Diochot, S., Lazdunski, M., and Waldmann, R. (2004). Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *J. Physiol.* *558*, 659–669.

- Rua, R., and McGavern, D.B. (2018). Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol. Med.* *24*, 542–559.
- Russell, M.B., and Olesen, J. (1995). Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *BMJ* *311*, 541–544.
- Russo, A., Coppola, G., Pierelli, F., Parisi, V., Silvestro, M., Tessitore, A., and Tedeschi, G. (2018). Pain Perception and Migraine. *Front. Neurol.* *9*, 576.
- Russo, A.F., Kuburas, A., Kaiser, E.A., Raddant, A.C., and Recober, A. (2009). A Potential Preclinical Migraine Model: CGRP-Sensitized Mice. *Mol. Cell. Pharmacol.* *1*, 264–270.
- Sabatowski, R., Schäfer, D., Kasper, S.M., Brunsch, H., and Radbruch, L. (2004). Pain treatment: a historical overview. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 701–716.
- Salinas, M., Rash, L.D., Baron, A., Lambeau, G., Escoubas, P., and Lazdunski, M. (2006). The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J. Physiol.* *570*, 339–354.
- Salinas, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009). Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J. Biol. Chem.* *284*, 31851–31859.
- Salinas, M., Besson, T., Delettre, Q., Diochot, S., Boulakirba, S., Douguet, D., and Lingueglia, E. (2014). Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J. Biol. Chem.* *289*, 13363–13373.
- Sampaolo, S., Liguori, G., Vittoria, A., Napolitano, F., Lombardi, L., Figols, J., Melone, M.A.B., Esposito, T., and Di Iorio, G. (2017). First study on the peptidergic innervation of the brain superior sagittal sinus in humans. *Neuropeptides*.
- Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol. Rev.* *89*, 707–758.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14628–14633.
- Santos-Torres, J., Ślimak, M.A., Auer, S., and Ibañez-Tallon, I. (2011). Cross-reactivity of acid-sensing ion channel and Na⁺-H⁺ exchanger antagonists with nicotinic acetylcholine receptors. *J. Physiol.* *589*, 5109–5123.
- Sarchielli, P., Alberti, A., Baldi, A., Coppola, F., Rossi, C., Pierguidi, L., Floridi, A., and Calabresi, P. (2006). Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache* *46*, 200–207.
- Sathyamurthy, A., Johnson, K.R., Matson, K.J.E., Dobrott, C.I., Li, L., Ryba, A.R., Bergman, T.B., Kelly, M.C., Kelley, M.W., and Levine, A.J. (2018). Massively Parallel Single Nucleus Transcriptional Profiling Defines Spinal Cord Neurons and Their Activity during Behavior. *Cell Rep.* *22*, 2216–2225.
- Schafer, M., Mousa, S.A., Zhang, Q., Carter, L., and Stein, C. (1996). Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 6096–6100.

- Schain, A.J., Melo-Carrillo, A., Borsook, D., Grutzendler, J., Strassman, A.M., and Burstein, R. (2018). Activation of pial and dural macrophages and dendritic cells by CSD (67 chrs). *Ann. Neurol.*
- Schankin, C.J., Maniyar, F.H., Seo, Y., Kori, S., Eller, M., Chou, D.E., Blecha, J., Murphy, S.T., Hawkins, R.A., Sprenger, T., et al. (2016). Ictal lack of binding to brain parenchyma suggests integrity of the blood-brain barrier for 11C-dihydroergotamine during glyceryl trinitrate-induced migraine. *Brain J. Neurol.* 139, 1994–2001.
- Scheller, D., Kolb, J., and Tegtmeyer, F. (1992). Lactate and pH change in close correlation in the extracellular space of the rat brain during cortical spreading depression. *Neurosci. Lett.* 135, 83–86.
- Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2009). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 205–212.
- Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2010). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 177–184.
- Scherer, P.C., Zaccor, N.W., Neumann, N.M., Vasavda, C., Barrow, R., Ewald, A.J., Rao, F., Sumner, C.J., and Snyder, S.H. (2017). TRPV1 is a physiological regulator of μ -opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13561–13566.
- Schmalbruch, H. (1987). The number of neurons in dorsal root ganglia L4–L6 of the rat. *Anat. Rec.* 219, 315–322.
- Schmelz, M., and Schmidt, R. (2010). Microneurographic single-unit recordings to assess receptive properties of afferent human C-fibers. *Neurosci. Lett.* 470, 158–161.
- Schmid, C.L., Kennedy, N.M., Ross, N.C., Lovell, K.M., Yue, Z., Morgenweck, J., Cameron, M.D., Bannister, T.D., and Bohn, L.M. (2017). Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell* 171, 1165-1175.e13.
- Schmidt, A., Rossetti, G., Jousen, S., and Gründer, S. (2017). Diminazene Is a Slow Pore Blocker of Acid-Sensing Ion Channel 1a (ASIC1a). *Mol. Pharmacol.* 92, 665–675.
- Schneider, E.R., Anderson, E.O., Gracheva, E.O., and Bagriantsev, S.N. (2014). Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr. Top. Membr.* 74, 113–133.
- Schneider, E.R., Anderson, E.O., Feketa, V.V., Mastrotto, M., Nikolaev, Y.A., Gracheva, E.O., and Bagriantsev, S.N. (2019). A Cross-Species Analysis Reveals a General Role for Piezo2 in Mechanosensory Specialization of Trigeminal Ganglia from Tactile Specialist Birds. *Cell Rep.* 26, 1979-1987.e3.
- Schoonman, G.G., Evers, D.J., Terwindt, G.M., van Dijk, J.G., and Ferrari, M.D. (2006). The prevalence of premonitory symptoms in migraine: a questionnaire study in 461 patients. *Cephalalgia Int. J. Headache* 26, 1209–1213.
- Schoonman, G.G., Grond, J. van der, Kortmann, C., Geest, R.J. van der, Terwindt, G.M., and Ferrari, M.D. (2008). Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation—a 3T magnetic resonance angiography study. *Brain* 131, 2192–2200.
- Schrader, H., Stovner, L.J., Helde, G., Sand, T., and Bovim, G. (2001). Prophylactic treatment of migraine with angiotensin converting enzyme inhibitor (lisinopril): randomised, placebo controlled, crossover study. *BMJ* 322, 19–22.

