

Etude sur neurones sensoriels et kératinocytes des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le prurit de la ciguatéra

Killian L'Herondelle

► To cite this version:

Killian L'Herondelle. Etude sur neurones sensoriels et kératinocytes des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le prurit de la ciguatéra. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT: 2016BRES0115. tel-03336529

HAL Id: tel-03336529 https://theses.hal.science/tel-03336529

Submitted on 7 Sep 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.



UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE sous le sceau de l'Université de Bretagne Loire pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention : Biologie-Santé École Doctorale "Santé, Information, Communication, Mathématiques, Matière" (ED SICMA) présentée par

Killian L'HERONDELLE

Préparée au Laboratoire des Interactions Neurones Epithelium (ex LNB), EA4685.

Thèse soutenue le 13 décembre 2016 devant le jury composé de :

Etude sur neurones sensoriels et kératinocytes des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le prurit de la ciguatéra

Laurent MISERY PU-PH, Université de Bretagne Occidentale/*Directeur de thèse*

Raphaële LE GARREC Docteur, Université de Bretagne Occidentale/*Co-directrice*

Evelyne BENOIT Docteur, CEA / *Rapporteur*

Laurence COIFFARD Professeur, Université de Nantes / *Rapporteur*

Serge PAUILLAC Docteur, Institut Pasteur Paris / Président-Examinateur

Pascale MARCORELLES PU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Examinateur

A mes Parents,

A mon grand frère et celle qui fait son bonheur,

A ma grand-mère,

A mon filleul et toute sa famille,

Et à mes amis

Est dédiée cette thèse

REMERCIEMENTS

"Heureux qui, comme Ulysse, a fait bon voyage..." [Joachim du Bellay, 1558]

Ce sonnet reflète parfaitement mon état d'âme après ces 3 dernières années, que je souhaite graver ici, avec simplicité et sincérité, comme l'a fait autrefois du Bellay dans son recueil. Ma vie de doctorant a été enrichie par de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je remercie en premier lieu le Pr. MISERY qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, il y a 4 ans déjà, initiant ma vie de doctorant durant mon stage de Master 2. Son encadrement, son soutien constant et ses conseils m'ont permis de m'épanouir tout au long de ma thèse. Merci pour m'avoir donné l'opportunité de participer à différents congrès. Il est rare d'avoir un directeur de laboratoire qui porte vers le haut ses doctorants et qui valorisent leurs travaux. Je suis conscient de la chance que j'ai eue en travaillant au LNB. Merci pour cette belle aventure.

Mes plus sincères remerciements s'adressent au Dr. Raphaële Le Garrec qui a coencadré ma thèse et dont le soutien au quotidien a été inégalé. Raphaële, je ne te remercierais jamais assez pour tes conseils, ta disponibilité et les nombreuses discussions scientifiques qui m'ont été d'une aide précieuse ces 3 dernières années. Ta bienveillance et ton humanité m'ont instillées la volonté d'aller toujours plus loin. Grâce à toi, je me suis épanoui autant sur le plan professionnel que personnel. Je suis plus qu'honoré d'avoir été ton premier doctorant et d'avoir mené à bien notre projet. Merci pour toute la confiance que tu as placée en moi.

Je remercie vivement le Dr. Evelyne Benoit d'avoir accepter d'être rapporteur de mon manuscrit. Merci pour les nombreux encouragements, le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de ma thèse et la considération que tu as donné à mes travaux.

Je remercie également le Pr. Laurence Coiffard qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur au sein de mon jury de thèse. Merci Laurence de m'avoir ouvert les portes de votre Master 2, sans lequel je ne serais jamais arrivé ici. Vos enseignements m'ont permis d'aiguiser mon esprit critique. Mes remerciements s'adressent également au Pr. Pascale Marcorelles qui me fait l'honneur de juger mon travail à travers son expertise des neuropathologies et de compter parmi les membres du jury.

J'adresse aussi mes remerciements au Dr. Serge Pauillac qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse et de juger mes travaux par son expertise des toxines.

Je remercie chaleureusement le Dr. Christelle Le Gall-Ianotto, le Dr. Virginie Buhe, le Dr. Nicolas Lebonvallet et le Dr. Matthieu Talagas pour les nombreux conseils, la disponibilité et le soutien qui m'ont été grandement bénéfique tout au long de ma thèse. Merci pour l'ambiance quotidienne à laquelle vous avez tous contribués et dans laquelle j'ai pu évoluer sereinement.

Je tiens à remercier aussi Raphael Leischiera pour tous les conseils qui m'ont permis de résoudre nombreux problèmes techniques rencontrés et de perfectionner ma pratique au laboratoire. Je compte sur toi pour continuer le combat contre les moucherons !

Mes sincères remerciements s'adressent aussi au Dr. Olivier Mignen dont la collaboration et les échanges m'ont permis de mener à bien mes expériences d'imagerie calcique. De la même façon, je remercie le Dr. Réginald Philippe pour le temps qu'il a passé à me former sur les différents dispositifs et matériels d'imagerie calcique.

Je remercie aussi mes collègues doctorants et amis, Mohamed Boudjarane et Olivier Gouin, de m'avoir apporté un soutien et une aide constante durant ces 3 dernières années. Votre bienveillance et notre complicité m'ont permis de garder la tête hors de l'eau dans les moments difficiles. Merci à vous d'avoir été présent (et surotut de m'avoir supporté), même en dehors du travail. J'ai passé avec vous des moments inoubliables.

A mes amis Florentin Huguet, Marie-Laure Calvez, Adeline Busson, Maria-Jose Lista, Nathalie Benz, Paul Buscaglia, Marjolaine Debant, Angélique Mottais, aucun mot n'est assez fort pour vous dire la chance que j'ai eu de vous connaître et de partager tous ces moments au laboratoire.

Je tiens aussi à remercier le personnel de l'animalerie: le Dr. Séverine Loisel, Marie-Françoise Scouazec et Emmanuel, dont la disponibilité et la gentillesse ont contribué au bon déroulement de mes expériences. Je remercie également le Pr. Richard Lewis, le Dr. Irina Vetter, le Dr. Marco Inserra et le Dr. Jennifer Deuis pour leur accueil au sein de l'Institute for Molecular Biosciences de l'Université de Queensland et qui m'ont permis de mener des expériences complémentaires à mon sujet de thèse.

Merci aussi à toi, Katell Floch, pour ta sympathie et tes encouragements durant toutes ces années. Nos confidences et notre complicité ont jalonné de gaieté ces dernières années.

J'exprime mes remerciements à Ophélie Pierre, nouvelle doctorante de l'équipe, qui continuera l'aventure avec Raphaële. Tu as été présente et tu m'as soutenu ces derniers mois, merci. Je ne peux que te souhaiter une thèse comme je l'ai vécu (tu es entre de bonnes mains).

Et enfin un remerciement aux personnes de mon entourage m'ayant soutenu tout au long de ce périple. Même si leurs contributions ne relevaient pas de la science, ils m'ont donné la force d'avancer et de croire. Merci à vous, mes amis et ma famille.

J'exprime mes remerciements auprès de la Société Française de Dermatologie qui dispensa l'aide financière sans laquelle ces travaux de thèse n'auraient pas été possibles. L'école doctorale SICMA est au même titre remerciée pour m'avoir attribué une bourse ministérielle en sélectionnant mon projet de thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCT	FION	1
I. PEAU	J ET PRURIT	3
I.1.	Généralités sur la peau	3
A.	Les fonctions de la peau	3
В.	Structure de la peau	4
a)	L'hypoderme	5
b)	Le derme	6
c)	L'épiderme et ses composantes cellulaires	6
	i) Les kératinocytes	7
	ii) Les mélanocytes	8
	iii) Les cellules de Langerhans	8
	iv) Les cellules de Merkel	9
I.2.	Le système nerveux périphérique (SNP)	10
Α.	Généralités	11
В.	Notions anatomo-fonctionnelles	11
C.	Système Nerveux Cutané (SNCu)	13
a)	SNCu autonome	13
b)	SNCu sensoriel	13
1.3.	Le Prurit	17
Α.	Généralités	17
a)	Définition	17
b)	Classification	17
c)	Epidémiologie	19
d)	L'affrontement des théories sur la démangeaison	20
В.	Physiopathologie du prurit	20
a)	Les pruricepteurs, fibres nerveuses du prurit et leur récepteur	20
b)	Inflammation neurogène cutanée et prurit	22
C)	Voie histaminergique versus voies non-histaminergiques	23
	Vole nistaminergique : nistamine et recepteurs associes	24
	(Proteose Activisted Recenters) focus sur la PAP 2	25 25
d)	Autres médiateurs et récenteurs du prurit	25
u)	i) Les Mranr (Mas-related G protein recentor)	27 27
	ii) Les canaux TRPs (Transient Recentor Potential channels)	27
		<u>2</u> 0
II 1	Généralités	31
Δ	Définition	21
A. R	Histoire	ک ۲۱
<u>р</u> . С.	Origine et le transfert des ciguatoxines	32

	D.	Structure et propriétés physico-chimiques des CTXs	34
11.1	2.	Revue de la littérature : Neurological disturbances in ciguatera fish pois	oning:
cli	inical	features and pathophysiological basis (à soumettre)	36
	Α.	ABSTRACT	36
	В.	INTRODUCTION	37
	a)) Ciguatera: an underreported and misdiagnosed disease lacking effective prev	ention/
	ar	nd treatment	37
	b)) Clinical features of ciguatera	41
		i) Clinical findings of acute CFP: a variety of neurological signs with pathod	gnomic
		sensory disturbances	41
	-	ii) Persistent and relapsing symptoms for months or years	45
	С.	PATHOPHYSIOLOGICAL BASIS OF CFP DISTURBANCES	45
	a)) Neuronal targets and neurocellular effects of CTXs related to CFP symptoms	45
		 Voltage-gated sodium channels (Na_v) as main primary targets resulting in mer 	nbrane
		ii) An <i>in vitre</i> cell evelling related to Schwapp cell adams in human	4545 47
		ii) Nouromodiator rologoo linkod to outonomic dysfunctions and nouroeut	
		disturbances	
		iv) Increase in intracellular calcium concentration by multiple mechanisms	4 9 51
	D	NEUROPHYSIOLOGICAL AND NERVE HISTOLOGICAL STUDIES	
	F.	TREATMENT OF CIGUATERA FISH POISONING	
	F.	CONCLUSION	57
00NTF			50
CONTE	:XIE	DE L'ETUDE ET SES OBJECTIFS	58
I.	CON	ITEXTE DE L'ÉTUDE	59
II.	Obje	ECTIFS	60
снарг			CTY.
י ואווס י			-710-
۷			01
I.	Ετυα	DE DE LA SÉCRÉTION DE NEUROPEPTIDES INDUITE PAR LA P-CTX-2	62
II.	Arti		
		ICLE T. RELEASE OF NEUROPEPTIDES FROM A NEURO-CUTANEOUS CO-CULTURE IN	IODEL:
A NO	VEL //	N VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ)	10DEL: 63
A no III.	VEL // Opti	IN VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE	10DEL: 63 72
A no III. III	VEL // Opti .1.	N VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté	10DEL: 63 72 74
А NO III. III	OVEL // OPTI .1. .2.	INISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire	NODEL: 63 72 74 75
А NO III. III III III	OVEL // OPTI .1. .2. .3.	N VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes	10DEL: 63 72 74 75 78
А NO III. III III III	OVEL // OPTI .1. .2. .3.	INVITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes	10DEL: 63 72 74 75 78
А NO III. III III CHAPI	OVEL // OPTI .1. .2. .3. TRE	 IN VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO 	10DEL: 63 72 74 75 78 N DE
A NO III. III III CHAPI NEURO	OVEL // OPTI .1. .2. .3. TRE DPEP	 N VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO TIDES PAR LA P-CTX-2 	MODEL: 63 72 74 75 78 N DE 83
A NO III. III III CHAPI NEURC	OPTI .1. .2. .3. TRE DPEP	 INCLE T. RELEASE OF NEUROPEPTIDES FROM A NEURO-CUTANEOUS CO-CULTURE N N VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO 'TIDES PAR LA P-CTX-2 	10DEL: 63 72 74 75 75 78 N DE 83
A NO III. III III CHAPI NEURC I.	OVEL // OPTI .1. .2. .3. TRE DPEP INVO	 IN VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO TIDES PAR LA P-CTX-2 	MODEL: 63 72 74 75 78 N DE 83 NS AND
A NO III. III III CHAPI NEURC I. KERA	OPEL // OPT/ .1. .2. .3. TRE DPEP INVO	 IN VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO PTIDES PAR LA P-CTX-2 DUVEMENT OF PAR-2 IN P-CTX-2-INDUCED SP RELEASE FROM SENSORY NEURON CYTES COCULTURE MODEL 	NODEL: 63 72 74 75 78 N DE 83 NS AND 85
A NO III. III III CHAPIT NEURC I. KERA II.	OVEL // OPTI .1. .2. .3. TRE DPEP INVO ABST	 IN VITRO MODEL FOR STUDYING SENSORY EFFECTS OF CIGUATOXINS (PUBLIÉ) IMISATION DU MODÈLE Choix d'un support et d'un revêtement adapté Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes 2 : ETUDE DES MEDIATEURS IMPLIQUES DANS LA SECRETIO PTIDES PAR LA P-CTX-2 DLVEMENT OF PAR-2 IN P-CTX-2-INDUCED SP RELEASE FROM SENSORY NEURON CYTES COCULTURE MODEL 	MODEL: 63 72 74 75 78 N DE 83 NS AND 85 85

IV. MAT	FERIAL AND METHODS	91
IV.1.	Reagents	
IV.2.	Coculture of rat DRG neurons and human keratinocytes	92
IV.3.	Coculture treatments with antagonists and P-CTX-2	
IV.4.	SP and CGRP enzyme immunoassays (EIA)	93
IV.5.	Data analysis	
V. Res	SULTS	
V.1.	Inhibitory effect of selected antagonists in P-CTX-2-evoked SP release.	
VI. Dise	CUSSION	
VI.1.	Role of Nav channels in CTX-induced SP release	
VI.2.	Calcium influx, key process in P-CTX-2-evoked SP release	97
VI.3.	Role of Ca _v channels in P-CTX-2-mediated SP release	
VI.4.	Role of NCX system in P-CTX-2-mediated SP release	
А.	Role of TRPV1 and TRPA1 in P-CTX-2-mediated SP release	98
В.	Role of PAR-2 in P-CTX-2-mediated SP release	99
VII. S	SUPPLEMENTARY DATA	100
VII.1.	Material and methods	100
Α.	Cell line and culture	100
В.	Measurement of intracellular Ca ²⁺ responses	100
VIII. F	RESULTATS PRÉLIMINAIRES ET COMPLÉMENTAIRES	103
IX. Syn	ITHÈSE SUR LE CHAPITRE	105
IX.1.	Conclusions	105
IX.2.	Perspectives	105
CHAPITRE	3: ETUDE DE LA SIGNALISATION CALCIQUE MEDIEE PAR LA P-CT	X-2 SUR
NEURONE	S SENSORIELS DE RAT (ARTICLE 2 - PARTIE B)	107
I. Mat	FERIALS AND METHODS	108
l.1.	Culture of rat DRG neurons	108
1.2.	Calcium imaging experiments in neurons and keratinocytes	108
1.3.	Data analysis	109
II. Res	SULTS	110
II.1.	Calcium imaging experiments in DRG neurons	110
A.	Typical pattern of calcium responses to P-CTX-2	
В.	Study of mediators involved in P-CTX-2-induced calcium response in DRG neur	ons111
III. Dise	CUSSION	116
III.1.	Different calcium signatures highlighting several subpopulations of neuro	ons . 116
III.2.	Calcium response in neurons induced by P-CTX-2 is Nav-dependent	116
III.3.	PAR-2, a new GPCR in P-CTX-2- mediated calcium signalling	117
Α.	Involvement of calcium influx-dependent mechanism and role of N-type \mbox{Ca}_{v} cha	nnels118
IV. SYN	ITHÈSE SUR LE CHAPITRE	121
IV.1.	Conclusions	121

١٧	/.2.	Perspectives	123
СНАРІ	TRE	4: ETUDE DU ROLE DES KERATINOCYTES DANS LES EFFETS M	EDIES PAR
LA P-C	CTX-2	2	124
I.	ΜΑΤ	ERIALS AND METHODS	
I.'	1.	Calcium imaging experiments in keratinocytes	
L	2.	Data analysis	
П.	Res	SULTS	
II.	.1.	Calcium imaging experiments in keratinocytes	127
	A.	A direct effect of P-CTX-2 on keratinocytes	
	В.	Nav channels and PAR-2 role in P-CTX-2-evoked calcium signalling	128
II.	.2.	Study of the role of keratinocytes in P-CTX-2- induced SP relea	se from the
C	ocultı	ıre	129
III.	Dise	CUSSION	131
II	l.1.	A PAR-2- and Nav-dependent mechanism mediating CTX-induc	ced calcium
in	crea	se in primary keratinocytes	131
Ш	I.2.	A synergistic effect of keratinocytes on P-CTX-2-induced SP release	132
Ш	I.3.	Suppplementary data	134
	Α.	Transitory inhibitory effect of keratinocytes calcium response to P-CTX-2 by	hyperosmolar
	D-M	annitol	134
	В.	Effect of differentiated state of keratinocytes on P-CTX-2 activation	135
IV.	Syn	THÈSE SUR LE CHAPITRE	136
١٧	/.1.	Conclusions	136
١٧	/.2.	Perspectives	137
CONC	LUSI	ON GENERALE	138
I.	Syn	THÈSE	139
11.	Sc⊦	ÉMA BILAN	141
III.	Per	SPECTIVES DE L'ÉTUDE	142
IV.	Per	SPECTIVES HORS CIGUATERA	144
REFEF	RENC	ES BIBLIOGRAPHIQUES	145
PUBLI	САТІ	ONS ET COMMUNICATIONS	174

LISTE DES ABBREVIATIONS

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

5-HTR : récepteur à la sérotonine

ADN : acide désoxyribonucléique

BDNF : brain-derived growth factor

BPE : extrait pituitaire bovin/bovine pituitary extract

BSA : albumine de sérum bovin/bovine serum albumin

Cav : canaux calciques voltage-dépendant /voltage-gated calcium channels

CCL20 : chemokine C-C motif ligand 20

CD4 : cluster de différenciation 4

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CTX(s) : ciguatoxines(s)/ciguatoxin(s)

EGF : epidermal growth factor

EGTA : ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

GDNF : glial cell-derived neurotrophic factor

GRD/DRG : ganglions rachidiens dorsaux/ganglions spinaux/dorsal root ganglia

H1R, H2R, H3R, H4R : récepteurs à l'histamine/histamine receptors

IB4 : isolectine B4

IFN-γ : interféron gamma

INC/CNI : inflammation neurogène cutanée/cutaneous neurogenic inflammation

JDE : jonction dermo-épidermique

KC(s) : kératinocyte(s)/keratinocyte(s)

KO : Knock-Out

KSFM : keratinocytes serum-free medium

Kv : canaux potassiques voltage-dépendant/voltage-gated potassium channels

LT : lymphocytes T

Mrgpr : mas-related G protein receptor

Nav : canaux sodiques voltage-dépendant/voltage-gated sodium channels

NCX : échangeur sodium-calcium

NGF : nerve growth factor

PA : potentiel d'action

P-CTX-2 : ciguatoxine-2 du Pacifique/Pacific-ciguatoxin-2

P-CTX-4A : pacific-ciguatoxin-4A, gambiertoxin

P-CTX-4B : pacific-ciguatoxin-4B, gambiertoxin

PDL : poly-D-lysine

PAR-2 : protease-activated receptor 2

- PLA2 : phospholipase A2
- PLC : phospholipase C
- PKC : protéine kinase C
- PCR : Polymerase Chain Reaction/Réaction en Chaîne par Polymérase
- RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
- qPCR : PCR en temps réel ou PCR quantitative
- SNC/CNS : système nerveux central/central nervous system
- SNCu : système nerveux cutané
- SNEIC : système neuro-endocrino-immuno cutané
- SNP/PNS : système nerveux périphérique/peripheral nervous system
- SOCE : store-operated calcium entry
- SP : substance P
- TGR : récepteur aux acides biliaires
- TMA : tetramethylammonium
- TRP : transient receptor potential
- TRPA : transient receptor potential, ankyrin subfamily
- TRPC : transient receptor potential, canonical subfamily
- TRPM : transient receptor potential, melastatin subfamily
- TRPML : transient receptor potential, mucolipin subfamily
- TRPP : transient receptor potential, polycystic subfamily
- TRPV : transient receptor potential, vanilloid subfamily
- TSLP : thymic stromal lymphopoietin
- TTX : tétrodotoxine
- TTX-r : résistant à la tétrodotoxine/tetrodotoxin-resistant
- TTX-s : sensible à la tétrodotoxine/tetrodotoxin-sensitive
- UV : ultra-violet
- VIH : virus de l'immuno-déficience humaine

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schéma d'une coupe de peau et de ses différentes couches	5
Figure 2 : Schéma des différentes couches de l'épiderme	7
Figure 3 : Principales composantes du sytème nerveux	10
Figure 4 : Représentation schématique de l'innervation cutanée	12
Figure 5 : Illustration des modalités sensorielles	14
Figure 6 : Illustration des mécanorécepteurs cutanés	15
Figure 7 : Schéma décisionnel de l'étiologie du prurit	18
Figure 8 : Illustration de l'inflammation neurogène cutanée	23
Figure 9 : Schéma des mécanismes d'activation du récepteur PAR-2	26
Figure 10 : Illustration des différentes voies de signalisation du prurit	30
Figure 11 : Cultures de neurones sensoriels issus de GRD à 5 jours	74
Figure 12 : Effet de la température sur l'adhérence des neurones	76
Figure 13 : Comparaisons des concentrations de SP libérée dans le modèle	
initial et le modèle optimisé	79
Figure 14 : Impact de la différenciation des kératinocytes en coculture sur la	
sécrétion de SP	80
Figure 15 : Expression relative des Nav par les kératinocytes non différenciés	
et différenciés	81
Figure 16 : Effects of different inhibitors on P-CTX-2-evoked SP release	95
Figure 17: Dose-response curves of GB83 effect on veratridine-induced	
membrane depolarization in transfected HEK cells with Na $_{ m V}$ isoforms	101
Figure 18: Effect of GB83 5 µM on P-CTX-2-induced SP release	102
Figure 19: Effect of different drugs on P-CTX-2-induced SP release	103
Figure 20: Two representative patterns of calcium responses in neurons	110
Figure 21: Effect of different antagonists on P-CTX-2-evoked calcium response	
on the 1st peak	111
Figure 22: Effect of different antagonists on the second peak of the P-CTX-2-	
evoked calcium response	113
Figure 23: Effect of different antagonists on the plateau of P-CTX-2-evoked	
calcium response	114

Figure 24: Calcium profiles obtained after P-CTX-2 10 nM application on	
keratinocytes	.127
Figure 25: Calcium signalling in keratinocytes in presence of Na_v and PAR-2	
blockers	.128
Figure 26: SP release from the coculture compared to the summ of	
independent release from neurons and keratinocytes monoculture	.129
Figure 27: Hyperosmolar D-mannitol effect on P-CTX-2-evoked calcium signal	
in keratinocytes	.134
Figure 28: P-CTX-2-evoked calcium response on undifferentiated versus	
differentiated keratinocytes	.135
Figure 29 : Schémas de synthèse	.142

INTRODUCTION

Le terme "prurit", terme médical pour parler de démangeaisons, a été énoncé pour la première fois en 1660 par le médecin allemand Samuel Haffenreffer comme sensation déplaisante conduisant au besoin de se gratter ou de se frotter. Longtemps négligé ou relégué au même rang que la douleur, il aura fallu attendre les années 90's pour que le prurit soit considéré comme symptôme pathologique à part entière, grâce à la découverte de fibres nerveuses de type C spécifiques du prurit (Schmelz et al., 1997). Malgré les avancées scientifiques récentes et la découverte de nouvelles cibles potentielles dans ce domaine, la connaissance de sa physiopathologie reste incomplète. Le prurit est un symptôme fréquent de maladies de peau (dermatite atopique, psoriasis, etc...) mais aussi systémiques (infection à VIH, syndromes myéloprolifératifs chroniques, etc...) bien que les recherches sur la démangeaison soient classiquement associées à des dermatoses prurigineuses. Notamment, un prurit intense se manifeste lors d'une intoxication appelée ciguatera. Originaire des régions tropicales, cet empoisonnement communément appelé "la Gratte" dans les îles du Pacifique, survient consécutivement à la consommation de poissons contaminés par des ciguatoxines (CTXs). Avec le réchauffement climatique, des microalgues et poissons ciguatérigènes colonisent des régions plus tempérées. De plus, l'essor du tourisme et de l'exportation de poissons favorisent la propagation du phénomène de la ciguatera qui s'étend maintenant aux pays de l'hémisphère nord. Aucun moyen fiable et rapide n'étant actuellement disponible pour détecter les poissons ciguatérigènes, la ciguatéra est un enjeu de santé publique notable. Il y a plusieurs raisons à étudier le prurit ciguatérique. La première raison est qu'il n'existe aucun traitement spécifique de la ciguatéra, ayant pour conséquence une prise en charge thérapeutique symptomatique. La deuxième raison est que la démangeaison est une thématique de recherche qui connaît un intérêt croissant au regard des industries cosmétiques et pharmaceutiques puisqu'il n'existe pas encore de traitements efficaces. Une grande part de la physiopathologie des ciguatoxines et du prurit reste encore à découvrir. Cette étude est la première à associer les connaissances dont nous disposons dans ces deux domaines pour envisager de nouvelles pistes

thérapeutiques à la fois du prurit et de la ciguatéra. C'est l'objet des travaux que je vous présente dans ce manuscrit.

I. Peau et Prurit

Le prurit est par définition la sensation désagréable cutanée qui conduit au besoin de se gratter. Le comportement de grattage, instinctif, a pour but d'éliminer les éléments présents à la surface de la peau responsables de la démangeaison, des parasites par exemple. Pourtant, les démangeaisons ne sont pas toujours provoquées par des facteurs exogènes mais un soulagement est souvent ressenti suite au grattage. Afin d'appréhender les tenants et les aboutissants de la démangeaison, il est nécessaire d'introduire des notions essentielles concernant la peau et les mécanismes physiopathologiques connus du prurit.

I.1. Généralités sur la peau

Non seulement par sa masse (15% du poids corporel), sa superficie (1,7 m²), la diversité des cellules qui la constitue, ses annexes cutanées mais aussi par les nombreux rôles qu'elle assure, la peau se positionne comme un organe essentiel du corps humain.

A. Les fonctions de la peau

A côté de rôles souvent méconnus, le rôle majeur manifeste de la peau est celui de barrière physique. C'est la première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis de l'environnement. En effet, la peau offre une protection à différents facteurs exogènes biologiques (bactéries, champignons), physiques (chocs, UV) et chimiques (toxines, acides/bases). La peau est aussi le siège de la régulation thermique. En effet, lorsque la température corporelle augmente, la sécrétion de sueur s'accentue et le phénomène d'évaporation en surface provoque un rafraîchissement. La fonction immunitaire de la peau n'est pas

négligeable puisque l'épiderme renferme des cellules de Langerhans, "sentinelles" capables d'activer les lymphocytes en présence d'un antigène. La peau est aussi un organe de synthèse. Par exemple, les ultra-violets (UV) permettent aux kératinocytes de produire de la vitamine D essentielle à notre organisme. Ils sont aussi capables de synthétiser des endorphines impactant le comportement et l'humeur des individus. La peau se voit aussi comme support de la relation sociale et de communication. De part, son odeur, sa couleur, sa texture, présence de tatouages et piercings, elle transmet des messages sociaux (émotions, appartenance ethnique, etc...) et sexuels. La peau, via son innervation, est aussi le siège des sensations aux stimuli thermiques (chaud, froid), physiques (chocs, pression, vibration) et du prurit. Son rôle d'organe sensoriel est assuré par une composante nerveuse, associée ou non à des cellules de Merkel mais aussi à d'autres cellules de la peau. A titre d'exemple, une étude récente a démontré le rôle crucial des kératinocytes dans la perception de la douleur (Pang et al., 2015). La fonction sensorielle de la peau est ainsi assurée non pas par une mais par plusieurs composantes cellulaires qui la constituent (Boulais and Misery, 2008).

B. Structure de la peau

La peau est un organe composé de plusieurs couches successives : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 1) (Talagas and Misery, 2015).





a) L'hypoderme

L'hypoderme est la partie la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Abondamment vascularisée, elle est composée de lobes contenant des lobules d'adipocytes, séparés entre eux par du tissu conjonctif. Les adipocytes sont impliqués principalement dans le stockage de graisse et participent à la sécrétion de substances ayant un rôle dans l'appétit et le métabolisme général. Cette couche de graisse a essentiellement une fonction de réserves énergétiques, et dans une moindre mesure, d'isolant thermique et d'amortisseur de chocs. Le concept du tissu adipeux restreint à la fonction de stockage des graisses a évolué récemment vers un paradigme plus complexe où l'hypoderme est davantage considéré comme organe endocrine, jouant un rôle dans la satiété, l'immunité, le métabolisme lipidique et l'angiogenèse (Barinaga, 1995; Ronti et al., 2006).

b) Le derme

Le derme est la couche se situant juste au-dessus de l'hypoderme. Ce tissu est dit conjonctif car il est composé de macromécules particulières telles que les fibres de collagène, d'élastine et de fibronectine conférant la souplesse et l'élasticité de la peau. Ces protéines sont maintenues dans un gel composé de mucopolysaccharides, molécules hygroscopiques dont la présence confère au derme la fonction d'hydratation de la peau. Les fibroblastes participent à la synthèse de ces macromolécules. Le derme est aussi la couche où sont localisées l'ensemble des annexes cutanées comprenant l'appareil pilo-sébacé (follicule pileux + glande sébacée apocrine) et les glandes sudoripares eccrines. Le derme est la dernière couche de la peau vascularisée par les vaisseaux sanguins et lymphatiques, permettant à la fois l'afflux de cellules immunitaires et l'apport des nutriments à l'épiderme par diffusion. De plus, elle contient aussi une innervation, complexée ou non à des cellules de Merkel.

c) L'épiderme et ses composantes cellulaires

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau qui se délimite du derme par une structure particulière appelée jonction dermo-épidermique (JDE). L'épiderme est un épithélium pluristratifié, appelé aussi épithélium malpighien, qui se compose de 4 à 5 couches distinctes suivant les zones du corps. De l'intérieur vers l'extérieur, il y a : la couche basale (*Stratum basale* ou *Stratum germinativum*), la couche épineuse (*Stratum spinosum*), la couche granuleuse (*Stratum granulosum*), la couche claire (*Stratum lucidum*), observée dans les zones corporelles où la peau est épaisse, et la couche cornée (*Stratum corneum*) (Figure 2).



Figure 2 : Schéma des différentes couches de l'épiderme

(Source adaptée: http://dmnemonics.blogspot.fr/2011/12/epidermal-layer.html)

i) Les kératinocytes

Les kératinocytes constituent plus de 90% des cellules de l'épiderme, assurant, au premier plan, un rôle de barrière. Les kératinocytes de la couche basale, dits "basaux", sont indifférenciés et prolifératifs. Ils sont fixés à la JDE via des hémidesmosomes. En migrant progressivement vers les couches supérieures par un processus de différenciation, ils assurent le renouvellement de l'épiderme. Ils prennent alors une morphologie aplatie et se lient entre eux par des jonctions de structure protéique appelées desmosomes. A ce stade, les cellules sont anucléées et très serrées les unes aux autres, formant une couche protectrice et imperméable (McGrath and Cuito, 2010). Les kératinocytes remplissent aussi un rôle d'ordre immunitaire, notamment dans l'inflammation

en sécrétant des chimio kinés indispensables au recrutement et l'activation de cellules immunitaires dans les dermatoses inflammatoires et prurigineuses (Kim and Kreuger, 2015; Lee et al., 2010; Wilson et al., 2013). Exprimant des TRPs, canaux cationiques impliqués dans la thermoception, la douleur et le prurit (Denda et al., 2007; Pang et al., 2015; Peier et al., 2002; Southall et al., 2003), ils assurent un rôle sensoriel.

ii) Les mélanocytes

Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation de la peau et des poils. Ils contiennent des organites spécifiques appelés mélanosomes dans lesquels sont synthétisés la mélanine. Leur morphologie dendritique leur permet d'être au contact de nombreux kératinocytes (40 en moyenne) et de leur transmettre la mélanine. Ce pigment s'agence autour du noyau des kératinocytes afin de les protéger des rayons UV pouvant induire des mutations de l'ADN et favoriser l'apparition de cancer (Wu and Hammer, 2014).

iii) Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans représentent 2 à 4 % des cellules épidermiques, localisées au niveau basal et suprabasal. Elles s'auto-renouvellent et appartiennent aux cellules du système immunitaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui interviennent dans l'hypersensibilité de type IV appelée aussi hypersensibilité retardée à médiation cellulaire ou encore dermatite allergique de contact (Silberberg-Sinakin and Thorbecke, 1980). Cela signifie qu'elles sont capables de détecter un antigène ou un haptène entré en contact avec l'épiderme, l'internaliser, le transporter jusqu'au ganglion lymphatique le plus proche pour le présenter aux lymphocytes T (LT). C'est la phase de sensibilisation. Avant la seconde exposition au même antigène, les LT ayant reconnus l'épitope antigénique vont se multiplier et former un pool de cellules dites "mémoires". Cette l'étape de latence. Lors d'une exposition répétée au même antigène, les cellules mémoires présentes vont réagir très rapidement et provoquer une réponse immunitaire importante sur le site, recrutant via la sécrétion de chimiokines, des macrophages et des polynucléaires basophiles (Streilein and Bergstresser, 1984). Ces cellules de

l'immunité vont sécréter nombreux médiateurs à l'origine d'un érythème et d'un œdème (Romani et al., 2010; Sparber et al., 2010; Vohr, 2016).

iv) Les cellules de Merkel

Dans l'épiderme, les cellules de Merkel sont encore plus rares que les kératinocytes et les cellules de Langerhans. Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs responsables de la sensation tactile fine. Elles sont présentes à la base du follicule pileux, réservoir de cellules souches, mais rarement associées à des nerfs. Elles sont retrouvées surtout au niveau des zones tactiles sensibles telles que les lèvres et les zones érogènes où elles se regroupent autour de terminaisons nerveuses non myélinisées (cluster de 50 cellules). Malgré leur très faible densité, elles sembleraient jouer un rôle crucial dans le système neuro-endocrino-immuno cutané (SNEIC) via les prolongements cytoplasmiques qu'elles envoient entre les kératinocytes et les cellules de Langerhans, ainsi que les synapses qu'elles forment avec les terminaisons nerveuses épidermiques (Boulais and Misery, 2008; Chateau and Misery, 2004; Nakatani et al., 2015).

I.2. Le système nerveux périphérique (SNP)

Le système nerveux du corps humain est divisé en système nerveux central (SNC) (encéphale, moëlle épinière et rétine) et le système nerveux périphérique (SNP) comprenant l'ensemble du réseau nerveux par où transite l'information entre ce système nerveux central et la périphérie. Le SNP est luimême subdivisé en 2 composantes fonctionnelles :

- des composantes sensorielles constituées par les nerfs sensitifs dont les terminaisons innervent les organes périphériques. Ils représentent la voie afférente /ascendante qui transmet les informations perçues en périphérie au SNC.
- des composantes motrices constituées par les nerfs moteurs et végétatifs qui constituent les voies efférentes/descendantes via lesquelles les informations du SNC sont émises aux organes périphériques cibles.



Figure 3 : Principales composantes du sytème nerveux et leurs relations fonctionnelles (source : Purves, 2016, Bases de Neurosciences, De Boeck, 758 pages, page 14, 978-2-8041-0962-2)

A. Généralités

Le système nerveux cutané est à la fois dense et complexe avec une voie afférente et efférente. Comme mentionné précédemment, la peau assure une fonction sensorielle par la présence d'une innervation dans les 3 compartiments cutanés (hypoderme, derme et épiderme, à l'exception de la couche cornée). La peau est en contact direct avec notre environnement et notre système nerveux cutané reçoit et répond continuellement à tout un panel de stimuli variés d'ordre physique (thermiques, mécaniques, rayonnements), chimique (polluants, cosmétiques, détergents) et biologique (microorganismes, parasites).

B. Notions anatomo-fonctionnelles

Le neurone est l'unité fonctionnelle du système nerveux, responsable de l'émission et du transit du signal nerveux. Classiquement, il est composé d'un corps cellulaire et de prolongements appelés dendrites et axones (Purves, 2016). Les dendrites sont des prolongements qui ont pour fonction la réception de l'information et sa conduction vers le corps cellulaire (conduction afférente) tandis que la partie axonale permet le transport de l'information depuis le corps cellulaire vers les terminaisons axonales (conduction efférente). D'un point de vue structural, les neurones peuvent être classés en 3 catégories:

- les neurones bipolaires constitués d'un prolongement afférent et efférent,
- les neurones multipolaires possédant un axone et de multiples dendrites,
- les neurones unipolaires n'ayant qu'un seul type de prolongement (afférent ou efférent),
- les neurones pseudo-unipolaires possèdent un prolongement initial qui se dédouble pour former un prolongement afférent et un autre efférent

Les cellules gliales font aussi partie intégrante du système nerveux, bien qu'elles soient totalement différentes des neurones. Dans le SNP, elles sont

représentées par les cellules satellites et des cellules de Schwann qui ont notamment pour rôle la synthèse de myéline enveloppant l'axone. Cette substance riche en lipides intervient dans la vitesse de conduction du signal nerveux.

Anatomiquement, le SNP est composé de 31 paires de nerfs spinaux (ou rachidiens) et 12 paires de nerfs crâniens qui émergent de la moëlle épinière et du cerveau, respectivement. Par opposition aux nerfs crâniens, les nerfs rachidiens sont tous "mixtes", c'est à dire qu'ils comportent à la fois des fibres motrices et des fibres sensitives. Les corps cellulaires des fibres sensitives sont regroupés dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD). A partir de ces ganglions rachidiens, les fibres nerveuses qui sont acheminées jusque dans la peau forment un plexus sous-épidermique à partir duquel certaines fibres traversent la JDE pour innerver l'épiderme.



<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de l'innervation cutanée (source: Misery et al., 2014)

C. Système Nerveux Cutané (SNCu)

Le SNCu se décline en système somatique, "volontaire", et système neurovégétatif (autonome), "involontaire".

a) SNCu autonome

Le système nerveux autonome ou végétatif ne se limite pas à la peau mais s'étend à travers l'organisme entier et se subdivise en 2 sous-systèmes nerveux : sympathique et parasympathique (Talagas and Misery, 2015). Le système parasympathique est exclusivement constitué de fibres nerveuses cholinergiques tandis que le système sympathique lui fait intervenir, au niveau post-ganglionnaire, des fibres noradrénergiques. Le système nerveux principalement autonome cutané compte des fibres nerveuses noradrénergiques restreintes au derme, qui innervent l'ensemble du derme, les vaisseaux qui le composent et les annexes cutanées qui s'y trouvent. Seule exception pour les glandes sudorales eccrines pour lesquelles des fibres cholinergiques les innervent. Les fibres nerveuses du SNCu autonome innervent l'ensemble des cellules dermiques ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les glandes eccrines et apocrines, les follicules pileux et les muscles arrecteurs des poils. Ce système nerveux autonome intervient dans le phénomène de sudation, la vasomotricité et le flux sanguin, englobant les processus régissant la thermorégulation (Démarchez, 2016; Kálmán and Csillag, 2005; Purves, 2016).

b) SNCu sensoriel

Il est important de noter que la sensibilité générale ou somesthésie se distingue de celle fournie par des organes sensoriels spécifiques (vision, audition, goût, odorat). La sensibilité générale se décline en sensibilité somatique ou intéroceptive. Cette sensibilité somatique se subdivise elle-même en sensibilité extéroceptive (sensibilité cutanée) ou proprioceptive (sensibilité de l'organisme à sa position et à son mouvement, qui dépend des récepteurs musculaires et articulaires). Quant à la sensibilité intéroceptive, elle rend compte de l'état des viscères et des changements physico-chimiques internes de l'organisme. Les fibres nerveuses du SNCu sont classées en 2 groupes: les fibres nerveuses épidermiques et dermiques. Au sein de de l'épiderme, des terminaisons nerveuses libres cheminent jusque dans la couche granuleuse. Le terme "terminaison libre" fait référence à une extension dendritique très fine non myélinisée. D'autres fibres font des synapses avec des cellules de Merkel au niveau de la couche basale formant les complexes de Merkel ou disques de Merkel. Dans le derme, des fibres nerveuses sont encapsulées et forment différents corpuscules (Figure 5).