- Schroeder, C.I., Rash, L.D., Vila-Farrés, X., Rosengren, K.J., Mobli, M., King, G.F., Alewood, P.F., Craik, D.J., and Durek, T. (2014). Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin mambalgin-2. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *53*, 1017–1020.
- Schuhmacher, L.-N., Srivats, S., and Smith, E.S.J. (2015). Structural domains underlying the activation of acid-sensing ion channel 2a. *Mol. Pharmacol.* *87*, 561–571.
- Schulte, L.H., and May, A. (2016). The migraine generator revisited: continuous scanning of the migraine cycle over 30 days and three spontaneous attacks. *Brain J. Neurol.* *139*, 1987–1993.
- Schulte, L.H., Allers, A., and May, A. (2018). Visual stimulation leads to activation of the nociceptive trigeminal nucleus in chronic migraine. *Neurology* *90*, e1973–e1978.
- Schürks, M. (2012). Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *J. Headache Pain* *13*, 1–9.
- Schwartz, V., Friedrich, K., Polleichtner, G., and Gründer, S. (2015). Acid-sensing ion channel (ASIC) 4 predominantly localizes to an early endosome-related organelle upon heterologous expression. *Sci. Rep.* *5*, 18242.
- Schytz, H.W., Schoonman, G.G., and Ashina, M. (2010). What have we learnt from triggering migraine? *Curr. Opin. Neurol.* *23*, 259–265.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* *462*, 651–655.
- Seiler, K., Nusser, J.I., Lennerz, J.K., Neuhuber, W.L., and Messlinger, K. (2013). Changes in calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor component and nitric oxide receptor (sGC) immunoreactivity in rat trigeminal ganglion following glyceroltrinitrate pretreatment. *J. Headache Pain* *14*, 74.
- Selvaraj, D., Gangadharan, V., Michalski, C.W., Kurejova, M., Stösser, S., Srivastava, K., Schweizerhof, M., Waltenberger, J., Ferrara, N., Heppenstall, P., et al. (2015). A Functional Role for VEGFR1 Expressed in Peripheral Sensory Neurons in Cancer Pain. *Cancer Cell* *27*, 780–796.
- Sengul, G., and Watson, C. (2012). Chapter 7 - Spinal Cord: Connections. In *The Human Nervous System (Third Edition)*, J.K. Mai, and G. Paxinos, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 233–258.
- Seo, H.-S., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kang, S.-Y., Moon, J.-Y., Kim, H.-W., Han, H.-J., Chung, J.M., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2010). Peripheral acid-sensing ion channels and P2X receptors contribute to mechanical allodynia in a rodent thrombus-induced ischemic pain model. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *11*, 718–727.
- Seo, H.-S., Roh, D.-H., Kwon, S.-G., Yoon, S.-Y., Kang, S.-Y., Moon, J.-Y., Choi, S.-R., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2011). Acidic pH facilitates peripheral $\alpha\beta$ meATP-mediated nociception in rats: differential roles of P2X, P2Y, ASIC and TRPV1 receptors in ATP-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology* *60*, 580–586.
- Servin-Vences, M.R., Moroni, M., Lewin, G.R., and Poole, K. (2017). Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes. *ELife* *6*.

Sessle, B.J. (2000). Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* *11*, 57–91.

Sessle, B.J., Hu, J.W., Amano, N., and Zhong, G. (1986). Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive neurones in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and its implications for referred pain. *Pain* *27*, 219–235.

Shang, H.-Q., Wang, Y., Mao, Y.-Y., Kong, L.-G., Sun, G.-Y., Xu, L., Zhang, D.-G., Han, Y.-C., Li, J.-F., Wang, H.-B., et al. (2016). Expression of artemin and GFR α 3 in an animal model of migraine: possible role in the pathogenesis of this disorder. *J. Headache Pain* *17*, 81.

Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H.A., Bichet, D., Duprat, F., Lauritzen, I., Arhatte, M., Jodar, M., Dedman, A., Chatelain, F.C., Schulte, U., et al. (2009). Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell* *139*, 587–596.

Shelukhina, I., Mikhailov, N., Abushik, P., Nurullin, L., Nikolsky, E.E., and Giniatullin, R. (2017). Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front. Neurol.* *8*, 163.

Shepherd, A.J., Cloud, M.E., Cao, Y.-Q., and Mohapatra, D.P. (2018). Deficits in Burrowing Behaviors Are Associated With Mouse Models of Neuropathic but Not Inflammatory Pain or Migraine. *Front. Behav. Neurosci.* *12*, 124.

Sherwood, T.W., and Askwith, C.C. (2009). Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 14371–14380.

Sherwood, T.W., Lee, K.G., Gormley, M.G., and Askwith, C.C. (2011). Heteromeric Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) Composed of ASIC2b and ASIC1a Display Novel Channel Properties and Contribute to Acidosis-Induced Neuronal Death. *J. Neurosci.* *31*, 9723–9734.

Shteinikov, V.Y., Barygin, O.I., Gmiro, V.E., and Tikhonov, D.B. (2018). Multiple modes of action of hydrophobic amines and their guanidine analogues on ASIC1a. *Eur. J. Pharmacol.*

Sicuteri, F. (1963). Mast Cells and Their Active Substances: Their Role in the Pathogenesis of Migraine. *Headache J. Head Face Pain* *3*, 86–92.

Sicuteri, F., Ricci, M., Monfardini, R., and Ficini, M. (1956). Cefalea Sperimentale de Istamina Endogena. *Sett Med* *44*, 583–587.

Sicuteri, F., Del Bene, E., Poggioni, M., and Bonazzi, A. (1987). Unmasking latent dynociception in healthy subjects. *Headache* *27*, 180–185.

Siegmund, D., Ehrenschwender, M., and Wajant, H. (2018). TNFR2 unlocks a RIPK1 kinase activity-dependent mode of proinflammatory TNFR1 signaling. *Cell Death Dis.* *9*, 921.

Silberstein, S.D., Dodick, D.W., Bigal, M.E., Yeung, P.P., Goadsby, P.J., Blankenbiller, T., Grozinski-Wolff, M., Yang, R., Ma, Y., and Aycardi, E. (2017). Fremanezumab for the Preventive Treatment of Chronic Migraine. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2113–2122.

da Silva Serra, I., Husson, Z., Bartlett, J.D., and Smith, E.S.J. (2016). Characterization of cutaneous and articular sensory neurons. *Mol. Pain* *12*.

- Silverman, A.P. (1976). Behavioural changes in rats suggesting drug-induced headache [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.* 58, 439P-440P.
- Simone, D.A., and Kajander, K.C. (1997). Responses of Cutaneous A-Fiber Nociceptors to Noxious Cold. *J. Neurophysiol.* 77, 2049–2060.
- Simonetti, M., Agarwal, N., Stösser, S., Bali, K.K., Karaulanov, E., Kamble, R., Pospisilova, B., Kurejova, M., Birchmeier, W., Niehrs, C., et al. (2014). Wnt-Fzd signaling sensitizes peripheral sensory neurons via distinct noncanonical pathways. *Neuron* 83, 104–121.
- Sisignano, M., Parnham, M.J., and Geisslinger, G. (2019). Novel Approaches to Persistent Pain Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*
- Sluka, K.A., and Gregory, N.S. (2015). The dichotomized role for acid sensing ion channels in musculoskeletal pain and inflammation. *Neuropharmacology* 94, 58–63.
- Sluka, K.A., Kalra, A., and Moore, S.A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24, 37–46.
- Sluka, K.A., Price, M.P., Breese, N.M., Stucky, C.L., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106, 229–239.
- Sluka, K.A., Radhakrishnan, R., Benson, C.J., Eshcol, J.O., Price, M.P., Babinski, K., Audette, K.M., Yeomans, D.C., and Wilson, S.P. (2007). ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129, 102–112.
- Sluka, K.A., Rasmussen, L.A., Edgar, M.M., O'Donnell, J.M., Walder, R.Y., Kolker, S.J., Boyle, D.L., and Firestein, G.S. (2013). Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 65, 1194–1202.
- Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., and Davis, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227–230.
- Smith, E.S., Cadiou, H., and McNaughton, P.A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145, 686–698.
- Smith, E.S.J., Omerbašić, D., Lechner, S.G., Anirudhan, G., Lapatsina, L., and Lewin, G.R. (2011). The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat. *Science* 334, 1557–1560.
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186–190.
- Smith-Edwards, K.M., DeBerry, J.J., Saloman, J.L., Davis, B.M., and Woodbury, C.J. (2016). Profound alteration in cutaneous primary afferent activity produced by inflammatory mediators. *ELife* 5.
- Sokołowska, M., Bednarski, M., Kwiecień, I., Filipek, B., and Włodek, L. (2004). Bioactivation of nitroglycerin to nitric oxide (NO) and S-nitrosothiols in the rat liver and evaluation of the coexisting hypotensive effect. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 18, 449–456.

- Song, H.Y., Régnier, C.H., Kirschning, C.J., Goeddel, D.V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9792–9796.
- Song, N., Zhang, G., Geng, W., Liu, Z., Jin, W., Li, L., Cao, Y., Zhu, D., Yu, J., and Shen, L. (2012). Acid Sensing Ion Channel 1 in Lateral Hypothalamus Contributes to Breathing Control. *PLoS ONE* *7*.
- Sorkin, L.S., Eddinger, K.A., Woller, S.A., and Yaksh, T.L. (2018). Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. *Semin. Immunopathol.* *40*, 237–247.
- Spahn, V., Del Vecchio, G., Labuz, D., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Massaly, N., Temp, J., Durmaz, V., Sabri, P., Reidelbach, M., Machelska, H., et al. (2017). A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. *Science* *355*, 966–969.
- Spencer, N.J., Kyloh, M., and Duffield, M. (2014). Identification of different types of spinal afferent nerve endings that encode noxious and innocuous stimuli in the large intestine using a novel anterograde tracing technique. *PLoS One* *9*, e112466.
- Spencer, N.J., Greenheigh, S., Kyloh, M., Hibberd, T.J., Sharma, H., Grundy, L., Brierley, S.M., Harrington, A.M., Beckett, E.A., Brookes, S.J., et al. (2018). Identifying unique subtypes of spinal afferent nerve endings within the urinary bladder of mice. *J. Comp. Neurol.* *526*, 707–720.
- Srikiatkhachorn, A., Suwattanasophon, C., Ruangpattanatawee, U., and Phansuwan-Pujito, P. (2002). 2002 Wolff Award. 5-HT_{2A} receptor activation and nitric oxide synthesis: a possible mechanism determining migraine attacks. *Headache* *42*, 566–574.
- Staikopoulos, V., Sessle, B.J., Furness, J.B., and Jennings, E.A. (2007). Localization of P2X₂ and P2X₃ receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* *144*, 208–216.
- Stanczyk, M.A., Livingston, K.E., Chang, L., Weinberg, Z.Y., Puthenveedu, M.A., and Traynor, J.R. (2019). The δ -opioid receptor positive allosteric modulator BMS 986187 is a G-protein-biased allosteric agonist. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 1649–1663.
- Staniland, A.A., and McMahon, S.B. (2009). Mice lacking acid-sensing ion channels (ASIC) 1 or 2, but not ASIC3, show increased pain behaviour in the formalin test. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *13*, 554–563.
- Stankewitz, A., and May, A. (2009). The phenomenon of changes in cortical excitability in migraine is not migraine-specific--a unifying thesis. *Pain* *145*, 14–17.
- Staruschenko, A., Dorofeeva, N.A., Bolshakov, K.V., and Stockand, J.D. (2007). Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Dev Neurobiol* *67*, 97–107.
- Steen, K.H., and Reeh, P.W. (1993a). Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro. *J. Neurophysiol.* *70*, 397–405.
- Steen, K.H., and Reeh, P.W. (1993b). Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci. Lett.* *154*, 113–116.
- Steen, K.H., Reeh, P.W., and Kreysel, H.W. (1995). Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppress pain from experimental tissue acidosis in human skin. *Pain* *62*, 339–347.

- Steen, K.H., Steen, A.E., Kreysel, H.W., and Reeh, P.W. (1996a). Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. *Pain* *66*, 163–170.
- Steen, K.H., Reeh, P.W., and Kreysel, H.W. (1996b). Dose-dependent competitive block by topical acetylsalicylic and salicylic acid of low pH-induced cutaneous pain. *Pain* *64*, 71–82.
- Stein, C., and Gaveriaux-Ruff, C. (2018). Opioids and Pain. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain*.
- Steiner, T.J., Stovner, L.J., Katsarava, Z., Lainez, J.M., Lampl, C., Lantéri-Minet, M., Rastenyte, D., Ruiz de la Torre, E., Tassorelli, C., Barré, J., et al. (2014). The impact of headache in Europe: principal results of the Eurolight project. *J. Headache Pain* *15*, 31.
- Stephan, G., Huang, L., Tang, Y., Vilotti, S., Fabbretti, E., Yu, Y., Nörenberg, W., Franke, H., Göröncsér, F., Sperlágh, B., et al. (2018). The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. *Nat. Commun.* *9*, 1354.
- Stewart, W.F., Staffa, J., Lipton, R.B., and Ottman, R. (1997). Familial risk of migraine: a population-based study. *Ann. Neurol.* *41*, 166–172.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* *112*, 819–829.
- Stovner, L.J., Tronvik, E., and Hagen, K. (2009). New drugs for migraine. *J. Headache Pain* *10*, 395–406.
- Strassman, A.M., and Levy, D. (2006). Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *J. Neurophysiol.* *95*, 1298–1306.
- Strassman, A.M., Raymond, S.A., and Burstein, R. (1996). Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* *384*, 560–564.
- Strassman, A.M., Weissner, W., Williams, M., Ali, S., and Levy, D. (2004). Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. *J. Comp. Neurol.* *473*, 364–376.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., and Plant, T.D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.* *2*, 695–702.
- Stuart, T., and Satija, R. (2019). Integrative single-cell analysis. *Nat. Rev. Genet.* *1*.
- Stubberud, A., Flaaen, N.M., McCrory, D.C., Pedersen, S.A., and Linde, M. (2019). Flunarizine as prophylaxis for episodic migraine: a systematic review with meta-analysis. *Pain* *160*, 762–772.
- Stucky, C.L., Abrahams, L.G., and Seybold, V.S. (1998). Bradykinin increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to capsaicin and protons. *Neuroscience* *84*, 1257–1265.
- Su, J., Tang, Y., Liu, L., Zhou, H., and Dong, Q. (2011). Regulation of acid-sensing ion channel 1a function by tissue kallikrein may be through channel cleavage. *Neurosci. Lett.* *490*, 46–51.
- Su, Y.-S., Mei, H.-R., Wang, C.-H., and Sun, W.-H. (2017). Peripheral 5-HT₃ mediates mirror-image pain by a cross-talk with acid-sensing ion channel 3. *Neuropharmacology*.