<u>Figure 5</u> : Tableau récapitulatif des modalités sensorielles et des caractéristiques nerveuses associées

(source : Baciu, Bases de Neurosciences, De Noeck, 2011, 268 pages. Neurosciences et cognition. 978-2-8041-0962-2)



<u>Figure 6</u> : Illustration des mécanorécepteurs cutanés (source : https://www.studyblue.com/notes/note/n/somatosensory-ch-25/deck/2743353)

Les fibres nerveuses sensorielles cutanées se distinguent selon leur rapidité à conduire le signal nerveux. Plus la fibre est myélinisée, plus son diamètre est important et plus la vitesse de conduction du signal nerveux est grande. Nous retrouvons ainsi les fibres de type C non myélinisées, les fibres A δ peu myélinisées et les fibres myélinisées de type A β . Dans la peau, les fibres A δ représentent presque 80% des nerfs sensoriels partant des GRD et sont principalement impliquées dans la nociception et la thermoception. D'autre part, les fibres C constituent 20% des terminaisons sensorielles afférentes et interviennent dans la nociception, la thermoception et la démangeaison (Alvarez and Fyffe, 2000; Lawson, 2002; Purves, 2016). Parmi ces fibres de types C, certaines sont dites "peptidergiques" car elles libèrent la SP, le CGRP,

la plupart n'expriment pas l'isolectine B4 (IB4) et ont le phénotype suivant : SP⁺, CGRP⁺, IB4⁻. Les autres sont dites "non-peptidergiques" car expriment l'IB4, le récepteur au GDNF et davantage de canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v) TTX-résistants (Molliver et al., 1997; Stucky and Lewin, 1999; Woolf and Ma, 2007). Même si cette catégorisation peptidergique versus non-peptidergique est restée ancrée dans les habitudes via les marqueurs cités précédemment, des travaux ont montré que tout n'était pas blanc ou noir. Certains auteurs ont montré que des fibres nociceptives et pruriceptives pouvaient aussi être IB4+ (Han et al., 2013; Petruska et al., 2002). Ces informations sont à prendre en compte et il ne faut pas considérer uniquement les fibres C peptidergiques comme étant la composante nerveuse principale à l'origine du prurit. Nous reviendrons sur cet aspect ultérieurement dans la partie qui va suivre.

I.3. Le Prurit

A. Généralités

a) Définition

Le prurit est par définition une sensation cutanée désagréable qui est associée à une envie subite de se gratter (Misery and Ständer, 2010; Rothman, 1941). A l'origine, le comportement de grattage dans le règne animal semble être un moyen de défense contre les stimuli exogènes divers et variés (parasites, allergènes, insectes). De la même façon, il est très fréquent de retrouver un prurit chronique ou aïgu dans le cadre de maladies dermatologiques et non dermatologiques, qui restent réfractaires à tout traitement. Jusqu'au début des années 90, la démangeaison était encore considérée comme une sensation douloureuse incomplète. Ce n'est que très récemment que le prurit a été défini comme une sensation distincte et indépendante de la douleur, bien qu'ils partagent de nombreuses similarités sur le plan physiopathologique (Ständer et al., 2003a).

b) Classification

A ce jour, le prurit peut être déterminé selon sa durée et son mécanisme. On désigne par prurit aïgu un prurit dont la durée ne va pas dépasser 6 semaines tandis qu'un prurit chronique va persister au-delà des 6 semaines. Cependant, il n'existe pas encore de classification internationale du prurit à ce jour. En 2003, une première classification neurophysiologique a été proposée selon l'origine du prurit (Twycross et al., 2003):

- pruritoceptif lorsqu'il a pour origine des fibres nerveuses pruriceptives activées par des pruritogènes,
- neuropathique lorsqu'il est généré par des neurones pruritoceptifs lésés ou défaillants,
- neurogène lorsqu'il est initié au niveau central sans atteinte nerveuse périphérique,

 psychogène lorsqu'il est d'origine psychologique, comme dans un état délirant de parasitophobie.

Cette classification semblait correcte sur le plan mécanistique mais présenta quelques limitations pour une application clinique. Elle nécessitait un diagnostic déjà établi de la cause du prurit et le prurit de nombreuses maladies se retrouvaient dans plusieurs catégories (dermatite atopique, prurit cholestatique). Les prurits d'origine inconnue n'appartenaient à aucune de ces catégories.

Quelques années plus tard, l'équipe de Ständer en proposa une nouvelle basée sur l'état clinique des patients et permet de distinguer parmi les maladies celles qui présentent ou non des lésions cutanées primaires ou secondaires. La première étape situe le patient dans un des 3 grands groupes prédéfinis (Ständer et al., 2007) :



Figure 7 : Schéma décisionnel de l'étiologie du prurit (source: Ständer et al., 2007)

- groupe I : prurit dont l'origine est une maladie de peau. Il représente les dermatoses prurigineuses et inclut les maladies de peau d'ordre inflammatoire, infectieux, auto-immun, génodermatose, réaction cutanée, dermatoses de grossesse et lymphome cutané.
- groupe II : prurit sur peau saine à l'origine. Ce type de prurit survient dans des maladies systémiques tels que les troubles hormonaux et métaboliques, les infections, les maladies lymphoprolifératives et hématologiques, les néoplasmes solides, des maladies neurologiques et psychiatriques, ainsi que des réactions médicamenteuses.
- groupe III : prurit à l'origine de lésions secondaires de grattage chronique et sévère (prurigo nodulaire, lichen simplex).

L'étape suivante est de déterminer la catégorie à laquelle appartient le patient au sein du groupe défini.

c) Epidémiologie

Le prurit chronique représente un fardeau pour la population à l'échelle mondiale. Il a été difficile de déterminer son incidence et sa prévalence car c'est un symptôme négligé (non reporté) dans les études cliniques et son origine est souvent multifactorielle (Weisshaar et Dalgard, 2009, 2016). La prise en charge de ce symptôme est un challenge pour le corps médical soignant car il impacte fortement la qualité de vie des patients qui en souffrent. Malgré les contraintes, certaines études épidémiologiques ont été réalisées. En Norvège, une prévalence du prurit de 10 % est mise en avant (Dalgard et al., 2004). En Allemagne, un quart de la population déclare souffrir d'un prurit chronique (Matterne et al., 2011) et en France 40 % de la population (Wolkenstein et al., 2003). De manière générale, la population européenne déclare avoir souffert d'un prurit la semaine passée (Misery, 2012).

d) L'affrontement des théories sur la démangeaison

Von Frey, en 1922, énonce que la démangeaison a longtemps été considérée comme une faible activation des fibres de type C de la douleur. Cette théorie appelée " théorie de l'intensité " a été confrontée à une nouvelle théorie appelée " théorie de la spécificité ". Selon cette dernière, douleur et démangeaison sont des sensations distinctes dont les signalisations sont indépendantes. Cette dernière théorie a été appuyée par certains résultats expérimentaux. A titre d'exemple, l'effet analgésique des opioïdes induit en contrepartie une démangeaison, et la démangeaison induite par stimuli électriques n'induisent pas de douleur à fréquences plus élevées (Tuckett, 1982). Quelques années plus tard, des travaux ont renforcé la "théorie de la spécificité " en identifiant des fibres nerveuses histaminergiques du prurit (Schmelz et al., 2003). L'ensemble des travaux menés jusqu'à présent relatés de manière plus exhaustive par Handwerker (2014) sont en faveur d'une signalisation indépendante du prurit et certaines études récentes tentent d'identifier les différents sous-types de fibres nerveuses responsables de la démangeaison (Johanek et al., 2008).

B. Physiopathologie du prurit

Précédemment, nous avons vu que les fibres nerveuses sensorielles cutanées innervent l'épiderme, le derme et le tissu adipeux sous-jacent. Elles se déclinent en 3 groupes: les fibres A β , A δ et C. Les fibres de type A δ et C sont impliqués dans les sensations thermiques, de douleur et démangeaison. Les fibres A β , quant à elle, sont impliquées dans le toucher et leur rôle dans le prurit n'a pas été mentionné (Lawson, 2002). Actuellement, que savons-nous précisément des fibres nerveuses de la démangeaison?

a) Les pruricepteurs, fibres nerveuses du prurit et leur récepteur

Il semble que les terminaisons nerveuses responsables de la démangeaison soient localisées dans une partie restreinte de la peau, à savoir l'épiderme. En effet, en 1907, Török démontra que la suppression de l'épiderme d'un patient

souffrant de lichen plan annula ses démangeaisons. Il caractérisa les fibres nerveuses de la démangeaison comme étant des terminaisons nerveuses libres de l'épiderme (voir Shelley et Arthur, 1957). De plus, il a été montré qu'une inflammation du derme réticulaire et des tissus adipeux sous-cutanés induisent une douleur et non une démangeaison. De ces constats, il est présumé que les fibres nerveuses des couches profondes de la peau ne sont pas impliquées dans le prurit (Yosipovitch, 2007). De plus, une surexpression de terminaisons nerveuses libres intraépidermiques au niveau du Stratum granulosum a été constatée dans de nombreuses dermatoses prurigineuses (Bigliardi-Qi et al., 2007; Kinkelin et al., 2000; Tobin et al., 1992). Dans l'épiderme sont considérées 2 classes de terminaisons nerveuses sensorielles qui se distinguent en fonction de la vélocité du signal nerveux, la réaction visà-vis de facteurs trophiques, l'expression de neuropeptides et de récepteurs particuliers (Schmelz et al., 2003). Ces différences, qui font la complexité de l'innervation épidermique, permettent au SNC de discriminer finement les messages afférents. De plus, ces fibres nerveuses intra-épidermigues font des contacts et maintiennent une communication entre les différentes cellules de la peau telles que les kératinocytes, cellules de Langerhans, mastocytes et autres cellules de l'immunité. Cela permet au système nerveux cutané de transmettre les informations au SNC (voie afférente) et de transmettre en retour une réponse efférente au niveau cutané, provoquant notamment la sécrétion de neuropeptides variés (Steinhoff et al., 2006).

Récemment, les fibres nerveuses spécifiques du prurit ont été dénommées "pruricepteurs" (Schmelz et al., 1997). Ces fibres considérées jusqu'alors comme fibres de type C exclusivement, de nouvelles études suggèrent l'implication des fibres peu myélinisées Aδ dans le prurit (Ringkamp et al., 2011; Timmes et al., 2013). Et pourtant, certains travaux auraient tendance à suggérer le contraire. En effet, il a été montré que les fibres nerveuses Aδ possèdent des ramifications non-myélinisées de 5 cm dans la peau (Peng et al., 1999). D'après ces auteurs, il serait compliqué de confirmer l'implication des fibres de type C à l'origine du prurit sachant que ces fibres puissent être des extensions de fibres Aδ. Contraints de cette ambiguïté, les chercheurs se sont focalisés sur les médiateurs et non plus sur les composantes cellulaires

responsables du prurit. Parmi ceux-ci, les récepteurs à l'histamine, récepteurs à la sérotonine, le récepteur aux protéases PAR-2, et des récepteurs Mrgpr ont été décrits comme RCPG inducteur du prurit (Kim, 2012; Liu et al., 2009; Reddy et al., 2010; Rossbach et al., 2011). Des canaux cationiques de la famille des TRPs (Transient Receptor Potential) tels que le TRPV1 et le TRPA1 appartiennent aux médiateurs du prurit. Nous développerons plus en détail ces différentes classes de médiateurs dans les parties suivantes.

b) Inflammation neurogène cutanée et prurit

L'inflammation neurogène cutanée (INC) est une inflammation du tissu cutané initiée ou amplifiée par la sécrétion massive de neuropeptides au niveau des terminaisons nerveuses intra-épidermiques via un réflexe d'axone (Lembeck and Holzer, 1979). Ce réflexe d'axone se manifeste par une stimulation des fibres nerveuses intra-épidermiques conduisant à l'activation de terminaisons nerveuses voisines (conduction antidromique du signal nerveux) qui provoque la libération de neuropeptides pro-inflammatoires (Szolcsányi, 1988). Parmi eux, le rôle de la SP et du calcitonin gene-related peptide (CGRP) comme initiateurs de l'INC est bien établi (Dallos et al., 2006). La SP et le CGRP, une fois sécrétés, vont agir sur les microvaisseaux cutanés, induisant une vasodilatation caractérisée par une rougeur et une extravasation plasmatique caractérisée par un œdème (Holzer, 1998). Ces deux neuropeptides vont aussi exercer leurs effets sur les cellules avoisinantes tels que les kératinocytes, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles et les fibroblastes (Ansel et al., 1997), qui vont à leur tour sécréter un panel varié de médiateurs incluant des protéases, des neuropeptides, des neurotrophines, des cytokines et des prostanoïdes (Hägermark et al., 1978; Scholzen et al., 1998). Ces différentes molécules vont exercer de nouveau un effet localement et entretenir l'inflammation dans un cercle vicieux (Gouin et al., 2015).

Souvent, les dermatoses prurigineuses sont initiées par une INC, positionnant la SP, le CGRP et d'autres médiateurs proinflammatoires dans la physiopathologie du prurit (Roosterman et al., 2006; Ständer et al., 2003b; Steinhoff et al., 2003). A l'heure actuelle, le prurit est difficilement dissociable
du phénomène d'INC et sa compréhension est indispensable pour envisager des pistes thérapeutiques du prurit.



<u>Figure 8</u> : Illustration de l'inflammation neurogène cutanée (source: Gouin et al., 2015)

c) Voie histaminergique versus voies non-histaminergiques

Les premières découvertes sur la démangeaison ont depuis longtemps mis en avant l'histamine comme molécule responsable de ce symptôme. Ce n'est que récemment qu'émergea la notion de prurit histamino-dépendant et histaminoindépendant. Histamine et pois Mascate, communément appelé poil-à-gratter (dont les spicules contiennent des pruritogènes de type protéases), semblent activer des sous-populations différentes de fibres nerveuses de type Aδ et C. Les fibres nerveuses de type С mécano-insensibles répondent préférentiellement à l'histamine mais pas aux protéases (Namer et al., 2008; Schmelz et al., 1997). A l'inverse, les fibres de type C mécano-sensibles sont activées par les extraits du poil-à-gratter et peu ou pas par l'histamine (Johanek et al., 2008). Actuellement, il est distingué des récepteurs histamino-

dépendants les récepteurs histamino-indépendants tels que les PARs, les Mrgpr, le TLR7 et le TRPA1 (Luo et al., 2015). Depuis quelques années, la physiopathologie du prurit s'est grandement enrichie et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques pour soulager les démangeaisons prend en compte ces voies dépendantes ou non de l'histamine.

i) Voie histaminergique : histamine et récepteurs associés

L'histamine, molécule appartenant à la famille des amines, et son récepteur H1R furent largement étudiés dans le prurit ces dernières décennies. Il y a plus d'un siècle, l'histamine a été caractérisée par Dale (Dale et Laidlaw, 1919). Plus tard, les travaux de Lewis montrèrent qu'une injection intradermique d'histamine provoque rougeur, œdème et inflammation, accompagné d'un prurit (Lewis, 1929), signes évocateurs d'une INC. Dans la peau, l'histamine est synthétisée et sécrétée dans les cas de lésions tissulaires, réactions allergiques ou infections par les polynucléaires basophiles, mastocytes, les lymphocytes, les neurones et les kératinocytes (Akdis and Simons, 2006; Fitzsimons et al., 2001). Ses récepteurs associés H1R, H2R, H3R, H4R sont exprimés par les fibres nerveuses sensorielles, les kératinocytes ainsi que les cellules de l'immunité (Cannon et al., 2007; Giustizieri et al., 2004; Strakhova et al., 2009). Parmi ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (RCPG), H1R, H2R et H3R, sont exprimés par les terminaisons nerveuses cutanées et jouent un rôle important dans le prurit (Rossbach et al., 2011; Thurmond et al., 2008). Les résultats de l'équipe de Dunford suggerent que H4R a une place beaucoup plus importante que H1R dans la signalisation du prurit histaminergique (Dunford et al., 2007). Les fibres afférentes histaminergiques impliquées dans le prurit ont été identifiées comme étant des fibres de type C, à conduction lente, mécano-insensibles, de faible sensibilité électrique transcutanée et générant un érythème par axone réflexe (Schmelz et al., 1997) et ces fibres nerveuses histaminergiques du prurit ne représentent que seulement 5% des nocicepteurs cutanés (Schmelz et al., 2003). De ce constat, les recherches se sont focalisées sur la voie nonhistaminergique du prurit.

ii) Une voie non-histaminergique: récepteurs activés par les protéases"PARs" (Protease-Activated Receptors), focus sur le PAR-2

Un intérêt croissant pour le prurit histamino-indépendant s'est manifesté par l'inefficacité des traitements anti-histaminiques (Bajaj et Yadav, 2009) et a notamment fait resurgir du passé des pistes oubliées. Les premiers travaux accessibles de l'effet pruritogène des protéases datent des années 1950 (Arthur et Shelley, 1955). Dans cette étude, les spicules de pois Mascate induisent un prurit "*ne présentant aucun signe visible d'altération cutanée*", pourtant observée avec l'histamine. Le composant actif de la spicule du poil-à-gratter, "*Mucunia pruriens*", est la mucunaïne, une cystéine protéase qui clive les récepteurs PAR-2 et PAR-4, conduisant à leur activation (Reddy et al., 2008). Les PARs sont des RCPGs au même titre que les récepteurs à l'histamine mais empruntent une voie du prurit bien distincte de celle de l'histamine. Ils appartiennent à la famille des PARs qui sont des récepteurs activés par protéolyse de la partie N-terminale extracellulaire. La partie N-terminale est perdue tandis que la partie restante va se replier sur le récepteur en se comportant comme un ligand et l'activer (Figure 6).



<u>Figure 9</u> : Schéma des mécanismes d'activation enzymatique et non enzymatique du récepteur PAR-2

(source : Kawabata 2002)

Parmi les ligands, la thrombine active PAR-1, PAR-3 (Ishihara et al., 1997) et PAR-4 tandis que la trypsine, la tryptase et les kallikréines activent PAR-2 (Böhm et al., 1996; Stefansson et al., 2008). Des ligands peptidiques ont été synthétisés pour PAR-1 (Vu et al., 1991), PAR-2 (Nystedt et al., 1994) et PAR-4 (Xu et al., 1998), permettant l'étude de ces différents récepteurs en s'affranchissant des protéases qui activent les récepteurs de façon aspécifique. Le récepteur PAR-2 est exprimé fortement par les kératinocytes (surtout dans le *Stratum granulosum*), cellules endothéliales et cellules dendritiques cutanées (Hou et al., 1998; Steinhoff et al., 1999). Les mastocytes expriment aussi le PAR-2, suggérant un mécanisme d'activation autocrine supplémentaire (D'Andrea et al., 1998). Surtout, PAR-2 est aussi exprimé sur les terminaisons

nerveuses intra-épidermiques et dont l'expression est augmentée chez les patients souffrant de dermatite atopique, dermatose inflammatoire très prurigineuse (Steinhoff et al., 2003).

d) Autres médiateurs et récepteurs du prurit

i) Les Mrgpr (Mas-related G protein receptor)

Les Mrgpr appartiennent aux RCPGs et constituent une toute nouvelle famille de récepteurs impliqués dans le prurit histamino-indépendant. Ces récepteurs sont exprimés sur les neurones sensoriels et se déclinent en différents sousgroupes présentant des caractéristiques différentes :

- le MrgprA3, exprimé dans seulement 5 % des neurones, est activé par la chloroquine, un antipaludique (Liu et al., 2009).
- Ie MrgprX1 (humain) et son analogue murin MrgprC11 sont activés par la préproenképhaline BAM8-22 et sont exprimés par la même souspopulation neuronale que le MrgprA3. Une étude a montré que l'injection de cette substance chez des volontaires a induit une démangeaison ne présentant ni rougeur, ni œdème, et réfractaire à un prétraitement antihistaminique, révélant un prurit histamino-indépendant (Sikand et al., 2011).
- le MrgprD est activé par la β-alanine et provoque un prurit nonhistaminergique chez la souris et chez l'homme (Liu et al., 2012).

Il est intéressant de noter que les neurones exprimant le MrgprA3, sont aussi IB4+, CGRP+ et SP- (Han et al., 2013). Cette même sous-population de neurones est aussi activable par un panel de pruritogènes variés tels que le BAM8-22, la chloroquine et l'histamine (Liu et al., 2009) et que les fibres nerveuses sensorielles MrgprA3+ sont exclusivement cutanées. De ces découvertes, il est conclu que les fibres nerveuses MrgprA3+ sont considérées comme spécifiques du prurit et se positionnent comme cibles à fort potentiel thérapeutique (Liu and Dong, 2015).

ii) Les canaux TRPs (Transient Receptor Potential channels)

Les canaux TRPs constituent une famille de canaux cationiques non sélectifs. La famille des TRPs ne cesse de croître et comprend actuellement plus de 30 canaux dont la plupart sont préférentiellement perméants au calcium. Ce sont des tétramères dont chaque monomère est constitué de 6 domaines transmembranaires (S1 à S6). Le domaine S5 et S6 de chaque monomère forme le pore cationique du canal. Basée sur l'homologie de séquence, les TRP sont divisés en 7 grandes familles:

- TRPC (Canonical)
- TRPV(Vanilloid)
- TRPM (Melastatin)
- TRPP (Polycystin)
- TRPML (Mucolipin)
- TRPA (Ankyrin)
- TRPN (NOMPC)

Ces canaux sont impliqués dans la transduction de stimuli thermiques, osmotiques, chémosensoriels incluant les pruritogènes. Nous focaliserons notre attention sur le TRPV1 et le TRPA1 dont le rôle a été montré dans la physiopathologie du prurit.

Le TRPV1 est largement exprimé dans la peau, à la fois par les kératinocytes, mélanocytes, mastocytes, cellules de Langerhans et terminaisons nerveuses de type A δ et C (Inoue, 2002 ; Bodo, 2004 ; Ständer, 2004 ; Kobayashi, 2005). Ce canal, préférentiellement perméable aux ions calcium, est activé par différents types de stimuli tels que le faible pH (< 5,9), le chaud nociceptif (> 42°C), les cannabinoïdes endogènes (anandamide), le leucotriène B4 et la capsaïcine exogène (molécule active du piment) (Caterina et al., 1997; Szallasi et al., 2007; Tominaga and Tominaga, 2005). Son activation ouvre le pore du canal, induisant l'influx de calcium et provoque une augmentation de calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) qui est généralement accompagnée d'une exocytose de neuromédiateurs ou neuropeptides. De plus, il a été montré *in vivo* que l'utilisation d'un antagoniste du TRPV1 inhibe la démangeaison médiée par

l'activation récepteur PAR-2 (Yun et al., 2011), que son rôle est prédominant dans le prurit médié par l'histamine (Imamachi et al., 2009; Shim et al., 2007) et l'IL-31(Cevikbas et al., 2014). Il a été démontré que l'application topique répétée d'une crème à base de capsaïcine supprime les sensations douloureuses et prurigineuses par désensibilisation des fibres nerveuses, inhibition du stockage de neuropeptides (Ständer, 2001). En effet, l'utilisation topique de la capsaïcine traite les démangeaisons survenant dans différents types de prurit (Yosipovitch et al., 2003). L'implication du TRPV1 à la fois dans la voie histaminergique et non-histaminergique le positionne comme régulateur clef et cible thérapeutique intéressante du prurit (Figure 10).

Le TRPA1 est un récepteur activé par des températures froides douloureuses < 17°C (Story, 2003), mais aussi par des substances exogènes d'origine naturelle (principe actif de la cannelle et la moutarde), des substances irritantes de l'environnement (polluants, aérosols) et des molécules endogènes (Steinhoff et al., 2006; Viana, 2016). Le canal TRPA1 est exprimé par les kératinocytes basaux (Atoyan et al., 2009), les fibres afférentes de type A et C au niveau des GRD (Kobayashi et al., 2005) mais son expression par les fibres nerveuses intraépidermiques n'a pas encore été démontrée. TRPA1 a été rapporté comme acteur dans la signalisation histamino-indépendante initiée par les Mrgpr (Wilson et al., 2011) (Figure 10). Des modèles animaux Knock-Out (KO) pour TRPA1 ont mis en évidence son implication dans le prurit induit par l'IL-31 et celui de l'allergie de contact (Cevikbas et al., 2014; Liu et al., 2013). Il joue aussi un rôle dans le prurit cholestatique où les acides biliaires activent TGR5, conduisant à l'activation du TRPA1 (Lieu et al., 2014). Il a été montré son implication dans la dermatite atopique (Oh et al., 2013).

Les nombreuses études concernant ces TRP permettent de démontrer leur importance dans la physiopathologie du prurit. Un consensus est établi quant au positionnement des TRPs dans la signalisation cellulaire du prurit. Généralement, les protéines G auxquels sont couplés les RCPG de la démangeaison induisent une signalisation via la PLC et la sous-unité G $\beta\gamma$ qui, *in fine*, activent les canaux cationiques TRP (Imamachi et al., 2009; Wilson et al., 2011).



Figure 10 : Illustration des différentes voies de signalisation du prurit. 3 voies du prurit sont établies: TRPV1-dépendente, TRPA1-dépendente et TRPV1/TRPA1-indépendente. (source : Luo et al., 2015)

II. La Ciguatera

II.1. Généralités

A. Définition

La ciguatera est une forme d'ichtysarcotoxisme dont l'étymologie ichtyos (poisson), sarcos (chair) et toxicon (poison) signifie empoisonnement par la chair de poisson. Endémique des regions tropicales et subtropicales de l'océan Pacifique et Indien, la ciguatera est la plus répandue des intoxications par la consommation de poissons contaminés par des toxines. L'appellation ciguatera fut employée la première fois pour une intoxication déclenchée par l'ingestion d'un mollusque gastéropode marin communément appelé "cigua" à Cuba (Poey, 1866). Par la suite, ce mot désigna des troubles digestifs et nerveux succédant la consommation de poissons toxiques.

B. Histoire

Certaines hypothèses ont été faites quant aux premières traces historiques de cette intoxication. Certains s'accordent à dire qu'elle aurait été symbolisée par des hiéroglyphes signalant la toxicité d'un tétrodon et daterait d'environ 2700 ans avant JC. Dès l'Antiquité (800 av. JC), de anciens récits comme l'Odyssée d'Homer, relatent cette forme d'empoisonnement bien avant sa dénomination. Durant ses conquêtes en Orient, Alexandre le Grand défendait à ses soldats la consommation de certains poissons. A priori, la première description historique reconnue d'une telle intoxication proviendrait du médecin chinois Chen Tsang Chi qui relata un empoisonnement mortel par une carangue à queue jaune au VII siècle. Bien plus tard, entre 1520 et 1526, Pedro Martyr d'Anghera, chroniqueur à la cour d'Espagne, enregistra des cas de poissons ciguatériques aux Antilles grâce aux informations obtenues par Vasco de Gamma, Magellan et C. Colomb (De orbo novo, the eight decades of Peter Martyr, 1912). D'autres grands Navigateurs tels que Pedro Fernandez de Queiros et James Cook s'inscrivirent parmi les premières personnes à décrire de façon détaillée les

symptômes de la maladie. En 1774, le capitaine James Cook relata les faits suivants dans son carnet de bord: "Cet après-midi, un des naturels, ayant harponné un poisson, mon secrétaire l'acheta [...] nous donnâmes l'ordre de l'apprêter pour le souper [...] on n'apprêta que le foie et les rognons auxquels Mr. Forster et moi goûtâmes tout juste. Vers trois heures du matin, nous nous trouvâmes atteints d'une extraordinaire faiblesse et d'un engourdissement de tous les membres. J'avais presque perdu le sentiment du toucher et je ne pouvais distinguer, entre ceux que j'avais la force de soulever, les corps lourds des légers. Un quart d'eau et une plume avaient le même poids pour ma main [...] Le matin, un des cochons qui avait mangé les entrailles fut trouvé mort." (Cook, 1967).

C. Origine et le transfert des ciguatoxines

La ciguatera est un empoisonnement des régions tropicales et subtropicales dont le risque est irrégulier et imprédictible. Les toxines qui en sont responsables sont produites par des "bloom", ou efflorescence, d'un type de microalgue benthique particulière du genre *Gambierdiscus* qui entrent dans la chaîne alimentaire marine et contaminent les poissons (Lewis and Holmes, 1993a). En plus de *Gambierdiscus toxicus* (Adachi and Fukuyo, 1979), première espèce mise en évidence dans la production de CTXs à partir d'une culture monoalgale (Bagnis et al., 1980; Holmes et al., 1991), d'autres espèces du même genre *Gambierdiscus* ont été découvertes avec un potentiel à biosynthétiser des CTXs telles que *G. polynesiensis*, *G. belizeanus*, *G. australes*, *G. caribbaeus*, *G. carolinianus* et *G. ruetzleri* (Chinain et al., 1999; Litaker et al., 2010). Les quantités de CTXs produites varient grandement suivant les espèces.

Bien avant de comprendre son origine, la ciguatera fit l'objet de nombreuses théories. J. Garnier relata dans son journal "Voyage autour du monde" (p179, 1871) que les habitants des îles attribuaient cette intoxication à des esprits démoniaques dissimulés dans le corps des poissons pour les tourmenter. Les guérisseurs employaient des méthodes ésotériques pour chasser le mal et préparaient aussi diverses décoctions à base de plantes médicinales locales

(Banner, 1963). Les premières hypothèses concernant l'origine de cette maladie furent énumérées par Halstead en 1953. Certains pensèrent que l'eau était contaminée par du cuivre provenant de bateaux naufragés ou de matériaux immergés durant la seconde guerre mondiale. D'autres suspectèrent le mancenillier, "Hippomane mancinella", petit arbre du bord des plages dont les baies sont très toxiques, d'en être l'origine. Il ne fallut pas longtemps pour déconsidérer ces suppositions, faute de preuves scientifiques. Des équipes de recherche émirent l'hypothèse d'une origine bactérienne mais tous les travaux menés en ce sens échouèrent (Mandry, 1928 ; Yasukawa, 1950 ; Arcisz, 1950). Les théories restantes mentionnaient la possibilité d'être intoxiqué via la présence d'invertébrés marins toxiques (dinoflagellés, méduses, coraux, mollusques, crabes), de macroalgues toxiques ou la présence de déchets autres que le cuivre contaminant l'eau (nitrocellulose). Ce n'est qu'en 1958 que la véritable origine de cette intoxication fut abordée. Randall compila l'ensemble des travaux menés jusqu'alors et suggéra qu'un organisme benthique produirait la toxine et qu'elle transiterait le long de la chaîne alimentaire marine. Halfriech et Banner (1963) repartirent de ces postulats et les confirmèrent. Un an plus tard, Randall émit l'hypothèse que la toxine serait introduite dans la chaîne alimentaire par le biais des poissons herbivores consommant des microalgues toxiques, qui seraient à leur tour mangés par de plus gros prédateurs (Randall, 1959). Au-delà de Gambierdiscus et des poissons, de récentes études indiquent que les voies de transmission de la ciguatéra dans la chaîne alimentaire marine peuvent aussi faire intervenir les cyanobactéries ainsi que le bénitier (Laurent et al., 2008). Cette découverte ne semble pas infondée puisqu'en 1974, l'enquête menée par Bagnis dans les îles polynésiennes démontra que 4% des intoxications étaient dues au bénitier. Une étude épidémiologique menée dans les îles australes a démontré l'intoxication de l'homme par le bénitier.

L'isolation et l'appellation "ciguatoxines" furent établies (Scheuer et al., 1967). Par la suite, la structure des ciguatoxines et leurs précurseurs dans *Gambierdiscus toxicus* furent identifiés (Murata et al., 1989).

D. Structure et propriétés physico-chimiques des CTXs

En 1967, les toxines responsables de la ciguatera furent isolées à partir de chairs de murène (Scheuer et al., 1967). Les scientifiques se sont accordés à dire que la variabilité des signes cliniques et des symptômes rapportés reflétaient l'implication de plusieurs toxines (Kodama and Hokama, 1989). Des études chromatographiques sur la fraction liposoluble toxique révélèrent la présence de nombreuses autres toxines (Chungue et al., 1977; Legrand et al., 1990; Vernoux and Abbad el Andaloussi, 1986). Il est clairement établi que les CTXs sont des composés polyéthers liposolubles constitués de 13 (P-CTXs) ou 14 cycles (C-CTXs) condensés par des liaisons éther dans un ensemble rigide, formant une structure en forme d'échelle (Lewis et al., 1991a, 1998a; Murata et al., 1989). Avec un poids moléculaire d'environ 1110 g.mol⁻¹ et une formule brute C₆₀H₈₆NO₁₉, ces molécules sont inodores, thermostables et ne sont pas dénaturées après cuisson, ni altérées en condition acide ou basique. Des travaux confirmèrent par HPLC, spectrométrie de masse et test souris que les CTX-1, CTX-2, CTX-3 sont majoritaires dans les poissons ciguatérigènes du Pacifique (Lewis et al., 1991b). A partir d'échantillons musculaires de poissons ciguatériques, il semblerait qu'il y ait 2 fois moins de P-CTX-2 et dix fois moins de P-CTX-3 par rapport à la P-CTX-1. En ce qui concerne leur puissance respective, en comparaison à la P-CTX-1, la P-CTX-2 est dix fois moins puissantes, et la P-CTX-3 est 4 fois moins puissante. Deux ciguatoxines des Caraïbes ont été identifiées: C-CTX-1 et C-CTX-2 et beaucoup moins puissantes que celles du Pacifique car moins polaires (Lewis et al., 1998a; Vernoux and Lewis, 1997). 4 CTXs de l'océan Indien, I-CTXs, ont été identifiées : I-CTX-1 et I-CTX-2 étant majoritaires, et I-CTX-3 et I-CTX-4 minoritaires (Hamilton et al., 2002). A l'heure actuelle, 29 isoformes de P-CTXs sont connues et se différencient entre elles par de légères différences structurelles (Yasumoto, 2001). Basées sur leurs structures chimiques, les gambiertoxines produites par Gambierdiscus toxicus sont les précurseurs des ciguatoxines. Il est suggéré que les GbTXs, appelées aussi P-CTX-4A et P-CTX-4B, subissent diverses oxydations via les cytochromes du foie des poissons dans la chaine alimentaire. Peu d'études ont été menées sur les gambiertoxines du fait de la

difficulté à en obtenir des quantités suffisantes purifiées. Comparé à la P-CTX-1, la P-CTX-4B est 50 fois moins puissante à induire des potentiels d'action répétés et 4 fois plus puissantes à bloquer les canaux K⁺ (Schlumberger et al., 2010). La P-CTX-2 compte parmi les analogues les moins oxygénés. Elle se différencie de la P-CTX-1 par une fonction hydroxyle (-OH) sur le carbone 54 et un oxygène en moins. Elle est issue d'un précurseur différent, la P-CTX-4A, alors que la P-CTX-1 se forme à partir de la P-CTX-4B. Cependant, la dose létale de ces 2 isoformes de gambiertoxines sur souris est comparable et les symptômes déclenchés identiques (Satake et al., 1996).

La partie suivante est une revue de la littérature qui traite des signes cliniques neurologiques et de la physiopathologie associée de la ciguatera.

II.2. Revue de la littérature "Neurological disturbances in ciguatera fish poisoning: clinical features and pathophysiological basis" (à soumettre)

L'Herondelle K, Talagas M, Mignen O, Misery L, Le Garrec R

A. ABSTRACT

Ciguatera fish poisoning, the most prevalent seafood poisoning worldwide, is caused by the consumption of fish from tropical and subtropical seas contaminated with potent neurotoxins called ciguatoxins. Those fishes from usually edible species are undistinguishable from safe specimens either organoleptically or through an available effective detection assay. Ciguatera is a complexe clinical syndrome where neurological signs predominate both in the acute phase of the intoxication than in cases with persistant or reoccuring disturbances. Thus, their recognition hold a particular importance in diagnosis establishment which is clinically based and can be a challenge for physicians unfamiliar for ciguatera, especially in delayed cases. To date, no specific treatment exists. Physiopathologically, while their primary target is well identified, little is known about molecular events and mediators involved downstream, whose identification would allow to develop targeted treatments. This review presents the clinical picture of ciguatera focusing on neurological disturbances, and gathers electrophysiological, neuroexperimental, histological and neurophysiological findings related to ciguatoxins' pathophysiology.

B. INTRODUCTION

a) Ciguatera: an underreported and misdiagnosed disease lacking effective prevention and treatment

Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is the most prevalent seafood poisoning worldwide, affecting mainly tropical and subtropical countries but also increasingly more temperate regions. Whereas this disease has existed for centuries, three major challenges remain: both its prevention, diagnosis and treatment are poorly managed. CFP is caused by the consumption of reef fish belonging to usually edible species but which have been contaminated with ciguatoxins (CTXs). These toxins originating from benthic microalgae of the genus Gambierdiscus sp (Chinain et al., 1999; Litaker et al., 2010) which naturally populate coral reefs. Under the influence of poorly understood factors, these microalgae can proliferate and produce precursors of the congeners that intoxicate humans. Among these microalgal CTXs, called gambiertoxins (GTXs), one can cite P-CTX4-A (Satake et al., 1997), P-CTX4-B (Murata et al., 1990) and CTX3C (Satake et al., 1993) which have been isolated from Pacific strains of *Gambierdiscus toxicus*. Toxin-producing microalgae being ingested by herbivorous grazing fish (of e.g. Scaridae or Acanthuridae families which are especially incriminated in French Polynesia) that in turn are eaten by carnivorous fish (among which Muranidae, Serranidae, Lutjanidae and Carangidae), GTXs are not only transfered and accumulated within marine food chain but also biotransformed to become more polar and more potent CTXs. For review on origin and transfer of CTXs, see (Lewis and Holmes, 1993b). In the Pacific Ocean, the ultimate product of these toxifying biotransformations is P-CTX-1 (Figure 10), the most polar and most toxic for mammals of all CTXs known to date. Isolated from carnivorous fish from the Pacific Ocean (Lewis et al., 1991b), it has about 10-fold higher potency in mice (Lewis and Holmes, 1993b) and 50-fold on the membrane potential of frog myelinated nerve fibers (Benoit, 1994) than the gambiertoxin P-CTX-4B whose it is derivated.



Figure 1: Structures of the major ciguatoxins isolated of carnivorous fishes of Pacific Ocean (P-CTX-1) and Caribbean (C-CTX-1). I-CTX-1 was not illustrated. Picture from (Lewis et al., 1991; Vernoux and Lewis, 1997)

The distribution of ciguateric areas can be sporadic (temporally variable), sometimes very localized and until now is unpredictable. One of the best ways to prevent CFP outbreaks would be to map ciguateric areas in real time, and so to inform local populations and fishermans about their risk or even to be able to restrict fishing in these zones. This is almost what is done since recently by the "Ciguatera Fish Poisoning observatory" which maps the reported cases and known toxic areas in French Polynesia (available on ciguatera-online.com) and plans to extend it to more regions. Meanwhile, prevention of ciguatera cases could be reached by detecting ciguateric fishes prior to consumption, which remains a challenge because no suitable and reliable detection method has been developed yet. Indeed, ciguateric fish are indistinguishable from uncontaminated with regard to taste, smell, appearence. CTXs are thermo- and

relatively acid and basic stable toxins which are unaffected by cooking, salting or congealing (Lehane and Lewis, 2000). Currently, there are no effective routine assays which can detect CTXs in fish prior to consumption. In this aim, enzyme-linked immunoassay (ELISA) is attractive for its accuracy, sensitivity, routine and portable use. Till now, all attempts for nearly fourty years to develop such an assay for CTXs (Hokama, 1985, 1990, Hokama et al., 1984, 1998; Park, 1994) were not conclusive in regard to cross-reactivity with other toxins, giving false positive and false negative results (Hokama et al., 1989, 1992). Recent promising immunoassay were established (Empey Campora et al., 2008; Pauillac et al., 2000; Tsumuraya et al., 2014), and particularly, an antibody labeled gold nanoparticles probe immunoassay 38-fold more sensitive than HPLC-MS/MS standard method for P-CTX-1 detection (Zhang et al., 2015). Besides ciguateric fish detection assays, laboratory methods such as HPLC-MS and -MS/MS have proved their significant usefulness to detect CTXs below ppb levels (Hamilton et al., 2002b, 2002c; Lewis and Jones, 1997; Lewis et al., 1998b, 1999, Pottier et al., 2002, 2003). Those methods are also efficient ways to purify CTXs which are not commercially available and then obtain chemical standards and pure toxins for biological studies. Furthermore, HPLC-MS/MS standard method was updated, increasing P-CTX-1 extraction efficiency by 37% (Meyer et al., 2015).