- Sufka, K.J., Staszko, S.M., Johnson, A.P., Davis, M.E., Davis, R.E., and Smitherman, T.A. (2016). Clinically relevant behavioral endpoints in a recurrent nitroglycerin migraine model in rats. *J. Headache Pain* 17, 40.
- Sugimura, N., Ikeuchi, M., Izumi, M., Kawano, T., Aso, K., Kato, T., Ushida, T., Yokoyama, M., and Tani, T. (2015). Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *Eur J Pain* 19, 629–638.
- Sugino, K., Clark, E., Schulmann, A., Shima, Y., Wang, L., Hunt, D.L., Hooks, B.M., Traenkner, D., Chandrashekar, J., Picard, S., et al. (2019). Mapping the transcriptional diversity of genetically and anatomically defined cell populations in the mouse brain. *ELife*.
- Sugiura, T., Dang, K., Lamb, K., Bielefeldt, K., and Gebhart, G.F. (2005). Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 2617–2627.
- Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F.R., and Kung, C. (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* 368, 265–268.
- Summ, O., Andreou, A.P., Akerman, S., and Goadsby, P.J. (2010). A potential nitrenergic mechanism of action for indomethacin, but not of other COX inhibitors: relevance to indomethacin-sensitive headaches. *J. Headache Pain* 11, 477–483.
- Sun, D., Yu, Y., Xue, X., Pan, M., Wen, M., Li, S., Qu, Q., Li, X., Zhang, L., Li, X., et al. (2018). Cryo-EM structure of the ASIC1a-mambalgin-1 complex reveals that the peptide toxin mambalgin-1 inhibits acid-sensing ion channels through an unusual allosteric effect. *Cell Discov.* 4, 27.
- Sun, S., Xu, Q., Guo, C., Guan, Y., Liu, Q., and Dong, X. (2017a). Leaky Gate Model: Intensity-Dependent Coding of Pain and Itch in the Spinal Cord. *Neuron* 93, 840-853.e5.
- Sun, X., Zhao, D., Li, Y.-L., Sun, Y., Lei, X.-H., Zhang, J.-N., Wu, M.-M., Li, R.-Y., Zhao, Z.-F., Zhang, Z.-R., et al. (2013). Regulation of ASIC1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in human glioblastoma multiforme. *Oncol. Rep.* 30, 2852–2858.
- Sun, X., Laroche, G., Wang, X., Ågren, H., Bowman, G.R., Giguère, P.M., and Tu, Y. (2017b). Propagation of the Allosteric Modulation Induced by Sodium in the δ -Opioid Receptor. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 23, 4615–4624.
- Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., and McCleskey, E.W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 711–716.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem.* 278, 22664–22668.
- Szczot, M., Pogorzala, L.A., Solinski, H.J., Young, L., Yee, P., Le Pichon, C.E., Chesler, A.T., and Hoon, M.A. (2017). Cell-Type-Specific Splicing of Piezo2 Regulates Mechanotransduction. *Cell Rep.* 21, 2760–2771.
- Szczot, M., Liljencrantz, J., Ghitani, N., Barik, A., Lam, R., Thompson, J.H., Bharucha-Goebel, D., Saade, D., Nécaise, A., Donkervoort, S., et al. (2018). PIEZO2 mediates injury-induced tactile pain in mice and humans. *Sci. Transl. Med.* 10, eaat9892.

- Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., and Mizumura, K. (2015). Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain* 156, 415–427.
- Takayama, Y., Uta, D., Furue, H., and Tominaga, M. (2015). Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5213–5218.
- Tan, C.-H., and McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536, 460–463.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313–318.
- Tang, C.M., Presser, F., and Morad, M. (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240, 213–215.
- Tang, Y., Liu, S., Shu, H., Xing, Y., and Tao, F. (2018). AMPA receptor GluA1 Ser831 phosphorylation is critical for nitroglycerin-induced migraine-like pain. *Neuropharmacology*.
- Tassorelli, C., and Joseph, S.A. (1995a). Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res.* 682, 167–181.
- Tassorelli, C., and Joseph, S.A. (1995b). NADPH-diaphorase activity and Fos expression in brain nuclei following nitroglycerin administration. *Brain Res.* 695, 37–44.
- Tassorelli, C., and Joseph, S.A. (1996). Systemic nitroglycerin activates peptidergic and catecholaminergic pathways in rat brain. *Peptides* 17, 443–449.
- Tassorelli, C., Joseph, S.A., Buzzi, M.G., and Nappi, G. (1999). The effects on the central nervous system of nitroglycerin--putative mechanisms and mediators. *Prog. Neurobiol.* 57, 607–624.
- Tassorelli, C., Costa, A., Blandini, F., Joseph, S.A., and Nappi, G. (2000). Effect of nitric oxide donors on the central nervous system--nitroglycerin studies in the rat. *Funct. Neurol.* 15 Suppl 3, 19–27.
- Tassorelli, C., Blandini, F., Costa, A., Preza, E., and Nappi, G. (2002). Nitroglycerin-induced activation of monoaminergic transmission in the rat. *Cephalalgia Int. J. Headache* 22, 226–232.
- Tassorelli, C., Greco, R., Wang, D., Sandrini, M., Sandrini, G., and Nappi, G. (2003a). Nitroglycerin induces hyperalgesia in rats--a time-course study. *Eur. J. Pharmacol.* 464, 159–162.
- Tassorelli, C., Greco, R., Sandrini, G., and Nappi, G. (2003b). Central components of the analgesic/antihyperalgesic effect of nimesulide: studies in animal models of pain and hyperalgesia. *Drugs* 63 Suppl 1, 9–22.
- Tassorelli, C., Blandini, F., Greco, R., and Nappi, G. (2004). Nitroglycerin enhances cGMP expression in specific neuronal and cerebrovascular structures of the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 27, 23–32.
- Tassorelli, C., Greco, R., Cappelletti, D., Sandrini, G., and Nappi, G. (2005a). Comparative analysis of the neuronal activation and cardiovascular effects of nitroglycerin, sodium nitroprusside and L-arginine. *Brain Res.* 1051, 17–24.

- Tassorelli, C., Greco, R., Morazzoni, P., Riva, A., Sandrini, G., and Nappi, G. (2005b). Parthenolide is the component of tanacetum parthenium that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 25, 612–621.
- Tfelt-Hansen, P., Daugaard, D., Lassen, L.H., Iversen, H.K., and Olesen, J. (2009). Prednisolone reduces nitric oxide-induced migraine. *Eur. J. Neurol.* 16, 1106–1111.
- Thomas, G.M., Lin, D.-T., Nuriya, M., and Haganir, R.L. (2008). Rapid and bi-directional regulation of AMPA receptor phosphorylation and trafficking by JNK. *EMBO J.* 27, 361–372.
- Thomsen, L.L., Brennum, J., Iversen, H.K., and Olesen, J. (1996). Effect of a Nitric Oxide Donor (Glyceryl Trinitrate) on Nociceptive Thresholds in Man. *Cephalalgia* 16, 169–174.
- Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreiter, E.R., et al. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat. Methods* 6, 875–881.
- Tipton, A.F., Tarash, I., McGuire, B., Charles, A., and Pradhan, A.A. (2015). The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836.
- Todd, A.J. (2017). Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Mol. Pain* 13, 1744806917693003.
- Todd, A.J., and Wang, F. (2018). Central Nervous System Pain Pathways. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain*.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
- de Tommaso, M., Libro, G., Guido, M., Difruscolo, O., Losito, L., Sardaro, M., and Cerbo, R. (2004). Nitroglycerin induces migraine headache and central sensitization phenomena in patients with migraine without aura: a study of laser evoked potentials. *Neurosci. Lett.* 363, 272–275.
- Tottene, A., Pivotto, F., Fellin, T., Cesetti, T., van den Maagdenberg, A.M.J.M., and Pietrobon, D. (2005). Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J. Biol. Chem.* 280, 17678–17686.
- Trac, P.T., Thai, T.L., Linck, V., Zou, L., Greenlee, M., Yue, Q., Al-Khalili, O., Alli, A.A., Eaton, A.F., and Eaton, D.C. (2017). Alveolar nonselective channels are ASIC1a/α-ENaC channels and contribute to AFC. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 312, L797–L811.
- Tronvik, E., Stovner, L.J., Helde, G., Sand, T., and Bovim, G. (2003). Prophylactic treatment of migraine with an angiotensin II receptor blocker: a randomized controlled trial. *JAMA* 289, 65–69.
- Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 37, 146–158.
- Turner, D.P., and Houle, T.T. (2017). Influences on headache trigger beliefs and perceptions. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102417739310.