CFP is a common disease in the Asia Pacific region (Bagnis et al., 1979; Oshiro et al., 2010; Wong et al., 2008), Carribean area (Pottier et al., 2001) and Indian Ocean islands (Quod and Turquet, 1996a) from where several CTXs have been isolated from fish P-CTXs, (Lewis et al., 1991b; Murata et al., 1990), C-CTXs (Lewis and Jones, 1997; Pottier et al., 2002, 2003; Vernoux and Lewis, 1997) and I-CTXs (Hamilton et al., 2002b, 2002c), respectively. Its global incidence is estimated to be 50 000-500 000 cases per year (Fleming et al., 1998; Lehane and Lewis, 2000; Quod and Turquet, 1996), with the highest incidences reported in Pacific Islands fifty years ago in Tahiti with 800 cases for 10.000 inhabitants/year (Bagnis, 1968) and recently in 1994-2010, in Cook Islands from 204 to 1058 for 10.000 inhabitants/year (Rongo and van Woesik, 2011). Additionally, it has been reported a 60% higher annual incidence from Pacific Islands of 194 cases/100.000 people (from 1973-1983) comparing 194/100.000

people (from 1998-2008) (Skinner et al., 2011). The large range of incidence should take into account the many underreported cases in endemic regions of CFP but also misdiagnosed cases, especially in non-endemic areas. The incidence of ciguatera in non-endemic areas is increasing with growing tourism, with an incidence for travelers estimated by U.S. Centers for Disease Control and Prevention to be 3% (Ansdell, 2016), and fish imports (Glaizal et al., 2011; de Haro et al., 2003; Mattei et al., 2014a; Otero et al., 2010). Moreover, global warming could contribute to extend concerned areas, since ciguateric episodes and/or Gambierdiscus presence/blooms have been reported in European costlines and mediterranean sea (Bentur and Spanier, 2007; Gingold, 2014; Otero et al., 2010). Misdiagnosis is due to the strinking variability in CFP symptomatology with a clinical picture well recognized in endemic areas but much less in non-endemic regions. This is all the more true as some symptoms may persist or re-occur months or years after the ciguateric meal and the acute phase of the symptomatology, thus making the link difficult.

This review first describes clinical features, on which CFP diagnosis is largely based, focusing on neurological symptoms. The variety of CFP symptoms, and in some cases their persistence, constitute patient suffering and challenge in diagnosis for clinicians. Accurate knowledge of "acute" and "chronic" clinical signs whose both are mainly neurological, is necessary for CFP to be better recognized, and thus for intoxicated patients to receive appropriate medical support, but also to better assess global incidence of CFP. The second part of this review reports neuronal targets and effects, neurophysiological and histological studies which have contributed to the knowledge related to CFP pathophysiology at molecular, neurocellular and tissular levels, on the basis of which specific treatments could be developed.

b) Clinical features of ciguatera

Clinically, CFP is a complexe syndrome with a polymorphous symptomatology which furthermore can present an unique chronology. Indeed, in addition to disturbances which immediatly follow the ingestion of the toxic fish, it is not rare that some of them persist, or re-occur in some circonstances, for weeks, months or even years.

i) Clinical findings of acute CFP: a variety of neurological signs with pathognomic sensory disturbances

Acute phase of ciguatera intoxication include a wide spectrum of symptoms which have been well documented, especially in Pacific, and in a lesser extent, in Caribbean regions. They comprise digestive, neurological, cardiac and general troubles (see Table 1) which can occur in multiple combinaisons (Allsop et al., 1986; Bagnis, 1968; Bagnis et al., 1979; Kodama and Hokama, 1989; Morris J et al., 1982; Pottier et al., 2001; Quod and Turquet, 1996; Russell, 1975).

Digestive	Cardiovascular	Neurological			Others or general	References
		Sensory	Motor	Others	<u>Cutaneous</u> :	(Dec.) (1950)
Nausea	Hypotension	Neurocutaneous:	Muscular	Mydriasis	Sweating	(Bagnis, 1968) (Russell, 1975)
Vomiting Abdominal cramps Diarrhea	Bradycardia (Tachycardia)	Perioral paresthesia Distal paresthesia* Cold dysesthesia* Pruritus* Superficial hyperesthesia Myalgia Arthralgia Dental pain Painful miction Metallic taste	weakness Ataxia Nystagmus	Headaches Nightmares	Skin rash Chilliness A sthenia/fatigue* Erectile dysfunction	(Halstead, 1978) (Bagnis et al., 1979) (Morris et al., 1982) (Allsop et al., 1986) (Bagnis and Legrand, 1987) (Kodama and Hokama, 1989) (Quod and Turquet, 1996 (Pottier et al., 2001)

 Table 1: Clinical symptoms during CFP classified by systems according to functionnal and physical signs, regardless to their physiopathological origin. Most common signs are figured in bold; *: persistent or relapsing symptoms.

The first symptoms appear within minutes to 24 hours following the toxic fish meal but arise between 1 to 6 hours in 90 % of cases (Ruff and Lewis, 1994). Onset symptoms are typically circumoral and distal paresthesia (see details below) and/or a gastroenteritis syndrom, both of them developing early. Gastrointestinal disorders include nausea, vomiting, abdominal cramps and diarrhea (watery stools). Cardiovascular disorders, not constant, arise mostly in severe cases of CFP. When present, they occur in the first 24 hours and consist in hypotension (decreased blood pressure) and bradycardia, or some rare times tachychardia. In severe cases, vital parameters are monitored and supported (Achaibar et al., 2007; Juranovic and Park, 1991; Ting and Brown, 2001). Distal cyanosis are also rarely reported (Russell, 1975). Neurological symptoms begin with early paresthesia on the face and especially around the mouth, then affect rather extremities, together with myalgia, especially the muscles of the legs, which appear mostly within the first 2 days, as well as painful sensations on contact with cold. Pruritus which is a very frequent symptom, begin 1-2 days after the ciguateric meal, sometimes associated to a

skin rash. Among neurologic disturbances, sensory symptoms are predominant, especially paresthesia, cold dysesthesia and itch which are the pathognomic neurological symptoms of CFP (see below dedicated paragraphs). Profuse sweating or hypersalivation are also frequently described as well as headaches, muscle weakness and asthenia. Some others sensory disorders include metallic taste, superficial hyperesthesia with sensation of burning and electric discharges, arthralgia mainly affecting the large joints (knees, ankles, shoulders and elbows), dental pain, painful miction, mydriasis, chills or chilliness, which are reported with lesser frequencies. Isolated cases of mechanical hypersensitivity have been described. Among this variety of symptoms, neurologic and especially sensory disorders predominate in all cases.

In severe cases of ciguatera, in addition to hypotension and bradycardia, vertigo, visual disturbances, motor incoordination with some cases of inability to stand or walk/(unspecified or cerebellar) ataxia, or paresis are described. Some cases of coma and death, although rare, have been described (Bagnis, 1970; Defusco et al., 1993; Gatti et al., 2008; Oh et al., 2012). The CFP fatality has been estimated to 0.1-1 %, often associated to consumption of ciguateric fish viscera, and especially the liver, which contains higher levels of CTXs (Bagnis, 1968; Bagnis et al., 1979).

In common cases, 3 particular signs are characteristic and, associated with the knowledge of a fish meal followed by a gastroenteritis syndrome, allow to recognize ciguatera poisoning: paresthesia, cold dysesthesia and itch.

Paresthesiae

The first signs to appear, if not digestive troubles, are circumoral paresthesiae described as unpleasant tingling, prickling and prominent numbness around the lips as well as nose, tongue and throat. Intense paresthesia affect also the limb, especially their extremities but also arms and legs. Those latter do not develop as early as the former but belong to the signs which may persist for from one to several weeks after the incriminated meal.

. Cold dysesthesia

With a high frequency regardless the geographic area, and especially in the South Pacific (88 % of 3009 cases in French Polynesia; (Bagnis et al., 1979), this is one of the pathognomic signs of CFP. Cold dysesthesia are described as painful tingling, burning, smarting, "electric shock" or "dry ice" sensations on skin on contact with cold or cool water, among other on the palms or soles when hands or feet are immersed, or handle cold objects. Mucous membranes such as oesophagus are also affected with fresh drinks (Bagnis, 1968; Cameron and Capra, 1993). Although frequently reported as "paradoxical sensory disturbance" or "reversal of temperature perception", gross temperature perception has been found unaltered in a study dedied to this particular symptom (Cameron and Capra, 1993). Furthermore, the cold is not only perceived as hot, but especially intensely painful. The notion of cold is also to be specified, as in 5 patients, the threshold of noxisous cold was triggered from 24 to 26°C.

ltch

That CFP is called "the itch" (la gratte) in the South Pacific but also "la gratelle" in French West Indies (Vernoux, 1988) suggests that itch is a common symptom. Pruritus appears in 24-48 hours, often first localized to palms of the hands and soles of the feet which can peel, then it became generalized (Russell, 1975). Itching could lead to scratching lesions that can become infected. This symptom is particularly persistent or relapsing for long times, reoccuring especially after alcohol consumption.

ii) Persistent and relapsing symptoms for months or years

Although human disturbances induced by single exposure to CTXs usually resolve within days or weeks after exposition, one of the most distressing and troublesome prevalent features in CFP is undeniably the persistence or relapse of sensory troubles, especially itch, distal paresthesia, cold dysesthesia and arthralgia associated to fatigue, for weeks, months or sometimes even beyond (Bagnis et al., 1979). Frequency of cases of so called chronic ciguatera has been estimated to be 5 % (Pearn, 2001). These symtoms persist intermittently without any particular triggering factors and/or recur after consumption of some drinks or foods, mostly alcohol but also peanuts, non-ciguateric seafood, pork or poultry (Lewis, 2001; Vucic and Kiernan, 2008). Occuring far into the time of the incriminated meal, they make the diagnosis difficult, particularly for physicians unfamiliar with CFP.

C. PATHOPHYSIOLOGICAL BASIS OF CFP DISTURBANCES

a) Neuronal targets and neurocellular effects of CTXs related to CFP symptoms

i) Voltage-gated sodium channels (Na_v) as main primary targets resulting in membrane hyperexcitability

After being for a time mistakenly regarded as anticholinesterases (Rayner et al., 1968), CTXs have long been identified as sodium flux-increasing toxins (Setliff et al., 1971). CTXs are now well known to bind with high affinity and specificity the receptor-site 5 (localized to the pore-lining segments S6 of domain I and S5 of domain IV) of the alpha subunit of Na_V (Lombet et al., 1987; Dechraoui et al., 1999; Cestèle and Catterall, 2000) which are highly expressed in excitable cells. Electrophysiological studies have demonstrated that CTXs, at low nanomolar concentrations, modify biophysical properties of both tetrodoxin-sensitive (TTX-s) and tetrodotoxin-resistant (TTX-r) Na_V. Alterations of TTX-s Na_V properties by CTXs comprise a shift of the activation threshold voltage to more negative values together with an impairement of their

inactivation process (Benoit et al., 1996; Hidalgo et al., 2002; Hogg et al., 1998; Strachan et al., 1999; Vetter et al., 2012). Althought few studies have been performed on TTX-r expressing preparations as sensory neurons, those show that TTX-r Na_v are also targeted by CTXs. Modifications in TTX-r channel biophysical properties by CTXs include an increase in the recovery rate from inactivation (Strachan et al., 1999) and a shift of the activation voltage-dependence to more negative values (Vetter et al., 2012).

As a consequence, CTXs allow opening of the channel at resting potential membrane and provoke a persistent Na⁺ conductance and a membrane depolarization frequently followed by spontaneous and repetitive firing (Benoit et al., 1996; Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987). It is worth noting that CTX binds both to resting and inactivated VGCs with similar affinity and that during action potentials, affinity of CTXs for Na_v is increased, what has been proposed to be due to a channel conformation change (Lewis and Endean, 1986). CTX-induced depolarization of numerous excitable cells through activation of their Na_v has been shown, among which almost all types of peripheral nerves and muscles cell types (see Table 2), except smooth muscle cells, since only indirect effects of CTXs through VGSC activation of innervation could be shown in vas deferens and ileum (Lewis and Wong Hoy, 1993; Ohizumi et al., 1981).

Binding affinities of several CTXs for VGSC site 5 have been compared to their mouse i.p. LD_{50} and EC_{50} for Na⁺-dependant neurocytotoxicity. Relative potencies of congeners on the 3 models were not exactly correlated, suggesting that cellular and *in vivo* toxicities of CTXs could involve other mechanisms than their binding to Na_v (Dechraoui et al., 1999).

Indeed, in addition to their activation of Na_V channels, CTXs and especially gambiertoxins (GTXs), have been shown to inhibit voltage-gated potassium channels (K_v), thus further increasing membrane excitability. CTXs isolated from ciguateric fish were found to inhibit on K⁺ efflux, C-CTX-1 and P-CTX-1 producing thus an increase action potential duration in frog myelinated nerve fiber and DRG neurons, respectively (Mattei et al., 1999a ; Birinyi-Strachan et al., 2005a). In rat myotubes, P-CTX-1 partially blocked K⁺ current in a dose-dependent manner (Hidalgo et al., 2002).

Gambiertoxins and related CTXs produced by *Gambierdiscus* microalgae exhibit actions on voltage-gated ion channels which differ from that of congeners isolated from fish. P-CTX-4B, which was 50-fold less potent than its metabolite in fish P-CTX-1 to induce spontaneous action potentials in myelinated nerve fibers (Benoit, 1994) was shown to block K_v 4-fold more effectively than P-CTX-1 and to block K_v 2-fold more effectively than Na_v channels (Schlumberger et al., 2010). In mouse taste cells, high concentrations of gambierol failed to activate Na_v channels whereas low nanomolar concentrations markedly inhibited K_v (Cuypers et al., 2008; Ghiaroni et al., 2005). In contrast, in the same model, CTX3C inhibits Na_v channels but was without effects on K_v (Ghiaroni et al., 2006).

ii) An *in vitro* cell swelling related to Schwann cell edema in human

Nanomolar concentrations of P-CTX-1, C-CTX-1, and CTX-3C were found to induce an about 2-fold swelling of the nodes of Ranvier swelling of frog myelinated nerve fibers. Events proposed to explain this swelling is an osmotically-drived water entry subsequent to the increased intracellular concentration of Na⁺ due to continuous Na⁺ influx through persistently activated Nav channels. Indeed, nodal swelling of myelinated nerve fibers was prevented by tetrodotoxin and completely prevented or reversed by pre-treatment or addition of hyperosmolar external solutions, of D-mannitol (Benoit et al., 1996; Mattei et al., 1999b). Recently, this nodal swelling was found to involve both sodium influx and potassium efflux (Mattei et al., 2014b). Interestingly, this swelling occured also on sensory neurons and was also reversed by hyperosmolar D-mannitol extracellular solutions (Birinyi-Strachan et al., 2005b). These findings are consitent with edema of the adaxonal Schwann cell cytoplasm observed in a biopsied sural nerve from a ciguatera severe case (Allsop et al., 1986). Motor nerve terminals of frog neuromuscular junctions exposed to CTXs were also found to be swollen as well as depleted in acetylcholine synaptic vesicles (Mattei et al., 1997; Molgó et al., 1991).

In mice experimentally intoxicated with a single dose of CTX, a swelling of cardiac myocytes was present, which appeared to be consecutive of direct effect of CTX (activation of myocardial Nav channels) on these cells. Synapses

in the smooth muscle layers of vas deferens were also swollen. Finally, small intestine was also affected with amyelinated nerves of ileal Auerbach's plexus markedly swollen as well as depleted in synaptic vesicles (Terao et al., 1991). The same authors performed in another study repeated exposure of CTX in mice for 2 weeks, after what cardiac myocytes were prominently swollen. It should be noticed that a swelling of the endothelial lining cells of heart capillaries was also present (Terao et al., 1992). Whether this latter was a direct effect of CTXs on non-excitable cells or consecutive to those occuring in neighboring excitable cells remains to be investigated. However, cell swelling induced by CTXs in non-excitable cells was otherwise reported. Indeed, P-CTX-1 and C-CTX-1 showed the ability to induce frog erythrocytes swelling. Surprisingly, this swelling was not sensitive to TTX (Boydron et al., 2001) but involved nitric oxide-cGMP pathway (Sauviat et al., 2006). Since this pathway has been shown to be involved in the relaxation of corpus cavernosum induced by other Nav channels activators (Fernandes de Oliveira et al., 2003), the question of its involvement in CTX-induced priapism in mice or human erectile disorders in CFP may be posed.

iii) Neuromediator release linked to autonomic dysfunctions and neurocutaneous disturbances

In several nerve models, CTXs have been shown to induce the release of neuromediators (Table 2). It is mainly the release of neurotransmitters from the autonomic nervous system that has been studied so far. Their release appears as of great importance in most of the CFP non-sensory disorders.

Neurotransmitter release elicited by CTXs has been early suggested by Legrand et al. (Legrand et al., 1982) whose *in vivo* study demonstrated the cholinergic origin of bradycardia and hypotension induced by CTXs. Evidence for acetylcholine release induced by P-CTX-1 has been brought in frog neuromuscular preparations with repetitive action potentials triggered by repetitive endplate potentials (e.p.ps), i.e. repetitive action potentials of skeletal muscle fibers caused by repetitive neurotransmitter release from motor nerve terminals, stimulated by CTX (Molgó et al., 1990a). Carribean C-CTX-1 caused Ca²⁺-dependent acetylcholine release from the same model (Mattei et al., 2010).

Diarrhea and common cardiovascular symptoms (i.e. bradycardia and hypotension) of CFP are likely due to involve the VGSC activation of cholinergic innervation of intestinal mucosa and heart, respectively, and subsequent acetylcholine release. Indeed in mice, CTX-induced diarrhea could be prevented by pretreatment of intestinal mucosa by atropine (Terao et al., 1991). Similarly, atropine prevented bradycardia and hypotension in experimentally intoxicated cats, (Legrand et al., 1982). In frog heart, acetylcholine release from cholinergic innervation of atria was found to be responsible for modulation of the action potential duration and of mechanical activity of cardiac tissue (Sauviat et al., 2002).

Besides, evidence of release of catecholamines induced by CTXs has been brought by several *in vitro* studies. In rat brain synaptosomes, P-CTX-1 increased rate of dopamine release (Bidard et al., 1984). Furthermore, in guinea pigs or human isolated heart tissues, the early phase of the inotropic action of P-CTX-1 was shown to be due to noradrenaline released from cardiac sympathetic innervation, whereas the later one results from a direct action (i.e.

activation of myocardial Nav channels) of P-CTX-1 (Lewis and Endean, 1986; Lewis and Wong Hoy, 1993; Lewis et al., 1992). At high CTX doses, negative inotropic and arrythmic effects were elicited through also a noradrenaline release from autonomic nerves (Lewis, 1988). The same indirect mechanisms is involved in the contraction of smooth muscle of vas deferens (Ohizumi et al., 1981) and in maintained depolarisation obtained in rat tail artery. Finally, CTXs was shown to cause catecholamine release from chromaffin cells (Mattei et al., 2008; Nguyen-Huu et al., 2010).

In addition to induce release of neurotransmitter from the autonomic nervous system, CTXs were recently proven to elicit a release from sensory neurons of neuropeptides calcitonin-gene related peptide (CGRP) (Vetter et al., 2012a) and substance P (Le Garrec et al., 2016). Interestingly, peptidergic neurons are mostly C fibers but also a small subpopulation of A fibers, fiber types supposed to be mainly targeted by CTXs, since main disturbances in CFP are sensory. Those two neuropeptides have been involed in pain and itch (McCoy et al., 2012; Metz et al., 2011a; Schaible, 2006) and play a major role in neurogenic inflammation (Rossi and Johansson, 1997). These results suggest thus that CTXs are able to induce cutaneous neurogenic inflammation with relevant consequences to explain sensory disturbances observed during CFP: released SP and CGRP interact with their cognate receptors on mastocytes, eliciting their degranulation with the release of histamine and tryptase (Roosterman et al., 2006). In turn, these mediators can activate their receptors (namely H1R and PAR2) expressed on sensory nerve fibers, and thus elicit pruritus, one of the main symptoms that characterize CFP.

Exocytosis of neurotransmitter or neuropeptide vesicles is known to require and to be initiated by an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). There are evidences that CTXs disturb intracellular calcium and we discuss it in the next section.

iv) Increase in intracellular calcium concentration by multiple mechanisms

Depending to models, CTXs have been shown to increase [Ca²⁺]_i by several mechanisms (reported in Table 2) which include calcium influx through reversed NCX mode but also mobilization of calcium from intracellular stores. Na⁺/Ca²⁺ exchange normally functions to extrude Ca²⁺, contributing to cell calcium homeostasis. In cholinergic synaptosomes from Torpedo exposed to CTXs, as a consequence of the induced massive Na⁺ entry in cells, the exchanger has been found to reverse its functioning mode in the aim to extrude excessive sodium (Gaudry-Talarmain et al., 1996; Molgó et al., 1993a).

In addition to NCX-mediated calcium entry, a $[Ca^{2+}]_i$ increase involving calcium influx through activated voltage-gated calcium channels (Ca_v) could be a consequence of depolarisation, if sufficient, induced by CTXs. Although this mechanism has not been demonstrated for CTXs isolated from ciguateric fish and has been discarded for some of their effects (Molgó et al., 1993a), two Ca_v channel blockers were used to study mechanisms involved in calcium responses elicited by gambierol in neuroblastoma cells (Louzao et al., 2006). The inhibitory effect of nitrendipine, a dihydropyridine blocking both L- and N-type calcium currents, and the absence of effect of nifedipine which selectively blocks L-type Ca_v channels, suggest that N-type Ca_v channels could be involved in gambierol-induced calcium increase.

Another CTX-induced mechanism leading to increase in $[Ca^{2+}]_i$ has been described, since no external was needed for CTX to induce repetitive action potentials of frog skeletal muscle fibers through repetitive acetylcholine release from motor nerve terminals (Molgó et al., 1990). This mechanism consists in the IP3-mediated Ca²⁺ mobilization from intracellular stores. Indeed, in NG108-15 cells and bovine chromaffin cells, Na_v-dependent sustained $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by CTX was mediated by internal store depletion (Mattei et al., 2008; Molgó et al., 1993b). Alike, in rat myotubes, P-CTX-1 has been reported to cause a transient increase of IP3 and Ca²⁺ release from store which were blocked by TTX (Hidalgo et al., 2002; Liberona et al., 2008)

Although CTXs has been shown to target both nerve and muscular Nav channels with a variety of cellular consequences, clinical signs of CFP, which are mainly neurological and especially peripheral, indicate that CTXs target mainly peripheral nerves. This has been experimentally confirmed, since in guinea pig atria, effects of CTXs were found to be 10- to 100-fold more potent to stimulate heart adrenergic nerves than myocardial cells (Lewis and Wong Hoy, 1993). Clinical signs designate especially sensory nerves as main targets of CTXs. Indeed, clinical disturbances are more frequently and persistently of sensory type, with autonomic disturbances such diarrhea and cardiovascular troubles relieving rapidly and/or appearing only in the most severe cases (i.e after exposure of high doses of CTXs), respectively.

Study type	Effects of CTXs	Model	References
Electrophysiological		Rat brain synaptosomes	(Bidard et al., 1984)
		Differentiated neuroblastoma cells	(Bidard et al., 1984; Molgo et al., 1993a)
		Frog myelinated nerve fibers	(Benoit et al., 1986; Benoit et al., 1994; Benoit et al., 1996)
		Sympathetic ganglia and ner∨e terminals	(Hamblin et al., 1995; Brock et al., 1995)
	VGSC-mediated membrane depolarization eventually followed by spontaneous action potentials or firing	Rat parasympathetic neurons	(Hogg et al., 1998; Hogg et al., 2002)
		Torpedo cholinergic synaptosomes	(Molgo et al., 1993b)
		Frog motor nerve terminals of neuromuscular junctions	(Molgo et al., 1990)
		Rat DRG neurons	(Vetter et al., 2012)
		Guinea pig and frog atrial heart muscle cells	(Lewis and Endean, 1986; Lewis and Wong Hoy, 1993)
		Rat skeletal myotubes	(Hidalgo et al., 2002)
		Ran∨ier nodes of frog myelinated ner∨e fibers	(Benoit et al., 1996 ; Mattei et al. 1999b; Birinyi-Strachan et al., 2005b; Mattei et al., 2014b)
	Osmotically-induced cell swelling	Frog motor nerve terminals	(Molgo et al., 1991 ; Mattei et al., 1997)
		Frog erythrocytes	(Boydron et al., 2001; Sauviat et al., 2006)
		Human adaxonal Schwann cell cytoplasm	(Allsop et al., 1986)
		Amyelinated ner∨es of Auerbach's plexus	(Terao et al., 1991)
		Endothelial lining cells of heart capillaries	(Terao et al., 1992)
		Acetylcholine release from parasympathetic innervation of:	
		• intestinal mucosa or ilea	(Teraoet al., 1991; Lewis and Wong Hoy, 1993)
		motor nerve terminals of neuromuscular junctions of skeletal muscle	(Molgo et al., 1990; Mattei et al., 2010)
		• heart	(Legrand et al., 1982; Sauviat et al., 2002)
Other neurocellular		Dopamine and GABA release from rat brain synaptosomes	(Bidard et al., 1984)
	Release of neuromediators	Noradrenaline release from sympathetic innervation of guineapig:	
		• heart	(Lewis, 1988, Lewis and Endean, 1986; Lewis et al., 1992; Lewis and Wong Hoy, 1993)
		• ileum	(Lewis and Endean, 1984)
		• vas deferens	(Ohizumi et al., 1981; Lewis and Endean, 1984)
		smooth muscle of rat tail artery	(Brock et al., 1997)
		Catecholamines from bovine chromaffin cells	(Mattei et al., 2008; Nguyen-Huu et al., 2010)
		Substance P and CGRP release from sensory neurons	(Le Garrec et al., 2016; Vetter et al., 2012)
	Na _v -dependent [Ca ²⁺] _i increase through reverse mode of NCX	Cholinergic synaptosomes from Torpedo	(Molgo et al;, 1993b; Gaudry-Talarmain et al., 1996)
	IP3-mediated Ca ²⁺ mobilization from	Neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cell line	(Molgo et al., 1993)
	intracellular stores	Rat skeletal myotubes	(Hidalgo et al., 2002)

 Table 2: Changes induced by CTXs in nerve or muscle preparations/cells

D. NEUROPHYSIOLOGICAL AND NERVE HISTOLOGICAL STUDIES

Very few neurophysiological and histological studies from CFP cases have been reported. Some of them are isolated cases that most likely reflect some of the severe forms of CFP and more studies performed on representative cases would be useful. Rare some studies have been carried out from experimentally intoxicated animals.

In rats intoxicated with CTXs, nerve conduction studies were performed on the ventral nerve of the tail. On both mixed and motor nerves, CTXs induced a slowing of conduction velocities and delayed F wave responses, decreased action potential amplitudes, prolonged absolute refractory period, and increased both magnitude and duration of the supernormal period (Cameron et al., 1991a). Interestingly, the same authors performed also a human neurophysiological study on 15 cases of CFP which, based on clinical symptoms, appeared to be moderate with acute gastrointestinal and sensory disturbances, but also motor disorders in extremities which are not representative to usual cases of CFP. Sensory (sural) and motor (peroneal) nerves were assesed. Similarly to anomalies recorded in rats, conduction velocites were slowed for both nerve types whereas only significantly for the sensory nerve. Action potential amplitude was increased for motor nerve but not modified for sensory nerve. Absolute and relative refractory periods were markedly prolonged for both nerves (Cameron et al., 1991b).

Allsop et al. (1986) reported 3 severe CFP cases with, in addition to marked sensory characteristic CFP symptoms, central disturbances in all. Neurophysiological studies performed on a peripheral mixte nerve (median nerve) revealed in all cases slowed motor conduction velocities. More detailled study was only performed on one case and showed a slowing in also sensory conduction velocity, decreased sensory amplitude and delayed distal and wave F latencies suggesting altered myeline sheath. This was confirmed by a biopsy of sural nerve which revealed a striking edema in the adaxonal layer of the

Schwann cell cytoplasm, with axonal compression and vesicular degeneration of the myelin.

A complete neurophysiological evaluation was performed on 4 cases of mild CFP with clinical features of usual CFP: motor and sensory conduction velocities in peroneal and right median nerves, repetitive nerve stimulation of the right median nerve as well as sudomotor sympathethic skin responses and neuromuscular excitability by latent tetany test. Except for the latter, no abnormalites were measured (Butera et al., 2000).

A interresting axonal excitability study were performed in 2 patients with "chronic ciguatera", i.e. subjected to relapsing sensory disturbances many years after the acute phase of CFP (Vucic and Kiernan, 2008). Results obtained by stimulating median nerve revealed no abnormalities of axonal VGSC functions in both motor and sensory fiber nerves. As noticed by the authors, given that patients were asymptomatic at the time of the study, abnormalities during intermittent recurrent symptoms cannot be excluded.

Furthermore, as pointed out in the latter study, such axonal excitability studies, as well as conventional nerve conduction studies, investigate functions of large-(i.e. myelinated such motor A α type and large sensory A α / β fibers) but not small-diameter fibers such autonomic and sensory thinly (A δ) and C fibers which are mainly targeted by CTXs. Abnormalities found in reported neurophysiological studies may explain muscular weakness or fatigability CFP symptoms, as well as some mechanical hypersensibilities rarely reported but not more common signs such as paresthesia, cold dysesthesia or pruritus likely to involve spontaneous action potential discharges of C and, in a lesser extend, A δ fibers (Benoit et al., 2005).

E. TREATMENT OF CIGUATERA FISH POISONING

Until now, no clinically validated cure exists for CFP. Only symptomatic treatments are delivered to patients suffering of ciguatoxic signs, consisting in analgesics against muscle and joint pain and anti-histaminic drugs for pruritus. Atropine was shown effective to relieve digestive and cardivascular disorders (Russell, 1975). In the Pacific, several plant extract remedies are preferentially employed (Boydron-Le Garrec et al., 2005). In the aim to treat neurologic disorders, amitryptiline (Bowman, 1984), tocainide (Lange et al., 1988), mexiletine, nifédipine, and gapapentin (Calvert et al., 1987a; Perez et al., 2001) have been adminitrated. The treatment of choice in severe forms consists in an intraveinous perfusion of hypertonic D-mannitol (1 g/kg over 30-45 minutes), commonly used to reduce increased intracranial pressure associated with brain edema, to appease neurological troubles. Despite an efficacy demonstrated on nerve preparations (Benoit et al., 1996; Birinyi-Strachan et al., 2005b) and humans (Schnorf et al., 2002), this treatment failed to relieve some effects of CTXs, among which some autonomic cardiac effets (Lewis, 2001). Moreover, this treatment might aggravate deshydration adue to digestive disorders (diarrhoea, vomiting) and must therefore be well monitored.

F. CONCLUSION

CFP is an under-reported disease with a complexe and polymorphous symptomatology with predominant sensory disturbances and the unique feature of a possible persistence or recurrence of these latter months or years after the ciguateric meal. They include paresthesia, intense pruritus and painful sensations to cold which have to be recognized by physicians to fix CFP diagnosis which can be a challenge in non endemic areas, especially in recurrent forms. Pathophysiological data indicate date most of neurological as well as non-neurological symptoms origin from sensory or autonomic nerve disturbances. However, molecular mediators of the sensory disturbances are partially unknown yet. Among available therapeutics, although acute autonomic dysfunction-based troubles, i.e. digestive and cardiovascular symptoms, are efficacely treated, effective treatment to relieve persistent sensory disturbances are lacking. Clinical trials assessing efficacy and safety of hyperosmotic IV Dmannitol have to be performed in CFP. Specific therapeutics could be emphazed by studies of molecular mediators involved in pathognomic sensory symptoms of CFP, namely itch and cold dysesthesia.

(references inserted at the end of the thesis)

CONTEXTE DE L'ETUDE ET SES OBJECTIFS
I. Contexte de l'étude

La physiopathologie du prurit, très fréquemment observée dans l'intoxication de type ciguatérique, et parfois très sévère, n'a jamais été étudiée. Cela n'a rien d'étonnant puisque la démangeaison est une thématique de recherche en pleine expansion depuis quelques décennies. A partir des éléments connus à ce jour, il est question ici de découvrir les médiateurs cellulaires et moléculaires intervenant dans le prurit induit par les ciguatoxines. Notre laboratoire est spécialisé sur la thématique du prurit et dispose de nombreux modèles d'étude *in vitro*, dont la coculture de neurones sensoriels et de kératinocytes humains mise au point il y a quelques années (Pereira et al., 2010). Cette coculture qui permet de mimer l'innervation sensorielle cutanée, et en particulier les petites fibres impliquées dans les sensations de douleur et de prurit, s'est avérée pertinente dans le cadre de notre étude. Nos résultats préliminaires, qui ont montré que la P-CTX-2 induit à partir de cette coculture une sécrétion de SP et de CGRP, ont initié les travaux de thèse qui vont être ici décrits.

II. Objectifs

L'objectif global de ces travaux est l'étude de la physiopathologie du prurit ciguatérique. Partant de la mise en évidence, intéressante dans ce contexte, de la libération des neuropeptides de l'inflammation neurogène induite par une CTX à partir de notre modèle de coculture, nous avons utilisé plusieurs méthodes/modèles d'étude pour en étudier les médiateurs moléculaires impliqués. Les résultats obtenus, destinés à faire l'objet d'un ou plusieurs articles, sont en grande partie présentés en anglais. Nous avons choisi de les organiser en 3 chapitres abordant les problématiques suivantes :

- Les ciguatoxines sont-elles capables d'induire la sécrétion de SP et CGRP par un modèle de coculture neurones sensoriels et kératinocytes
 ? Peut-on optimiser cette libération ?
- Quels sont les médiateurs impliqués dans l'exocytose de SP médiée par la P-CTX-2 ?
- Dissection des mécanismes à l'origine de cette libération de neuropeptides par imagerie calcique sur neurones sensoriels.
- > Quelle est la place des kératinocytes dans cette libération?

CHAPITRE 1: ETUDE DE LA LIBERATION DE NEUROPEPTIDES INDUITE PAR LA P-CTX-2

I. Etude de la sécrétion de neuropeptides induite par la P-CTX-2

La première question qui a été à la base de nos travaux fut la suivante : sachant que le prurit est largement représenté parmi les symptômes de la ciguatera (~60%) (Bavastrelli et al., 2001; Chateau-Degat et al., 2007; Morris J et al., 1982), des médiateurs du prurit sont-ils sécrétés sous l'influence de ciguatoxines ?

Notre modèle de coculture de neurones sensoriels de rat et kératinocytes humains, qui mime l'innervation sensorielle cutanée ciblée par les CTXs, nous a semblé particulièrement adéquat pour cette étude. Les médiateurs SP et CGRP nous ont semblé prioritaires à rechercher. Ces deux neuropeptides sont bien connus pour leur implication dans l'INC, la douleur et le prurit (Chan et al., 1997; Steinhoff et al., 2006). Il est à noter que les territoires innervés par les fibres peptidergiques, en particulier SP+ (peau, muqueuse nasale, pulpe dentaire, colon, liquide synovial), concordent avec les signes cliniques de la ciguatera (Laduron, 1998). D'après la littérature, les neurones sensoriels de rat sont en mesure de sécréter de la SP (Garland et al., 1995, 1997; Vasko et al., 1994) et du CGRP (Hou and Wang, 2001; Sanada et al., 2002). Les kératinocytes humains sont aussi capables de sécréter de la SP (Bae et al., 1999; Song et al., 2000) et expriment le CGRP (Hou et al., 2011).

L'ensemble de ces éléments nous a conduit à explorer la sécrétion de SP et CGRP induite par la P-CTX-2. Pour cela, nous avons mis la toxine au contact des cellules cocultivées puis le surnageant a été dosé. Nous avons publié les résultats de ces premiers travaux dans l'article suivant :

II. Article 1: Release of neuropeptides from a neuro-cutaneous co-culture model: A novel *in vitro* model for studying sensory effects of ciguatoxins (publié)

Toxicon 116 (2016) 4-10



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Release of neuropeptides from a neuro-cutaneous co-culture model: A novel in vitro model for studying sensory effects of ciguatoxins







Raphaele Le Garrec^{a,*}, Killian L'herondelle^a, Christelle Le Gall-Ianotto^{a,1}, Nicolas Lebonvallet^{a, 1}, Raphael Leschiera^a, Virginie Buhe^a, Matthieu Talagas^{a, b}, Irina Vetter^c, Richard J. Lewis^c, Laurent Misery^{a, d}

^a Laboratory of Neurosciences of Brest (EA4685), University of Western Brittany, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France

^b Department of Pathology, University Hospital of Brest, 2 avenue Foch, 29200 Brest, France

^c Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St. Lucia, Queensland 4072, Australia

^d Department of Dermatology, University Hospital of Brest, 2 avenue Foch, 29200 Brest, France

ARTICLE INFO

Article history. Received 23 July 2015 Received in revised form 24 October 2015 Accepted 4 November 2015 Available online 10 November 2015

Keywords: Ciguatoxins Sensory disorders Neuropeptide release In vitro model

ABSTRACT

Ciguatoxins are the major toxins responsible for ciguatera fish poisoning, a disease dominated by mucocutaneous sensory disorders including paresthesiae, cold dysesthesia and pruritus. While the ciguatoxins are well known to target voltage-gated sodium channels (VGSCs), the ensuing molecular mechanisms underlying these sensory disorders remain poorly understood. In this study, we propose a primary sensory neuron-keratinocyte co-culture as an appropriate model to study the neuro-cutaneous effects of ciguatoxins. Using this model, we show for the first time that nanomolar concentrations of Pacific ciguatoxin-2 (P-CTX-2) induced a VGSC-dependent release of substance P (SP) and calcitonin generelated peptide (CGRP). As these neuropeptides are known mediators of pain and itch sensations, the ciguatoxin-induced sensory disturbances in ciguatera fish poisoning may involve the release of these neuropeptides. We further determined time- and P-CTX-2 concentration-dependence of the release of SP and CGRP from the co-culture model. Moreover, we highlighted the influence of extracellular calcium on the release of neuropeptides elicited by P-CTX-2. These findings underline the usefulness of this novel in vitro model for studying the cellular and molecular mechanisms of the neuro-cutaneous effects of ciguatoxins, which may assist with identifying potential therapeutics for ciguatera fish poisoning. © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ciguatera fish poisoning (CFP), the most widespread nonbacterial seafood intoxication in the world, results from the consumption of tropical fishes contaminated with high levels of ciguatoxins (CTXs). CTXs are a group of lipophilic hydroxylated

Corresponding author.

polyether toxins derived from phycotoxins produced by Gambierdiscus spp. dinoflagellates. The Pacific, Caribbean and Indian Ocean CTXs vary slightly structurally across the corresponding endemic regions of CFP but appear to have similar pharmacology (Lewis, 2001). Epidemiological studies estimate that the annual incidence of CFP is 10,000-50,000 cases world-wide but it is not clear if these figures fully account for the misdiagnosis and non-reporting of cases (Lehane and Lewis, 2000). Moreover, in recent years, CFP cases were reported in non endemic areas due to the expansion of tropical tourism and the increased export of tropical fishes (De Haro et al., 2003; Epelboin et al., 2014; Mattei at al., 2014). Global warming also has the potential to promote an expansion of the geographic range of ciguatera (Silva et al., 2015).

The symptoms of the intoxication include gastrointestinal, neurological and cardiovascular disturbances in more severe cases. The most characteristic clinical manifestations are sensory disorders including joint, muscle and dental pain and predominant paresthesiae, cold dysesthesia/allodynia and pruritus (Vetter et al.,

Abbreviations: BPE, bovine pituitary extract; BSA, bovine serum albumin; CaCl₂, calcium chloride; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CFP, ciguatera fish poisoning; CTXs, ciguatoxins; DRG, dorsal root ganglion; EGF, epidermal growth factor; KSFM, Keratinocyte-Serum Free Medium; MeOH, methanol; NP, neuropeptide; P-CTX-1 and -2, Pacific ciguatoxin-1 and -2; SP, substance P; TRPA1, transient receptor potential, subfamily ankyrin, member 1; TRPV1, transient receptor potential, subfamily vanilloid, member 1; TTX, tetrodotoxin; TTX-S, tetrodotoxinsensitive: TTX-R, tetrodotoxin-resistant; VGPC, voltage-gated potassium channel; VGSC, voltage-gated sodium channel.

E-mail address: rlegarrec@univ-brest.fr (R. Le Garrec).

¹ Equal contribution.

http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.004 0041-0101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

R. Le Garrec et al. / Toxicon 116 (2016) 4-10

2012; Misery et al., 2014). Those cutaneous sensory disturbances have been well described, especially in CFP from Pacific region. Paresthesiae, the first signs to appear, consist of numbness and tingling in extremities as well as prickling sensations in circumoral areas and the tongue. Dysesthesiae manifest during contact of cold water, objects or air in the form of painful tingling, burning or electric discharges sensation. A superficial hyperesthesia with the same sensations is also described. An intense pruritus, which is first localized to the extremities and then becomes generalized, can persist several months, together with arthralgia and fatigue (Bagnis, 1968; Bagnis et al., 1979; Ruff and Lewis, 1994; Swift and Swift, 1993; Misery et al., 2014).

It is well established that the main primary molecular targets of CTXs are the voltage-gated sodium channels (VGSCs; Vetter et al., 2014). The cutaneous sensory manifestations of CFP thus likely arise due to the interaction of the CTXs with VGSCs on afferents fibers, including nociceptors and pruriceptors (Benoit et al., 2005). The increase in membrane excitability induced by CTXs in sensory neurons also involves an inhibition of voltage-gated potassium channels (VGPCs; Birinyi-Strachan et al., 2005). However, little is known about the downstream molecular events that lead to CTX-induced sensory disturbances, although Vetter et al. (2012) have described VGSCdependent involvement of the cold-sensitive TRPA1 (transient receptor potential, subfamily ankyrin, member 1) cation channel in peptidergic cutaneous fibers as contributing to cold allodynia in mice induced by Pacific ciguatoxin-1 (P-CTX-1). In addition, a positive allosteric modulation of TRPV1 (transient receptor potential, subfamily vanilloid, member 1), a key sensor of various nociceptive stimuli in skin, by gambierol, a CFP-related toxin, has been shown in a heterologous expression system (Cuypers et al., 2007).

Paresthesiae, dysesthesiae and pruritus are sensory disturbances that are strictly localized to the skin and (for the first two) to the mucous membranes where nerve endings terminate in close proximity to keratinocytes. Our laboratory has developed and used neuro-cutaneous models that allow the study of interactions between keratinocytes and sensory neurons and which are able to release substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in response to capsaicin (Château et al., 2007; Pereira et al., 2010a, 2010b). These neuropeptides (NPs) released by primary afferent fibers are involved in both pain and itch (Schaible, 2006; Metz et al., 2011; McCoy et al., 2012). Moreover, the mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons in which P-CTX-1 elicited an intracellular calcium increase at room temperature were virtually all CGRP-positive (Vetter et al., 2012) and P-CTX-1-induced CGRP release from isolated rat skin has been previously reported (Zimmermann et al., 2013). Using a sensory neuron-keratinocyte co-culture model, the purpose of this work was to study whether CTXs are able to induce SP and CGRP release and the involvement of VGSCs in this effect. Furthermore, as the medium used for keratinocyte growth contains low concentrations of calcium (0.09 mM), we studied the effect of additional external calcium during exposure to the toxin. It is worth noting that preponderating clinical patterns of CFP can vary depending on geographic origin of the CTXs involved, sensory disorders predominating in Pacific area (Lewis, 2001; Benoit et al., 2005). This study was conducted using Pacific ciguatoxin-2 (P-CTX-2), which, in addition to P-CTX-1, is one of the main CTXs isolated from fishes of this area (Lewis et al., 1991; Lewis and Jones, 1997) and has contributed to a ciguatera fatality (Hamilton et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Keratinocyte-Serum Free Medium (KSFM) with L-glutamine, EGF (epidermal growth factor), and BPE (bovine pituitary extract)

obtained as a kit from Life Technologies (Saint Aubin, France) was supplemented with 100 μ g/mL Normocin[®] (Cayla-InvivoGen, Toulouse, France) to obtain a so-called complete KSFM. Dispase[®] and B27[®] were obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France). Collagenase IV, nerve growth factor (NGF), insulin, hydrocortisone, bovine serum albumin (BSA) and calcium chloride (CaCl₂) were provided by Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Trypsin-EDTA was purchased from Lonza (Verviers, Belgium). P-CTX-2 (>90% purity) was isolated from moray eel (*Gymnothorax javanicus*) livers as previously described (Lewis et al., 1991) and dissolved in methanol (MeOH):water (1:1) to prepare a 10 μ M stock solution. Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Latoxan (Valence, France).

5

2.2. Primary cell dissociation and co-culture

Rat sensory neurons were obtained as previously described (Lebonvallet et al., 2012; Sevrain et al., 2013) with minor modifications. Dorsal root ganglia were extracted from newborn (2- to 5-day-old) Wistar rats then dissociated using collagenase IV (200 units/mL) and trituration. Dissociated cells were filtered through a 100 μ m-nylon cell strainer and centrifuged at 150 g for 5 min. Besides sensory neurons, the minor presence of Schwann cells and fibroblasts could not be excluded. Animal experimental procedures were performed in accordance with the French Ministry of Agriculture and the European Communities Council Directive 2010/63/UE and approved by the local veterinary authority.

Human skin specimens were obtained from healthy adult donors undergoing abdominal reduction surgery after informed consent. Human epidermal keratinocytes were isolated and dissociated as previously described (Le Gall-Ianotto et al., 2012). Briefly, the epidermal layer was separated by Dispase[®] digestion and cells were dissociated using 0.05% trypsin-EDTA solution. The epidermal suspension was filtered through a 100 µm-nylon cell strainer and centrifuged at 400 g for 5 min. Cells were cultured in complete KSFM and sub-cultured until passage 2–3 to ensure removal of non-keratinocyte epidermal cells. They were detached using trypsin-EDTA and not used beyond passage 8–9.

For P-CTX-2 experiments, keratinocytes were seeded on an uncoated 48-well plate at a density of 5000 cells per well in complete KSFM supplemented with B27 (20 μ L/mL), NGF (100 ng/mL), insulin (4 μ g/mL) and hydrocortisone (10 ng/mL). DRG neurons obtained from one rat were distributed over 8 wells in the same medium. Cocultures were maintained for 7 days at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere with a 50% medium renewal each 2–3 days.

2.3. Co-culture treatments with P-CTX-2

At day 7 after plating, co-cultured cells were treated with P-CTX-2 (10 nM or otherwise specified as final concentration in a final volume of 200 μ L) or its vehicle (MeOH:water 1:1 diluted in complete KSFM plus 0.1% BSA in proportions equivalent to P-CTX-2). Treatments were applied for 90 min unless otherwise indicated, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. In some experiments, TTX (0.3, 3, 10 or 100 μ M) or CaCl₂ (1.8 mM) were applied 10 min before P-CTX-2 or vehicle exposure. At the end of the indicated treatment time, the supernatants were collected, centrifuged to remove cells, then stored at -20° C until SP and CGRP measurements.

2.4. SP and CGRP enzyme immunoassays (EIA)

The levels of SP and CGRP in the supernatants were quantified using SP EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA) and rat CGRP EIA kit (SPI-Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France) following the manufacturer's instructions as previously described (Chéret et al., 2014). Levels of NPs were obtained in pg/mL.

R. Le Garrec et al. / Toxicon 116 (2016) 4-10

2.5. Immunocytochemical analysis

6

DRG neurons and keratinocytes were seeded at the same densities and in the same medium as for P-CTX-2 experiments onto Poly-L-Lysine-coated glass slides and co-cultured for 7 days within multiwell slide chambers (flexiPERM®, Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). Cells were fixed and permeabilized with MeOH at -20°C for 30 s. Non-specific binding was blocked in DPBS with 1% BSA. Cells were then double stained by incubating rabbit NF200 (heavy neurofilament, ab8135) and mouse peripherin primary (ab129007) antibodies (Abcam, Cambridge, UK, 1:200) overnight at 4°C in humidified atmosphere. Pig anti-rabbit TRITC (Abcam, Cambridge, UK, 1:1000 dilution) and goat anti-mouse FITC (Dako, Glostrup, Denmark, 1:1000 dilution), used as secondary antibodies, were incubated for 90 min at room temperature in the dark. A negative control was obtained by omitting the primary antibodies. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) was used to stain nuclei. Fluorescence analysis was performed using an Axiostar plus system (Carl ZEISS, Microlmaging Gmbh, Germany).

2.6. Data analysis

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of at least 3 separate experiments. The levels of released SP or CGRP (NP in pg/mL) obtained in the presence of TTX or CaCl₂ were expressed as a percentage of those obtained under control conditions, calculated by the following formula: % of CTX-induced release = $(NP_{CTX} + x - NP_{MeOH} + x)/(NP_{CTX} - NP_{MeOH}) \times 100$, where x is TTX or CaCl₂. The statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc tests for multiple comparisons or a one-tailed unpaired Student's t-test, as indicated in the Figure legends. Differences were considered statistically significant if the p value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Time-course of SP and CGRP release induced by P-CTX-2 (10 nM)

The time course results indicate that the release of SP (Fig. 1A) was the highest after a 90-min exposure of P-CTX-2 (10 nM; 93.3 \pm 94.8 pg/mL). Longer exposures led to a time-dependent decrease of the SP levels in the supernatants. By contrast, the levels of released CGRP (Fig. 1B) increased with time until 24 h (776.9 \pm 262.0 pg/mL), the maximal time of exposure studied.

However, the longest exposure to the vehicle control MeOH 0.05% itself significantly increased the basal level of released CGRP (307.8 \pm 107.5 pg/mL). Data obtained by subtracting the MeOH-induced released levels from that measured for P-CTX-2 (not shown) reveal that maximal levels of released CGRP were nearly achieved within 90 min and were maintained until 24 h. The optimal time of P-CTX-2 exposure to further study the release of both SP and CGRP produced by the toxin was therefore 90 min. It is worth noting that the released amounts of CGRP induced by P-CTX-2 were higher than those of SP.

3.2. Concentration-dependence of the P-CTX-2-induced NP release

Fig. 2 shows the influence of increasing P-CTX-2 concentrations (from 1 to 10 nM) on the magnitude of the release of SP (Fig. 2A) and CGRP (Fig. 2B) in the co-culture after a 90-min exposure. The release of SP increased almost linearly with P-CTX-2 concentration from 1 nM to 10 nM. The minimal P-CTX-2 concentration that induced a statistically significant SP release was 4 nM ($50.8 \pm 31.2 \text{ pg/mL}$). By contrast, the magnitude of CGRP release was almost constant irrespective of the studied P-CTX-2 concentration. Statistical significance of the CGRP release was indeed obtained from 1 nM ($303.5 \pm 144.5 \text{ pg/mL}$). According to those results, the optimal concentration of P-CTX-2 to further study the release of both SP and CGRP produced by the toxin was 10 nM.

3.3. TTX sensitivity of NP release induced by P-CTX-2

The involvement of TTX-sensitive (TTX-S, which $K_i = 0.3$ nM TTX; Roy and Narahashi, 1992) and TTX-resistant (TTX-R, which $K_i = 100 \mu$ M TTX) VGSCs in the P-CTX-2-induced NP release was studied by applying increasing concentrations of TTX (300 nM that only blocks TTX-S VGSCs and 3, 10 and 100 μ M that affect both types of VGSCs; Roy and Narahashi, 1992) prior to P-CTX-2 (10 nM; 90 min). As shown in Fig. 3A and B, the release of both SP and CGRP was significantly prevented by the highest concentration of TTX studied (100 μ M; 21 \pm 12% and 34 \pm 18% of the P-CTX-2-induced SP and CGRP release, respectively). Lower concentrations of TTX did not significantly reduce SP or CGRP release induced by P-CTX-2. TTX on its own, regardless of its concentration, did not affect the control levels of SP and CGRP (data not shown).

3.4. Effect of extracellular calcium on NP release induced by P-CTX-2

The low calcium concentration (0.09 mM) of the KSFM, which maintains keratinocytes in a proliferative, non-differentiated state,



Fig. 1. Time course of release of SP (A) and CGRP (B) induced by P-CTX-2 (10 nM, black bars) or its vehicle control MeOH 0.05% (white bars). Data are expressed in pg/mL as the mean \pm SD of 4 separate experiments. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by Sidak's post-test for multiple comparisons. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.



Fig. 2. Levels of SP (A) and (B) CGRP released 90 min after application of a range of nanomolar concentrations of P-CTX-2. Data are expressed in pg/mL as the mean \pm SD of 4 experiments. For statistical analysis of the results, a one-way ANOVA followed by Dunett's post-test for multiple comparisons to control (0 nM) was used. **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001.



Fig. 3. Effects of TTX on P-CTX-2-induced release of SP (A) and CGRP (B). Various concentrations of TTX were pre-incubated 10 min before P-CTX-2 (10 nM) treatment for 90 min. The levels of released SP or CGRP (NP in pg/mL) obtained in the presence of TTX were expressed as a percentage of those obtained under control conditions, calculated by the following formula: % of CTX-induced release = $(NP_{CTX} + TTX - NP_{MeOH} + TTX)/(NP_{CTX} - NP_{MeOH}) \times 100$. Data are expressed as the mean \pm SD of 4 or 5 experiments depending on TTX concentrations. They were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons to control. **p < 0.01.

is required for their growth during the 7 days of co-culture. Addition of 1.8 mM CaCl₂ to the low-calcium culture medium prior to P-CTX-2 exposure (10 nM; 90 min) led to a dramatic increase in the release of both SP and CGRP induced by the toxin (Fig. 4A and B; $920 \pm 452\%$ and $527 \pm 230\%$ of the P-CTX-2-induced SP and CGRP release, respectively). CaCl₂ (1.8 mM) by itself did not significantly affect the control levels of SP and CGRP (data not shown).

3.5. Immunocytochemical characterization of $A\delta$ - and C-fibers in the co-culture

The immunocytochemical analysis performed after 7 days of coculture using peripherin and NF200 indicated that both peripherinand NF200-positive fibers were present in the co-culture (Fig. 5B and C, respectively). Merged image (Fig. 5D) showed that virtually all the structures that are immunoreactive to NF200 (a marker of Atype fibers or neurons; Ruscheweyh et al., 2007) are also peripherin-positive (i.e. Aδ- or C-type fibers or neurons; Vetter et al., 2012), indicating an Aδ-type identity. By contrast, most of the peripherin-positive fibers or neurons are NF200-negative, indicating a preponderance of C-type structures. The virtual absence of NF200 single-labeled structures denotes that co-culture contained few or no $A\alpha/\beta$ fibers or neurons.

4. Discussion

The results of this study show for the first time that P-CTX-2 is able to induce a significant release of SP and CGRP from a co-culture



Fig. 4. Effect of additional external CaCl₂ on P-CTX-2-induced release of SP (A) and CGRP (B). Co-cultures were pre-incubated for 10 min in the presence of additional CaCl₂ (1.8 mM) before P-CTX-2 (10 nM) treatment for 90 min. The levels of released SP or CGRP (NP in pg/mL) obtained in the presence of CaCl₂ were expressed as a percentage of those obtained under control conditions, calculated by the following formula: % of CTX-induced release = (NP_{CTX} + CaCl₂ - NPMoOH + CaCl₃)(NPCTX - NP_{MEOH}) × 100. Data are expressed as the mean \pm SD of 3 experiments. To determine statistical significance, a one-tailed unpaired r-test was performed. ***p < 0.001.

7

R. Le Garrec et al. / Toxicon 116 (2016) 4-10



Fig. 5. Immunochemical characterization of sensory nerve fibers/neurons in the co-culture model. (A, blue) Nuclei stained with DAPI; (B, green) Peripherin-positive fibers or soma; (C, red) NF200-positive fibers or soma; (D) Merged image. Arrows indicate double-labeled peripherin⁺/NF200⁺ structures, while arrowheads indicate peripherin⁺/NF200⁻ structures.

of rat sensory neurons and human keratinocytes. Evidences of neurosecretory effects of CTXs have been shown in past studies, mainly the enhancement or the elicitation of the release of acetylcholine or noradrenaline from motor and/or autonomic nerves as well as secretory cells (Molgo and Benoit, 2002; Brock at al., 1995; Hamblin et al., 1995; Mattei et al., 2008). Although parasympathetic and sympathetic nervous systems may participate in clinical manifestations of CFP, they are unlikely to be directly involved in paresthesiae, cold dysesthesia and pruritus. Since SP and CGRP can be released from primary sensory afferents in both the periphery and the dorsal horn of the spinal cord and mediate pain or itch (Schaible, 2006), their CTX-induced release from sensory fibers could contribute to these sensory disturbances.

8

The release of both NPs was achieved using low nanomolar concentrations of P-CTX-2, which is 9-times less potent than P-CTX-1 in mice (Lewis et al., 1991). The exquisite potency of P-CTX-2 to induce NP release points to the clinically relevance of this effect. However, an inter-experimental variability of the magnitude of the SP and CGRP release ought to be noted, which may be correlated to the density of the neurite network in the culture, as previously described (Holz et al., 1988).

The time course results reveal that the release of both NPs was the highest after a 90-min exposure of P-CTX-2 (10 nM), since the further increase of the CGRP release for the longest incubation times is attributable to the vehicle. The levels of SP decreased after 90 min, whereas those of CGRP were maintained until 24 h. It is suspected that the decrease of SP levels could be linked to its enzymatic degradation (e.g. by the neutral endopeptidase) whereas CGRP would be more stable (Gontijo et al., 1999).

In the range of 1–10 nM, the observed concentrationdependence of NP release induced by P-CTX-2 was clearly established for that of SP, with a statistical significance from 4 nM of P-CTX-2. Conversely, the released levels of CGRP were almost maximal and statistically significant from 1 nM, the lowest P-CTX-2 concentration studied, suggesting that the EC₅₀ for CGRP release lies in the sub-nanomolar range. In sensory neurons, SP is exclusively expressed by C-type neurons, whereas CGRP-positive neurons can be classified as C- or A-type (Ruscheweyh et al., 2007). Since our co-culture model contained both C- and A δ -type neurons, the larger levels of released CGRP compared with SP could result from a larger proportion of CGRP- than SP-positive neurons. Further immunochemical experiments using CGRP and SP antibodies would be required to clarify this point.

Our immunocytochemical data suggested that the neuronal subtypes present in the co-culture belonged mostly to C- and Aδ-type neurons, with C-type appearing to be in the greatest proportion, while Aα/β-type being virtually absent. Our model therefore contains all (and only) the DRG fiber types involved in nociception and pruriception (Ruscheweyh et al., 2007; Metz et al., 2011), which are also those in skin-nerve preparations that responded to P-CTX-1 by an ongoing activity or were sensitized to cold in the presence of P-CTX-1 (Vetter et al., 2012). This makes our novel co-culture system a relevant model for *in vitro* studies of sensory disturbances, including those of CFP.

CTXs are well known to target TTX-S VGSCs in various excitable cells as well as TTX-R ones in sensory neurons (Strachan et al., 1999). This interaction, in combination with the inhibition of VGPCs (Birinyi-Strachan et al., 2005), is assumed to lead to most of, if not all, the clinical manifestations of CFP. Our results showed that VGSCs indeed contribute to the P-CTX-2-induced release of SP and CGRP from co-cultured keratinocytes and DRG neurons. Surprisingly, only the highest micromolar concentration of TTX studied was able to significantly prevent both SP and CGRP release induced by P-CTX-2. These results suggest that the release of NPs induced by P-CTX-2 involves TTX-resistant but not TTX-sensitive VGSCs. We can not totally depart the assumption that a small contribution of TTX-S channels was obscured by the relatively moderate release of NPs obtained during these experiments. However, although both TTX-S and TTX-R VGSCs are expressed in DRG neurons (Persson et al., 2010), their relative proportions vary during the

R. Le Garrec et al. / Toxicon 116 (2016) 4-10

development and TTX-R currents largely predominate in 2-5 dayold rat DRG neurons (Roy and Narahashi, 1992). Moreover, only those expressing SP and/or CGRP are capable of releasing those NPs. i.e. subpopulations of mainly C-type neurons (Ruscheweyh et al., 2007). Our results are thus consistent with a recent work relative to the TTX sensitivity of CTX-targeted sensory neurons. Vetter et al. (2012) demonstrated indeed that sensory fibers from skin-nerve preparations that responded to P-CTX-1 at 30°C with the emergence of spontaneous activity are mainly TTX-resistant C-fibers. Although P-CTX-1 sensitized TTX-sensitive A-fibers to cold, those fibers showed little or no ongoing activity in response to P-CTX-1 at room temperature. In addition to TTX-R VGSCs, the contribution of other previously documented molecular targets for CFP toxins, such as VGPCs or TRPV1 (Birinyi-Strachan et al., 2005; Cuypers et al., 2007), in the NP release established in this study would be worth exploring.

Finally, our results indicate that increasing the extracellular calcium concentration greatly potentiated NP release elicited by P-CTX-2. This is consistent with the previously reported effect of extracellular calcium on evoked release of NPs from sensory neurons (Holz et al., 1988; Ulrich-Lai et al., 2001). Since KSFM is poor in -but not totally devoid of- calcium, the absolute Ca²⁺-dependence of NP release induced by P-CTX-2 could not be definitively concluded and requires further study. However, the striking effect observed upon Ca2+ addition suggests that Ca2+-dependent mechanisms play a major role in P-CTX-2-induced CGRP and SP release. The molecular bases of these mechanisms remain to be studied, including the involvement of the Na+/Ca2+ exchanger or voltage-gated calcium channels that have been implicated in neurosecretory effects of CTXs from non sensory models (Nicholson and Lewis, 2006). With a view to further experiments using this model, addition of external calcium would lead to improve the magnitude of the release and would thus be likely to reduce the inter-experimental variability.

It is worth noting that besides sensory neurons, keratinocytes present in the co-culture are also able to release SP and express CGRP as well as their cognate receptors (Bae et al., 1999; Hou et al., 2011). These cells, in addition to promoting neurite growth of cocultured sensory neurons (Ulmann et al., 2007), could thus contribute and respond to the release of NPs induced by P-CTX-2. Interestingly, human primary keratinocytes are capable of releasing substantial amounts of SP but not CGRP (Bae et al., 1999; Hou et al., 2011). Therefore, a P-CTX-2-induced release of SP but not CGRP from keratinocytes could explain that the levels of SP released from the co-culture still increased up to the highest P-CTX-2 concentration studied (10 nM), while the levels of released CGRP reached a plateau from 1 nM of P-CTX-2. This hypothesis and the possible underlying mechanisms remain to be studied. In addition to DRG neurons and keratinocytes, Schwann cells, initially isolated and cultured alongside dissociated DRG neurons, are present in the coculture which is maintained for 7 days without antimitotic agent. These cells contribute, among other things, to myelination of neuronal fibers (Stettner et al., 2013) and can be targeted by CTXs (Molgo et al., 1994). Moreover, NP release from DRG neurons has been shown to require Schwann cells (Tang et al., 2007). The role of the different cell types in P-CTX-2-induced NP release from the coculture remains to be established.

In conclusion, the P-CTX-2 induced release of SP and CGRP demonstrated by this study constitutes a new element of knowledge regarding the mechanisms underlying the sensory disturbances of CFP. Furthermore, the keratinocyte-sensory neuron coculture model used, especially performed with additional external calcium during CTX exposure, is a suitable tool for further investigating those mechanisms, with the aim to identify potential therapeutic targets for CFP.

Acknowledgments

We thank the French Society of Dermatology (Paris, France) for financial support of this study.

9

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.004.

References

- Bae, S., Matsunaga, Y., Tanaka, Y., Katayama, I., 1999. Autocrine induction of substance P mRNA and peptide in cultured normal human keratinocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263, 327-333.
- Bagnis, R., 1968. Clinical forms of fish poisoning of the "ciguatera" type in French Polynesia. In: Seminar on Ichthyosarcotoxism, 16th–22nd August, Rangiroa, French Polynesia, South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia, p. 7.
- Bagnis, R., Kuberski, T., Laugier, S., 1979. Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28, 1067 - 1073
- Benoit, E., Boydron-Le Garrec, R., Sauviat, M.-P., 2005. Implication de la nociception Benoti, E., Boychi-Le Garlec, K., Sauviat, M.-P., 2005. Implication de la notception cutanée dans l'intoxination de type ciguatera. In: Bon, C., Goudey-Perrière, F., Goyffon, M., Sauviat, M.-P. (Eds.), Toxines et douleur, Collection Rencontres en Toxinologie. Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 123–132.
 Birinyi-Strachan, L.C., Gunning, S.J., Lewis, R.J., Nicholson, G.M., 2005. Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to income desurged excited exc
- increased neuronal excitability in rat sensory neurons. Toxicol. Appl. Pharmacol. 204, 175-186.
- Brock, J.A., McLachlan, E.M., Jobling, P., Lewis, R.J., 1995. Electrical activity in rat tail artery during asynchronous activation of postganglionic nerve terminals by ciguatoxin-1. Br. J. Pharmacol. 116, 2213–2220.
 Chàteau, Y., Dorange, G., Clément, J.F., Pennec, J.P., Gobin, E., Griscom, L.,
- Baudrimont, M., Rougier, N., Chesné, C., Misery, L., 2007. In vitro reconstruction of neuro-epidermal connections. J. Invest. Dermatol. 127, 979-981.
- Chéret, J., Lebonvallet, N., Buhé, V., Carre, J.L., Misery, L., Le Gall-Ianotto, C., 2014. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing pro-cess. J. Dermatol. Sci. 74, 193–203.
- Cuypers, E., Yanagihara, A., Rainier, J.D., Tytgat, J., 2007. TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning. Biochem. Biophys. Res. Commun. 361, 214-217.
- Haro, L., Pommier, P., Valli, M., 2003. Emergence of imported ciguatera in Europe: report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 41, 927–930.
- Epelboin, L., Pérignon, A., Hossen, V., Vincent, R., Krys, S., Caumes, E., 2014. Two clusters of ciguatera fish poisoning in Paris, France, related to tropical fish imported from the French Caribbean by travelers. J. Travel Med. 21, 397–402. Gontijo, J.R., Smith, L.A., Kopp, U.C., 1999. CCRP activates renal pelvic substance P activates and the protocol and the sector of the
- receptors by retarding substance P metabolism. Hypertension 33, 493-498. Hamblin, P.A., McLachlan, E.M., Lewis, R.J., 1995. Sub-nanomolar concentrations of
- ciguatoxin-1 excite preganglionic terminals in guinea pig sympathetic ganglia. Naunyn Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 352, 236-246.
- Hamilton, B., Whittle, N., Shaw, G., Eaglesham, G., Moore, M.R., Lewis, R.J., 2010. Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. Toxicon 56, 668-673.
- Holz 4th, G.G., Dunlap, K., Kream, R.M., 1988, Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: methods and
- dihydropyridine sensitivity. J. Neurosci. 8, 463–471.
 Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., Guha, U., Lavker, R., Kessler, J., Chittur, S., Fiorino, D., Rice, F., Albrecht, P.u Q1, Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., Guha, U., Lavker, R., Kessler, J., Chittur, S., Fiorino, D., Rice, F., Albrecht, P., 2011. Keratinocyte expression of calcidance in generative procession of calcidance in generative procession of calcidance in the second sec calcitonin gene-related peptide β : implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. Pain 152, 2036–2051.
- Lebonvallet, N., Boulais, N., Le Gall, C., Pereira, U., Gauché, D., Gobin, E., Pers, J.O., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., Misery, L., 2012. Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. Exp. Dermatol. 21, 156–158.
- Le Gall-lanotto, C., Andres, E., Hurtado, S.P., Pereira, U., Misery, L., 2012. Character-ization of the first coculture between human primary keratinocytes and the dorsal root ganglion-derived neuronal cell line F-11. Neuroscience 210, 47–57. Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. Int. J.
- Food Microbiol. 61, 91–125.
 Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. Toxicon 39, 97–106.
 Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., MacLeod, J.K., Sheil, M.M., 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis jav-*
- anicus, Muraenidae). Toxicon 29, 1115–1127. Lewis, R.J., Jones, A., 1997. Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners
- Devis, A.J., Jones, P., 1997. Characterization of organization and equation of a second se

R. Le Garrec et al. / Toxicon 116 (2016) 4-10

Lewis, R.I., Baden, D.G., Molgó, J., Meunier, F.A., 2008. Brevenal inhibits pacific ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. PLoS One 3. e3448.

10

- Mattei, C., Vetter, I., Eisenblätter, A., Krock, B., Ebbecke, M., Desel, H., Zimmermann, K., 2014. Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. Toxicon 91, 76–83.
- McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., Zylka, M.J., 2012. CGRPa-expressing sensory neurons respond to stimuli that evoke sensations of pain and itch. PLoS One 7, e36355.
- Metz, M., Grundmann, S., Ständer, S., 2011. Pruritus: an overview of current concepts. Vet. Dermatol. 22, 121–131.
 Misery, L., Brenaut, E., Le Garrec, R., Abasq, C., Genestet, S., Marcorelles, P., Zagnoli, F., 2014. Neuropathic pruritus. Nat. Rev. Neurol. 10, 408–416.
 Molgo, J., Juzans, P., Legrand, A.M., 1994. Confocal laser scanning microscopy: a new read for studying (CTV 18) and D. granital at meters.
- tool for studying the effects of ciguatoxin (CTX-18) and D-mannitol at motor nerve terminals of the neuromuscular junction in situ. Mem. Queensl. Mus. 34, 577-585 Molgo, J., Benoit, E., 2002. Involvement of Na+ in the actions of ciguatoxins and
- brevetoxins that stimulate neurotransmitter release and affect synaptic trans-mission. In: Menez, A. (Ed.), Perspectives in Molecular Toxinology. John Wiley &
- Sons Ltd, London, United Kingdom, pp. 67–94.
 Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. Mar. Drugs 4, 82–118.
 Pereira, U., Boulais, N., Lebonvallet, N., Lefeuvre, L., Gougerot, A., Misery, L., 2010a.
- Development of an in vitro coculture of primary sensitive pig neurons and keratinocytes for the study of cutaneous neurogenic inflammation. Exp. Dermatol. 19, 931-935.
- Pereira, U., Garcia-Le Gal, C., Le Gal, G., Boulais, N., Lebonvallet, N., Dorange, G., Lefeuvre, L., Gougerot, A., Misery, L., 2010b. Effects of sangre de drago in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation. Exp. Dermatol. 19, 796-799.
- Persson, A.K., Black, J.A., Gasser, A., Cheng, X., Fischer, T.Z., Waxman, S.G., 2010.
 Sodium-calcium exchanger and multiple sodium channel isoforms in intra-epidermal nerve terminals. Mol. Pain 6, 84.
 Roy, M.L., Narahashi, T., 1992. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and
- tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. J. Neurosci. 12, 2104–2111.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. Mem. Queensl. Mus. 34, 609–619.
- Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Schoffnegger, D., Sandkühler, J., 2007. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with

- Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. J. Comp. Neurol. 502, 325-336
- Schaible, H.G., 2006. Peripheral and central mechanisms of pain generation. Handb.
- Schalbe, H.G., 2000. Periphera and Central mechanisms of pair generation. Hando.
 Exp. Pharmacol. 177, 3–28.
 Sevrain, D., Le Grand, Y., Buhé, V., Jeanmaire, C., Pauly, G., Carré, J.L., Misery, L., Lebonvallet, N., 2013. Two-photon microscopy of dermal innervation in a human re-innervated model of skin. Exp. Dermatol. 22, 290-291. Silva, M., Pratheepa, V.K., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2015. Emergent toxins in
- North Atlantic temperate waters: a challenge for monitoring programs and legislation. Toxins (Basel) 7, 859–885.
- Stettner, M., Wolffman, K., Mausberg, A.K., Wolf, C., Heikaus, S., Derksen, A., Dehmel, T., Kieseier, B.C., 2013. A reliable in vitro model for studying peripheral
- nerve myelination in mouse. J. Neurosci. Methods 214, 69–79. Strachan, L.C., Lewis, R.J., Nicholson, G.M., 1999. Differential actions of pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 288, 379–388. wift, A.E., Swift, T.R., 1993. Ciguatera. Clin. Toxicol. 31, 1–29.

- Tang, H.B., Li, Y.S., Nakata, Y., 2007. The release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons requires the non-neuronal cells around these neurons. J. Pharmacol. Sci. 105, 264–271. Ulmann, L., Rodeau, J.L., Danoux, L., Contet-Audonneau, J.L., Pauly, G., Schlichter, R.,
- 2007. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. Eur. J. Neurosci. 26, 113-125.
- Ulrich-Lai, Y.M., Flores, C.M., Harding-Rose, C.A., Goodis, H.E., Hargreaves, K.M., 2001. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from rat trigeminal ganglion: evidence for intraganglionic neurotransmission, Pain 91, 219-226.
- Vetter, I., Touska, F., Hess, A., Hinsbey, R., Sattler, S., Lampert, A., Sergejeva, M., Sharov, A., Collins, L.S., Eberhardt, M., Engel, M., Cabot, P.J., Wood, J.N., Vlachová, V., Reeh, P.W., Lewis, R.J., Zimmermann, K., 2012. Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. EMBO J. 31, 3795-3808.
- Vetter, I., Zimmermann, K., Lewis, R.J., 2014. Ciguatera toxins: pharmacology, toxi-cology and detection. In: Botana, L.M. (Ed.), Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, third ed. CRC Press, Boca Raton, United States, pp. 925-950.
- Zimmermann, K., Deuis, J.R., Inserra, M.C., Collins, L.S., Namer, B., Cabot, P.J., Reeh, P.W., Lewis, R.J., Vetter, I., 2013. Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. Pain 154, 1999–2006.

Ces résultats mettent en évidence deux faits majeurs :

- Le premier est que la P-CTX-2 est capable de provoquer la sécrétion de SP et CGRP à partir de ce modèle de coculture. Ces données apportent une pierre à l'édifice de la physiopathologie de la ciguatera. En effet, cela suggère qu'une inflammation neurogène pourrait être induite lors de l'intoxication de type ciguatera. Au niveau cutané, la substance P pourrait ainsi induire la dégranulation des mastocytes, libérant histamine et protéases, qui peuvent être à l'origine d'un prurit histaminergique et non-histaminergique, respectivement.
- Le deuxième point est la validité du modèle, tout d'abord par sa capacité à libérer SP et CGRP, mais aussi par sa constitution quasi-exclusive de fibres C et Aδ dans nos conditions, révélée par immunocytochimie.

Ces données établissent la pertinence de ce modèle de coculture kératinocytes et neurones sensoriels pour l'étude des troubles sensitifs cutanés évoqués dans la ciguatera.

Enfin, ces résultats ont mis en évidence les paramètres d'activation de temps (1h30 d'incubation) et de concentration en ciguatoxine (P-CTX-2 à 10 nM) pour une libération optimale de neuropeptides. De plus, ils ont permis d'établir que la présence de Ca²⁺ extracellulaire augmente drastiquement la sécrétion de neuropeptides induite par la P-CTX-2.

III. Optimisation du modèle

Bien que ces résultats soient novateurs, le relargage de neuropeptides n'était pas élevé de façon suffisamment constante. L'importance de ce relargage ayant été corrélée à la densité du réseau des neurites (Chad and Yeats, 1986), nous avons cherché à optimiser celle-ci. Dans ce but, deux axes d'amélioration ont été établis :

- l'adhérence et la répartition homogène des neurones. Ce premier point a conduit à tester différents supports de culture, différents revêtements et différents temps entre ensemencement et incubation à 37°C.
- ii. la croissance des neurites. La présence de calcium extracellulaire est un élément clé connu de la croissance des neurites (Kater and Mills, 1991). Sachant qu'elle induit la différenciation des kératinocytes et annule leur capacité de multiplication et d'adhérence (Hennings et al., 1980), nous avons différé l'ensemencement des kératinocytes afin de ne viser, dans un premier temps, que l'obtention d'un réseau dense de neurites en cultivant les neurones sensoriels dans un milieu contenant 1,4 mM de CaCl₂ (DMEM + DMEM/F12, v/v, 50/50).

Les différentes conditions testées ont été évaluées qualitativement, par l'observation en microscopie optique de l'aspect général des cultures et en particulier de 2 critères principaux : l'adhérence des cellules et le développement du réseau de neurites.

Dans un deuxième temps, nous avons ensemencé les kératinocytes sur les neurones cultivés. Les concernant, un axe d'amélioration a été exploré : celui de leur état de différenciation au moment de l'activation par la P-CTX-2. En effet, les kératinocytes non différenciés sont prolifératifs (à l'image des kératinocytes basaux) et capables d'adhérer, mais n'expriment que peu de protéines spécialisées. L'influence de leur différenciation sur la libération de neuropeptides par la P-CTX-2 a ainsi été explorée.

La partie suivante relate les différentes expériences réalisées selon ces axes pour améliorer le modèle initialement établi.

III.1. Choix d'un support et d'un revêtement adapté

Le but de cette optimisation a été le choix du support et du "coating" (revêtement du fond des plaques permettant une meilleure adhérence des cellules) adaptés pour une bonne culture de neurones sensoriels issus de GRD. Nous avons testé 6 types de plaques 96 puits des fournisseurs habituels du laboratoire (Corning, Cellstar, Sarstedt, CytoOne). Dans chacune d'elles, nous avons réalisé différents coatings : le collagène, la poly-D-lysine et la poly-L-lysine. La photo ci-contre expose des cultures de neurones dans des conditions de coating différentes.



Figure 11 : Cultures de neurones sensoriels issus de GRD à 5 jours, observées au microscope optique inversé : sans coating (A), avec collagène (B), avec poly-D-lysine (C) et poly-L-lysine (D).

Basé sur les deux critères préalablement énoncés, nous avons retenu l'association de la plaque 96 puits pour cellules adhérentes sensibles (réf.

83.3924.300) fournie par Sarstedt avec le coating collagène à 40 µg/mL comme étant la meilleure condition pour l'adhérence et la croissance des neurites.

III.2. Etude de l'effet de la température sur l'adhérence cellulaire

L'agrégation massive des neurones entre eux, entraînant leur décollement du support, est un inconvénient bien décrit dans la littérature (Lange et al., 2012). Autre phénomène observé, les neurones sensoriels ont tendance à former un réseau en périphérie du puits. Ce phénomène est d'autant plus marqué sur les puits les plus extérieurs de la plaque. Une pratique permet de limiter cet "effet de bord" en remplissant les puits les plus externes par de l'eau ou une solution tampon. Cependant, l'effet de bord a tendance à persister, et cumulé à l'agrégation des neurones, cela génère un problème de variabilité entre les puits. Nous avons émis l'hypothèse que l'incubation directe des cellules à 37°C pouvait favoriser l'agrégation, et par conséquent, le décollement des gros amas. Pour étudier ce paramètre, nous avons incubé les cellules 1h30 à température ambiante avant de les incuber à 37°C, et comparer cette condition à une condition témoin (cellules directement incubées à 37°C). Les 2 cultures ont été entretenues 5 jours. Des photos des conditions respectives sont présentées ci-dessous :



Figure 12 : Effet de la température sur l'adhérence des neurones: directement incubés à 37°C (A) et avec une étape préalable d'incubation d'1h30 à température ambiante (B).

En tenant compte de l'échelle de chaque photo, les neurones sans préincubation à température ambiante forment des amas 2 fois plus gros et moins homogènes. Un délai d'incubation d'1h30 à température ambiante favorise une répartition homogène des amas de cellules au sein des puits. Cette étape d'adhérence réalisée à température ambiante limite la formation des amas neuronaux (Figure 12). Nous avons donc retenu pour la suite des expériences cette étape supplémentaire d'incubation des cellules à température ambiante avant incubation à 37°C. Il s'est avéré par la suite que les cultures de neurones ont été quasiment toutes obtenues sans "clumping" (formation de gros amas), constatée au bout de 2-3 jours de culture, conduisant au décollement de l'ensemble des amas et rendant la culture inutilisable.

Jusqu'à ce stade, l'optimisation s'est faite sur des critères qualitatifs morphologiques d'observations microscopiques (agencement cellulaire et neuritogénèse). En résumé :

- Nous avons défini les plaques 96 puits Sarstedt jaune et le coating collagène associé comme support optimal pour la culture de neurones sensoriels.
- Nous avons ajouté une étape supplémentaire d'incubation des cellules 1h30 à température ambiante pour une répartition homogène des cellules au sein des puits.

La partie suivante évalue l'optimisation du modèle d'un point de vue quantitatif, avec des données expérimentales de libération de neuropeptides afin de valider les modifications apportées.

III.3. Modification du protocole et étude de la différenciation des kératinocytes

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive sur la peau, les kératinocytes sont des cellules épithéliales qui se retrouvent dans des états de différenciation différents au sein de la peau. Le KSFM, milieu appauvri en calcium et enrichi en facteurs de croissance spécifiques, nous permet de les maintenir en culture dans un état prolifératif et indifférencié. Notre premier article de résultats (Le Garrec et al., 2016) mentionne une coculture des neurones et des kératinocytes à J0 dans du KSFM enrichi en suppléments pour neurones où la coculture est maintenue 5 à 7 jours avant activation. Nous avons choisi de changer la procédure en faisant pousser les neurones seuls, dans un premier temps, pour obtenir une culture de neurones dont le réseau de neurites est en place et optimisé. Ensuite, les kératinocytes sont ajoutés à raison de 20 000 à 25 000 cellules par puits dans du KSFM pour permettre leur adhérence puis leur prolifération. Quand la coculture arrive à 75-80 % de confluence, le KSFM est remplacé par du DMEM + DMEM/F12 (v/v, 50/50 ; contenant 1,4 mM CaCl₂) pour induire la différenciation des kératinocytes. Douze à 16 heures plus tard, la coculture est prête pour une activation. Nous avons comparé les concentrations de SP obtenues entre les conditions de coculture initialement et nouvellement établies, reportées dans la figure suivante :



Figure 13 : Concentrations de SP libérée en présence de 10 nM de P-CTX-2 dans le modèle initial "prototypical" (n = 4) comparées au modèle optimisé "optimized" (n = 16). Les données sont présentées de la façon suivante : moyenne \pm écart-moyen. L'analyse statistique a été réalisée par un test de Mann-Whitney (données non appariées). ** p ≤ 0,01.

La sécrétion de SP induite par la P-CTX-2 dans le modèle initialement mis en place ($67,88 \pm 22,48 \text{ pg/mL}$) est augmentée pratiquement d'un facteur 10 dans le nouveau modèle ($606 \pm 112,4 \text{ pg/mL}$). Ces données démontrent que l'exocytose de SP est grandement amplifiée par les différentes améliorations apportées au modèle initial, et valident ainsi nos nouvelles conditions de culture.