- Ugawa, S., Ueda, T., Takahashi, E., Hirabayashi, Y., Yoneda, T., Komai, S., and Shimada, S. (2001). Cloning and functional expression of ASIC-beta2, a splice variant of ASIC-beta. *Neuroreport* *12*, 2865–2869.
- Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Nishigaki, M., Shibata, Y., and Shimada, S. (2002). Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J. Clin. Invest.* *110*, 1185–1190.
- Ugawa, S., Ueda, T., Yamamura, H., and Shimada, S. (2005). In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *136*, 125–133.
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P.V., et al. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* *18*, 145–153.
- Valente, P., Castroflorio, E., Rossi, P., Fadda, M., Sterlini, B., Cervigni, R.I., Prestigio, C., Giovedì, S., Onofri, F., Mura, E., et al. (2016). PRRT2 Is a Key Component of the Ca(2+)-Dependent Neurotransmitter Release Machinery. *Cell Rep.* *15*, 117–131.
- Vallbo, A.B., and Hagbarth, K.E. (1968). Activity from skin mechanoreceptors recorded percutaneously in awake human subjects. *Exp. Neurol.* *21*, 270–289.
- Vandewauw, I., De Clercq, K., Mulier, M., Held, K., Pinto, S., Van Ranst, N., Segal, A., Voet, T., Vennekens, R., Zimmermann, K., et al. (2018). A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*.
- Varga, H., Pardutz, A., Vamos, E., Bohar, Z., Bago, F., Tajti, J., Bari, F., and Vecsei, L. (2009). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates nitroglycerin-induced calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neurosci. Lett.* *451*, 170–173.
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., and McNaughton, P.A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* *534*, 813–825.
- Vellani, V., Colucci, M., Lattanzi, R., Giannini, E., Negri, L., Melchiorri, P., and McNaughton, P.A. (2006). Sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 by the prokineticin receptor agonist Bv8. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 5109–5116.
- Vergo, S., Craner, M.J., Ezensperger, R., Attfield, K., Friese, M.A., Newcombe, J., Esiri, M., and Fugger, L. (2011). Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain J. Neurol.* *134*, 571–584.
- Verkest, C., Piquet, E., Diochot, S., Dauvois, M., Lanteri-Minet, M., Lingueglia, E., and Baron, A. (2018). Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine. *Br. J. Pharmacol.* *175*, 4154–4166.
- Vetter, I., Hein, A., Sattler, S., Hessler, S., Touska, F., Bressan, E., Parra, A., Hager, U., Leffler, A., Boukalova, S., et al. (2013). Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 16627–16641.
- Viana, F., and Voets, T. (2018). Heat Pain and Cold Pain. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain*.

- Viana, F., de la Peña, E., and Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat. Neurosci.* 5, 254–260.
- Vick, J.S., and Askwith, C.C. (2015). ASICs and neuropeptides. *Neuropharmacology* 94, 36–41.
- Vicuña, L., Strohlic, D.E., Latremoliere, A., Bali, K.K., Simonetti, M., Husainie, D., Prokosch, S., Riva, P., Griffin, R.S., Njoo, C., et al. (2015). The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. *Nat. Med.* 21, 518–523.
- Vidrio, H., and Fernández, G. (2001). Influence of endothelium in dose-dependent inhibition and potentiation by isoniazid of isosorbide dinitrate relaxation of rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37, 630–638.
- Villanueva, L., and Nosedá, R. (2013). Trigeminal Mechanisms of Nociception. In: McMahon SB, Koltzenburg M and Editors, Wall & Melzack's Textbook of Pain, 6th Edition (Philadelphia: Elsevier Saunders).
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748–754.
- Voilley, N. (2004). Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 3, 71–79.
- Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., and Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 8026–8033.
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., et al. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* 70, 482–494.
- Vriens, J., Nilius, B., and Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 573–589.
- de Vries, B., Anttila, V., Freilinger, T., Wessman, M., Kaunisto, M.A., Kallela, M., Artto, V., Vijfhuizen, L.S., Göbel, H., Dichgans, M., et al. (2016). Systematic re-evaluation of genes from candidate gene association studies in migraine using a large genome-wide association data set. *Cephalalgia Int. J. Headache* 36, 604–614.
- Vrublevskii, S.V., Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., and Tsyndrenko, A.Y. (1985). Proton-activated sodium conduction in cerebral cortex neurones. *Dokl Akad Nauk SSSR* 284, 990–993.
- Vukicevic, M., Weder, G., Boillat, A., Boesch, A., and Kellenberger, S. (2006). Trypsin cleaves acid-sensing ion channel 1a in a domain that is critical for channel gating. *J. Biol. Chem.* 281, 714–722.
- Vullo, S., and Kellenberger, S. (2019). A molecular view of the function and pharmacology of acid-sensing ion channels. *Pharmacol. Res.*
- Vullo, S., Bonifacio, G., Roy, S., Johner, N., Bernèche, S., and Kellenberger, S. (2017). Conformational dynamics and role of the acidic pocket in ASIC pH-dependent gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- Vuralli, D., Wattiez, A.-S., Russo, A.F., and Bolay, H. (2019). Behavioral and cognitive animal models in headache research. *J. Headache Pain* 20, 11.
- Vyvers, A., Schmidt, A., Wiemuth, D., and Gründer, S. (2018). Screening of 109 neuropeptides on ASICs reveals no direct agonists and dynorphin A, YFMRamide and endomorphin-1 as modulators. *Sci. Rep.* 8, 18000.
- Wager, T.D., Atlas, L.Y., Lindquist, M.A., Roy, M., Woo, C.-W., and Kross, E. (2013). An fMRI-based neurologic signature of physical pain. *N. Engl. J. Med.* 368, 1388–1397.
- Waite, P.M.E., and Ashwell, K.W.S. (2012). Chapter 31 - Trigeminal Sensory System. In *The Human Nervous System (Third Edition)*, J.K. Mai, and G. Paxinos, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 1110–1143.
- Walder, R.Y., Rasmussen, L.A., Rainier, J.D., Light, A.R., Wemmie, J.A., and Sluka, K.A. (2010). ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia After Inflammatory Muscle Injury. *J. Pain* 11, 210–218.
- Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1998). H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 418–424.
- Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., and Lazdunski, M. (1996). The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 271, 10433–10436.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997a). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386, 173–177.
- Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997b). Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 20975–20978.
- Waldmann, R., Champigny, G., Lingueglia, E., De Weille, J.R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1999). H(+)-gated cation channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 67–76.
- Walker, C.S., Raddant, A.C., Woolley, M.J., Russo, A.F., and Hay, D.L. (2018). CGRP receptor antagonist activity of olcegepant depends on the signalling pathway measured. *Cephalalgia Int. J. Headache* 38, 437–451.
- Walker, R.G., Willingham, A.T., and Zuker, C.S. (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287, 2229–2234.
- Wall, P.D., and Woolf, C.J. (1984). Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. *J. Physiol.* 356, 443–458.
- Walwyn, W.M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H.S., McRoberts, J.A., and Marvizón, J.C.G. (2016). Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and α 2A Adrenergic Receptors: Role of Constitutive Activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 204–221.
- Wan, Y., Yu, Y., Pan, X., Mo, X., Gong, W., Liu, X., and Chen, S. (2019). Inhibition on acid-sensing ion channels and analgesic activities of flavonoids isolated from dragon's blood resin. *Phytother. Res. PTR.*