Pour finir, nous avons voulu démontrer l'intérêt de l'étape finale du nouveau protocole : la différenciation des kératinocytes. Pour ce faire, nous avons testé 2 conditions. Une condition dite "indifférenciée" correspond la condition précédemment décrite mais sans le changement du milieu KSFM pour du DMEM + DMEM/F12 (v/v, 50/50), c'est-à-dire dans laquelle les kératinocytes sont maintenus indifférenciés jusqu'à l'activation de la coculture par la P-CTX-2. La condition dite "différenciée" correspond la condition précédemment décrite. Les résultats du dosage de la SP dans le surnageant, dans ces 2 conditions, sont illustrés par la figure suivante:



Figure 14 : Impact de l'état de différenciation des kératinocytes en coculture sur la sécrétion de SP induite par la P-CTX-2. Les concentrations de SP sécrétées (pg/mL) obtenues dans les conditions témoins, méthanol 0,05 % et P-CTX-2 10 nM ont été exprimées en pourcentages de celles obtenues en condition indifférenciée, calculés de la façon suivante : % of CTX-induced SP release = $([SP_{CTX+x}] - [SP_{MeOH+x}]) / ([SP_{CTX}] - [SP_{MeOH}]) \times 100$, où x est la condition de différenciation. Les valeurs normalisées sont exprimées en valeurs moyennes. Aucun test statistique n'a été effectué car les conditions doivent être répétées (n = 2).

Les résultats de la figure ci-dessus montrent une sécrétion de SP largement supérieure dans la condition différenciée (168,6 %) comparée à la condition indifférenciée (100 %). Ces données suggèrent que des kératinocytes différenciés favorisent la libération de SP en coculture avec les neurones.

Les cibles primaires des CTXs sont les canaux sodiques voltages-dépendants (Nav channels) et le PAR-2 est reporté exprimé par les kératinocytes. Une étude récente a montré l'expression de certaines isoformes (Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7) de ces canaux sodiques sur les kératinocytes humains *in situ* (Zhao et al., 2008). Nous avons mené des expériences de PCR quantitative (RT-qPCR) afin de déterminer, *in vitro*, l'expression de ces canaux et du PAR-2 par les kératinocytes indifférenciés et différenciés. Les résultats sont présentés ci-dessous:



Figure 15 : Expression relative des Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7 et du PAR-2 par les kératinocytes non différenciés et différenciés 8 heures, 16 heures et 24 heures. L'expression relative des ARNm a été réalisée par PCR quantitative. Les données ont été normalisées avec l'expression relative de l'Actine 16S. Aucun test statistique n'a été réalisé car seules les conditions du PAR-2 ont été dupliquées, les autres n'ayant été réalisées qu'une fois.

Ces résultats indiquent une expression augmentée des Nav1.5, Nav1.7 et du PAR-2 à 8 heures de différenciation. Ils montrent une augmentation de l'expression du Nav1.6 à 24 h de différenciation alors que l'expression du Nav1.7 a tendance à diminuer. Le Nav1.5 et le PAR-2 sont surexprimés pour tous les temps de différenciation testés comparés à l'état indifférencié, avec un maximum pour le PAR-2 à 16 heures de différenciation et à 8 heures pour le Nav1.5. Le PAR-2 est reporté préférentiellement exprimé *in situ* dans la couche granuleuse de l'épiderme (D'Andrea et al., 1998; Steinhoff et al., 1999). Ici, les résultats suggèrent un état de différenciation des kératinocytes *in vitro* équivalent à ceux de la couche granuleuse.

Ces résultats sont importants car ils confirment la présence des Nav channels sur les kératinocytes *in vitro* et les positionnent comme cible cellulaire potentielle des ciguatoxines.

L'état de différenciation des kératinocytes primaires *in vitro* est peu documenté dans la littérature scientifique. Un doctorant de notre équipe, Olivier GOUIN, a

travaillé avec des kératinocytes différenciés 16 heures. Il a caractérisé par RTqPCR et immunocytochimie (ICC) l'expression de certains marqueurs clés de la différenciation en les comparant aux kératinocytes indifférenciés. Ces marqueurs sont la cytokératine 14, un marqueur des cellules prolifératives et indifférenciées de la couche basale de l'épiderme, et l'involucrine, un marqueur de la couche épineuse et granuleuse où les kératinocytes sont à un stade intermédiaire de différenciation. Les résultats ont montré que les kératinocytes indifférenciés expriment la CK14 mais pas l'involucrine. Quant aux kératinocytes différenciés, l'expression de l'involucrine est présente et celle de la CK14 absente. Les kératinocytes différenciés 16 heures présentent une surexpression du PAR-2. Ces données démontrent que nous travaillons bien avec des kératinocytes différenciés à un stade "*Stratum granulosum*-like" après 16 heures en présence de calcium.

Ainsi, nous disposons d'arguments qualitatifs et quantitatifs validant l'utilisation de notre protocole de coculture optimisé, à savoir :

- > un support de culture approprié et un coating collagène associé,
- la culture des neurones seuls jusqu'à développement du réseau de neurites avant ajout des kératinocytes
- une étape d'adhérence des neurones à température ambiante avant incubation à 37°C,
- > la différenciation pendant 12-16 h des kératinocytes en coculture.

Ces modifications apportent une meilleure reproductibilité des cultures et une meilleure sécrétion de SP induite par la P-CTX-2.

Sur ce modèle optimisé, l'étude des médiateurs impliqués dans la libération de neuropeptides par la P-CTX-2 a pu être réalisée. Dans ce but, des inhibiteurs pharmacologiques de différentes cibles ont été choisis en connaissance de la physiopathologie à la fois du prurit et de la ciguatera. Ces cibles sont les canaux Na_v, le TRPV1, le TRPA1, PAR-2, les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) et l'échangeur sodium-calcium (NCX).

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale lors des 22èmes rencontres de la Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET) axée sur la thématique "Toxins: New targets and new functions" dont le résumé est publié dans une issue spéciale du journal Toxicon.

De plus, l'ensemble des résultats des chapitres 2, 3 et 4 étant destinés à faire l'objet d'un article **en préparation**, les chapitres qui vont suivre seront en anglais. La partie abstract/introduction sera commune aux 3 chapitres.

I. Involvement of PAR-2 in P-CTX-2-induced SP release from sensory neurons and keratinocytes coculture model

L'HERONDELLE K.¹, MISERY L.^{1,3}, LE GALL-IANOTTO C.¹, PHILIPPE R.⁵, MIGNEN O.⁵, TALAGAS M.⁴, LEWIS R. J.², LE GARREC R.¹

¹ Laboratory of Neurosciences of Brest (EA4685), University of Western Brittany, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France.

² Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St. Lucia, Queensland 4072, Australia

³ Department of Dermatology, Morvan University Hospital, 2 avenue Foch, 29200 Brest, France.

⁴ Department of Pathology, University Hospital of Brest, 2 avenue Foch, 29200 Brest, France.

⁵ INSERM U1078, University of Western Brittany, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France.

Corresponding author

Killian.LHerondelle@univ-brest.fr

Tel.: +33 298 016448

Fax.: +33 298 223422

Postal adress : Laboratory of Neuroscience of Brest (EA4685), University of Western Brittany, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France

II. Abstract

Ciguatera fish poisoning (CFP) is the most widespread seafood poisoning caused by the consumption of contaminated tropical fish flesh. This intoxication originates from ciguatoxins (CTXs) which are predominantly responsible of characteristic clinical cutaneous sensory troubles such as paresthesiae, cold dysesthesia and severe pruritus. CTXs are potent voltage-gated sodium channel activators but the following molecular mechanisms relating to the sensory disorders are still poorly understood. Previously, using a primary coculture model of sensory neurons and keratinocytes, we showed that Pacific-ciguatoxin-2 are able to induce a voltage-gated sodium channel-dependent release of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Le Garrec et al., 2016). Since those neuropeptides are involved in pain and itch

sensations, this ciguatoxin-induced effect may contribute to explain the sensory disturbances of ciguatera fish poisoning. In the present study, we made this prototypical model better and prospected the role of several mediators involved in the neurocutaneous effects of CTXs. Using this model coupled with calcium imaging experiments performed on neurons or keratinocytes separatly, we show that P-CTX-2-induced calcium signal is Na₂-dependent and, interestingly, PAR-2-dependent, thus highlighting for the first time the involvement of this target in effects induced by CTXs. Moreover, we give supplementary informations concerning signaling pathway consecutive to P-CTX-2 activation on sensory neurons and keratinocytes. Indeed, N-type Ca₂ channel blockade exhibited a mild inhibition, suggesting their importance in CTX-mediated signalling pathway in neurons. Finally, we provide findings of a striking synergistic role of keratinocytes in the CTX-induced SP release from the coculture and, interestingly, a direct CTX activation on keratinocytes.

Keywords: ciguatoxin, sensory, neuropeptide, calcium imaging, PAR-2

Abbreviations (à mettre à jour ultérieurement): BPE, bovine pituitary extract; BSA, bovine serum albumin; CaCl₂, calcium chloride; CGRP, calcitonin generelated peptide; CFP, ciguatera fish poisoning; CTXs, ciguatoxins; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DRG, Dorsal root ganglion; EGF, epidermal growth factor; EGTA, [Ca²⁺]₀, external calcium concentration; [Ca²⁺]_i, intracellular calcium concentration; KSFM, Keratinocyte-Serum Free Medium; MeOH, methanol; Ca_v, voltage-gated calcium channel; Na_v, voltage-gated sodium channel; P-CTX-1 and -2, Pacific ciguatoxin-1 and -2; SP, substance P; TTX, tetrodotoxin; NCX, sodium-calcium exchanger.

III. Introduction

The main primary molecular targets of ciguatoxins (CTXs) are the voltage-gated sodium channels (Nav channels). Thus, cutaneous sensory manifestations of ciguatera fish poisoning (CFP), namely mainly paresthesia, cold dysesthesia and itch, are highly likely due to the interactions of CTXs with those channels on afferents fibers, nociceptors and pruriceptors (Benoit et al., 2005). Substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), two well-known neuropeptides involved in itch and nociception pathophysiology (Metz et al., 2011b; Pedersen-Bjergaard et al., 1991; Schaible, 2006; Steinhoff et al., 2006), have been shown to be released from our model after CTX exposure (Le Garrec et al., 2016). Those findings are consistent with the 84 % CGRP-positive mouse DRG neurons responding to Pacific-ciguatoxin-1 (P-CTX-1) (Vetter et al., 2012) and CGRP detected in rat skin after intradermal P-CTX-1 injection (Zimmermann et al., 2013). However, molecular processes that lead to this secretion remain little explored.

Substance P is a neuropeptide which belongs to the tachikynin family and its cognate receptor is NK1R. It is widely demonstrated that SP takes part in inflammatory and pruritic skin disease, as well as in pain, and can be used as a reliable neuropeptide marker (Steinhoff et al., 2006; Wallengren, 2005). Both intraepidermal nerve fiber and keratinocytes were reported to express SP and its cognate receptor (Bae et al., 1999; Reilly et al., 1997). Moreover, our previous study exhibited the P-CTX-2 potency to elicit SP release from sensory neurons cocultived with keratinocytes. Taken together, those elements argue for the use of this *in vitro* model to explore cellular pathway originating from SP release. Based on both SP release and calcium imaging experiments, the aim of this study is to explore molecular signalling pathway involved in SP exocytosis elicited by P-CTX-2.

Tetrodotoxin (TTX), the tradionnally used inhibitor to counteract CTX effects, binds and blocks voltage-gated sodium channels (Na_v channels) (Lombet et al., 1987). It has been demonstrated that micromolar concentrations of TTX block both TTX-resistant and TTX-sensitive Na_v channels (Roy and Narahashi,

1992). Even if TTX cannot be used as therapeutic drug because of its high toxicity, it remains a good tool to characterize sodium channels (Blankenship, 1976) and Na_v channels remains prominent targets to treat refractory pruritus and pain (Lee et al., 2014). Use of lidocaine and derivatives (tocainide) which also block Na_v channels has exhibited *in vitro* (Benoit and Legrand, 1991) and *in vivo* (Cameron and Capra, 1993; Lange and Kreider, 1989) interesting reduction of CTX-evoked effects. As well, some case reports of cholestatic pruritus reported transitory pruritus reduction by intraveinous lidocaine treatment (Fishman et al., 1997; Pogatzki-Zahn et al., 2008; Villamil et al., 2005).

Besides, it is clearly established that calcium is a pivotal second messenger, whose intracellular increase is necessary for neuromediator exocytosis, especially for SP release from DRG neurons (Oshita et al., 2005; Tang et al., 2006, 2008). The enhancement of P-CTX-2-induced neuropeptide release by increased extracellular calcium reported in our previous study suggested that P-CTX-2-induced exocytosis is dependent of external calcium concentration ($[Ca^{2+}]_0$). Indeed, intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) increase can be mediated by two main signaling pathways: 1) calcium uptake from extracellular compartment and 2) calcium mobilization from internal stores (Carafoli, 1987). Here, we studied inhibitory effect on P-CTX-2-induced SP release of antagonists targetting selected mediators known to be involved in both $[Ca^{2+}]_i$ increase and itch or effects of CTXs (see Table 1 in materials and methods section).

EGTA is widely used to obtain calcium-free extracellular medium and thus to highlight mechanisms independent of $[Ca^{2+}]_{\circ}$. Among mediators participating to calcium influx, voltage-gated calcium channels (Ca_v) are activated by depolarization (Catterall et al., 2005). Gabapentin and pregabalin, which are known to alter Ca_v channel function (Sills, 2006), has been partially effective to fade neurological disorders in CFP cases (Brett and Murnion, 2015; Perez et al., 2001) but there are no neurocellular evidences proving that Ca_v channels are involved in effects mediated by CTXs. However, CTXs binding on Na_v channels lead to Na⁺ influx and subsequent membrane depolarization which positioned Ca_v channels as potential candidates in CTX-induced cellular

effects. Moreover, N-type selective Ca_v channel inhibitor was validated in itchinduced animal model (Maciel et al., 2014) and others Ca_v channel inhibitors were efficient for numerous refractory pruritus to anti-histamine drugs (Gunal et al., 2004; Mendham, 2004; Winhoven et al., 2004). Since expression of N/Ltype but not P/Q-type Ca_v channels has been reported in the skin (Kress et al., 2001), here, we prospected the participation of N-type and L-type Ca_v channels using their respective antagonists, ω -conotoxin and nifedipine.

NCX has been suspected to play a role in CTXs-evoked acetylcholine release since a while (Molgó et al., 1993a) and has been later shown to enhance acetylcholine release (Gaudry-Talarmain et al., 1996). The sodium-calcium exchanger (NCX) is a pump regulating intracellular calcium level in many cell types in concert with other plasma membrane pumps. In normal conditions, NCX expels calcium thanks to the high external sodium concentration. In conditions -often pathophysiological- where internal sodium levels are increased, NCX can act in a reverse-mode, allowing calcium uptake against sodium ejection. Three NCX isoforms are expressed in DRG neurons, and intraepidermal nerve fibers preferentially express NCX2 (Persson et al., 2010; Verdru et al., 1997). In this study, we prospected reversed mode of NCX involvement in P-CTX-2-induced SP release by using KB-R7943 (Iwamoto, 2004).

In addition, we focused our interest on TRPV1 and TRPA1, belonging to Transient Receptor Potential (TRP) channel family which are non-selective cationic channels. TRPV1 and TRPA1 are thermosensors involved in burning pain elicited by noxious hot (\geq 43°C) and noxious cold (\leq 17°C), respectively (Kwan and Corey, 2009; Willis, 2009). Various others exogenous and endogenous factors are able to activate those channels (McMahon and Wood, 2006). Moreover, TRPV1 is known to be a mediator in pruritus (Imamachi et al., 2009; Shim et al., 2007) and is role in pain is well demonstrated (Riera et al., 2014). Interestingly, a ciguatoxin congener called gambierol, supposed as a player in CFP (Fuwa et al., 2004; Inoue et al., 2003; Ito et al., 2003), has been shown to potentiate TRPV1 activity by an allosteric effect what has been suggested to play a key role in unusual temperature perception occuring in CFP

(Cuypers et al., 2008). Concerning TRPA1, its involvement in pruritus has been widely proved (Liang et al., 2011; Oh et al., 2013; Wilson et al., 2011) and recent studies highlighted its prominent role in CTX-evoked cold allodynia (Patel et al., 2015; Vetter et al., 2012). Here we used AMG9810 and HC030031 as selective inhibitors of TRPV1 and TRPA1, respectively.

Although no studies have reported PARs in CTXs effects, this work has been highly interested in the protease activated receptor PAR-2, a seventransmembrane domain receptor coupled to intracellular G proteins (also named GPCR) whose activation is induced by proteolytic cleavage of the extracellular N-terminus (Vergnolle et al., 2003). Its activation leads to intracellular Ca²⁺ mobilization from internal stores through InsP3 receptor activation (Böhm et al., 1996; Wilson et al., 2011). PAR-2, which is expressed by both keratinocytes and sensory neurons, is a now well-known mediator of pruritus (Steinhoff et al., 2003). Although proteinases (e.g. from Mucunia pruriens powder, also named cowhage) were proven as itch mediators several decades ago (Törok, 1907 in Shelley and Arthur, 1957), PAR-2 activation has only recently been clearly established as a distinct itch pathway from that of histamine. Indeed, antihistamine treatment is ineffective to block cowhageevoked itch (Kosteletzky et al., 2009; Namer et al., 2008). In addition, PAR-2 has been demonstrated to play a pivotal role in pivotal role in hyperalgesia (Vergnolle et al., 2001) as well as cutaneous neurogenic inflammation since its activation leads to release of both SP and CGRP (Steinhoff et al., 2000 ; Luger, 2002). Here, we study PAR-2 involvement in P-CTX-2-induced SP release by using GB83 as selective PAR-2 inhibitor (Barry et al., 2010).

IV. Material and methods

IV.1. Reagents

Keratinocyte-Serum Free Medium (KSFM) with L-glutamine, EGF (epidermal growth factor), and BPE (bovine pituitary extract) obtained as a kit from Life Technologies (Saint Aubin, France) was supplemented with 100 g/mL Normocin® (Cayla-InvivoGen, Toulouse, France). B27 was obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France). Collagenase IV, poly-D-lysin, nerve growth factor (NGF), insulin, hydrocortison, bovine serum albumin (BSA), nifedipine (Ltype Ca_v blocker) and KB-R7943 (Na⁺/Ca²⁺ exchanger antagonist) were provided by Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). BDNF was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, CA, USA) and ω -conotoxin GVIA (selective N-type Ca_v2.2 blocker) from Smartox (Saint Martin d'Hères, France). Protease inhibitor Coktail was provided from Roche (Meylan, France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium + Ham's F-12 Medium (DMEM/F12) supplemented with 100 g/mL Normocin® and trypsin-EDTA were purchased from Lonza (Verviers, Belgium). Pacific ciguatoxin-2 (P-CTX-2, > 90 % purity) was isolated from moray eel (Gymnothorax javanicus) livers as previously described (Lewis et al., 1991) and provided by R. Lewis (Institute of Molecular Biosciences, Brisbane, Australia). Methanol MeOH:water (1:1) and P-CTX-2 stock solutions were diluted in DMEM:DMEM/F12 (50:50) supplemented with Normocin®. Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Latoxan (Valence, France). GB83 (PAR-2 antagonist) was obtained from Axon Medchem (Groninger, Netherland).

Antagonists	Targets
Tetrodotoxin (100 μM)	TTX-resistant and TTX-sensitive Na_v channels
Tetrodotoxin (300 nM)	TTX-sensitive Nav channels
HC030031 (30 μM)	TRPA1
AMG9810 (1 µM)	TRPV1
Benzamil (1 μM)	NCX
KB-R7943 (0.5 μM)	Selective reverse-mode NCX
GB83 (50 μM ; 5 μM)	PAR-2
Nifedipine (1 µM)	L-type Ca _v channels
ω-conotoxin GVIA (1 μM)	N-type Ca _v channels

Table 1: Antagonists used in this study and associated targets

IV.2. Coculture of rat DRG neurons and human keratinocytes

Rat sensory neurons were obtained as previously described (Lebonvallet et al., 2012) with modifications (Le Garrec et al., 2016). In brief, dorsal root ganglia were extracted from newborn Wistar rats and dissociated neuronal cell suspension was filtered and seeded in wells. Animal experimental procedures were performed in accordance with the French Ministry of Agriculture and the European Communities Council Directive 2010/63/UE and approved by the local veterinary authority.

Human skin samples were obtained from healthy adult donors undergoing abdominal reduction surgery after informed consent. Dissociated human epidermal keratinocytes were obtained as previously described (Le Gall-lanotto et al., 2012).

Coculture model from our previous study (Le Garrec et al., 2016) has undergone some modifications in order to get better neurite outgrowth, limited neuron clumps and potentiated neuropeptide release. DRG neurons were seeded on 96 well-plates at a rate of one newborn rat for 12-14 wells in DMEM + DMEM/F12 (v/v 50%) supplemented with Normocin® (100 g/mL), B27 (20 μ L/mL), NGF (100 ng/mL), insulin (4 μ g/mL), BDNF (20 ng/mL) and hydrocortison (10 ng/mL), then incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After 5-7 days of culture, medium was gently removed from wells and keratinocytes were seeded on neurons at a density of 20.000-25.000 cells per well in complete KSFM. Cocultures were maintained for at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere to allow keratinocytes proliferation. For monoculture experiments, keratinocytes were seeded on free wells and neurons monoculture only undergone a medium replacement by KSFM. At subconfluence, medium was replaced by DMEM + DMEM/F12 (v/v 50%) for 12 to 16 hours to induce keratinocyte differentiation.

IV.3. Coculture treatments with antagonists and P-CTX-2

Cocultured cells were treated with pharmacological antagonists (applied at concentrations specified in Table 1) 15 minutes before exposure to P-CTX-2 (10 nM or otherwise specified as final concentration in a final volume of 100 μ L DMEM + DMEM/F12 (v/v 50%) supplemented with Normocin®) or its vehicle (MeOH:water 1:1 diluted in the same medium). Treatments were applied for 90 min at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Supernatants from each condition performed in triplicate were then pooled in presence of protease inhibitor cocktail, centrifuged to remove floating cells and stored at -20°C for later neuropeptide measurements.

IV.4. SP and CGRP enzyme immunoassays (EIA)

The levels of SP and CGRP in the supernatants were quantified using SP EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA) and CGRP (rat) EIA kit (SPI-Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France) following the manufacturer's

instructions as previously described (Chéret et al., 2014). Levels of neuropeptides were obtained in pg/mL.

IV.5. Data analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The levels of released neuropeptides (NP in pg/mL) obtained in the different conditions were expressed as a percentage of those obtained in control conditions, calculated by the following formula: % of CTX-induced release = (NP_{CTX+x} - NP_{MeOH+x}) / (NP_{CTX} - NP_{MeOH}) x 100, where x is an antagonist. Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA) and test choice details are indicated in figures' legends. Differences were considered statistically significant if p value was less than 0.05.
V.Results

V.1. Inhibitory effect of selected antagonists in P-CTX-2-evoked SP release



Figure 16: Effects of different inhibitors on P-CTX-2-evoked SP release. TTX 100 μ M (n = 10), HC030031 30 μ M (n = 16), AMG9810 1 μ M (n = 16), Benzamil 1 μ M (n = 12), EGTA 2 mM (n = 6), GB83 50 μ M (n = 7), nifedipine 1 μ M (n = 5), ω -conotoxin GVIA 1 μ M (n = 5) and KB-R7943 0.5 μ M (n = 4) have been incubated with cells before P-CTX-2 activation (10 nM). Normalized values are expressed as Mean ± SEM and statistical analysis was performed using multiple comparison one-way ANOVA with Dunett's post test. ****p<0.0001, ***p<0.001, ***p<0.001, ***p<0.05.

Results from Fig. 16 show that P-CTX-2-induced SP release was significantly decreased by TTX (28.05 \pm 9.55 %), GB83 (0.706 \pm 0.71 %) and EGTA (85.03 \pm 13.35 %) conditions. TTX 100 μ M as well as EGTA 2 mM decreased 4-fold the released SP levels whereas GB83 totally abolished the release. TRPV1 (106.1 \pm 15.62 %), TRPA1 (94.77 \pm 15.18 %) and NCX (153.1 \pm 49.44 %) had

no inhibitory effect on CTX-induced SP release. Although their inhibitory effects were not significant, an inhibitory trend is visible for ω -conotoxin (70.97 ± 18.25 %) and, in a lesser extent for nifedipine (80.8 ± 19.82 %). Given the striking inhibitory effect of GB83, in the aim to ensure that it was not due to an effect towards Na_V channels, we studied its inhibitory effect against membrane depolarization induced by veratridine in HEK cells heterologously expressing each isoforms of Na_V channels, with the exception of Na_V1.9. In those transfected cells, 5 µM of GB83 had no effect on veratridine concentration-response curves and 50 µM had little effects (supplementary data, Figure 17). Furthermore, inhibitory effect of GB83 5 µM against SP release induced by P-CTX-2 was as striking as 50 µM (supplementary data, Figure 18). These results demonstrate that PAR-2 is involved in P-CTX-2-evoked SP release.

VI. Discussion

VI.1. Role of Nav channels in CTX-induced SP release

Micromolar range of TTX inhibited around 70% of P-CTX-2-evoked SP release. At this concentration, both TTX-r and TTX-s Nav are blocked (Roy and Narahashi, 1992). These data demonstrate that SP release is a VGSC-dependent mechanism, involving TTX-s and/or TTX-r Nav channels. Our results are relevant with prior studies showing effective antagonism by TTX of CTXs-induced cellular effects [e.g. in neuromuscular junctions (Molgó et al., 1990b), nerve myelinated fibers (Benoit et al., 1996; Mattei et al., 1999a), chromaffin cells (Mattei et al., 2008), rat myotubes (Hidalgo et al., 2002), cholinergic synaptosomes (Molgó et al., 1993a), neuroblastoma cells (Molgó et al., 1993b) and atria and papillary muscles (Lewis, 1988)]. More recent studies have highlighted TTX-r in addition to TTX-s Nav channels as involved targets in CTX-induced SP in the latter, which suggest that both types of Nav channels are involved in the induced SP release studied here.

Both TTX-r (Na_v1.8) and TTX-s (Na_v1.6, Na_v1.7) VGSC expression have been demonstrated on free nerve endings in epidermis (Persson et al., 2010). Interestingly, keratinocytes which are non excitable cells express Na_v1.5, Na_v1.6 and Na_v1.7 (Zhao et al., 2008) and are able to release SP (Bae et al., 1999). Such findings suggest that keratinocytes may contribute in P-CTX-2-induced SP release from the coculture.

VI.2. Calcium influx, key process in P-CTX-2evoked SP release

Here, we reported that P-CTX-2-induced SP release from our model is strongly reduced in calcium-free extracellular medium, consitently with our previous results. This finding demonstrate that calcium influx is necessary for SP exocytosis elicited by P-CTX-2 from our coculture, as it was shown for that from rat DRG neurons in response to potassium depolarization (Perney et al., 1986). Furthermore, extracellular calcium has been demonstrated to be indispensible for CTX-induced acetylcholine release from cholinergic synaptosomes model (Molgó et al., 1993a), whereas its quantal release from neuromuscular junction evoked by P-CTX-1 was a $[Ca^{2+}]_0$ -independent mechanism (Molgó et al., 1990b) as well as P-CTX-1-induced $[Ca^{2+}]_1$ increase in mouse NG108-15 cells (Molgó et al., 1993b) and rat myotubes (Hidalgo et al., 2002). Most part of $[Ca^{2+}]_1$ increase induced by P-CTX-2 in our coculture model thus appears to be mediated by a calcium influx, whose mediators we explored in this study are Ca_v channels, TRP channels or NCX.

VI.3. Role of Ca_v channels in P-CTX-2-mediated SP release

No significant inhibition but a partial decrease of the SP relase was obtained by the studied VGCC inhibitors, with a higher inhibitory effect of ω -conotoxin GVIA than that of nifedipine. These results suggest a contribution of N-type, and in a lesser extent, of L-type Ca_v channels in the P-CTX-2-induced SP release from

the coculture. These results are consistent with previous studies in which Ca_v channels are involved in SP release induced from various cell types by other stimuli (Holz et al., 1988; Lundberg et al., 1992; Perney et al., 1986), with N-type channels more often implicated in sensory neurons (Lundberg et al., 1992). To our knowledge, the involvement of Ca_v channels in CTX effects has never been reported. However, their activation consecutive to a sufficient depolarization could be restricted to sensory neurons on which CTXs have been little studied.

VI.4. Role of NCX system in P-CTX-2-mediated SP release

Neither benzamil nor KB-R7943 used to distinguish general NCX system blockade from reverse-mode inhibition exhibited any inhibitory effect of P-CTX-2-evoked SP release, indicating that NCX is not involved. In contrast, previous works suspected involvement of NCX system in P-CTX-1-evoked acetylcholine release from cholinergic synaptosomes, based on experiments whereby Li⁺ replaced Na⁺ and the use of bepridil and cietedil as NCX blockers (Gaudry-Talarmain et al., 1996; Molgó et al., 1993a), A recent study showed that Na⁺ substitution by Li⁺ prevented P-CTX-1-evoked action potential firing as well as nodal swelling on nerve fiber model, indicating that inhibitory effect of Li⁺ substitution is more likely due to the absence of Na⁺ influx through Na_v channels (Mattei et al., 2014b). Additionally, unspecificity of bepridil and cetiedil has been reported at low doses (Iwamoto, 2004). Such elements cast doubt on NCX involvement in cellular CTX effects observed in prior studies. Furthermore, our findings do not support NCX as potential mediator involved CTX-mediated SP release.

A. Role of TRPV1 and TRPA1 in P-CTX-2-mediated SP release

We explored the role of TRPV1 and TRPA1 in P-CTX-2-evoked SP release and no changes have been observed using their respective inhibitors compared to

control conditions. The role of TRPV1 and TRPA1 in CTXs-mediated neurosecretory effects has never been explored but were suspected in CFP pathophysiology (see introduction section). Our results indicate that TRPA1 and TRPV1 are not involved in the SP exocytosis induced by P-CTX-2. However, since activation/sensitization of these TRP channels has been involved in downstream steps following pruriceptors and nociceptors activation (Bautista et al., 2014; Veldhuis et al., 2015), their role can not be exclude in more downstream events leading to itch and other sensory disorders during CFP.

B. Role of PAR-2 in P-CTX-2-mediated SP release

Data showed that GB83 which antagonizes PAR-2 abolished P-CTX-2-evoked SP release. This result is of major importance in the study of the pathophysiology of the CFP: indeed, this study which was the first to explore the role of PAR-2 in neurocellular effects of CTXs demonstrated its potent role in CTX-mediated SP release. Since PAR-2 has been demonstrated to mediate both pruritus (Steinhoff et al., 2003) and abnormal pain (Vergnolle et al., 2001), it appears as a promising candidate to relieve both sensory disturbances developing during CFP. In addition PAR-2 activation was shown to lead to membrane depolarization by inhibiting a voltage-gated K⁺ channel (Kayssi et al., 2007; Linley et al., 2008). It could thus potentializate depolarization induced by CTX-activated Na_V channels. Furthermore, since there is no evidence of binding of CTXs to voltage-gated K⁺ channels, it could be interesting to explore PAR2 activation role in their inhibitory action of these channels.

VII. Supplementary data

VII.1. Material and methods

A. Cell line and culture

HEK293 cells (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA, USA) were maintained at 37°C in a 5 % humidified CO₂ incubator in DMEM containing 10 % heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, pyridoxine and 110 mg/mL sodium pyruvate. Cells were split every 4–6 days or when approximately 90 % confluent in a ratio of 1:5 to 1:10 using 0.25 % trypsin/EDTA and subcultured into T-75 cm^2 tissue culture flasks.

B. Measurement of intracellular Ca²⁺ responses

To assess increases in intracellular Ca^{2+} in response to addition of veratridine, HEK cells were seeded on uncoated on black-walled imaging plates (Corning, Lowell, MA, USA) 48 h prior to the experiment. Seeding densities were 50 000 cells/well, resulting in 90–95 % confluent monolayers on the day of Ca^{2+} imaging.

Cells were loaded for 30 min at 37°C with a membrane potential dye in physiological salt solution (PSS; composition NaCl 140 mM, glucose 11.5 mM, KCl 5.9 mM, MgCl₂ 1.4 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 10 mM) containing in addition 0.3% BSA. After 2 washes with PSS, cells were transferred to the FLIPR^{TETRA} (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) fluorescent plate reader and membrane potential responses measured using a cooled CCD camera. Camera gain and intensity were adjusted for each plate to yield a minimum of 1000 arbitrary fluorescence units (AFU) baseline fluorescence. Prior to addition of agonists, 10 baseline fluorescence readings were taken every 2 seconds for 300 s.



Figure 17: Dose-response curves of GB83 effect on veratridine-induced membrane depolarization in transfected HEK cells with Na_v isoform (Na_v1.1-1.8). Data are are expressed in arbitrary membrane potential unit (AMPU) and a GB83 range from 100 μ M to 1 μ M has been evaluated. Dotted line indicates 5 μ M effect and dashed line 50 μ M.



Figure 18: Effect of GB83 5 μ M on P-CTX-2-induced SP release (pg/mL) GB83 5 μ M (n = 1) and control condition (P-CTX-2 10 nM).





Figure 19: Effect of different drugs on P-CTX-2-induced SP release: GB83 5 μ M (n=1), U73122 (n=4), BimX (n=1) and Gallein (n=1) compared to control condition (P-CTX-2 10 nM).

Les résultats obtenus sont préliminaires car les expériences n'ont été réalisées qu'une fois. Ils mettent en avant des éléments de la signalisation qui restent néanmoins à confirmer.

Les protéines G sont intracellulaires, liées aux RCPGs et sont constituées de deux sous-unités G α et G $\beta\gamma$ sous leurs formes inactives. Quand le RCPG est activé par son agoniste, la sous-unité G α va se dissocier de G $\beta\gamma$ et induire une signalisation en aval. G $\beta\gamma$ est bien connue pour activer la PLC, transformant le PIP2 en IP3 et DAG (Camps et al., 1992; McCudden et al.; Nystedt et al., 1994). Il en découle une déplétion des réserves intracellulaires par l'IP3. Cette signalisation a été identifiée comme existant suite à l'activation de PAR2 à l'origine de la libération de SP (Tang et al., 2006). D'un autre côté, le DAG

active la PKC, connue pour son rôle dans la libération de SP (Barber and Vasko, 1996; Miyano et al., 2009).

BimX (inhibiteur de la PKC) et galléine (inhibiteur de la sous-unité βγ de la protéine G), appliqués séparément, entrainent chacun une diminution d'environ 60% de la sécrétion de SP induite par la PCTX-2.

Ces données, corrélées à celles obtenus sur jonction neuromusculaire, myotubes de rat, lignée NG108-15 et cellules chromaffines (Hidalgo et al., 2002; Mattei et al., 2008; Molgó et al., 1990a, 1993c; Nguyen-Huu et al., 2010) démontrent un mécanisme d'activation des Nav par les CTXs conduisant à la déplétion des réserves intracellulaires via l'IP3. Il est admis qu'une augmentation de calcium intracellulaire conduit à l'exocytose. Cependant, sans calcium extracellulaire, il a été montré que les CTXs perdaient leur potentiel à induire une sécrétion de neuromédiateurs. Cela suggèrerait l'implication d'un phénomène "Store Operated Channel Entry" dans la signalisation induite par les CTX qui conduirait à une entrée soutenue de calcium nécessaire à l'exocytose. Bien que ce mécanisme ait été exclu de la signalisation des CTXs sur cellules chromaffines, il ne représente qu'environ 1% de la sécrétion totale de catécholamines (Nguyen-Huu et al., 2010). La question se pose quant à la pertinence du modèle pour démontrer l'implication ou non d'un SOCE. A notre connaissance, aucune étude n'établit une quelconque relation de signalisation entre Nav et la déplétion des réserves intracellulaires ou l'activation de RCPG. Nos résultats précédemment décrits évoquent pourtant l'implication de RCPGs dans la sécrétion induite de SP par la P-CTX-2, à savoir le PAR-2. Ce résultat est le point fort de ce chapitre car c'est la première fois que la participation d'un RCPG est démontrée dans les effets médiés par les CTXs et que ce récepteur est aussi connu pour son rôle dans le prurit, la douleur et l'inflammation.

IX. Synthèse sur le chapitre

IX.1. Conclusions

Ce chapitre a été dédié à l'étude de différents médiateurs impliqués dans la sécrétion de SP induite par la P-CTX-2. Dans notre modèle de coculture, les résultats de dosage ont montré que ce relargage de SP : est un mécanisme dépendant de l'activation des Na_v,

- nécessite un influx de Ca²⁺ extracellulaire et exclut le TRPV1, le TRPA1, et l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ comme médiateurs jouant un rôle majeur dans cet influx,
- reste discutable pour le rôle des Cav qui semblent contribuer, sans être les médiateurs majeurs à l'origine du relargage de SP
- et positionne le récepteur PAR-2 comme élément crucial dans ce phénomène.

IX.2. Perspectives

En gardant comme objectif la publication de ces résultats, des expériences supplémentaires seront réalisées pour :

 confirmer de manière indiscutable l'implication du PAR-2. Pour cela, nous envisageons l'utilisation d'un siRNA et/ou d'antiprotéases spécifiques de sérine protéases ciblées. Le GB83 à 5 µM s'est montré aussi efficace qu'à 50 µM mais il est nécessaire de répéter les expériences.

- explorer les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la [Ca²⁺]_i induite par la P-CTX-2 via l'activation du PAR-2, et plus

précisément en explorant le phénomène SOCE dans la signalisation induite par les CTXs avec le protocole suivant :

1) prétraiter les cellules avec de la thapsigargine en l'absence de calcium extracellulaire ($[Ca^{2+}]_e$) (i.e, déplétion des réserves intracellulaires)

2) perfuser avec du $[Ca^{2+}]_e$ pour obtenir le profil du mécanisme SOCE (contrôle). Même expérience avec 1) prétraitement des cellules avec la thapsigargine 2) avec la CTX sans $[Ca^{2+}]_e$ puis 3) perfuser avec du $[Ca^{2+}]_e$.

Dans le but d'approfondir la signalisation induite par la P-CTX-2 à la fois sur neurones sensoriels et sur kératinocytes séparément, nous avons réalisé des expériences d'imagerie calcique. Ces travaux vont être exposés dans les chapitres suivants.

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats d'imagerie calcique obtenus sur neurones sensoriels de rat en réponse à la P-CTX-2 seule ou en présence de différents antagonistes pharmacologiques. Pour des raisons techniques et de matériel, nous n'avons pas pu réaliser les expériences d'imagerie calcique sur coculture directement. Comme dans le chapitre précédent, la suite est rédigée en anglais dans l'optique d'une soumission d'article. Nous détaillerons uniquement la partie "Materials and methods" concernant l'imagerie calcique pour éviter les redites avec les autres chapitres.

I. Materials and methods

I.1. Culture of rat DRG neurons

Rat sensory neurons were obtained as previously described (Lebonvallet et al., 2012) with minor modifications (Le Garrec, 2015). Dorsal root ganglia were extracted from newborn Wistar rats. Then, DRG have been chemically and physically dissociated, using collagenase IV and trituration, respectively. Dissociated neuronal cell suspension was filtered and seeded in wells. Animal experimental procedures were performed in accordance with the French Ministry of Agriculture and the European Communities Council Directive 2010/63/UE and approved by the local veterinary authority.

I.2. Calcium imaging experiments in neurons and keratinocytes

For Ca²⁺ imaging, experiments, cells were plated on PDL-coated glass coverslips. Changes in cytosolic Ca²⁺ concentration were measured using Fura-2 probe (Thermo Fisher Scientific, Molecular probes, F-1221). Cells were loaded with 4 μ M Fura-2/AM plus 2 μ M pluronic acid (24040-032, Gibco) for 45 minutes in the dark at 37°C in a medium containing (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, pH adjusted at 7.45 with NaOH.

Cells were washed twice and equilibrated for 10-15 minutes in the same buffer to allow de-esterification of the dye. Ratiometric images of Ca²⁺ signals (340 nm / 380 nm) were obtained using a microscope (IX71, Olympus) equipped with a monochromator illumination system (Polychrome V, TILL Photonics). Emission was collected through a 415DCLP dichroic mirror, by a 14-bit CCD camera (EXiBlue, Qimaging). Image acquisition and analysis were performed with the Metafluor 6.3 software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Region of interests (ROIs) choosed on Metafluor were clearly defined by single DRG neurons with tidy calcium response (i.e not aberrant). DRG neurons were considered as responders if 10 nM of P-CTX-2 exhibited a 340 / 380 nm ratio increase of at least 0.15 after 2 minutes following injection. Experiments were performed at room temperature in the same HEPES-buffered solution. Ciguatoxin was injected manually to limit amount consumed.

I.3. Data analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Calcium imaging data were normalized using this formula: $\Delta R/R = (F-F0)/F0$ where F is a ratiometric value at a given moment and F0 the average of the first values (baseline) before any cell treatments. Outliers were removed from analysis using ROUT method (with Q set to 1%) in each condition of each experiment. Amplitude values are reported only from cells responding to CTX alone and the average of maximal values, in each cells, for each phase, have been calculated from all responding cells. Then, averages have been normalized considering as 100 % the mean of responses to CTX alone obtained from all experiments performed. For keratinocytes, values were non-normalized.

Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA) and details are indicated in figures' legends. Differences were considered statistically significant if p value was less than 0.05.

II. Results

II.1. Calcium imaging experiments in DRG neurons

A. Typical pattern of calcium responses to P-CTX-2



Figure 20: Two representative patterns (blue and dark lines) of calcium responses of neurons to P-CTX-2 10 nM. Calcium signals from P-CTX-2-evoked neurons activation is decomposed in 3 steps: 1) a first quick [Ca²⁺]_i at P-CTX-2 injection named "first peak", 2) a second phase where a so-called "second peak" appears and 3) a long-lasting and sustained calcium "plateau" which almost never came back to the baseline. Vehicle control condition MeOH 0.05 % has no effect on [Ca²⁺]_i (data not shown).

Although heterogenous, neuron calcium responses induced by P-CTX-2 can be represented mostly by the pattern presented in Figure 20. From this, we reported three consecutive steps (as described in legend): first peak, second peak and plateau. According to all calcium imaging experiments conducted on neurons, it has been observed that responses from P-CTX-2 activation were heterogenous due to different neuron subpopulations. We broke down this

calcium pattern in the presented 3 distinct phases in order to explore chronological involvement of each mediator assessed by using antagonists. Based on these 3 descriptive calcium phases, 3 parameters were recorded: 1) percentage of cell responding to the first peak, and amplitude values associated wich have been normalized, 2) percentage of cells responding with the second peak with normalized amplitude values associated, 3) and plateau values from all responding cells.



B. Study of mediators involved in P-CTX-2-induced calcium response in DRG neurons

Figure 21: Effect of different antagonists on P-CTX-2-evoked calcium response on the 1st peak. P-CTX-2 alone (control condition, n = 23), TTX 100 μ M (n = 5), TTX 300 nM (n = 7), GB83 5 μ M (n = 8), EGTA 1 mM (n = 9), nifedipine 1 μ M (n = 9), w-conotoxin 1 μ M (n = 8) and KB-R7943 0.5 μ M (n = 6) have been tested. Percentage of responding cells and amplitude values from antagonist conditions have been normalized compared to P-CTX-2 condition (control) and expressed as the mean ± SEM. They were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunett's post test for multiple comparisons. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Results from Fig. 21 indicated 46.4 ± 3.8 % of cells responding to P-CTX-2 with an averaged amplitude of 1 ± 0.0822 (raw data, not shown). Number of cells responding to P-CTX-2 were significantly decreased with TTX at micromolar $(15.2 \pm 7.9 \%)$ and nanomolar $(18.6 \pm 7.5 \%)$ concentrations, as well as with ω conotoxin (19.7 ± 5.9 %). EGTA (18.9 ± 8.4 %) and GB83 (16.9 ± 6.3 %) exhibited a significant inhibition of the same extent whereas AMG9810 (54 ± 5.6 %), nifedipine (37.7 ± 7.2 %) and KB-R7943 (38.1 ± 5.8 %) did not significantly affect the percentage of cells responding to P-CTX-2. Considering amplitude values associated to responding cells, nifedipine ($62 \pm 8.6 \%$) appeared to significantly diminish amplitude values even if the number of responding cells is not significantly different compared to CTX condition. For others antagonists, effects on amplitude values were correlated with the inhibitory effects seen on percentage of responding cells with amplitudes values of 45.5 ± 9.4 % in micromolar concentration of TTX, 34.3 ± 6.1 % in nanomolar concentration of TTX, 26.6 ± 5.4 % for GB83 condition, 31.4 ± 5.4 % for EGTA condition and 46.2 \pm 10.7 % for ω -conotoxin condition. No significant amplitude decrease was noticed for nifedipine (62 ± 8.6 %), KB-R7943 (66.7 ± 18 %) and TRPV1 (83.9 ± 10.9 %). Those results show that VGSCs, $[Ca^{2+}]_{0}$, PAR-2 and N-type Ca_v channels but not TRPV1, NCX system in reverse-mode and L-type are crucial mediators initiating calcium signal in sensory neurons by P-CTX-2.



Figure 22: Effect of different antagonists on the second peak of the P-CTX-2-evoked calcium response. P-CTX-2 alone (control condition, n = 23), TTX 100 μ M (n = 5), TTX 300 nM (n = 7), GB83 5 μ M (n = 8), EGTA 1 mM (n = 9), nifedipine 1 μ M (n = 9), ω -conotoxin 1 μ M (n = 8) and KB-R7943 0.5 μ M (n = 6) have been tested. Percentage of responding cells and amplitude values from antagonists conditions have been normalized compared to P-CTX-2 condition (control) and expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis of percentage of responding cells was performed with Kruskall-Wallis multiple comparison followed by Dunn's post-test. Amplitude values were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunett's post test for multiple comparisons. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

As shown in Figure 22, $38.8 \pm 4.3 \%$ of cells exhibited a second peak in presence of CTX. For micromolar TTX ($8.2 \pm 4.9 \%$) and GB83 conditions ($8 \pm 2.2 \%$), most of the cells are considered as unresponding in term of second peak to CTX. A clear inhibitory trend, although not significant, was visible for TTX 300 nM ($18.6 \pm 9.6 \%$), more pronounced and significant for TTX 100 µM. In EGTA condition, there is no noticeable difference in percentage of responding cell ($31.6 \pm 12.9 \%$) compared to control but linked amplitude values ($34.3 \pm 10.8 \%$) are strongly decreased, suggesting an activation in most of cells in its presence but which is slight, i.e. whose magnitude remains very low. Considering responding cell percentages, a tendancy is also remarkable with

N-type (15.5 \pm 4.9 %) and L-type (37.5 \pm 9.4 %) Ca_v channel blockers with a higher inhibition on N-type Ca_v channels.



Figure 23: Effect of different antagonists on the plateau of P-CTX-2-evoked calcium response. P-CTX-2 alone (control condition, n = 23), TTX 100 μ M (n = 5), TTX 300 nM (n = 7), GB83 5 μ M (n = 8), EGTA 1 mM (n = 9), nifedipine 1 μ M (n = 9), ω -conotoxin 1 μ M (n = 8) and KB-R7943 0.5 μ M (n = 6) have been tested. Percentage of responding cells and amplitude values from antagonist conditions have been normalized compared to P-CTX-2 alone condition (control) and expressed as the mean ± SEM. They were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunett's post test for multiple comparisons (Fig., percentage of responding cells from Fig.). A non parametric Kruskal-Wallis test was conducted in this case following by Dunn's post test. **p* < 0.05.

Data concerning the plateau showed normalized amplitude values from the last step of the calcium pattern named "plateau". P-CTX-2 induced an averaged plateau of 0.2221 \pm 0.03162 (raw data, not shown) which have been considered as 100 %. In the presence of TTX 100 μ M (4.4 \pm 1.8 %), GB83 (20.9 \pm 9.4 %) and EGTA (33.8 \pm 14 %) added prior to P-CTX-2, plateau amplitude was significantly decreased (4.4 \pm 1.8 %, 20.9 \pm 9.4 % and 33.8 \pm 14 %, respectively). Nanomolar TTX seemed have less effect on this phase of the P-CTX-2 response (46.7 \pm 17.4 %). A slight plateau inhibition is observed with ω -

conotoxin (49.9 \pm 13.6 %). A minor decrease appeared for NCX reverse-mode antagonist (66.2 \pm 18.1 %).

III. Discussion

III.1. Different calcium signatures highlighting several subpopulations of neurons

Calcium imaging experiments on sensory neurons have been performed to understand the molecular mechanisms subsequent to Na_v activation by P-CTX-2 and identify mediators leading to neuropeptide release. Although calcium responses of DRG neurons to P-CTX-2 were somewhat heterogenous, P-CTX-2-induced calcium signal, which reflects P-CTX-2-mediated neuronal activation has been described in three distinct parts in order to establish the chronology of events mediated by each studied inhibitor. In normal condition, intracellular calcium concentration is finely regulated and an increase is always followed by a subsequent decrease with return to basal level. Our data showed that P-CTX-2 evoked a calcium signal in which [Ca²⁺]_i never comes back to the basal level. We show that 45 % of total neurons responded to 10 nM of P-CTX-2. This is consistent with previous works that have shown that 1 nM of P-CTX-1, which is 10-fold more potent than P-CTX-2 (Lewis et al., 1991b). activated around 50 % of mouse DRG neurons (Vetter et al., 2012b).

III.2. Calcium response in neurons induced by P-CTX-2 is Na_v-dependent

Tetrodotoxin is a good tool to assess VGSC involvement and its use at micromolar or nanomolar concentrations allows to discriminate TTX-resistant and TTX-sensitive sodium current (Kostyuk et al., 1981; Roy and Narahashi, 1992). Considering their kinetics of activation, inactivation and sensitivity to TTX, Na_V channels have been overall classified as fast inactivating TTX-sensitive, slow-inactivating TTX-resistant and persistent TTX-resistant in DRG neurons (Dib-Hajj et al., 2002). In this study, micromolar and nanomolar concentrations were used to know the part of calcium signaling which is

mediated by TTX-r and/or TTX-s Na_v. From our results, in early events of the calcium signaling (1st peak), there is equal inhibition with micromolar and nanomolar concentrations of TTX, indicating that Nav channels that initiated the early calcium response are TTX-s. This finding is coherent with prior study showing that VGSC activation, mediated by hyperpolarizing shift in voltage dependence and steady state inactivation, was higher in TTX-s than TTX-r Nav channels (Strachan et al., 1999). In contrast, we observed that only micromolar TTX condition was effective to inhibit the second peak and, in more pronounced extend, the plateau. Thus, we demonstrated that TTX-r VGSC-dependent mechanism takes an important role in prolonging the P-CTX-2-mediated calcium signal which has been initiated through TTX-s VGSC activation. Those observations are relevant with previous work in which authors demonstrated that a significant increase in the rate of recovery from Nav inactivation has been reported for TTX-r but not TTX-s Nav channels (Strachan et al., 1999). To conclude, our findings show that TTX-s Nav channels play a pivotal role in early calcium events elicited by P-CTX-2 while TTX-r Nav channels are involved in late calcium signal of P-CTX-2. Furthermore, our data suggest that persistent TTX-r Na_v activation considerably contribute to long-lasting sustained $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by P-CTX-2 in sensory neurons.

III.3. PAR-2, a new GPCR in P-CTX-2- mediated calcium signalling

Here, we used GB83, a small molecule which is effective to inhibit responses from both trypsin and synthetic agonists in low concentration range (Suen et al., 2012). GB83 is also one of the last most potent PAR-2 antagonist to date whose potency was proved in preclinical model of inflammatory diseases (Barry et al., 2010; Lohman et al., 2012). Considering our calcium imaging assays, PAR-2 inhibition was strongly exhibited in all phases of neurons calcium profile, implying its crucial role in CTX-induced calcium signaling. Interestingly, PAR-2 appears to participate early in P-CTX-2-mediated response. Apart from this, experiments on transfected HEK293 cells (Na_v1.1 to Na_v1.8) did not display any GB83 interference on any Na_v channels below 10 μ M (supplementary data,

Figure 17). PAR-2 is expressed in sensory neurons (Dai et al., 2004) and some elements of its pathway have been discovered. PAR-2 activation induces G proteins and mediates several pathways such as PLC leading to $[Ca^{2+}]_{i}$ increase through internal store depletion (Amadesi et al., 2006), and DAG which leads to PKC activation (Rothmeier and Ruf, 2012). Accordingly, our calcium imaging experiment with PLC blocker exhibited 50 % of respondig cells. Among these cells, amplitude value normalized associated was around 30 % for the first peak, 50 % for the second peak and 30 % for the plateau (data not shown). This is consistent with intracellular process implying PLC pahway and our findings indicate PAR-2 as a pivotal mediator in intracellular signaling consecutive to CTXs activation on neurons. In priro studies, it has been demonstrated that voltage-dependent potassium channels are blocked by P-CTX-1 (Birinyi-Strachan et al., 2005a), leading to an neuronal hyperexcitability. Recently, PAR-2 has been reported to inhibit M-type potassium current, belonging to Kv7 channels, leading to an increase in neuronal excitability (Linley et al., 2008) and Kv7 channel agonists have been reported to suppress action potential firing (Gamper et al., 2006; Passmore et al., 2003; Peretz et al., 2007).

A. Involvement of calcium influx-dependent mechanism and role of N-type Ca_v channels

Results of our experiments performed in free-calcium solution supplemented with EGTA highlights a calcium influx as a non negligible part of the calcium response from the first peak. Interestingly, percentage of cells responding to P-CTX-2 with a second peak was not diminished whereas normalized amplitude values associated where greatly decreased, indicating that a weak $[Ca^{2+}]_i$ increase occured in most of the cells in the absence of external calcium. The simpliest hypothesis for this observation is that the complete P-CTX-2-mediated calcium 2^{nd} peak-response is not reached because of the lack of calcium influx from extracellular compartment. Our results are correlated with previous one in which rat myotubes exposed to P-CTX-1, bathed in Ca²⁺-free solution, exhibited a transient $[Ca^{2+}]_i$ increase (Hidalgo et al., 2002). Analogous results have been found on mouse NG108-15 cells whereby P-CTX-1-induced

 $[Ca^{2+}]_i$ increase is mediated through Na_v-dependent mechanism following by Ca²⁺ internal store depletion via InsP3 receptor (Molgó et al., 1993b). From different cell types, those findings suggest a Na_v-dependent calcium signalling pathway, $[Ca^{2+}]_o$ -independent to be initiated by needing calcium influx to be sustained. This calcium influx can be provided by activation of different channels or receptors. We explored here different possibilities which can be behind this calcium entry from extracellular medium such as Ca_v channels, TRP channels and NCX exchanger.

On one hand, we focus a part of our work on TRP channels. Despite of interest in those channels (see introduction section), antagonized TRPV1 did not altered any steps of calcium profile on DRG neurons. We conclude that TRPV1 is not involved in P-CXT-2-mediated effects in our conditions.

On the other hand, our results exhibit that N-type voltage-gated calcium channels participate in early calcium influx and in delayed calcium response (not significant but visible) as do, in a much lesser extent, L-type Ca_v channels. These data are consistent with the fact that N-type Ca_v channel inhibitors markedly blocked pruritus in several animal model of itching (Maciel et al., 2014). Although no in vitro studies showed Cav channels involvement in CTXevoked [Ca²⁺]_i increase, clinical studies have reported therapeutical use of voltage-dependent calcium channel blockers in cases of CFP. Gabapentin and pregabalin, known to bind $\alpha 2\delta$ -1 subunit of Ca_v channels, have been reported for their potency to completely blur neurological CFP signs even though they slightly reappeared once treatment cessed (Brett and Murnion, 2015; Perez et al., 2001). Nifedipine, a L-type Cav channel blocker, has been reported to relieve headaches during CFP (Calvert et al., 1987). Gabapentin and pregabalin have been effective in the treatment of refractory pruritus to antihistamine treatment (Gunal et al., 2004; Mendham, 2004; Winhoven et al., 2004). Although Ca_v channel blockers were reported as potential targets to relieve pruritus and CFP cases, our mitigated results in calcium imaging and neuropeptide release experiments could be due to *in vitro* limitations. Indeed, most of studies reporting efficiency of gabapentinoids/Cav channel inhibitors in pruritus, neuropathic pain and dysesthesia (Garcovich, 2016) or CFP (Brett and

Murnion, 2015; Perez et al., 2001), administrated intrathecally, underlying a preferential action of Ca_v channel antagonists at the central level to be effective (Perret and Luo, 2009).

Interestingly, it has been shown in a myometrium preparation that around 25-35 % of $[Ca^{2+}]_i$ increase is mediated by N-type Ca_v channels and that Ca_v induced $[Ca^{2+}]_i$ increase strongly suspected to initiate SOCE process. Those values are relevant with our results from calcium imaging experiments and SP release where the N-type blocker ω -conotoxin exhibited a similar inhibition. Thus, SOCE phenomenon might be involved in P-CTX-2-induced calcium signal as well as neuropeptide release more investigations are needed to confirm it.

Taken together, our results identify N-type Ca_v channels as mediators involved in early calcium events provoked by P-CTX-2. We suggest future studies to explore the role of $\alpha 2\delta$ -1 subunit of Ca_v channels in CTX effects at cellular and molecular level.

The transport Na⁺-Ca²⁺, system so-called NCX exchanger, is a key player in cellular calcium homeostasis in several cell types. A concentration as low as 0.5 μ M KB-R7943 was used to inhibit reverse but not forward mode NCX exchanger (Watanabe et al., 2006). NCX has been proposed to function in reverse-mode in CTX effects (Gaudry-Talarmain et al., 1996). In contrast, results of our calcium imaging experiments on DRG neurons showed no significant inhibition of calcium response to P-CTX-2 in KB-R7943 condition. A subtle effect of KB-R7943 is observable on all phases, and more visible on the long-lasting and sustained calcium plateau, but not enough prominent to support the idea of a substantial role of NCX in P-CTX-2 cellular effects that we studied.

In concluding remark, we provide with these calcium imaging experiements additionnal elements on cellular pathway involved in response to P-CTX-2, with the most marking result being that PAR-2 is strongly involved in P-CTX-2-evoked calcium signal.

IV. Synthèse sur le chapitre

IV.1. Conclusions

Nous avons mené des expériences d'imagerie calcique sur des neurones sensoriels de rat exposés à la P-CTX-2 en présence ou non des mêmes antagonistes qu'au chapitre précédent afin d'approfondir les mécanismes cellulaires médiés par la P-CTX-2. Ces résultats montrent que la P-CTX-2 induit une dérégulation de l'homéostasie calcique des neurones dont le profil a été divisé en 3 parties successives comprenant : un premier pic, un deuxième pic et un plateau. Nos résultats montrent que la réponse calcique des neurones sensoriels à la P-CTX-2 :

- ne fait pas intervenir le TRPV1, les Cav de type L et l'échangeur NCX,
- implique, dans ses évènements précoces, l'activation des Nav TTX-s alors que les Nav TTX-r sont impliqués dans les évènements plus tardifs et dans le maintien de la réponse,
- implique, dans ses évènements précoces, le récepteur PAR-2,
- fait intervenir les Cav de type N,
- fait intervenir un influx de calcium extracellulaire, en particulier dans la phase précoce de la réponse,
- persiste, en particulier pour sa 2eme phase (second pic) en l'absence de calcium externe, suggérant qu'une mobilisation des réserves intracellulaires Nav-dépendante est impliquée dans cette phase de la réponse calcique à la P-CTX-2.

A partir de ces éléments, la chronologie des évènements amenant le profil de réponse calcique typique observé en réponse à la P-CTX-2 pourrait ainsi être :

- Activation des Nav TTX-s amenant une entrée de Na⁺ responsable d'une dépolarisation suffisante pour activer les Cav et finalement la réponse calcique précoce,
- Parallèlement ou en conséquence de l'activation des Nav TTX-s, activation des TTX-r impliqués dans la phase plus tardive de la réponse calcique à la P-CTX-2.
- Parallèlement ou en conséquence de l'activation des Nav, activation du PAR-2 qui conduit à la mobilisation des réserves calciques intracellulaires.

IV.2. Perspectives

Afin de publier ces résultats, les expériences supplémentaires suivantes sont envisagées :

- Confirmer l'implication du PAR-2 par des arguments supplémentaires, i.e. notamment réaliser des expériences calciques sur neurones sensoriels transfectés avec un petit ARN interférent (siRNA) du PAR-2 ou en présence d'antagonistes du PAR-2 d'autres familles chimiques que celle du GB83. Il serait aussi intéressant de réaliser des expériences sur des neurones sensoriels obtenus à partir d'animaux Knock Out pour le récepteur PAR-2.
- Explorer l'implication du mécanisme SOCE, qui pourrait être le mécanisme dépendant du calcium externe (influx) responsable de la réponse calcique à la P-CTX-2.
- Tester l'antagoniste du TRPA1 en imagerie calcique pour étudier son implication,
- Tester prégabaline ou gabapentine, des antagonistes non spécifiques des Ca_v mais spécifiques de la sous-unité α2δ-1 qui ont démontré leur efficacité *in vivo*.

Dans ce dernier chapitre, nous aborderons l'étude du rôle des kératinocytes dans les effets médiés par la P-CTX-2. Nous présenterons des éléments issus d'expériences d'imagerie calcique indiquant clairement leur activation directe par la P-CTX-2, ainsi que des résultats de dosage de SP démontrant leur contribution notable dans la libération de SP induite par la P-CTX-2 à partir de la coculture. Comme pour les chapitres précédents, les résultats et la discussion associée sont présentés rédigés en anglais.

Ces résultats sur kératinocytes ont fait l'objet d'une communication orale lors du 8th World Congress on Itch: "Are keratinocytes and some itch mediators involved in the neuropeptide release induced by pacific-ciguatoxin-2 in a sensory neuro-keratinocyte coculture model ? " dont le résumé est publié dans Acta Dermato-Venereologica, 2015; 95(7): 894.

I. Materials and methods

I.1. Calcium imaging experiments in keratinocytes

Dissociated keratinocytes were obtained as previously described and treated 16 hours with calcium medium (DMEM+DMEM/F12, v/v 50/50), to get so-called differentiated keratinocytes. For Ca²⁺ imaging, cells were plated on PDL-coated glass coverslips. Changes in cytosolic Ca²⁺ concentration were measured with Fura-2 probe (Thermo Fisher ScientificMolecular probes, F-1221). Cells were loaded with 4 μ M Fura-2/AM plus 2 μ M pluronic acid (24040-032, Gibco) for 45 min in the dark at 37°C in a medium containing (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, pH adjusted at 7.45 with NaOH. Cells were washed twice and equilibrated for 10-15 min in the same buffer to allow de-esterification of the dye. Ratiometric images of Ca²⁺ signals (340 nm / 380 nm) were obtained using a microscope (IX71, Olympus) equipped with a monochromator illumination system (Polychrome V, TILL Photonics). Emission was collected through a 415DCLP dichroic mirror, by a 14-bit CCD camera

(EXiBlue, Qimaging). Image acquisition and analysis were performed with the Metafluor 6.3 software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Region of interests (ROIs) choosed on Metafluor were clearly defined by single keratinocytes with tidy calcium response (i.e not aberrant), with 20-100 keratinocytes analyzed per experiment. Ciguatoxin was injected manually to limit amount per experience and avoid waste.

I.2. Data analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Calcium imaging data were normalized using this formula: $\Delta R/R = (F-F0) / F0$ where F is a ratiometric value at a given moment and F0 the average of the first values (baseline) before any cell treatments. Outliers' data were removed from analysis using ROUT method (with Q set to 1%) in each condition of each experiment. For keratinocytes, values were not normalized. Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA) and details are indicated in figures' legends. Differences were considered statistically significant if p value was less than 0.05.

II. Results

II.1. Calcium imaging experiments in keratinocytes

A. A direct effect of P-CTX-2 on keratinocytes



Figure 24: Calcium profiles obtained after P-CTX-2 10 nM application on keratinocytes obtained from 3 different patients: red symbols (\Box ; n = 101), (Δ ; n = 64) and (O; n = 18). Values from MeOH 0.05% condition were obtained from one of this patient, green line. Outlines represent average response from whole cells ± SEM.

Figure 24 exhibits a direct calcium response in primary keratinocytes induced by P-CTX-2 injection. Different calcium responses were obtained on primary keratinocytes provided from distinct patients, explaining the variability of the calcium patterns. In all case, 0.05 % methanol, the P-CTX-2 control vehicle, did not induce any calcium signal in these cells. In contrast to that obtained in neurons, P-CTX-2-mediated calcium signal in keratinocytes increases

gradually to reach a long-lasting and sustained plateau. Remarkably, calcium profiles are composed of two successive increases which vary according to the patient from which the keratinocytes were obtained. Furthermore, those calcium patterns reached very high values after 45 minutes, similar if not higher than those obtained for the highest peak (first peak) obtained in sensory neurons.



B. Na_v channels and PAR-2 role in P-CTX-2-evoked calcium signalling

Figure 25: Calcium signalling in keratinocytes in presence of Na_v and PAR-2 blockers. Data expressed as Δ R/R (e.g 340 / 380 nm ratio) are obtained after 45 minutes, from analyzed keratinocytes treated with P-CTX-2 10 nM (n = 11; control condition) compared with keratinocytes pretreated with GB83 50 µM (n = 8) or TTX 100 µM (n = 4) 5 minutes before P-CTX-2 treatment, with n is the number of experiments in which 20 to 100 cells were analyzed. Statistical analysis was conducted with ordinary one-way ANOVA (parametric and unpaired data) followed by Dunnett's post-test. *p<0.05.

In order to identify mediators leading to P-CTX-2-evoked calcium responses in keratinocytes, we tested the most efficient ones found in neurons, i.e. TTX and GB83, since it has been demonstrated that keratinocytes expressed both Na_v channels and PAR-2 receptors (D'Andrea et al., 1998; Steinhoff et al., 1999; Zhao et al., 2008). 10 nM of P-CTX-2 elicited a calcium reponse reaching an

averaged ratio of 0.74 \pm 0.1 Δ R/R ratio. Figure 25 displays a significant 2-fold decrease of P-CTX-2-evoked calcium signal in keratinocytes by GB83 50 μ M (0.3 \pm 0.1) or TTX 100 μ M (0.34 \pm 0.1). Inhibition brought by TTX 100 μ M appears to be not significant but the trend is clearly visible and this condition need to be repeated. [Ca²⁺]_i increase was abolished in extracellular calcium-free medium supplemented with EGTA 2 mM (data not shown). From those findings, we can conclude that Na_V channels and PAR-2 are important mediators involved in P-CTX-2-evoked calcium signalling in keratinocytes.

II.2. Study of the role of keratinocytes in P-CTX-2- induced SP release from the coculture



Figure 26: P-CTX-2-induced SP release from the coculture compared to the summ of independent release from DRG neurons and from keratinocytes monoculture. Values from methanol 0.05% condition were substracted from P-CTX-2 10 nM conditions, after what neurons and keratinocyte release values in pg/mL were summed and considered as 100% for normalization of coculture release values. Normalized values (n = 11) were expressed in mean \pm sem and statistical analysis was performed realizing a Kolmogorov-Smirnov test (non-parametric with unpaired data).**p < 0.01

To investigate the role of keratinocytes in the SP relase induced by P-CTX-2 from the coculture, we first quantified separatly SP from neuron and keratinocyte monocultures (see legend for data analysis). Result data show that P-CTX-2-evoked SP release from the coculture is increased about 5-fold (551 \pm 207 %) compared to sum SP release from individual monocultures. Additionnaly, we confirmed by RT-qPCR experiments on primary keratinocytes Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7 and PAR-2 expression in cultured primary keratinocytes (data not shown), consistent with previous studies in which immunohistostaining in human skin revealed Nav channels and PAR-2 expression in human keratinocytes (Steinhoff et al., 1999; Zhao et al., 2008). Those findings strongly demonstrate the synergistic role of keratinocytes in the SP release induced by P-CTX-2 from the coculture.
III. Discussion

III.1. A PAR-2- and Na_v-dependent mechanism mediating CTX-induced calcium increase in primary keratinocytes

Here, we exhibit findings that P-CTX-2 is able to directly evoke a calcium response in keratinocytes, non-excitable cells. Interestingly, in these cells, all calcium patterns presented two successive gradually increases to reach a plateau after 45 minutes whereas, in neurons, abrupt and fast responses were elicited in few minutes after P-CTX-2 application, following by a decrease to a stabilized plateau. However, in both cell types, [Ca²⁺]_i never came back to basal level, indicating a calcium homeostasis dysregulation mediated by P-CTX-2. In keratinocytes, plateau values collected after 45 minutes were higher than those measured in neurons. It suggests that neuronal cells have more performant regulation system than keratinocytes to extrude excess of internal calcium.

We showed that PAR-2 and Na_v channels are involved in P-CTX-2-mediated calcium signalling pathway.

Apart from this, based on previous electrophysiological and morphological studies which demonstrated inhibitory effectiveness of hyperosmolar D-Mannitol on CTX-induced effects (Benoit et al., 1996; Mattei et al., 1999b; Birinyi-Strachan et al., 2005b), we tested hypertonic D-mannitol solution towards calcium increase in keratinocytes elicited by P-CTX-2. Interestingly, we observed that D-mannitol transiently diminishesd keratinocyte calcium response which progressively reached again high [Ca²⁺]_i after 30 minutes (supplementary data, FIgure 27).

III.2. A synergistic effect of keratinocytes on P-CTX-2-induced SP release

Keratinocytes have previsously been shown to enhance axonal growth (Ulmann et al., 2007) and stabilize neurite network (Gingras et al., 2003) which is an important factor for SP release (Le Garrec et al., 2016). Here, we demonstrated the synergistic role of keratinocytes in the SP release induced by P-CTX-2 from the coculture, since P-CTX-2-evoked SP release from the coculture is increased about 5-fold compared to summed SP release from individual monocultures. It is relevent with the fact that keratinocytes can release SP, expressed its cognate receptor and that SP elicits them to release SP (Bae et al., 1999). These data suggest that SP released from sensory neurons may induce a further SP release from keratinocytes in coculture supernatant.

In addition, we performed further results of calcium imaging experiments (see supplementary data), showing that calcium response of differentiated keratinocytes to P-CTX-2 is more marked than that of undifferentiated cells (supplementary data, Figure 28), which were correlated with their respective levels of mRNA expression of Nav isoforms (data not shown), further arguing for the role of Nav channels in keratinocytes responses to P-CTX-2. consistent with a previous work where immunohistochemical experiments demonstrated Nav channels expression on human keratinocytes (Zhao et al., 2008). In addition, PAR-2 is overexpressed by differentiated keratinocytes in vitro in our conditions (data not shown). This interesting finding is correlated with PAR-2 distribution in human skin which has been observed by two different stainings and to be preferentially expressed in the granular layer (D'Andrea et al., 1998; Steinhoff et al., 1999). Interestingly, without [Ca²⁺]₀, P-CTX-2 elicited no response on keratincoytes (data not shown), suggesting that also in this cell type, calcium influx is necessary. SOCE, for "Store Operated Calcium Entry", is a process of calcium influx enhances by Ca²⁺ release from the store and this phenomenon has been suspected to occured during CTX activation on keratinocytes since it has been postulated as preferential biological process in

CHAPITRE 4 : ETUDE DU ROLE DES KERATINOCYTES DANS LES EFFETS MEDIES PAR LA P-CTX-2

non-excitable cell type, more detailed in (Lewis, 2007). This molecular process has been discovered recently and it is not only a store refilling mechanism but also a phenomenon generating sustained calcium influx which is the cause of multiple essential functions as cell metabolism, gene expression and exocytosis (Parekh and Putney, 2005)(Parekh and Putney, 2005). Interestingly, a recent study demonstrated that PAR-2 activation on keratinocytes leads to TSLP release through SOCE process and stimulates sensory C-fibers to initiate itch (Wilson et al., 2013). Considering this, no TSLP has been quantified by EIA in our coculture model after CTX exposure (data not shown).

To conclude, we demonstrated for the fisrt time that keratinocyte is a new cellular target for ciguatoxins, with PAR-2 and Na_v channels identified as mediators involved in P-CTX-2-mediated calcium response on keratinocytes. Additionally, those mediators are overexpressed in differentiated keratinocytes which we shown to act synergistically in the coculture to mediate SP release. Taking together, these findings validate the optimized coculture as a suitable *in vitro* model to study molecular basis of CTX-mediated peripheral sensory disorders.

III.3. Suppplementary data



A. Transitory inhibitory effect of keratinocytes calcium response to P-CTX-2 by hyperosmolar D-mannitol

Figure 27: Hyperosmolar D-mannitol effect on P-CTX-2-evoked calcium signal in keratinocytes (n = 54). Values were collected at different time after 100 mM D-mannitol perfusion illustrated as scatter plot (A) and the whole pattern in (B). Statistical analysis has been realized with one-way ANOVA multiple comparison (parametric, paired data) followed by Dunnett post-test. **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001.



B. Effect of differentiated state of keratinocytes on P-CTX-2 activation

Figure 28: Study of the P-CTX-2-evoked calcium response on undifferentiated (n = 78) versus differentiated (n = 82) keratinocytes. Values were collected after 45 minutes of P-CTX-2 10 nM application and raw data were presented as scatter plot with mean \pm standard deviation. Statistical analysis was conducted using t-test (unpaired data). **** p < 0.0001.

IV. Synthèse sur le chapitre

IV.1. Conclusions

Nous avons exploré l'effet de la toxine sur les kératinocytes en imagerie calcique. Nous avons montré que la P-CTX-2 sur kératinocytes :

- induit une activation directe, positionnant les kératinocytes comme nouvelles cibles cellulaires des CTXs,
- provoque un signal calcique qui se décompose en 2 phases successives atteignant un plateau final au bout de 45 minutes/1 heure,
- induit une réponse calcique dépendante des Nav, du PAR-2 et du calcium externe,
- induit une réponse calcique transitoirement inhibée par une solution hyperosmotique de D-mannitol.

IV.2. Perspectives

Pour les mêmes raisons citées dans les chapitres précédents, nous envisageons des expériences supplémentaires sur kératinocytes en imagerie calcique pour :

- confirmer l'implication du PAR-2 dans la réponse calcique induite par la P-CTX-2 via l'apport d'arguments supplémentaires (autres antagonistes du PAR-2 que le GB83, antiprotéases spécifiques, siRNA du PAR-2, expériences sur neurones sensoriels d'animaux KO pour le PAR-2),
- connaître l'importance du Nav1.5 (TTX-r) dans cette activation avec des concentrations nanomolaires de TTX (300nM),
- explorer le rôle du D-Mannitol (hypertonique versus isotonique) pour confirmer ou non son rôle de régulateur osmotique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

I. Synthèse

Les travaux menés ces 3 dernières années ont été focalisés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires du prurit survenant dans l'intoxication de type ciguatera. Nous avons choisi un modèle de coculture de kératinocytes et neurones sensoriels déjà préétabli au laboratoire pour étudier cette modalité sensorielle périphérique qu'est le prurit. Avec des modifications, ce modèle de coculture largement optimisé nous a permis de répondre à la question suivante : "Des neuropeptides impliqués dans la physiopathologie du prurit sont-ils aussi présents dans l'intoxication de type ciguatera ?". Il s'avère que SP et CGRP, deux neuropeptides bien connus dans la physiopathologie du prurit, de la douleur et dans le phénomène d'inflammation neurogène cutanée, sont libérés sous l'action de la P-CTX-2. Ces résultats ont fait l'objet d'une première publication.

Des modifications au modèle de coculture, évaluées par des critères qualitatifs (observés, morphologiques) et quantitatifs (dosage de SP, qPCR), ont été apportées afin d'optimiser la reproductibilité de relargage et les quantités de neuropeptides sécrétés en présence de la P-CTX-2. Une meilleure sécrétion de SP, des cultures plus facilement reproductibles, stables et homogènes dans le temps ont été les points forts de cette optimisation.

Une fois le modèle optimisé, nous avons testé différents antagonistes de médiateurs connus du prurit pour contrer la sécrétion de SP induite par la toxine. Parmi eux, l'inhibition du PAR-2 s'est avérée particulièrement efficace. Nos travaux ont ainsi identifié une toute nouvelle cible pour les CTXs et suggèrent l'implication du PAR-2 dans leurs effets neurocutanés lors de la ciguatera.

Sachant que l'augmentation de calcium intracellulaire est le phénomène initiant l'exocytose, nous avons choisi de suivre l'évolution de ce calcium intracellulaire en présence de P-CTX-2 sur neurones sensoriels pour approfondir les mécanismes impliqués dans la sécrétion de SP qu'elle induit. L'implication des mêmes médiateurs a été explorée. Les expériences d'imagerie calcique

montrent une très forte implication du PAR-2 dans la réponse induite par la P-CTX-2, résultat pertinent avec ceux précédemment obtenus en dosage de neuropeptides. L'inhibiteur des Ca_v de type N altère aussi, mais dans une moindre mesure, la réponse calcique. De manière intéressante, nous avons montré qu'en absence de calcium externe, les cellules restaient faiblement activées par la P-CTX-2. Ces résultats suggèrent un mécanisme Na_vdépendent faisant intervenir les réserves intracellulaires.

En parallèle, nos résultats montrent par des expériences d'imagerie calcique que les kératinocytes sont directement activés par la P-CTX-2. Nous avons mis en évidence que le PAR-2 est aussi un médiateur important de la réponse calcique sur kératinocytes. Le D-Mannitol exerce un effet inhibiteur transitoire sur cette réponse calcique mais la question demeure quant à l'explication d'un tel effet.

L'ensemble des autres médiateurs (TRPV1, TRPA1, échangeur NCX, Cav de type L) étudiés n'ont aucun rôle notable dans la signalisation calcique ou la sécrétion de SP induite par la P-CTX-2.

Une synthèse des résultats est illustrée par le schéma figurant ci-après.

II. Schéma bilan

L'ensemble des résultats ont été illustrés par les 2 schémas de synthèses suivants :





Figure 29 : Schémas de synthèse. Illustrations proposées des mécanismes médiée par la P-CTX-2 à l'origine de la sécrétion de neuropeptides (A) et la signalisation calcique sur neurones sensoriels (B).

III. Perspectives de l'étude

D'une part, les perspectives de ces travaux comprennent les conditions à répéter dans certaines expériences pour confirmer statistiquement certains résultats. Les expériences dont les conditions doivent être répétées sont mentionnées à la fin de chaque chapitre.

D'autre part, elles incluent les autres expériences envisagées pour donner du poids à l'étude, en particulier concernant l'implication du PAR-2 en tant que nouvelle cible moléculaire des CTXs : il sera en effet important de confirmer l'implication de PAR-2 par un autre moyen que l'utilisation du GB83. Nous proposons plusieurs possibilités telles que l'utilisation d'autres types d'antagonistes : pepducines (Sevigny et al., 2011), siRNA spécifique du PAR-2 ou encore des rongeurs Knock Out pour le PAR-2 (McGuire et al., 2008).

Il serait aussi souhaitable de répéter les conditions de coculture avec le GB83 5µM pour le dosage de la SP. Les résultats de ces travaux obtenus in vitro suggèrent un potentiel prometteur des antagonistes du PAR-2 *in vivo*. Des études sur l'animal sont envisagées depuis un moment et le dossier d'autorisation pour le projet en question est en cours de réalisation.

De plus, pour aller plus loin dans l'exploration des mécanismes impliqués, de nouveaux inhibiteurs pourraient être testés tels que des inhibiteurs de SOCE (synta 66), inhibiteurs des canaux potassiques, le D-Mannitol iso-osmolaire et hyperosmolaire.

De nouvelles pistes peuvent être envisagées comme la libération d'autres neuropeptides que la SP et le CGRP à partir de notre coculture, sous l'action de CTXs, et d'autres médiateurs connus pour leur implication dans la physiopathologie du prurit. L'endothéline-1 en est un exemple. Elle est sécrétée par les kératinocytes (Imokawa et al., 1992) et peut activer les terminaisons nerveuses intraépidermiques (Zhou et al., 2001) pour induire un prurit (Liang et al., 2010; Trentin et al., 2006). De plus, l'endothéline-1 est rapportée dans de nombreuses modalités nociceptives (Khodorova et al., 2009), incluant potentiellement l'allodynie au froid.

Cibler les récepteurs associés aux neuropeptides sécrétés en présence de P-CTX-2 est une stratégie envisageable dans le traitement des troubles sensoriels de la ciguatera. Le récepteur à la substance P, NK1R, est le candidat de choix. Son antagoniste est l'aprépitant et a déjà montré ses preuves comme traitement efficace dans différentes maladies où le prurit est sévère et chronique (Ständer, 2016). Tester un tel antagoniste sur des souris ayant reçu des CTXs est une perspective des plus intéressante Cibler les récepteurs associés aux neuropeptides sécrétés en présence de P-CTX-2 est une stratégie envisageable.

Le dernier point concerne les canaux potassiques dont l'inhibition par la P-CTX-1 a été démontrée (Birinyi-Strachan et al., 2005a). Leur rôle est important puisque ces canaux potassiques permettent la repolarisation membranaire consécutive à la dépolarisation, et ainsi un retour au potentiel membranaire de

143

repos. De nos jours, les canaux potassiques suscitent un intérêt croissant, en particulier leur rôle dans les douleurs neuropathiques (Busserolles et al., 2016). Bien que nous ne nous soyons pas focalisés sur ces canaux, de récentes études ont montré que des souris KO $K_v9.1^{-/-}$ présentent une hypersensibilité mécanique et thermique au froid et que ces canaux sont exclusivement exprimés sur les fibres de type A. De plus, il a été démontré que l'activation du récepteur PAR-2 inhibent les courant potassiques de type M, conduisant à la génération de PA répétés. Il nous semblerait intéressant d'explorer le rôle du PAR-2 dans l'inhibition des K_v constatée pour la CTX.

IV. Perspectives hors ciguatera

Nous avons développé un modèle de coculture kératinocytes et neurones sensoriels qui permet d'étudier les mécanismes cellulaires des CTXs à l'origine des signes sensitifs périphériques survenant lors d'une intoxication type ciguatera. Nous nous sommes intéressés en particulier au prurit. De façon plus générale, ce modèle est aussi valable pour l'étude d'autres substances, exogènes ou endogènes, provoquant des troubles sensoriels cutanés (prurit, douleur, inflammation). Parmi les substances exogènes, de nombreux ingrédients cosmétiques ont des propriétés irritantes que notre modèle est à même de mettre en évidence (huiles essentielles, tensioactifs, conservateurs).