- Wang, H., and Siemens, J. (2015). TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temp. Austin Tex* 2, 178–187.
- Wang, F., Bélanger, E., Côté, S.L., Desrosiers, P., Prescott, S.A., Côté, D.C., and Koninck, Y.D. (2018a). Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold. *Cell Rep.* 23, 2001–2013.
- Wang, P.-H., Zhao, L.-X., Wan, J.-Y., Zhang, L., Mao, X.-N., Long, F.-Y., Zhang, S., Chen, C., and Du, J.-R. (2016a). Pharmacological characterization of a novel gastrodin derivative as a potential anti-migraine agent. *Fitoterapia* 109, 52–57.
- Wang, Q., Wang, Q., Song, X.-L., Jiang, Q., Wu, Y.-J., Li, Y., Yuan, T.-F., Zhang, S., Xu, N.-J., Zhu, M.X., et al. (2018b). Fear extinction requires ASIC1a-dependent regulation of hippocampal-prefrontal correlates. *Sci. Adv.* 4, eaau3075.
- Wang, S., Wu, B.-X., Liu, C.-Y., Qin, G.-C., Yan, W.-H., Zhou, J.-Y., and Chen, L.-X. (2018c). Expression of ASIC3 in the Trigeminal Nucleus Caudalis Plays a Role in a Rat Model of Recurrent Migraine. *J. Mol. Neurosci.* MN.
- Wang, T., Chen, N., Zhan, W., Liu, J., Zhang, J., Liu, Q., Huang, H., He, L., Zhang, J., and Gong, Q. (2015a). Altered effective connectivity of posterior thalamus in migraine with cutaneous allodynia: a resting-state fMRI study with Granger causality analysis. *J. Headache Pain* 17, 17.
- Wang, W., Duan, B., Xu, H., Xu, L., and Xu, T.L. (2006). Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem* 281, 2497–2505.
- Wang, W., Yu, Y., and Xu, T.L. (2007). Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 145, 631–641.
- Wang, W., Ye, S.-D., Zhou, K.-Q., Wu, L.-M., and Huang, Y.-N. (2012). High doses of salicylate and aspirin are inhibitory on acid-sensing ion channels and protective against acidosis-induced neuronal injury in the rat cortical neuron. *J. Neurosci. Res.* 90, 267–277.
- Wang, X., Li, W.-G., Yu, Y., Xiao, X., Cheng, J., Zeng, W.-Z., Peng, Z., Xi Zhu, M., and Xu, T.-L. (2013). Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 4265–4279.
- Wang, X.Y., Yan, W.W., Zhang, X.L., Liu, H., and Zhang, L.C. (2014). ASIC3 in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus of brain parenchyma contributes to inflammatory pain in rats. *Neurol Res* 36, 270–275.
- Wang, Y., Guo, Z.-Y., Sun, X., Lu, S.-B., Xu, W.-J., Zhao, Q., and Peng, J. (2016b). Identification of Changes in Gene expression of rats after Sensory and Motor Nerves Injury. *Sci. Rep.* 6, 26579.
- Wang, Y., Fu, X., Huang, L., Wang, X., Lu, Z., Zhu, F., and Xiao, Z. (2018d). Increased Asics Expression via the Camkii-CREB Pathway in a Novel Mouse Model of Trigeminal Pain. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 46, 568–578.
- Wang, Y.-Z., Wang, J.-J., Huang, Y., Liu, F., Zeng, W.-Z., Li, Y., Xiong, Z.-G., Zhu, M.X., and Xu, T.-L. (2015b). Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction. *ELife* 4.

- Wei, X., Edelmayer, R.M., Yan, J., and Dussor, G. (2011). Activation of TRPV4 on dural afferents produces headache-related behavior in a preclinical rat model. *Cephalalgia Int. J. Headache* *31*, 1595–1600.
- Wei, X., Melemedjian, O.K., Ahn, D.D.-U., Weinstein, N., and Dussor, G. (2014). Dural fibroblasts play a potential role in headache pathophysiology. *Pain* *155*, 1238–1244.
- de Weille, J., and Bassilana, F. (2001). Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions. *Brain Res* *900*, 277–281.
- de Weille, J.R., Bassilana, F., Lazdunski, M., and Waldmann, R. (1998). Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel. *FEBS Lett* *433*, 257–260.
- Weiller, C., May, A., Limmroth, V., Jüptner, M., Kaube, H., Schayck, R.V., Coenen, H.H., and Diener, H.C. (1995). Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat. Med.* *1*, 658–660.
- Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., et al. (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* *34*, 463–477.
- Wemmie, J.A., Taugher, R.J., and Kreple, C.J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 461–471.
- Wetzel, C., Hu, J., Riethmacher, D., Benckendorff, A., Harder, L., Eilers, A., Moshourab, R., Kozlenkov, A., Labuz, D., Caspani, O., et al. (2007). A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature* *445*, 206–209.
- Wetzel, C., Pifferi, S., Picci, C., Gök, C., Hoffmann, D., Bali, K.K., Lampe, A., Lapatsina, L., Fleischer, R., Smith, E.S.J., et al. (2016). Small-molecule inhibition of STOML3 oligomerization reverses pathological mechanical hypersensitivity. *Nat. Neurosci.*
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A., and Fischer, J.A. (1984). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci. Lett.* *52*, 199–204.
- Wilson, P.C., Lee, M.-H., Appleton, K.M., El-Shewy, H.M., Morinelli, T.A., Peterson, Y.K., Luttrell, L.M., and Jaffa, A.A. (2013). The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist [Sar1,Ile4,Ile8]-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.* *288*, 18872–18884.
- Wirth, F.P., and Van Buren, J.M. (1971). Referral of pain from dural stimulation in man. *J. Neurosurg.* *34*, 630–642.
- Wlaschin, J.J., Gluski, J.M., Nguyen, E., Silberberg, H., Thompson, J.H., Chesler, A.T., and Pichon, C.E.L. (2018). Dual leucine zipper kinase is required for mechanical allodynia and microgliosis after nerve injury. *ELife* *7*, e33910.
- Woo, S.-H., Ranade, S., Weyer, A.D., Dubin, A.E., Baba, Y., Qiu, Z., Petrus, M., Miyamoto, T., Reddy, K., Lumpkin, E.A., et al. (2014). Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* *509*, 622–626.

- Woo, S.-H., Lukacs, V., de Nooij, J.C., Zaytseva, D., Criddle, C.R., Francisco, A., Jessell, T.M., Wilkinson, K.A., and Patapoutian, A. (2015). Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat. Neurosci.* *18*, 1756–1762.
- Woolf, C.J. (2010). Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat. Med.* *16*, 1241–1247.
- Woolf, C.J., and Wall, P.D. (1986). Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *6*, 1433–1442.
- Wray, S.H., Mijović-Prelec, D., and Kosslyn, S.M. (1995). Visual processing in migraineurs. *Brain* *118*, 25–35.
- Wright, A.J., Husson, Z.M.A., Hu, D.-E., Callejo, G., Brindle, K.M., and Smith, E.S.J. (2018). Increased hyperpolarized [1-13 C] lactate production in a model of joint inflammation is not accompanied by tissue acidosis as assessed using hyperpolarized 13 C-labelled bicarbonate. *NMR Biomed.*
- Wu, J., Zhang, X., Nauta, H.J., Lin, Q., Li, J., and Fang, L. (2008). JNK1 regulates histone acetylation in trigeminal neurons following chemical stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 781–786.
- Wu, J., Xu, Y., Jiang, Y.-Q., Xu, J., Hu, Y., and Zha, X.-M. (2016). ASIC subunit ratio and differential surface trafficking in the brain. *Mol. Brain* *9*, 4.
- Wu, J., Liu, T.-T., Zhou, Y.-M., Qiu, C.-Y., Ren, P., Jiao, M., and Hu, W.-P. (2017). Sensitization of ASIC3 by proteinase-activated receptor 2 signaling contributes to acidosis-induced nociception. *J. Neuroinflammation* *14*, 150.
- Wu, L.-J., Duan, B., Mei, Y.-D., Gao, J., Chen, J.-G., Zhuo, M., Xu, L., Wu, M., and Xu, T.-L. (2004). Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* *279*, 43716–43724.
- Wu, W.L., Lin, Y.W., Min, M.Y., and Chen, C.C. (2010). Mice lacking *Asic3* show reduced anxiety-like behavior on the elevated plus maze and reduced aggression. *Genes Brain Behav* *9*, 603–614.
- Wu, X., Zhang, M., and Huang, H. (2014). Effect of qilongtoutong granule on calcitonin gene-related peptide, beta-endorphin, serotonin, dopamine, and noradrenalin in migraine model rats and mice. *J. Tradit. Chin. Med. Chung Tsa Chih Ying Wen Pan Spons. -China Assoc. Tradit. Chin. Med. Acad. Tradit. Chin. Med.* *34*, 188–193.
- Wu, Y., Chen, Z., and Canessa, C.M. (2019). A valve-like mechanism controls desensitization of functional mammalian isoforms of acid-sensing ion channels. *ELife* *8*, e45851.
- Wulff, H., Christophersen, P., Colussi, P., Chandy, K.G., and Yarov-Yarovoy, V. (2019). Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*.
- Wultsch, T., Painsipp, E., Shahbazian, A., Mitrovic, M., Edelsbrunner, M., Lazdunski, M., Waldmann, R., and Holzer, P. (2008). Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *Pain* *134*, 245–253.
- Xiao, M.-M., Zhang, Y.-Q., Wang, W.-T., Han, W.-J., Lin, Z., Xie, R.-G., Cao, Z., Lu, N., Hu, S.-J., Wu, S.-X., et al. (2016). Gastrodin protects against chronic inflammatory pain by inhibiting spinal synaptic potentiation. *Sci. Rep.* *6*, 37251.

- Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* *118*, 687–698.
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., et al. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* *418*, 181–186.
- Xu, Y., Jiang, Y.-Q., Li, C., He, M., Rusyniak, W.G., Annamdevula, N., Ochoa, J., Leavesley, S.J., Xu, J., Rich, T.C., et al. (2018). Human ASIC1a mediates stronger acid-induced responses as compared with mouse ASIC1a. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201701367R.
- Xu, Y., Wu, S., Wu, Y., Gong, M., and Wang, Z. (2019). Recognition and Optimization of Ingredients Treating Nitroglycerin-Induced Migraine Rats from Wuzhuyu Decoction. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* *2019*, 6156754.
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *7*, 1598–1608.
- Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., and McCleskey, E.W. (2006). Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res* *99*, 501–509.
- Yan, J., Edelmayer, R.M., Wei, X., De Felice, M., Porreca, F., and Dussor, G. (2011). Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain* *152*, 106–113.
- Yan, J., Melemedjian, O.K., Price, T.J., and Dussor, G. (2012). Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). *Mol. Pain* *8*, 6.
- Yan, J., Wei, X., Bischoff, C., Edelmayer, R.M., and Dussor, G. (2013). pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache* *53*, 1250–1261.
- Yang, H.-Y.T., and Iadarola, M.J. (2006). Modulatory roles of the NPF system in pain mechanisms at the spinal level. *Peptides* *27*, 943–952.
- Yang, Y., Li, S., Jin, Z.-R., Jing, H.-B., Zhao, H.-Y., Liu, B.-H., Liang, Y.-J., Liu, L.-Y., Cai, J., Wan, Y., et al. (2018). Decreased abundance of TRESK two-pore domain potassium channels in sensory neurons underlies the pain associated with bone metastasis. *Sci Signal* *11*, eaao5150.
- Yao, G., Han, X., Hao, T., Huang, Q., and Yu, T. (2015). Effects of rizatriptan on the expression of calcitonin gene-related peptide and cholecystokinin in the periaqueductal gray of a rat migraine model. *Neurosci. Lett.* *587*, 29–34.
- Yarmolinsky, D.A., Peng, Y., Pogorzala, L.A., Rutlin, M., Hoon, M.A., and Zuker, C.S. (2016). Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron* *92*, 1079–1092.
- Yarwood, R.E., Imlach, W.L., Lieu, T., Veldhuis, N.A., Jensen, D.D., Klein Herenbrink, C., Aurelio, L., Cai, Z., Christie, M.J., Poole, D.P., et al. (2017). Endosomal signaling of the receptor for calcitonin gene-related peptide mediates pain transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 12309–12314.
- Yashima, S., Shimazaki, A., Mitoma, J., Nakagawa, T., Abe, M., Yamada, H., and Higashi, H. (2015). Close association of B2 bradykinin receptors with P2Y2 ATP receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* *158*, 155–163.

- Yekkirala, A.S., Roberson, D.P., Bean, B.P., and Woolf, C.J. (2017). Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 545–564.
- Yen, Y.-T., Tu, P.-H., Chen, C.-J., Lin, Y.-W., Hsieh, S.-T., and Chen, C.-C. (2009). Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol. Pain* *5*, 1.
- Yermolaieva, O., Leonard, A.S., Schnizler, M.K., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6752–6757.
- Yi, L., Wu, Q., Chen, N., Song, G., Wang, C., Zou, Q., and Zhang, Z. (2017). Valproate Plays a Protective Role against Migraine by Inhibiting Protein Kinase C Signalling in Nitroglycerin-treated Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*
- Yin, Z., Fang, Y., Ren, L., Wang, X., Zhang, A., Lin, J., and Li, X. (2009). Atorvastatin attenuates NF-kappaB activation in trigeminal nucleus caudalis in a rat model of migraine. *Neurosci. Lett.* *465*, 61–65.
- Yoder, N., and Gouaux, E. (2018). Divalent cation and chloride ion sites of chicken acid sensing ion channel 1a elucidated by x-ray crystallography. *PLoS One* *13*, e0202134.
- Yoder, N., Yoshioka, C., and Gouaux, E. (2018). Gating mechanisms of acid-sensing ion channels. *Nature*.
- Young, G.T., Gutteridge, A., Fox, H.D.E., Wilbrey, A.L., Cao, L., Cho, L.T., Brown, A.R., Benn, C.L., Kammonen, L.R., Friedman, J.H., et al. (2014). Characterizing human stem cell-derived sensory neurons at the single-cell level reveals their ion channel expression and utility in pain research. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *22*, 1530–1543.
- Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., Yu, F., Liu, H., Jiang, H., and Xu, T.-L. (2010). A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* *68*, 61–72.
- Yu, Z., Wu, Y.-J., Wang, Y.-Z., Liu, D.-S., Song, X.-L., Jiang, Q., Li, Y., Zhang, S., Xu, N.-J., Zhu, M.X., et al. (2018). The acid-sensing ion channel ASIC1a mediates striatal synapse remodeling and procedural motor learning. *Sci. Signal.* *11*.
- Zagami, A.S., and Lambert, G.A. (1990). Stimulation of cranial vessels excites nociceptive neurones in several thalamic nuclei of the cat. *Exp. Brain Res.* *81*, 552–566.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A.C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* *67*, 821–870.
- Zamponi, G.W., Gandini, M.A., and Snutch, T.P. (2018). Voltage-Gated Calcium Channels: Molecular Targets for Treating Chronic Pain. *Oxf. Handb. Neurobiol. Pain*.
- Zappia, K.J., Garrison, S.R., Palygin, O., Weyer, A.D., Barabas, M.E., Lawlor, M.W., Staruschenko, A., and Stucky, C.L. (2016). Mechanosensory and ATP Release Deficits following Keratin14-Cre-Mediated TRPA1 Deletion Despite Absence of TRPA1 in Murine Keratinocytes. *PLoS One* *11*, e0151602.
- Zappia, K.J., O’Hara, C.L., Moehring, F., Kwan, K.Y., and Stucky, C.L. (2017). Sensory Neuron-Specific Deletion of TRPA1 Results in Mechanical Cutaneous Sensory Deficits. *ENeuro* *4*.

- Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yévenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol. Rev.* *92*, 193–235.
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., Zwan, J. van der, Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., Manno, G.L., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* *174*, 999–1014.e22.
- Zeitz, K.P., Guy, N., Malmberg, A.B., Dirajlal, S., Martin, W.J., Sun, L., Bonhaus, D.W., Stucky, C.L., Julius, D., and Basbaum, A.I. (2002). The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1010–1019.
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., and Bogoyevitch, M.A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *80*, 793–835.
- Zelenka, M., Schäfers, M., and Sommer, C. (2005). Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* *116*, 257–263.
- Zha, X. (2013). Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function. *Mol. Brain* *6*, 1.
- Zha, X., Wemmie, J.A., Green, S.H., and Welsh, M.J. (2006). Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16556–16561.
- Zha, X., Costa, V., Harding, A.M.S., Reznikov, L., Benson, C.J., and Welsh, M.J. (2009a). ASIC2 subunits target acid-sensing ion channels to the synapse via an association with PSD-95. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 8438–8446.
- Zha, X., Wang, R., Collier, D.M., Snyder, P.M., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2009b). Oxidant regulated inter-subunit disulfide bond formation between ASIC1a subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3573–3578.
- Zhang, P., and Canessa, C.M. (2002). Single channel properties of rat acid-sensitive ion channel-1alpha, -2a, and -3 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* *120*, 553–566.
- Zhang, F., Wang, Y., Zhang, D., Fan, X., Han, H., Du, X., Gamper, N., and Zhang, H. (2018). Transcriptional regulation of voltage-gated sodium channels contributes to GM-CSF induced pain. *BioRxiv* 386698.
- Zhang, J., Carver, C.M., Choveau, F.S., and Shapiro, M.S. (2016). Clustering and Functional Coupling of Diverse Ion Channels and Signaling Proteins Revealed by Super-resolution STORM Microscopy in Neurons. *Neuron* *92*, 461–478.
- Zhang, Q., Lee, W.-C.A., Paul, D.L., and Ginty, D.D. (2019). Multiplexed peroxidase-based electron microscopy labeling enables simultaneous visualization of multiple cell types. *Nat. Neurosci.* *1*.
- Zhang, X., Li, L., and McNaughton, P.A. (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* *59*, 450–461.

- Zhang, X., Levy, D., Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2010). Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 8807–8814.
- Zhang, X., Levy, D., Kainz, V., Nosedá, R., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2011a). Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann. Neurol.* *69*, 855–865.
- Zhang, X., Burstein, R., and Levy, D. (2012). Local action of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 on intracranial meningeal nociceptors. *Cephalalgia Int. J. Headache* *32*, 66–72.
- Zhang, X., Kainz, V., Zhao, J., Strassman, A.M., and Levy, D. (2013a). Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Ann. Neurol.* *73*, 741–750.
- Zhang, X.-C., Strassman, A.M., Burstein, R., and Levy, D. (2007). Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *322*, 806–812.
- Zhang, X.-C., Kainz, V., Burstein, R., and Levy, D. (2011b). Tumor necrosis factor- α induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions. *Pain* *152*, 140–149.
- Zhang, X.-F., Zhang, W.-J., Dong, C.-L., Hu, W.-L., Sun, Y.-Y., Bao, Y., Zhang, C.-F., Guo, C.-R., Wang, C.-Z., and Yuan, C.-S. (2017). Analgesia effect of baicalein against NTG-induced migraine in rats. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* *90*, 116–121.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O’Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *34*, 11929–11947.
- Zhang, Y., Zhao, S., Rodriguez, E., Takatoh, J., Han, B.-X., Zhou, X., and Wang, F. (2015). Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J. Clin. Invest.* *125*, 3782–3794.
- Zhang, Y.-K., Huang, Z.-J., Liu, S., Liu, Y.-P., Song, A.A., and Song, X.-J. (2013b). WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J. Clin. Invest.* *123*, 2268–2286.
- Zhao, D., Ning, N., Lei, Z., Sun, H., Wei, C., Chen, D., and Li, J. (2014). Identification of a novel protein complex containing ASIC1a and GABAA receptors and their interregulation. *PLoS One* *9*, e99735.
- Zhao, J., Bree, D., Harrington, M.G., Strassman, A.M., and Levy, D. (2016). Cranial dural permeability of inflammatory nociceptive mediators: Potential implications for animal models of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache*.
- Zhou, H., Wang, X., Wang, S., Liu, C., Fu, Q., Qin, G., Zhou, J., and Chen, L. (2018a). Inhibition of nerve growth factor signaling alleviates repeated dural stimulation-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience*.
- Zhou, P., Xu, H.-S., Li, M.-M., Chen, X.-D., Wang, J., Zhou, H.-B., Chen, L., Zhang, N., and Liu, N. (2018b). Mechanism of nitric oxide and acid-sensing ion channel 1a modulation of panic-like behaviour in the dorsal periaqueductal grey of the mouse. *Behav. Brain Res.*
- Zhou, R., Wu, X., Wang, Z., Ge, J., and Chen, F. (2015). Interleukin-6 enhances acid-induced apoptosis via upregulating acid-sensing ion channel 1a expression and function in rat articular chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* *29*, 748–760.

Zhou, R.-P., Dai, B.-B., Xie, Y.-Y., Wu, X.-S., Wang, Z.-S., Li, Y., Wang, Z.-Q., Zu, S.-Q., Ge, J.-F., and Chen, F.-H. (2017). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α augment acidosis-induced rat articular chondrocyte apoptosis via nuclear factor-kappaB-dependent up-regulation of ASIC1a channel. *Biochim. Biophys. Acta*.

Zhou, S., Bonasera, L., and Carlton, S.M. (1996). Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuroreport* 7, 895–900.

Zhu, X., Han, Y., Xiong, W., Liu, W., Lu, S., Li, J., Wang, H., and Fan, Z. (2011). Effects of heating coagulation of middle meningeal artery on plasma CGRP level and c-fos expression in migraine rat triggered by nitroglycerin. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 32, 589–594.

Zhuang, Z.-Y., Wen, Y.-R., Zhang, D.-R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G.R., Decosterd, I., and Ji, R.-R. (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3551–3560.

Ziemann, A.E., Schnizler, M.K., Albert, G.W., Severson, M.A., Howard, M.A., Welsh, M.J., and Wemmie, J.A. (2008). Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat. Neurosci.* 11, 816–822.

Ziemann, A.E., Allen, J.E., Dahdaleh, N.S., Drebot, I.I., Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Lynch, C.M., Faraci, F.M., Howard, M.A., Welsh, M.J., et al. (2009). The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell* 139, 1012–1021.

Zimmermann, K., Reeh, P.W., and Averbeck, B. (2002). ATP can enhance the proton-induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE(2) release in isolated rat dura mater. *Pain* 97, 259–265.

Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., and Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447, 855–858.

Zimmermann, K., Hein, A., Hager, U., Kaczmarek, J.S., Turnquist, B.P., Clapham, D.E., and Reeh, P.W. (2009). Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat. Protoc.* 4, 174–196.

Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18114–18119.

Zuo, L., Zhu, Y., Hu, L., Liu, Y., Wang, Y., Hu, Y., Wang, H., Pan, X., Li, K., Du, N., et al. (2019). PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane transportation of acid-sensing ion channel 1a/Calcium ion influx/endoplasmic reticulum stress activation on PDGF-induced HSC Activation. *J. Cell. Mol. Med.*

Zuo, Z., Smith, R.N., Chen, Z., Agharkar, A.S., Snell, H.D., Huang, R., Liu, J., and Gonzales, E.B. (2018). Identification of a unique Ca²⁺-binding site in rat acid-sensing ion channel 3. *Nat. Commun.* 9, 2082.