Ainsi, ce modèle optimisé présente diverses applications tant fondamentales qu'appliquées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achaibar, K.C., Moore, S., and Bain, P.G. (2007). Ciguatera poisoning. Pract. Neurol. 7, 316–322.

Adachi, R. (Mie U., and Fukuyo, Y. (1979). The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate Gambierdiscus toxicus gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. Jpn.

Akdis, C.A., and Simons, F.E.R. (2006). Histamine receptors are hot in immunopharmacology. Eur. J. Pharmacol. *533*, 69–76.

Allsop, J.L., Martini, L., Lebris, H., Pollard, J., Walsh, J., and Hodgkinson, S. (1986). Les manifestations neurologiques de la Ciguatera: trois cas avec étude neurophysiologique et examen d'une biopsie nerveuse. Rev. Neurol. (Paris) *142*, 590–597.

Alvarez, F.J., and Fyffe, R.E.W. (2000). Nociceptors for the 21st Century. Curr. Rev. Pain *4*, 451–458.

Ansdell, V. (2016). Food Poisoning from Marine Toxins (Centers for Disease Control and Prevention).

Ansel, J.C., Armstrong, C.A., Song, I., Quinlan, K.L., Olerud, J.E., Caughman, S.W., and Bunnett, N.W. (1997). Interactions of the Skin and Nervous System. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. *2*, 23–26.

Arthur, R.P., and Shelley, W.B. (1955). The Role of Proteolytic Enzymes in the Production of Pruritus in Man*. J. Invest. Dermatol. *25*, 341–346.

Atoyan, R., Shander, D., and Botchkareva, N.V. (2009). Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. J. Invest. Dermatol. *129*, 2312–2315.

Bae, S., Matsunaga, Y., Tanaka, Y., and Katayama, I. (1999). Autocrine Induction of Substance P mRNA and Peptide in Cultured Normal Human Keratinocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *263*, 327–333.

Bagnis, R. (1968). Clinical aspects of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia. Hawaii Med. J. *28*, 25–28.

Bagnis, R. (1970). Concerning a Fatal Case of Ciguatera Poisoning in the Tuamotu Islands. Clin. Toxicol. *3*, 579–583.

Bagnis, R., Kuberski, T., and Laugier, S. (1979). Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. Am. J. Trop. Med. Hyg. *28*, 1067–1073.

Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., and Inoue, A. (1980). Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, Gambierdiscus toxicus Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology *18*, 199–208.

Bajaj, A., and Yadav, S. (2009). Management of difficult urticaria. Indian J. Dermatol. *54*, 275.

Barber, L.A., and Vasko, M.R. (1996). Activation of Protein Kinase C Augments Peptide Release from Rat Sensory Neurons. J. Neurochem. *67*, 72–80.

Barinaga, M. (1995). "Obese" protein slims mice. Science 269, 475–476.

Barry, G.D., Suen, J.Y., Le, G.T., Cotterell, A., Reid, R.C., and Fairlie, D.P. (2010). Novel Agonists and Antagonists for Human Protease Activated Receptor 2. J. Med. Chem. *53*, 7428–7440.

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.

Bavastrelli, M., Bertucci, P., Midulla, M., Giardini, O., and Sanguigni, S. (2001). Ciguatera Fish Poisoning: An Emerging Syndrome in Italian Travelers. J. Travel Med. *8*, 139–142.

Benoit, E. (1994). Gambiertoxin-induced modifications of the membrane potential of myelinated nerve fibres.

Benoit, E., and Legrand, A.-M. (1991). Purified ciguatoxin-induced modifications in excitability of myelinated nerve fibre. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1990 *85*, 497–499.

Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., and Molgo, J. (1996). Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. Neuroscience *71*, 1121–1131.

Benoit, E., Boydron-Le Garrec, R., and Sauviat, M.-P. (2005). Implication de la nociception cutanée dans l'intoxination de type ciguatera. In Toxines et Douleur (Collection Rencontres En Toxinologie), M.G.& M.P.S. C. Bon F. Goudey-Perrière, ed. (Librairie Lavoisier, Paris, France), pp. 123–130.

Bentur, Y., and Spanier, E. (2007). Ciguatoxin-like substances in edible fish on the eastern Mediterranean. Clin. Toxicol. *45*, 695–700.

Bidard, J.N., Vijverberg, H.P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R., and Lazdunski, M. (1984). Ciguatoxin is a novel type of Na+ channel toxin. J. Biol. Chem. *259*, 8353–8357.

Bigliardi-Qi, M., Gaveriaux-Ruff, C., Pfaltz, K., Bady, P., Baumann, T., Rufli, T., Kieffer, B.L., and Bigliardi, P.L. (2007). Deletion of mu- and kappa-opioid receptors in mice changes epidermal hypertrophy, density of peripheral nerve endings, and itch behavior. J. Invest. Dermatol. *127*, 1479–1488.

Birinyi-Strachan, L.C., Gunning, S.J., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (2005a). Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. Toxicol. Appl. Pharmacol. *204*, 175–186. Birinyi-Strachan, L.C., Davies, M.J., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (2005b). Neuroprotectant effects of iso-osmolar d-mannitol to prevent Pacific ciguatoxin-1 induced alterations in neuronal excitability: A comparison with other osmotic agents and free radical scavengers. Neuropharmacology *49*, 669–686.

Birinyi-Strachan, L.C., Gunning, S.J., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (2005c). Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. Toxicol. Appl. Pharmacol. *204*, 175–186.

Blankenship, J.E. (1976). Tetrodotoxin: From Poison to Powerful Tool. Perspect. Biol. Med. *19*, 509–526.

Böhm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., and Bunnett, N.W. (1996). Mechanisms of Desensitization and Resensitization of Proteinase-activated Receptor-2. J. Biol. Chem. *271*, 22003–22016.

Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. Eur. J. Dermatol. EJD *18*, 119–127.

Bowman, P.B. (1984). Amitriptyline and ciguatera. Med. J. Aust. 140, 802.

Boydron, R., Laurent, D., and Sauviat, M.P. (2001). Un test biologique destiné à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication ciguatérique en Nouvelle-Calédonie. In Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs, C. Bon, F. Goudey-Perrière, B. Poulain, and S. Puiseux-Dao, eds. (Paris: Elsevier), pp. 63–66.

Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgó, J., and Laurent, D. (2005). Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. Toxicon *46*, 625–634.

Brett, J., and Murnion, B. (2015). Pregabalin to treat ciguatera fish poisoning. Clin. Toxicol. *53*, 588–588.

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.

Butera, R., Prockop, L.D., Buonocore, M., Locatelli, C., Gandini, C., and Manzo, L. (2000). Mild ciguatera poisoning: Case reports with neurophysiological evaluations. Muscle Nerve *23*, 1598–1603.

Calvert, G.M., Hryhorczuk, D.O., and Leikin, J.B. (1987a). Treatment of Ciguatera Fish Poisoning with Amttriptyline and Nifedipine. J. Toxicol. Clin. Toxicol. *25*, 423–428.

Calvert, G.M., Hryhorczuk, D.O., and Leikin, J.B. (1987b). Treatment of Ciguatera Fish Poisoning with Amttriptyline and Nifedipine. J. Toxicol. Clin. Toxicol. *25*, 423–428.

Cameron, J., and Capra, M.F. (1993). The Basis of the Paradoxical Disturbance of Temperature Perception in Ciguatera Poisoning. J. Toxicol. Clin. Toxicol. *31*, 571–579.

Cameron, J., Flowers, A.E., and Capra, M.F. (1991a). Effects of ciguatoxin on nerve excitability in rats (Part I). J. Neurol. Sci. *101*, 87–92.

Cameron, J., Flowers, A.E., and Capra, M.F. (1991b). Electrophysiological studies on ciguatera poisoning in man (Part II). J. Neurol. Sci. *101*, 93–97.

Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., and Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. Nature *360*, 684–686.

Cannon, K.E., Chazot, P.L., Hann, V., Shenton, F., Hough, L.B., and Rice, F.L. (2007). Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: Potential antinociceptive targets. Pain *129*, 76–92.

Carafoli, E. (1987). Intracellular Calcium Homeostasis. Annu. Rev. Biochem. *56*, 395–433.

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.

Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. Pharmacol. Rev. *57*, 411–425.

Cestèle, S., and Catterall, W.A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie *82*, 883–892.

Cevikbas, F., Wang, X., Akiyama, T., Kempkes, C., Savinko, T., Antal, A., Kukova, G., Buhl, T., Ikoma, A., Buddenkotte, J., et al. (2014). A sensory neuron–expressed IL-31 receptor mediates T helper cell–dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. J. Allergy Clin. Immunol. *133*, 448–460.e7.

Chad, J.E., and Yeats, J.C. (1986). Calcium fluxes activated during neurite spiking induced by bradykinin. J. Gen. Physiol. *88*, p.A15.

Chan, J., Smoller, B.R., Raychauduri, S.P., Jiang, W.-Y., Farber, E.M., and Chan, C. (1997). Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin generelated peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. Arch. Dermatol. Res. *289*, 611–616.

Chateau, Y., and Misery, L. (2004). Connections between nerve endings and epidermal cells: are they synapses? Exp. Dermatol. *13*, 2–4.

Chateau-Degat, M.-L., Huin-Blondey, M.-O., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Nguyen, N.L., Laudon, F., Chansin, R., and Dewailly, E. (2007).

Prevalence of Chronic Symptoms of Ciguatera Disease in French Polynesian Adults. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 842–846.

Chéret, J., Lebonvallet, N., Buhé, V., Carre, J.L., Misery, L., and Le Gall-Ianotto, C. (2014). Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. J. Dermatol. Sci. *74*, 193–203.

Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S., and Legrand, A.-M. (1999). Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate Gambierdiscus spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. Mar. Biol. *135*, 259–267.

Chungue, E., Bagnis, R., Fusetani, N., and Yasumoto, T. (1977). Le complexe toxinique des poissons perroquets. Biochimie *59*, 739–741.

Cuypers, E., Abdel-Mottaleb, Y., Kopljar, I., Rainier, J.D., Raes, A.L., Snyders, D.J., and Tytgat, J. (2008). Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels. Toxicon *51*, 974–983.

Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2004). Proteinase-Activated Receptor 2-Mediated Potentiation of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 Activity Reveals a Mechanism for Proteinase-Induced Inflammatory Pain. J. Neurosci. 24, 4293–4299.

Dale, H.H., and Laidlaw, P.P. (1919). Histamine shock. J. Physiol. 52, 355–390.

Dalgard, F., Svensson, A., Holm, J.Ø., and Sundby, J. (2004). Self-reported skin morbidity among adults: associations with quality of life and general health in a Norwegian survey. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res. *9*, 120–125.

Dallos, A., Kiss, M., Polyánka, H., Dobozy, A., Kemény, L., and Husz, S. (2006). Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. Neuropeptides *40*, 251–263.

D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., and Andrade-Gordon, P. (1998). Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *46*, 157–164.

Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Pauillac, S., and Legrand, A.-M. (1999). Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. Toxicon *37*, 125–143.

Defusco, D.J., O'Dowd, P., Hokama, Y., and Ott, B.R. (1993). Coma due to ciguatera poisoning in Rhode Island. Am. J. Med. *95*, 240–243.

Démarchez, M. (2016). Biologie de la peau.

Denda, M., Nakatani, M., Ikeyama, K., Tsutsumi, M., and Denda, S. (2007). Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. Exp. Dermatol. *16*, 157–161.

Dib-Hajj, S., Black, J.A., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2002). NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties. Trends Neurosci. *25*, 253–259.

Dunford, P.J., Williams, K.N., Desai, P.J., Karlsson, L., McQueen, D., and Thurmond, R.L. (2007). Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. J. Allergy Clin. Immunol. *119*, 176–183.

Empey Campora, C., Dierking, J., Tamaru, C.S., Hokama, Y., and Vincent, D. (2008). Detection of ciguatoxin in fish tissue using sandwich ELISA and neuroblastoma cell bioassay. J. Clin. Lab. Anal. *22*, 246–253.

Fernandes de Oliveira, J., Teixeira, C.E., Arantes, E.C., de Nucci, G., and Antunes, E. (2003). Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. Urology *62*, 581–588.

Fishman, M., Scott M., Caneris, M., Onassis A., Stojanovic, M., Milan P., and Borsook, M., PhD, David (1997). Intravenous Lidocaine for Treatment-Resistant Pruritus. Am. J. Med. *102*, 584–585.

Fitzsimons, C., Engel, N., Durán, H., Policastro, L., Cricco, G., Martín, G., Molinari, B., and Rivera, E. (2001). Histamine production in mouse epidermal keratinocytes is regulated during cellular differentiation. Inflamm. Res. *50*, 100–101.

Fleming, L.E., Bean, J.A., Blythe, D.G., Weisman, R., and Baden, D.G. (1998). Marine Seafood Toxin Diseases: Issues In Epidemiology & Community Outreach (NIEHS).

Fuwa, H., Kainuma, N., Tachibana, K., Tsukano, C., Satake, M., and Sasaki, M. (2004). Diverted Total Synthesis and Biological Evaluation of Gambierol Analogues: Elucidation of Crucial Structural Elements for Potent Toxicity. Chem. – Eur. J. *10*, 4894–4909.

Gamper, N., Zaika, O., Li, Y., Martin, P., Hernandez, C.C., Perez, M.R., Wang, A.Y., Jaffe, D.B., and Shapiro, M.S. (2006). Oxidative modification of M-type K+ channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. EMBO J. *25*, 4996–5004.

Garcovich, S. (2016). Anticonvulsants. In Pruritus, L. Misery, and S. Ständer, eds. (Springer International Publishing), pp. 379–388.

Garland, A., Jordan, J.E., Necheles, J., Alger, L.E., Scully, M.M., Miller, R.J., Ray, D.W., White, S.R., and Solway, J. (1995). Hypertonicity, but not

hypothermia, elicits substance P release from rat C-fiber neurons in primary culture. J. Clin. Invest. *95*, 2359–2366.

Garland, A., Necheles, J., White, S.R., Neeley, S.P., Leff, A.R., Carson, S.S., Alger, L.E., McAllister, K., and Solway, J. (1997). Activated eosinophils elicit substance P release from cultured dorsal root ganglion neurons. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. *273*, L1096–L1102.

Gatti, C., Oelher, E., and Legrand, A.M. (2008). Severe seafood poisoning in French Polynesia: A retrospective analysis of 129 medical files. Toxicon *51*, 746–753.

Gaudry-Talarmain, Y.M., Molgo, J., Meunier, F.A., Moulian, N., and Legrand, A.-M. (1996). Reversed Mode Na+-Ca2+ Exchange Activated by Ciguatoxin (CTX-1b) Enhances Acetylcholine Release from Torpedo Cholinergic Synaptosomesa. Ann. N. Y. Acad. Sci. 779, 404–406.

Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G.P., Scalera, G., Yasumoto, T., Pietra, P., and Bigiani, A. (2005). Inhibition of Voltage-Gated Potassium Currents by Gambierol in Mouse Taste Cells. Toxicol. Sci. *85*, 657–665.

Ghiaroni, V., Fuwa, H., Inoue, M., Sasaki, M., Miyazaki, K., Hirama, M., Yasumoto, T., Rossini, G.P., Scalera, G., and Bigiani, A. (2006). Effect of Ciguatoxin 3C on Voltage-Gated Na+ and K+ Currents in Mouse Taste Cells. Chem. Senses *31*, 673–680.

Gingold, D.B. (2014). Ciguatera Fish Poisoning and Climate Change: Analysis of National Poison Center Data in the United States.

Gingras, M., Bergeron, J., Déry, J., Durham, H.D., and Berthod, F. (2003). In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. FASEB J. *17*, 2124–2126.

Giustizieri, M.L., Albanesi, C., Fluhr, J., Gisondi, P., Norgauer, J., and Girolomoni, G. (2004). H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes. J. Allergy Clin. Immunol. *114*, 1176–1182.

Glaizal, M., Tichadou, L., Drouet, G., Hayek-Lanthois, M., and de Haro, L. (2011). Ciguatera contracted by French tourists in Mauritius recurs in Senegal. Clin. Toxicol. *49*, 767–767.

Gouin, O., Lebonvallet, N., L'Herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., Lefeuvre, L., and Misery, L. (2015). Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. Exp. Dermatol. *24*, 723–726.

Gunal, A.I., Ozalp, G., Yoldas, T.K., Gunal, S.Y., Kirciman, E., and Celiker, H. (2004). Gabapentin therapy for pruritus in haemodialysis patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. Nephrol. Dial. Transplant. *19*, 3137–3139.

Hägermark, Ö., Hökfelt, T., and Pernow, B. (1978). Flare and Itch Induced by Substance P in Human Skin. J. Invest. Dermatol. *71*, 233–235.

Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.-P., Jones, A., and Lewis, R.J. (2002a). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. Toxicon *40*, 685–693.

Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.-P., Jones, A., and Lewis, R.J. (2002b). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. Toxicon *40*, 685–693.

Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A., and Lewis, R.J. (2002c). Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. Toxicon *40*, 1347–1353.

Han, L., Ma, C., Liu, Q., Weng, H.-J., Cui, Y., Tang, Z., Kim, Y., Nie, H., Qu, L., Patel, K.N., et al. (2013). A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. Nat. Neurosci. *16*, 174–182.

Handwerker, H.O. (2014). Itch Hypotheses: From Pattern to Specificity and to Population Coding. In Itch: Mechanisms and Treatment, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.

de Haro, L., Pommier, P., and Valli, M. (2003). Emergence of imported ciguatera in Europe: report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. J. Toxicol. Clin. Toxicol. *41*, 927–930.

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell *19*, 245–254.

Hidalgo, J., Liberona, J.L., Molgó, J., and Jaimovich, E. (2002). Pacific ciguatoxin-1b effect over Na+ and K+ currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca2+ signals in cultured rat myotubes. Br. J. Pharmacol. *137*, 1055–1062.

Hogg, R.C., Lewis, R.J., and Adams, D.J. (1998). Ciguatoxin (CTX-1) modulates single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat parasympathetic neurones. Neurosci. Lett. *252*, 103–106.

Hokama, Y. (1985). A rapid, simplified enzyme immunoassay stick test for the detection of ciguatoxin and related polyethers from fish tissues. Toxicon *23*, 939–946.

Hokama, Y. (1990). Simplified solid-phase immunobead assay for detection of ciguatoxin and related polyethers. J. Clin. Lab. Anal. *4*, 213–217.

Hokama, Y., Kimura, L.H., Abad, M.A., Yokochi, L., Scheuer, P.J., Nukina, M., Yasumoto, T., Baden, D.G., and Shimizu, Y. (1984). An enzyme immunoassay for the detection of ciguatoxin: and competitive inhibition by related natural polyether toxins. ACS Symp. Ser. - Am. Chem. Soc. USA. Hokama, Y., Honda, S.A.A., Asahina, A.Y., Fong, J.M.L., Matsumoto, C.M., and Gallacher, T.S. (1989). Cross-reactivity of ciguatoxin, okadaic acid, and polyethers with monoclonal antibodies. Food Agric. Immunol. *1*, 29–35.

Hokama, Y., Hong, T.W.P., Isobe, M., Ichikawa, Y., and Yasumoto, T. (1992). Cross-reactivity of highly purified okadaic acid (OA), synthetic, spiroketal east sphere of OA and ciguatoxin. J. Clin. Lab. Anal. *6*, 54–58.

Hokama, Y., Nishimura, T., Takenaka, and Ebesu, J. (1998). Simplified solidphase membrane immunobead assay (MIA) with monoclonal anti-ciguatoxin antibody (MAb-CTX) for detection of ciguatoxin and related polyether toxins. J. Nat. Toxins 7, 1–21.

Holmes, M.J., Lewis, R.J., Poli, M.A., and Gillespie, N.C. (1991). Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by Gambierdiscus toxicus (Dinophyceae) in culture. Toxicon *29*, 761–775.

Holz, G.G., Dunlap, K., and Kream, R.M. (1988). Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: methods and dihydropyridine sensitivity. J. Neurosci. *8*, 463–471.

Holzer, P. (1998). Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen. Pharmacol. Vasc. Syst. *30*, 5–11.

Hou, L., and Wang, X. (2001). PKC and PKA, but not PKG mediate LPSinduced CGRP release and [Ca2+]i elevation in DRG neurons of neonatal rats. J. Neurosci. Res. *66*, 592–600.

Hou, L., Kapas, S., Cruchley, A.T., Macey, M.G., Harriott, P., Chinni, C., Stone, S.R., and Howells, G.L. (1998). Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. Immunology *94*, 356–362.

Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., et al. (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β : Implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. PAIN *152*, 2036–2051.

Imamachi, N., Park, G.H., Lee, H., Anderson, D.J., Simon, M.I., Basbaum, A.I., and Han, S.-K. (2009). TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 11330–11335.

Imokawa, G., Yada, Y., and Miyagishi, M. (1992). Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. J. Biol. Chem. *267*, 24675–24680.

Inoue, M., Hirama, M., Satake, M., Sugiyama, K., and Yasumoto, T. (2003). Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. Toxicon *41*, 469–474.

Ishihara, H., Connolly, A.J., Zeng, D., Kahn, M.L., Wu Zheng, Y., Timmons, C., Tram, T., and Coughlin, S.R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. Nature *386*, 502–506.

Ito, E., Suzuki-Toyota, F., Toshimori, K., Fuwa, H., Tachibana, K., Satake, M., and Sasaki, M. (2003). Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins. Toxicon *42*, 733–740.

Iwamoto, T. (2004). Forefront of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Studies: Molecular Pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ Exchange Inhibitors. J. Pharmacol. Sci. *96*, 27–32.

Johanek, L.M., Meyer, R.A., Friedman, R.M., Greenquist, K.W., Shim, B., Borzan, J., Hartke, T., LaMotte, R.H., and Ringkamp, M. (2008). A Role for Polymodal C-Fiber Afferents in Nonhistaminergic Itch. J. Neurosci. *28*, 7659–7669.

Juranovic, L.R., and Park, D.L. (1991). Foodborne Toxins of Marine Origin: Ciguatera. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, G.W. Ware, ed. (Springer New York), pp. 51–94.

Kálmán, M., and Csillag, A. (2005). The Skin and Other Diffuse Sensory Systems. In Atlas of the Sensory Organs, A.C.M. DSc, ed. (Humana Press), pp. 199–243.

Kater, S.B., and Mills, L.R. (1991). Regulation of growth cone behavior by calcium. J. Neurosci. *11*, 891–899.

Kayssi, A., Amadesi, S., Bautista, F., Bunnett, N.W., and Vanner, S. (2007). Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. J. Physiol. *580*, 977–991.

Khodorova, A., Montmayeur, J.-P., and Strichartz, G. (2009). Endothelin Receptors and Pain. J. Pain *10*, 4–28.

Kim, K. (2012). Neuroimmunological Mechanism of Pruritus in Atopic Dermatitis Focused on the Role of Serotonin. Biomol. Ther. *20*, 506–512.

Kim, J., and Krueger, J.G. (2015). The Immunopathogenesis of Psoriasis. Dermatol. Clin. *33*, 13–23.

Kinkelin, I., Mötzing, S., Koltzenburg, M., and Bröcker, E.-B. (2000). Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema. Cell Tissue Res. *302*, 31–37.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with $a\delta/c$ -fibers and colocalization with trk receptors. J. Comp. Neurol. *493*, 596–606.

Kodama, A.M., and Hokama, Y. (1989). Variations in symptomatology of Ciguatera poisoning. Toxicon *27*, 593–595.

Kosteletzky, F., Namer, B., Forster, C., and Handwerker, H.O. (2009). Impact of Scratching on Itch and Sympathetic Reflexes Induced by Cowhage (Mucuna pruriens) and Histamine. Acta Derm. Venereol. *89*, 271–277.

Kostyuk, P.G., Veselovsky, N.S., and Tsyndrenko, A.Y. (1981). lonic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons—I. Sodium currents. Neuroscience *6*, 2423–2430.

Kress, M., Izydorczyk, I., and Kuhn, A. (2001). N-and L-but not P/Q-type calcium channels contribute to neuropeptide release from rat skin in vitro. Neuroreport *12*, 867–870.

Kwan, K.Y., and Corey, D.P. (2009). Burning Cold: Involvement of TRPA1 in Noxious Cold Sensation. J. Gen. Physiol. *133*, 251–256.

Laduron, P. (1998). L'inflammation neurogénique. Inflamm. Eds Russo-Marie F Peltier Polla BSLibbey Paris 172–185.

Lange, W.R., and Kreider, S.D. (1989). Pilot Study of the Potential Benefit of Tocainide in the Management of Ciguatera Toxicity. In Travel Medicine, P.D. med R. Steffen, D.H. Lobel, D.J. Haworth, and P.D.J.B.M. FIPHE DM, FRCPath, FFCM, FRCP, FIBiol, Hon, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 371–374.

Lange, W.R., Kreider, S.D., Hattwick, M., and Hobbs, J. (1988). Potential benefit of tocainide in the treatment of ciguatera: report of three cases. Am. J. Med. *84*, 1087–1088.

Laurent, D., Kerbrat, A.-S., Darius, H.T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Chinain, M., Molgo, J., and Pauillac, S. (2008). Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae *7*, 827–838.

Lawson, S.N. (2002). Phenotype and Function of Somatic Primary Afferent Nociceptive Neurones with C-, $A\delta$ - or $A\alpha/\beta$ -Fibres. Exp. Physiol. *87*, 239–244.

Le Gall-Ianotto, C., Andres, E., Hurtado, S.P., Pereira, U., and Misery, L. (2012). Characterization of the first coculture between human primary keratinocytes and the dorsal root ganglion-derived neuronal cell line F-11. Neuroscience *210*, 47–57.

Le Garrec, R., L'herondelle, K., Le Gall-Ianotto, C., Lebonvallet, N., Leschiera, R., Buhe, V., Talagas, M., Vetter, I., Lewis, R.J., and Misery, L. (2016). Release of neuropeptides from a neuro-cutaneous co-culture model: A novel in vitro model for studying sensory effects of ciguatoxins. Toxicon *116*, 4–10.

Lebonvallet, N., Boulais, N., Le Gall, C., Pereira, U., Gauché, D., Gobin, E., Pers, J.-O., Jeanmaire, C., Danoux, L., Pauly, G., et al. (2012). Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. Exp. Dermatol. *21*, 156–158.

Lee, J.-H., Park, C.-K., Chen, G., Han, Q., Xie, R.-G., Liu, T., Ji, R.-R., and Lee, S.-Y. (2014). A monoclonal antibody that targets a NaV1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief. Cell *157*, 1393–1404.

Lee, S.E., Jeong, S.K., and Lee, S.H. (2010). Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. Yonsei Med. J. *51*, 808–822.

Legrand, A.M., Galonnier, M., and Bagnis, R. (1982). Studies on the mode of action of ciguateric toxins. Toxicon *20*, 311–315.

Legrand, A.M., Cruchet, P., Bagnis, R., Murata, M., Ishibashi, Y., and Yasumoto, T. (1990). Chromatographic and spectral evidence for the presence of multiple ciguatera toxins. p.

Lehane, L., and Lewis, R.J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. Int. J. Food Microbiol. *61*, 91–125.

Lembeck, F., and Holzer, P. (1979). Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *310*, 175–183.

Lewis, R.J. (1988). Negative inotropic and arrhythmic effects of high doses of ciguatoxin on guinea-pig atria and papillary muscles. Toxicon *26*, 639–649.

Lewis, R.J. (2001). The changing face of ciguatera. Toxicon 39, 97–106.

Lewis, R.S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. Nature *446*, 284–287.

Lewis, R.J., and Endean, R. (1986). Direct and indirect effects of ciguatoxin on guinea-pig atria and papillary muscles. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *334*, 313–322.

Lewis, R.J., and Holmes, M.J. (1993a). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. *106*, 615–628.

Lewis, R.J., and Holmes, M.J. (1993b). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. Comp. Biochem. Physiol. C *106*, 615–628.

Lewis, R.J., and Jones, A. (1997). Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Toxicon *35*, 159–168.

Lewis, R.J., and Wong Hoy, A.W. (1993). Comparative action of three major ciguatoxins on guinea-pig atria and ilea. Toxicon *31*, 437–446.

Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., MacLeod, J.K., and Sheil, M.M. (1991a). Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (Lycodontis javanicus, Muraenidae). Toxicon *29*, 1115–1127.

Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., MacLeod, J.K., and Sheil, M.M. (1991b). Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (Lycodontis javanicus, Muraenidae). Toxicon *29*, 1115–1127.

Lewis, R.J., Wong Hoy, A.W., and McGiffin, D.C. (1992). Action of ciguatoxin on human atrial trabeculae. Toxicon *30*, 907–914.

Lewis, R.J., Vernoux, J.-P., and Brereton, I.M. (1998a). Structure of Caribbean Ciguatoxin Isolated from Caranx latus. J. Am. Chem. Soc. *120*, 5914–5920.

Lewis, R.J., Vernoux, J.-P., and Brereton, I.M. (1998b). Structure of Caribbean Ciguatoxin Isolated from Caranx latus. J. Am. Chem. Soc. *120*, 5914–5920.

Lewis, R.J., Jones, A., and Vernoux, J.-P. (1999). HPLC/Tandem Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Sub-ppb Levels of Pacific and Caribbean Ciguatoxins in Crude Extracts of Fish. Anal. Chem. *71*, 247–250.

Liang, J., Kawamata, T., and Ji, W. (2010). Molecular signaling of pruritus induced by endothelin-1 in mice. Exp. Biol. Med. *235*, 1300–1305.

Liang, J., Ji, Q., and Ji, W. (2011). Role of transient receptor potential ankyrin subfamily member 1 in pruritus induced by endothelin-1. Neurosci. Lett. *492*, 175–178.

Liberona, J.L., Cárdenas, J.C., Reyes, R., Hidalgo, J., Molgó, J., and Jaimovich, E. (2008). Sodium-dependent action potentials induced by brevetoxin-3 trigger both IP3 increase and intracellular Ca2+ release in rat skeletal myotubes. Cell Calcium *44*, 289–297.

Lieu, T., Jayaweera, G., Zhao, P., Poole, D.P., Jensen, D., Grace, M., McIntyre, P., Bron, R., Wilson, Y.M., Krappitz, M., et al. (2014). The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. Gastroenterology *147*, 1417–1428.

Linley, J.E., Rose, K., Patil, M., Robertson, B., Akopian, A.N., and Gamper, N. (2008). Inhibition of M Current in Sensory Neurons by Exogenous Proteases: A Signaling Pathway Mediating Inflammatory Nociception. J. Neurosci. *28*, 11240–11249.

Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Faust, M.A., Kibler, S.R., Nau, A.W., Holland, W.C., Chinain, M., Holmes, M.J., and Tester, P.A. (2010). Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus Gambierdiscus. Toxicon *56*, 711–730.

Liu, Q., and Dong, X. (2015). The Role of the Mrgpr Receptor Family in Itch. In Pharmacology of Itch, A. Cowan, and G. Yosipovitch, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 71–88.

Liu, B., Escalera, J., Balakrishna, S., Fan, L., Caceres, A.I., Robinson, E., Sui, A., McKay, M.C., McAlexander, M.A., Herrick, C.A., et al. (2013). TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. FASEB J. *27*, 3549–3563.

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, Q., Sikand, P., Ma, C., Tang, Z., Han, L., Li, Z., Sun, S., LaMotte, R.H., and Dong, X. (2012). Mechanisms of Itch Evoked by β -Alanine. J. Neurosci. *32*, 14532–14537.

Lohman, R.-J., Cotterell, A.J., Barry, G.D., Liu, L., Suen, J.Y., Vesey, D.A., and Fairlie, D.P. (2012). An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. FASEB J. *26*, 2877–2887.

Lombet, A., Bidard, J.-N., and Lazdunski, M. (1987a). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na+ channel. FEBS Lett. *219*, 355–359.

Lombet, A., Bidard, J.N., and Lazdunski, M. (1987b). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na+ channel. FEBS Lett. *219*, 355–359.

Louzao, M., Cagide, E., Vieytes, M.R., Sasaki, M., Fuwa, H., Yasumoto, T., and Botana, L.M. (2006). The Sodium Channel of Human Excitable Cells is a Target for Gambierol. Cell. Physiol. Biochem. *17*, 257–268.

Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Alving, K., Delay-Goyet, P., and Lou, Y.-P. (1992). Release of Calcitonin Gene—Related Peptide from Sensory Neuronsa. Ann. N. Y. Acad. Sci. *657*, 187–193.

Luo, J., Feng, J., Liu, S., Walters, E.T., and Hu, H. (2015). Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. Cell. Mol. Life Sci. *72*, 3201–3223.

Maciel, I.S., Azevedo, V.M., Pereira, T.C., Bogo, M.R., Souza, A.H., Gomez, M.V., and Campos, M.M. (2014). The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice. Neuroscience *277*, 794–805.

Mattei, C., Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., and Molgó, J. (1997). Gambiertoxin (CTX-4B), purified from wild Gambierdiscus toxicus dinoflagellates, induces Na+-dependent swelling of single frog myelinated axons and motor nerve terminals in situ. Neurosci. Lett. *234*, 75–78.

Mattei, C., Dechraoui, M.-Y., Molgó, J., Meunier, F.A., Legrand, A.-M., and Benoit, E. (1999a). Neurotoxins targetting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. J. Neurosci. Res. *55*, 666–673.

Mattei, C., Molgó, J., Marquais, M., Vernoux, J.-P., and Benoit, E. (1999b). Hyperosmolar d-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. Brain Res. *847*, 50–58.

Mattei, C., Wen, P.J., Nguyen-Huu, T.D., Alvarez, M., Benoit, E., Bourdelais, A.J., Lewis, R.J., Baden, D.G., Molgó, J., and Meunier, F.A. (2008). Brevenal Inhibits Pacific Ciguatoxin-1B-Induced Neurosecretion from Bovine Chromaffin Cells. PLoS ONE *3*, e3448.

Mattei, C., Marquais, M., Schlumberger, S., Molgó, J., Vernoux, J.-P., Lewis, R.J., and Benoit, E. (2010). Analysis of Caribbean ciguatoxin-1 effects on frog myelinated axons and the neuromuscular junction. Toxicon *56*, 759–767.

Mattei, C., Vetter, I., Eisenblätter, A., Krock, B., Ebbecke, M., Desel, H., and Zimmermann, K. (2014a). Ciguatera fish poisoning: A first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. Toxicon *91*, 76–83.

Mattei, C., Molgó, J., and Benoit, E. (2014b). Involvement of both sodium influx and potassium efflux in ciguatoxin-induced nodal swelling of frog myelinated axons. Neuropharmacology *85*, 417–426.

Matterne, U., Apfelbacher, C.J., Loerbroks, A., Schwarzer, T., Büttner, M., Ofenloch, R., Diepgen, T.L., and Weisshaar, E. (2011). Prevalence, Correlates and Characteristics of Chronic Pruritus: A Population-based Cross-sectional Study. Acta Derm. Venereol. *91*, 674–679.

McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., and Zylka, M.J. (2012). CGRPα-Expressing Sensory Neurons Respond to Stimuli that Evoke Sensations of Pain and Itch. PLOS ONE *7*, e36355.

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. G-protein signaling: back to the future. Cell. Mol. Life Sci. *62*, 551–577.

McGrath, J.A., and Uitto, J. (2010). Anatomy and Organization of Human Skin. In Rook's Textbook of Dermatology, T.B.M. Dermatologist BS, FRCP Emeritus Consultant, S.B. Dermatologist MB, BChir, MD,, FRCP Consultant, N.C.Bs. Visitingessor MB, ChB, FRCP(Lond &.Edin) Consultant Dermatologist, and C.G.Bs. Dermatologist MD, FRCP, FRCPathessor of Dermatology Consultant, eds. (Wiley-Blackwell), pp. 1–53.

McGuire, J.J., Van Vliet, B.N., and Halfyard, S.J. (2008). Blood pressures, heart rate and locomotor activity during salt loading and angiotensin II infusion in protease-activated receptor 2 (PAR2) knockout mice. BMC Physiol. *8*, 20.

McMahon, S.B., and Wood, J.N. (2006). Increasingly Irritable and Close to Tears: TRPA1 in Inflammatory Pain. Cell *124*, 1123–1125.

Mendham, J.E. (2004). Gabapentin for the treatment of itching produced by burns and wound healing in children: a pilot study. Burns *30*, 851–853.

Metz, M., Grundmann, S., and Ständer, S. (2011a). Pruritus: an overview of current concepts. Vet. Dermatol. *22*, 121–131.

Metz, M., Grundmann, S., and Ständer, S. (2011b). Pruritus: an overview of current concepts. Vet. Dermatol. 22, 121–131.

Meyer, L., Carter, S., and Capper, A. (2015). An updated ciguatoxin extraction method and silica cleanup for use with HPLC-MS/MS for the analysis of P-CTX-1, PCTX-2 and P-CTX-3. Toxicon *108*, 249–256.

Misery, L. (2012). Quoi de neuf sur le prurit ? Rev. Fr. Allergol. 52, 181–184.

Misery, L., and Ständer, S. (2010). Pruritus (London: Springer London).

Misery, L., Brenaut, E., Le Garrec, R., Abasq, C., Genestet, S., Marcorelles, P., and Zagnoli, F. (2014). Neuropathic pruritus. Nat. Rev. Neurol. *10*, 408–416.

Miyano, K., Tang, H.-B., Nakamura, Y., Morioka, N., Inoue, A., and Nakata, Y. (2009). Paclitaxel and vinorelbine, evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. Neuropharmacology *57*, 25–32.

Molgó, J., Cornelia, J.X., and Legrand, A.M. (1990a). Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. Br. J. Pharmacol. *99*, 695–700.

Molgó, J., Cornelia, J.X., and Legrand, A.M. (1990b). Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. Br. J. Pharmacol. *99*, 695–700.

Molgó, J., Comella, J.X., Shimahara, T., and Legrandc, A.M. (1991). Tetrodotoxin-Sensitive Ciguatoxin Effects on Quantal Release, Synaptic Vesicle Depletion, and Calcium Mobilizationa. Ann. N. Y. Acad. Sci. *635*, 485– 488.

Molgó, J., Gaudry-Talarmain, Y.M., Legrand, A.M., and Moulian, N. (1993a). Ciguatoxin extracted from poisonous moray eels Gymnothorax javanicus triggers acetylcholine release from Torpedo cholinergic synaptosomes via reversed Na(+)-Ca2+ exchange. Neurosci. Lett. *160*, 65–68.

Molgó, J., Shimahara, T., and Legrand, A.M. (1993b). Ciguatoxin, extracted from poisonous morays eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma × glioma hybrid cells. Neurosci. Lett. *158*, 147–150.

Molgó, J., Shimahara, T., and Legrand, A.M. (1993c). Ciguatoxin, extracted from poisonous morays eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma × glioma hybrid cells. Neurosci. Lett. *158*, 147–150.

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.

Morris J, Jr, Lewin P, Hargrett NT, Smith C, Blake PA, and Schneider R (1982). Clinical features of ciguatera fish poisoning: A study of the disease in the us virgin islands. Arch. Intern. Med. *142*, 1090–1092.

Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., and Yasumoto, T. (1989). Structures of ciguatoxin and its congener. J. Am. Chem. Soc. *111*, 8929–8931.

Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui, M., and Yasumoto, T. (1990). Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel Gymnothorax javanicus and its likely precursor from the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus. J. Am. Chem. Soc. *112*, 4380–4386.

Nakatani, M., Maksimovic, S., Baba, Y., and Lumpkin, E.A. (2015). Mechanotransduction in epidermal Merkel cells. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. *467*, 101–108.

Namer, B., Carr, R., Johanek, L.M., Schmelz, M., Handwerker, H.O., and Ringkamp, M. (2008). Separate Peripheral Pathways for Pruritus in Man. J. Neurophysiol. *100*, 2062–2069.

Nguyen-Huu, T.D., Mattei, C., Wen, P.J., Bourdelais, A.J., Lewis, R.J., Benoit, E., Baden, D.G., Molgó, J., and Meunier, F.A. (2010). Ciguatoxin-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology *56*, 792–796.

Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., and Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. *91*, 9208–9212.

Oh, M.-H., Oh, S.Y., Lu, J., Lou, H., Myers, A.C., Zhu, Z., and Zheng, T. (2013). TRPA1-Dependent Pruritus in IL-13–Induced Chronic Atopic Dermatitis. J. Immunol. *191*, 5371–5382.

Oh, S.-Y., Kim, D.-H., Seo, M.-W., and Shin, B.-S. (2012). Reversible Cerebellar Dysfunction Associated with Ciguatera Fish Poisoning. J. Emerg. Med. *43*, 674–676.

Ohizumi, Y., Shibata, S., and Tachibana, K. (1981). Mode of the excitatory and inhibitory actions of ciguatoxin in the guinea-pig vas deferens. J. Pharmacol. Exp. Ther. *217*, 475–480.

Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hirama, M., Yasumoto, T., and Inafuku, Y. (2010). Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. Toxicon *56*, 656–661.

Oshita, K., Inoue, A., Tang, H.-B., Nakata, Y., Kawamoto, M., and Yuge, O. (2005). CB₁ Cannabinoid Receptor Stimulation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 Activities in Calcium Influx and Substance P Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Cells. J. Pharmacol. Sci. 97, 377–385.

Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N.N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., et al. (2010). First Toxin Profile of Ciguateric Fish in Madeira Arquipelago (Europe). Anal. Chem. *82*, 6032–6039.

Pang, Z., Sakamoto, T., Tiwari, V., Kim, Y.-S., Yang, F., Dong, X., Güler, A.D., Guan, Y., and Caterina, M.J. (2015). Selective keratinocyte stimulation is sufficient to evoke nociception in mice. Pain *156*, 656–665.

Parekh, A.B., and Putney, J.W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. Physiol. Rev. *85*, 757–810.

Park, D.L. (1994). Evolution of Methods for Assessing Ciguatera Toxins in Fish. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, G.W. Ware, ed. (Springer New York), pp. 1–20.

Passmore, G.M., Selyanko, A.A., Mistry, M., Al-Qatari, M., Marsh, S.J., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., Brown, T.A., Burbidge, S.A., Main, M., et al. (2003). KCNQ/M Currents in Sensory Neurons: Significance for Pain Therapy. J. Neurosci. *23*, 7227–7236.

Patel, R., Brice, N.L., Lewis, R.J., and Dickenson, A.H. (2015). Ionic mechanisms of spinal neuronal cold hypersensitivity in ciguatera. Eur. J. Neurosci. *42*, 3004–3011.

Pauillac, S., Sasaki, M., Inoue, M., Naar, J., Branaa, P., Chinain, M., Tachibana, K., and Legrand, A.-M. (2000). Characterization of mice antisera elicited with a ciguatoxin tetracyclic synthetic ring fragment (JKLM) conjugated to carrier proteins. Toxicon *38*, 669–685.

Pearn, J. (2001). Neurology of ciguatera. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 70, 4–8.

Pedersen-Bjergaard, U., Nielsen, L.B., Jensen, K., Edvinsson, L., Jansen, I., and Olesen, J. (1991). Calcitonin gene-related peptide, neurokinin A and substance P: effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. Peptides *12*, 333–337.

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. (2002). A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. Science *296*, 2046–2049.

Peng, Y.B., Ringkamp, M., Campbell, J.N., and Meyer, R.A. (1999). Electrophysiological Assessment of the Cutaneous Arborization of Aδ-Fiber Nociceptors. J. Neurophysiol. *82*, 1164–1177.

Pereira, U., Boulais, N., Lebonvallet, N., Lefeuvre, L., Gougerot, A., and Misery, L. (2010). Development of an in vitro coculture of primary sensitive pig neurons and keratinocytes for the study of cutaneous neurogenic inflammation. Exp. Dermatol. *19*, 931–935.

Peretz, A., Sheinin, A., Yue, C., Degani-Katzav, N., Gibor, G., Nachman, R., Gopin, A., Tam, E., Shabat, D., Yaari, Y., et al. (2007). Pre- and Postsynaptic Activation of M-Channels By a Novel Opener Dampens Neuronal Firing and Transmitter Release. J. Neurophysiol. *97*, 283–295.

Perez, C.M., Vasquez, P.A., and Perret, C.F. (2001). Treatment of Ciguatera Poisoning with Gabapentin. N. Engl. J. Med. *344*, 692–693.

Perney, T.M., Hirning, L.D., Leeman, S.E., and Miller, R.J. (1986). Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. *83*, 6656–6659.

Perret, D., and Luo, Z.D. (2009). Targeting Voltage-Gated Calcium Channels for Neuropathic Pain Management. Neurotherapeutics *6*, 679–692.

Persson, A.-K., Black, J.A., Gasser, A., Cheng, X., Fischer, T.Z., and Waxman, S.G. (2010). Sodium-calcium exchanger and multiple sodium channel isoforms in intra-epidermal nerve terminals. Mol. Pain *6*, 84.

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.

Pogatzki-Zahn, E., Marziniak, M., Schneider, G., Luger, T.A., and Ständer, S. (2008). Chronic pruritus: targets, mechanisms and future therapies. Drug News Perspect. *21*, 541–551.

Pottier, I., Vernoux, J.P., and Lewis, R.J. (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean islands and Western Atlantic. Rev. Environ. Contam. Toxicol. *168*, 99–141.

Pottier, I., Vernoux, J.-P., Jones, A., and Lewis, R.J. (2002). Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (Caranx latus) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Toxicon *40*, 929–939.

Pottier, I., Hamilton, B., Jones, A., Lewis, R.J., and Vernoux, J.P. (2003). Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (Sphyraena barracuda) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. Toxicon *42*, 663–672.

Purves, D. (2016). Neurosciences.

Quod, J.P., and Turquet, J. (1996a). Ciguatera in Réunion Island (SW Indian Ocean): Epidemiology and clinical patterns. Toxicon *34*, 779–785.

Quod, J.P., and Turquet, J. (1996b). Ciguatera in Réunion Island (SW Indian Ocean): Epidemiology and clinical patterns. Toxicon *34*, 779–785.

Rayner, M.D., Kosaki, T.I., and Fellmeth, E.L. (1968). Ciguatoxin: More Than an Anticholinesterase. Science *160*, 70–71.

Reddy, V.B., Iuga, A.O., Shimada, S.G., LaMotte, R.H., and Lerner, E.A. (2008). Cowhage-Evoked Itch Is Mediated by a Novel Cysteine Protease: A Ligand of Protease-Activated Receptors. J. Neurosci. *28*, 4331–4335.

Reddy, V.B., Shimada, S.G., Sikand, P., LaMotte, R.H., and Lerner, E.A. (2010). Cathepsin S elicits itch and signals via protease-activated receptors. J. Invest. Dermatol. *130*, 1468–1470.

Reilly, D. m., Ferdinando, D., Johnston, C., Shaw, C., Buchanan, K. d., and Green, M. r. (1997). The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations. Br. J. Dermatol. *137*, 163–170.

Riera, C.E., Huising, M.O., Follett, P., Leblanc, M., Halloran, J., Van Andel, R., de Magalhaes Filho, C.D., Merkwirth, C., and Dillin, A. (2014). TRPV1 Pain Receptors Regulate Longevity and Metabolism by Neuropeptide Signaling. Cell *157*, 1023–1036.

Ringkamp, M., Schepers, R.J., Shimada, S.G., Johanek, L.M., Hartke, T.V., Borzan, J., Shim, B., LaMotte, R.H., and Meyer, R.A. (2011). A Role for Nociceptive, Myelinated Nerve Fibers in Itch Sensation. J. Neurosci. *31*, 14841–14849.

Romani, N., Clausen, B.E., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. Immunol. Rev. *234*, 120–141.

Rongo, T., and van Woesik, R. (2011). Ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. Harmful Algae *10*, 345–355.

Ronti, T., Lupattelli, G., and Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *64*, 355–365.

Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., and Steinhoff, M. (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiol. Rev. *86*, 1309–1379.

Rossbach, K., Nassenstein, C., Gschwandtner, M., Schnell, D., Sander, K., Seifert, R., Stark, H., Kietzmann, M., and Bäumer, W. (2011). Histamine H1, H3 and H4 receptors are involved in pruritus. Neuroscience *190*, 89–102.

Rossi, R., and Johansson, O. (1997). Cutaneous innervation and the role of neuronal peptides in cutaneous inflammation: a minireview. Eur. J. Dermatol. EJD *8*, 299–306.

Rothman, S. (1941). Physiology of Itching. Physiol. Rev. 21, 357–381.

Rothmeier, A.S., and Ruf, W. (2012). Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. Semin. Immunopathol. *34*, 133–149.

Roy, M.L., and Narahashi, T. (1992). Differential properties of tetrodotoxinsensitive and tetrodotoxin- resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. J. Neurosci. *12*, 2104–2111.

Ruff, (Prénom), and Lewis, R.J. (1994). Clinical aspects of ciguatera: an overview.

Russell, F.E. (1975). Ciguatera poisoning: A report of 35 cases. Toxicon *13*, 383–385.

Sanada, M., Yasuda, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Isono, T., Matsuura, H., and Kikkawa, R. (2002). Increase in intracellular Ca2+ and calcitonin generelated peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience *111*, 413–422.

Satake, M., Murata, M., and Yasumoto, T. (1993). The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured Gambierdiscus toxicus. Tetrahedron Lett. *34*, 1975–1978.

Satake, M., Ishibashi, Y., Legrand, A.-M., and Yasumoto, T. (1996). Isolation and Structure of Ciguatoxin-4A, a New Ciguatoxin Precursor, from Cultures of Dinoflagellate Gambierdiscus toxicus and Parrotfish Scarus gibbus. Biosci. Biotechnol. Biochem. *60*, 2103–2105.

Satake, M., Morohashi, A., Oguri, H., Oishi, T., Hirama, M., Harada, N., and Yasumoto, T. (1997). The Absolute Configuration of Ciguatoxin. J. Am. Chem. Soc. *119*, 11325–11326.

Sauviat, M.-P., Marquais, M., and Vernoux, J.-P. (2002). Muscarinic effects of the Caribbean ciguatoxin C-CTX-1 on frog atrial heart muscle. Toxicon *40*, 1155–1163.

Sauviat, M.-P., Boydron-Le Garrec, R., Masson, J.-B., Lewis, R.L., Vernoux, J.-P., Molgó, J., Laurent, D., and Benoit, E. (2006). Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins. Blood Cells. Mol. Dis. *36*, 1–9.

Schaible, H.-G. (2006). Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. In Analgesia, P.D.C. Stein, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 3–28.

Scheuer, P.J., Takahashi, W., Tsutsumi, J., and Yoshida, T. (1967). Ciguatoxin: Isolation and Chemical Nature. Science *155*, 1267–1268.

Schlumberger, S., Mattei, C., Molgó, J., and Benoit, E. (2010). Dual action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent K+ and Na+ channels of single myelinated axons. Toxicon *56*, 768–775.

Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H.O., and Torebjörk, H.E. (1997). Specific C-Receptors for Itch in Human Skin. J. Neurosci. *17*, 8003–8008.
Schmelz, M., Schmidt, R., Weidner, C., Hilliges, M., Torebjork, H.E., and Handwerker, H.O. (2003). Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. J. Neurophysiol. *89*, 2441–2448.

Schnorf, H., Taurarii, M., and Cundy, T. (2002). Ciguatera fish poisoning A double-blind randomized trial of mannitol therapy. Neurology *58*, 873–880.

Scholzen, T., Armstrong, C.A., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Olerud, J.E., and Ansel, J.C. (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp. Dermatol. *7*, 81–96.

Setliff, J.A., Rayner, M.D., and Ki Hong, S. (1971). Effect of Ciguatoxin on sodium transport across the frog skin. Toxicol. Appl. Pharmacol. *18*, 676–684.

Sevigny, L.M., Zhang, P., Bohm, A., Lazarides, K., Perides, G., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2011). Interdicting protease-activated receptor-2-driven inflammation with cell-penetrating pepducins. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 8491–8496.

Shelley, W., and Arthur, R. (1957). The neurohistology and neurophysiology of the itch sensation in man. AMA Arch. Dermatol. *76*, 296–323.

Shim, W.-S., Tak, M.-H., Lee, M.-H., Kim, M., Kim, M., Koo, J.-Y., Lee, C.-H., Kim, M., and Oh, U. (2007). TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 2331–2337.

Sikand, P., Dong, X., and LaMotte, R.H. (2011). BAM8–22 peptide produces itch and nociceptive sensations in humans independent of histamine release. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 7563–7567.

Silberberg-Sinakin, I., and Thorbecke, J. (1980). Contact Hypersensitivity and Langerhans Cells. J. Invest. Dermatol. *75*, 61–67.

Sills, G.J. (2006). The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. Curr. Opin. Pharmacol. *6*, 108–113.

Skinner, M.P., Brewer, T.D., Johnstone, R., Fleming, L.E., and Lewis, R.J. (2011). Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). PLOS Negl Trop Dis *5*, e1416.

Song, I.-S., Bunnett, N.W., Olerud, J.E., Harten, B., Steinhoff, M., Brown, J.R., Sung, K.J., Armstrong, C.A., and Ansel, J.C. (2000). Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). Exp. Dermatol. *9*, 42–52.

Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., and Travers, J.B. (2003). Activation of Epidermal Vanilloid Receptor-1 Induces Release of Proinflammatory Mediators in Human Keratinocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. *304*, 217–222.

Sparber, F., Tripp, C.H., Hermann, M., Romani, N., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. Immunobiology *215*, 770–779.

Ständer, S. (2016). NK-1 Antagonists. In Pruritus, L. Misery, and S. Ständer, eds. (Springer International Publishing), pp. 407–414.

Ständer, S., Weisshaar, E., Steinhof, M., Luger, T.A., and Metze, D. (2003a). [Pruritus--pathophysiology, clinical features and therapy--an overview]. J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG *1*, 105–118.

Ständer, S., Steinhoff, M., Schmelz, M., Weisshaar, E., Metze, D., and Luger, T. (2003b). Neurophysiology of Pruritus: Cutaneous Elicitation of Itch. Arch. Dermatol. *139*, 1463–1470.

Ständer, S., Weisshaar, E., Mettang, T., Szepietowski, J.C., Carstens, E., Ikoma, A., Bergasa, N.V., Gieler, U., Misery, L., Wallengren, J., et al. (2007). Clinical Classification of Itch: a Position Paper of the International Forum for the Study of Itch. Acta Derm. Venereol. *87*, 291–294.

Stefansson, K., Brattsand, M., Roosterman, D., Kempkes, C., Bocheva, G., Steinhoff, M., and Egelrud, T. (2008). Activation of Proteinase-Activated Receptor-2 by Human Kallikrein-Related Peptidases. J. Invest. Dermatol. *128*, 18–25.

Steinhoff, M., Corvera, C.U., Thoma, M.S., Kong, W., McAlpine, B.E., Caughey, G.H., Ansel, J.C., and Bunnett, N.W. (1999). Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. Exp. Dermatol. *8*, 282–294.

Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P.S., Luger, T.A., and Schmelz, M. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 23, 6176–6180.

Steinhoff, M., Bienenstock, J., Schmelz, M., Maurer, M., Wei, E., and Bíró, T. (2006). Neurophysiological, Neuroimmunological, and Neuroendocrine Basis of Pruritus. J. Invest. Dermatol. *126*, 1705–1718.

Strachan, L.C., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (1999a). Differential Actions of Pacific Ciguatoxin-1 on Sodium Channel Subtypes in Mammalian Sensory Neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. *288*, 379–388.

Strachan, L.C., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (1999b). Differential Actions of Pacific Ciguatoxin-1 on Sodium Channel Subtypes in Mammalian Sensory Neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. *288*, 379–388.

Strakhova, M.I., Nikkel, A.L., Manelli, A.M., Hsieh, G.C., Esbenshade, T.A., Brioni, J.D., and Bitner, R.S. (2009). Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. Brain Res. *1250*, 41–48.

Streilein, J.W., and Bergstresser, P.R. (1984). Langerhans Cells: Antigen Presenting Cells of the Epidermis. Immunobiology *168*, 285–300.

Stucky, C.L., and Lewin, G.R. (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 6497–6505.

Suen, J., Barry, G., Lohman, R., Halili, M., Cotterell, A., Le, G., and Fairlie, D. (2012). Modulating human proteinase activated receptor 2 with a novel antagonist (GB88) and agonist (GB110). Br. J. Pharmacol. *165*, 1413–1423.

Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A., and Eid, S.R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. Nat. Rev. Drug Discov. *6*, 357–372.

Szolcsányi, J. (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. Agents Actions 23, 4–11.

Talagas, M., and Misery, L. (2015). Innervation cutanée. In Kinésithérapie-Médecine physique-Réadaptation, (Elsevier), pp. 1–6.

Tang, H.-B., Inoue, A., Iwasa, M., Hide, I., and Nakata, Y. (2006). Substance P release evoked by capsaicin or potassium from rat cultured dorsal root ganglion neurons is conversely modulated with bradykinin. J. Neurochem. *97*, 1412–1418.

Tang, H.-B., Li, Y.-S., Miyano, K., and Nakata, Y. (2008). Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. Neuropharmacology *55*, 1405–1411.

Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Ishibashi, Y., Legrand, A.-M., and Yasumoto, T. (1991). Light and electron microscopic studies of pathologic changes induced in mice by ciguatoxin poisoning. Toxicon *29*, 633–643.

Terao, K., Ito, E., and Yasumoto, T. (1992). Light and electron microscopic studies of the murine heart after repeated administrations of ciguatoxin or ciguatoxin-4c. Nat. Toxins *1*, 19–26.

Thurmond, R.L., Gelfand, E.W., and Dunford, P.J. (2008). The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. Nat. Rev. Drug Discov. 7, 41–53.

Timmes, T.R., Rothbaum, R., Kirti, Silva, C.Y., Bhawan, J., Cummins, D.L., and Wolpowitz, D. (2013). Gastrin-Releasing Peptide-Expressing Nerves Comprise Subsets of Human Cutaneous Aδ and C Fibers that May Sense Pruritus. J. Invest. Dermatol. *133*, 2645–2647.

Ting, J.Y., and Brown, A.F. (2001). Ciguatera poisoning: a global issue with common management p...: European Journal of Emergency Medicine.

Tobin, D., Nabarro, G., de la Faute, H.B., van Vloten, W.A., van der Putte, S.C.J., and Schuurman, H.-J. (1992). Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. *90*, 613–622.

Tominaga, M., and Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. Pflüg. Arch. *451*, 143–150.

Trentin, P.G., Fernandes, M.B., D'Orléans-Juste, P., and Rae, G.A. (2006). Endothelin-1 Causes Pruritus in Mice. Exp. Biol. Med. *231*, 1146–1151.

Tsumuraya, T., Fujii, I., and Hirama, M. (2014). Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: sandwich ELISA detection of ciguatoxins. J. AOAC Int. *97*, 373–379.

Tuckett, R.P. (1982). Itch Evoked by Electrical Stimulation of the Skin. J. Invest. Dermatol. *79*, 368–373.

Twycross, R., Greaves, M.W., Handwerker, H., Jones, E.A., Libretto, S.E., Szepietowski, J.C., and Zylicz, Z. (2003). Itch: scratching more than the surface. QJM *96*, 7–26.

Ulmann, L., Rodeau, J.-L., Danoux, L., Contet-Audonneau, J.-L., Pauly, G., and Schlichter, R. (2007). Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. Eur. J. Neurosci. *26*, 113–125.

Vasko, M.R., Campbell, W.B., and Waite, K.J. (1994). Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. J. Neurosci. *14*, 4987–4997.

Veldhuis, N.A., Poole, D.P., Grace, M., McIntyre, P., and Bunnett, N.W. (2015). The G Protein–Coupled Receptor–Transient Receptor Potential Channel Axis: Molecular Insights for Targeting Disorders of Sensation and Inflammation. Pharmacol. Rev. *67*, 36–73.

Verdru, P., Greef, C.D., Mertens, L., Carmeliet, E., and Callewaert, G. (1997). Na+-Ca2+ Exchange in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. J. Neurophysiol. 77, 484–490.

Vergnolle, N., Bunnett, N.W., Sharkey, K.A., Brussee, V., Compton, S.J., Grady, E.F., Cirino, G., Gerard, N., Basbaum, A.I., Andrade-Gordon, P., et al. (2001). Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. Nat. Med. *7*, 821–826.

Vergnolle, N., Ferazzini, M., D'Andrea, M.R., Buddenkotte, J., and Steinhoff, M. (2003). Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. Trends Neurosci. *26*, 496–500.

Vernoux, J. (1988). La ciguatera dans l'île de Saint-Barthélémy: aspects épidémiologiques, toxicologiques et préventifs. Oceanol. Acta *11*, 37–46.

Vernoux, J.-P., and Abbad el Andaloussi, S. (1986). Hétérogénéité des ciguatoxines extraites de poissons péchés aux Antilles françaises. Biochimie *68*, 287–291.

Vernoux, J.-P., and Lewis, R.J. (1997). Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (Caranx latus). Toxicon *35*, 889–900.

Vetter, I., Touska, F., Hess, A., Hinsbey, R., Sattler, S., Lampert, A., Sergejeva, M., Sharov, A., Collins, L.S., and Eberhardt, M. (2012a). Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. EMBO J. *31*, 3795–3808.

Vetter, I., Touska, F., Hess, A., Hinsbey, R., Sattler, S., Lampert, A., Sergejeva, M., Sharov, A., Collins, L.S., Eberhardt, M., et al. (2012b). Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. EMBO J. *31*, 3795–3808.

Viana, F. (2016). TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. J. Physiol. *594*, 4151–4169.

Villamil, A.G., Bandi, J.C., Galdame, O.A., Gerona, S., and Gadano, A.C. (2005). Efficacy of lidocaine in the treatment of pruritus in patients with chronic cholestatic liver diseases. Am. J. Med. *118*, 1160–1163.

Vohr, H.-W. (2016). Delayed-Type Hypersensitivity. In Encyclopedia of Immunotoxicology, H.-W. Vohr, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 254–257.

Vu, T.-K.H., Hung, D.T., Wheaton, V.I., and Coughlin, S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell *64*, 1057–1068.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2008). Normal axonal ion channel function in large peripheral nerve fibers following chronic ciguatera sensitization. Muscle Nerve *37*, 403–405.

Wallengren, J. (2005). Neuroanatomy and neurophysiology of itch. Dermatol. Ther. *18*, 292–303.

Watanabe, Y., Koide, Y., and Kimura, J. (2006). Topics on the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger:
>Pharmacological Characterization of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Inhibitors. J. Pharmacol. Sci. *102*, 7–16.

Weisshaar, E., and Dalgard, F. (2009). Epidemiology of Itch: Adding to the Burden of Skin Morbidity. Acta Derm. Venereol. *89*, 339–350.

Weisshaar, E., and Dalgard, F. (2016). Epidemiology. In Pruritus, L. Misery, and S. Ständer, eds. (Springer International Publishing), pp. 73–79.

Willis, W.D. (2009). The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. Exp. Brain Res. *196*, 5–11.

Wilson, S.R., Gerhold, K.A., Bifolck-Fisher, A., Liu, Q., Patel, K.N., Dong, X., and Bautista, D.M. (2011). TRPA1 is required for histamine-independent, Masrelated G protein-coupled receptor-mediated itch. Nat. Neurosci. *14*, 595–602.

Wilson, S.R., Thé, L., Batia, L.M., Beattie, K., Katibah, G.E., McClain, S.P., Pellegrino, M., Estandian, D.M., and Bautista, D.M. (2013). The epithelial cellderived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. Cell *155*, 285–295.

Winhoven, S. m., Coulson, I. h., and Bottomley, W. w. (2004). Brachioradial pruritus: response to treatment with gabapentin. Br. J. Dermatol. *150*, 786–787.

Wolkenstein, P., Grob, J.-J., Bastuji-Garin, S., Ruszczynski, S., Roujeau, J.-C., Revuz, J., and Société Française de Dermotologie (2003). French people and skin diseases: results of a survey using a representative sample. Arch. Dermatol. *139*, 1614–1619; discussion 1619.

Wong, C.-K., Hung, P., Lee, K.L.H., Mok, T., Chung, T., and Kam, K.-M. (2008). Features of Ciguatera Fish Poisoning Cases in Hong Kong 2004-2007. Biomed. Environ. Sci. *21*, 521–527.

Woolf, C.J., and Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. Neuron *55*, 353–364.

Wu, X., and Hammer, J.A. (2014). Melanosome transfer: it is best to give and receive. Curr. Opin. Cell Biol. *29*, 1–7.

Xu, W., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W., and Foster, D.C. (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 6642–6646.

Yasumoto, T. (2001). The chemistry and biological function of natural marine toxins. Chem. Rec. *1*, 228–242.

Yosipovitch, G. (2007). The Pruritus Receptor Unit: A Target for Novel Therapies. J. Invest. Dermatol. *127*, 1857–1859.

Yosipovitch, G., Greaves, M.W., and Schmelz, M. (2003). Itch. The Lancet *361*, 690–694.

Yun, J.-W., Seo, J.A., Jang, W.-H., Koh, H.J., Bae, I.-H., Park, Y.-H., and Lim, K.-M. (2011). Antipruritic Effects of TRPV1 Antagonist in Murine Atopic Dermatitis and Itching Models. J. Invest. Dermatol. *131*, 1576–1579.

Zhang, Z., Zhang, C., Luan, W., Li, X., Liu, Y., and Luo, X. (2015). Ultrasensitive and accelerated detection of ciguatoxin by capillary electrophoresis via on-line sandwich immunoassay with rotating magnetic field and nanoparticles signal enhancement. Anal. Chim. Acta *888*, 27–35.

Zhao, P., Barr, T.P., Hou, Q., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Albrecht, P.J., Petersen, K., Eisenberg, E., Wymer, J.P., Rice, F.L., et al. (2008). Voltage-

gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: Evidence for a role in pain. PAIN *139*, 90–105.

Zhou, Q.-L., Strichartz, G., and Davar, G. (2001). Endothelin-1 activates ETA receptors to increase intracellul...: NeuroReport.

Zimmermann, K., Deuis, J.R., Inserra, M.C., Collins, L.S., Namer, B., Cabot, P.J., Reeh, P.W., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2013). Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. PAIN® *154*, 1999–2006.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Oral presentation (OP52) - 8th World Congress on Itch (2015),

Nara, Japan.

Résumé publié dans le journal Acta-Dermato Venereologica. 95(7): 894.

ARE KERATINOCYTES AND SOME ITCH MEDIATORS INVOLVED IN THE NEUROPEPTIDE RELEASE INDUCED BY PACIFIC-CIGUATOXIN-2 IN A SENSORY NEURON-KERATINOCYTE COCULTURE MODEL?

<u>Killian Lherondelle</u>¹, Réginald Philippe², Olivier Mignen², Irina Vetter³, Richard Lewis³, Laurent Misery¹, Raphaèle Le Garrec¹

¹Laboratoire de Neurosciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale, Brest, ²INSERM U¹⁰⁷⁸, Université Bretagne Occidentale, Brest, France, ³Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St Lucia, Australia

Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is caused by the consumption of fishes contaminated by ciguatoxins (CTXs). One of the most characteristic clinical signs is an intense pruritus which can persist for several weeks and is poorly or not relieved by antihistamine drugs. It is admitted that CTXs bind to Voltage-Gated Sodium Channels but the molecular mechanisms underlying CTX-induced itch remain unclear. Skin cells or skin afferents fibres can release pruritogen substances, such as substance P (SP) and Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), and express emerging receptors, including some TRP (Transient Receptor Potential) channels and some Protease-Activated Receptors (PARs), that have been shown to mediate or facilitate pruritus. We showed that nanomolar concentrations of Pacific-CTX-2 induce a substantial SP and CGRP release from a co-culture of human keratinocytes and rat DRG neurons. The aim of this study was to dissect the cellular and molecular mechanisms of this effect. In particular, the involvement of keratinocytes, PAR-2 and some TRPs channels were studied using pharmacological tools and calcium imaging experiments. CFP-associated pruritus has never been the subject of any study. This work may not only identify new potential targets for treating ciguatera but is also an original way to better understanding the pathophysiology of itch.

Présentation orale - Journée Dermatologiques de Paris (2015),

Paris, France.

Résumé publié dans le journal Annales de Dermatologie et Vénéréologie., 142 (12),

S433-S434.

CO027 La ciguatéra : l'étude du prurit sous

un nouvel angle

K. L'herondelle^{1,*}, R. Philippe², O. Mignen², I. Vetter³,
R.J. Lewis³, L. Misery⁴, R. Le Garrec¹
¹ LNB EA4685, université Bretagne Occidentale, Brest, France
² Inserm U1078, université Bretagne Occidentale, Brest, France
³ Institute for Molecular Bioscience, Université de Queensland, Saint-Lucia, Australie
⁴ LNB EA4685, université Bretagne Occidentale, service de dermatologie, CHU de Brest, France

Auteur correspondant.

Introduction La ciguatéra est une intoxication des régions tropicales provoquée par l'ingestion de poissons contaminés par des ciguatoxines (CTXs). Les signes cliniques caractéristiques de cette maladie sont des troubles sensitifs cutanés, tels qu'une allodynie au froid et un prurit intense qui peuvent persister des semaines, voire des mois. C'est la raison pour laquelle la ciguatéra est communément appelée «la gratte». Les CTXs se fixent aux canaux Na* des neurones. Il a été montré que les fibres sensorielles activées par les CTXs lors de l'allodynie au froid sont de type Aå et C, expriment le CGRP et que l'activation implique le canal cationique TRPA1. Le prurit est une sensation désagréable qui conduit au besoin de se gratter. Bien que sa physiopathologie complexe reste incomplètement connue, nous savons que certains éléments y participent, tels que le TRPA1, les TRPV (Transient Receptor Potential Ankyrin/Vanilloid) et les PARs (Protease Activated Receptors). De plus, les fibres nerveuses du prurit possèdent comme neuropeptides de référence la SP et le CGRP. Les anti-histaminiques ne fonctionnent que dans 30% des cas de prurit et il est nécessaire de trouver de nouvelles voies d'activation. L'étude du prurit ciguatérique, non histaminergique, apparaît comme une approche intéressante pour mieux comprendre la physiopathologie du prurit.

Matériel et méthodes Nous avons établi une co-culture de kératinocytes humains et de neurones sensoriels de rat afin de mieux appréhender les signes sensitifs périphériques de la ciguatéra. Des dosages de SP et CGRP dans les surnageants ont été réalisés pour explorer l'effet d'une CTX sur la sécrétion de neuropeptides. Sur ce même modèle, différents inhibiteurs ont été utilisés pour identifier des acteurs potentiels dans cet effet neurosécretoire, comme le TRPV1, le TRPA1 et le PAR2. Comme l'exocytose de neuropeptides est consécutive à une augmentation de calcium intracellulaire, nous avons réalisé des expériences d'imagerie calcique. Afin de tester si les kératinocytes pouvaient être une cible directe des CTXs, nous avons étudié leur réponse calcique à une CTX, avec ou non pré-incubation d'inhibiteurs spécifiques.

Résultats Nous avons montré que les neuropeptides de référence du prurit, SP et CGRP, sont sécrétés sous l'influence des CTXs. Nous avons aussi montré que la neurosécrétion induite par les CTXs est liée à l'activation de récepteurs spécifiques encore inconnus en tant que cibles des CTXs. Les expériences d'imagerie calcique ont révélé que les kératinocytes sont une nouvelle cible cellulaire des CTXs, en plus des terminaisons nerveuses.

Conclusion Cette étude met pour la première fois en évidence une libération de neuropeptides et une activation directe des kératinocytes par une CTX. Elle permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques dans la ciguatéra mais aussi plus largement dans un certain nombre de prurits non histaminergiques. Travail réalisé avec le soutien de la SFD.

Mots clés Ciguatoxines ; Neuropeptides ; Prurit

Déclaration de liens d'intérêts Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

http://dx.doi.org/10.1016/j.annder.2015.10.028



Présentation orale - 32^e Congrès Annuel de Recherche en

Dermatologie (2014), Brest, France

Résumé publié dans le journal *Annales de Dermatologie et Vénéréologie.*, 141 (6-7 Suppl 2) : S90.



Annales de Dermatologie et de Vénéréologie Volume 141, numéro 6-752 page 90 (juin 2014) Doi : 10.1016/j.annder.2014.04.154

Communications orales

Effets de la ciguatoxine P-CTX-2 sur la libération induite de neuropeptides dans un modèle de co-culture kératinocytesneurones sensoriels

K. L'herondelle ^a, *, R. Philippe ^b, O. Mignen ^b, I. Vetter ^c, R.J. Lewis ^c, L. Misery ^a, ^d, R. Le Garrec ^a ^a LNB, EA4685, Brest, France

^b Inserm U1078, Brest, France

^c Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St Lucia, Australie

^d Department of Dermatology, Brest University Hospital, Brest, France

•Auteur correspondant.

Mots clés : Ciguatoxine, Neuropeptides, Troubles sensitifs

La ciguatera est une intoxication provoquée par l'ingestion de poissons contaminés par des ciguatoxines (CTXs). Parmi les signes cliniques caractéristiques, des troubles sensitifs cutanés tels que des dysesthésies induites par le froid, des paresthésies et un prurit intense peuvent persister plusieurs semaines. Il est admis que les CTXs ciblent les canaux Na_v voltage-dépendants. Cette interaction entraîne l'entrée de Na⁺ dans la cellule et augmente l'excitabilité membranaire. Récemment, il a été montré que l'allodynie au froid provoquée par une CTX chez la souris est Na_v -dépendante et implique le canal cationique TRPA1. De plus, les neurones sensoriels répondant à la CTX expriment le CGRP. Le but de ces travaux est d'étudier l'effet de la P-CTX-2 sur la sécrétion de neuropeptides *in vitro* par des neurones sensoriels co-cultivés avec des kératinocytes. En présence de concentrations nanomolaires de P-CTX-2, une libération soutenue de CGRP et de substance P par la co-culture a été constatée. De plus, des expériences d'imagerie calcique sur neurones seuls ont montré une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets ont été explorés à l'aide de différents antagonistes pharmacologiques (notamment des Na_v, TRPA1, TRPV1) dans le but de mettre en évidence des cibles potentielles pour traiter les troubles sensitifs de la ciguatera.

Oral presentation - 22th Meeting of French Society of Toxinology: New targets and new functions (SFET 2014), Paris,

France.

Résumé publié dans une issue spéciale du journal Toxicon.

STUDY OF THE INVOLVEMENT OF ITCH MEDIATORS IN THE NEUROPEPTIDE RELEASE INDUCED BY PACIFIC-CIGUATOXIN-2 IN A CO-CULTURE MODEL OF SENSORY NEURONS AND KERATINOCYTES

K. L'herondelle^{a,*}, R. Philippe^b, O. Mignen^b, I. Vetter^c, R.J. Lewis^c, L. Misery^{a,d}, R. Le Garrec^a, ^aLaboratoire de Neurosciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France; ^bINSERM U1078, Université Bretagne Occidentale, 46 rue Felix Le Dantec, 29218 Brest, France; ^cInstitute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St Lucia, Australia; ^dDépartement de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brest, 2 avenue Foch, 29609 Brest, France

Ciguatera Fish Poisoning (CFP), which is called "La Gratte" (the itch) in the Pacific islands, is caused by eating fish contaminated with ciguatoxins (CTXs). The most characteristic clinical signs are cutaneous sensory disorders such as cold-induced dysesthesia, paresthesia and an intense pruritus. CFP-associated itch, which can persist for several weeks, is poorly or not relieved by antihistamine drugs. At the cellular and molecular levels, it is recognized that CTXs bind to voltage-gated sodium channels (VGSCs) leading to Na* entry and increased excitability with various cellular, including secretory, consequences. Recently, it was shown that the cold allodynia induced by CTX in mice is VGSC-dependent and involves TRPA1, and that sensory neurons which respond to CTX express Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP). However, the molecular basis of the mechanisms underlying CTX-induced itch remain unclear. Pruritus is the unpleasant sensation that leads to the need to scratch. It can seriously impair quality of life, especially when it is chronic. Whatever its origin is, its pathophysiology is complex and still incompletely known, despite recent advances. Whereas the best-known pruritogen in humans is histamine, many types of itch do not respond to anti-H1 drugs. Other substances released from skin cells, such as substance P (SP) and CGRP, have been shown to mediate or facilitate pruritus. Furthermore, substantial evidence indicate the involvement of emerging receptors expressed by various skin cells, including some TRP (Transient Receptor Potential) channels and some Protease-Activated Receptors (PARs). The purpose of this work was to study the release of the neuropeptides substance P (SP) and CGRP in a coculture of human keratinocytes and rat DRG neurons exposed to Pacific-Ciguatoxin-2 (P-CTX-2). Neuropeptides were quantified in the culture supernatant by ELISA. For the first time, we showed that low nanomolar concentrations of P-CTX-2 cause a large release of SP and CGRP in this model. In addition, calcium imaging experiments on cultured keratinocytes alone showed an increase of intracellular Ca2+. Pharmacological tools were used to study the involvement of some TRP channels and of PAR-2 receptor in these effects of the P-CTX-2. Up to now, CFP-associated pruritus has never been the subject of any study. This work is not only an original way to better understand the pathophysiology of itch but it will also supplement the knowledge of the molecular and cellular mechanisms of CFP. The long-term aim of this study is to identify potential targets for treating sensory disorders of ciguatera.

Présentation poster - Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie (2016), Paris, France.

Résumé non publié.



Présentation poster - Journée des Doctorants, 2014, Brest,

France.

Résumé non publié.



Présentation poster - 31e Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie (2013), Paris, France.

Résumé publié dans le journal *Annales de Dermatologie et Vénéréologie*. 140 (12), S648-S649.



Co-auteur d'un Article de résultats (2016)

"Release of neuropeptides from a neuro-cutaneous co-culture model: a novel in vitro model for studying sensory effects of ciguatoxins"

Le Garrec R, <u>L'Herondelle K</u>, Le Gall-Ianotto C, Lebonvallet N, Leschiera R, Buhe V, Talagas M, Vetter I, Lewis RJ, Misery L, (**2016**). Toxicon 116:4-10.

Highlights

- A novel co-culture model is proposed for studying neuro-cutaneous effects of CTXs.
- ♦ Nanomolar concentrations of P-CTX-2 induced SP and CGRP release from the co-culture.
- The release of neuropeptides induced by P-CTX-2 involved TTX-resistant VGSCs.
- ✤ Increasing the external [Ca2+] greatly potentiated the P-CTX-2-elicited NP release.

Abstract

Ciguatoxins are the major toxins responsible for ciguatera fish poisoning, a disease dominated by muco-cutaneous sensory disorders including paresthesiae, cold dysesthesia and pruritus. While the ciguatoxins are well known to target voltage-gated sodium channels (VGSCs), the ensuing molecular mechanisms underlying these sensory disorders remain poorly understood. In this study, we propose a primary sensory neuron-keratinocyte co-culture as an appropriate model to study the neurocutaneous effects of ciguatoxins. Using this model, we show for the first time that nanomolar concentrations of Pacific ciguatoxin-2 (P-CTX-2) induced a VGSCdependent release of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). As these neuropeptides are known mediators of pain and itch sensations, the ciguatoxininduced sensory disturbances in ciguatera fish poisoning may involve the release of these neuropeptides. We further determined time- and P-CTX-2 concentrationdependence of the release of SP and CGRP from the co-culture model. Moreover, we highlighted the influence of extracellular calcium on the release of neuropeptides elicited by P-CTX-2. These findings underline the usefulness of this novel in vitro model for studying the cellular and molecular mechanisms of the neuro-cutaneous effects of ciguatoxins, which may assist with identifying potential therapeutics for ciguatera fish poisoning.

Co-auteur d'un Article de revue (2015)

"Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin"

Gouin O, Lebonvallet N, <u>L'Herondelle K</u>, Le Gall-Ianotto C, Buhé V, Plée-Gautier E, Carré JL, Lefeuvre L, Misery L, (2015). Exp Dermatol. 24(10):723-726.

Abstract

Cutaneous neurogenic inflammation (CNI) is frequently associated with skin disorders. CNI is not limited to the retrograde signalling of nociceptive sensory nerve endings but can instead be regarded as a multicellular phenomenon. Thus, soluble mediators participating in communication among sensory nerves, skin and immune cells are key components of CNI. These interactions induce the self-maintenance of CNI, promoting a vicious cycle. Certain G protein-coupled receptors (GPCRs) play a prominent role in these cell interactions and contribute to self-maintenance. Protease-activated receptors 2 and 4 (PAR-2 and PAR-4, respectively) and Mas-related G protein-coupled receptors (Mrgprs) are implicated in the synthesis and release of neuropeptides, proteases and soluble mediators from most cutaneous cells. Regulation of the expression and release of these mediators contributes to the vicious cycle of CNI. The authors propose certain hypothetical therapeutic options to interrupt this cycle, which might reduce skin symptoms and improve patient quality of life.

Co-auteur de Poster (2016) - The 19th International Congress on In Vitro Toxicology, Juan-les-Pins, France

"A co-culture of sensory neurons and keratinocytes as a prospective model to assess in vitro the cutaneous neurogenic pro-inflammatory potential of chemicals"

Le Garrec R, <u>L'Herondelle K</u>, Le Gall-Ianotto C, Buhe V, Lebonvallet N, Gouin O, Misery L. (2015). *Résumé publié prochainement.*

Abstract

Human skin is increasingly exposed to repeated exposure of multiple chemicals, mainly cosmetic and air pollution ingredients. Epidermal keratinocytes are the firstcells exposed to such chemicals and are widely used in regulatory assays to assess in vitro the irritating/corrosive or sensitization potential of chemicals. Although intraepidermal nerve fibers (IENF) can also be targeted by chemicals in contact to skin, there is currently no assay that uses them for skin hazard assessment of chemicals. Sensitive skin is a syndrome defined by the occurrence of abnormal tingling, stinging, burning and itch sensations, with erythema or not, in response to "everyday stimuli" such as cosmetics, UV, cold or hot. It is a very common syndrome, with a reported prevalence of 50 % in Europe. Despite a confusing terminology, skin sensitivity does not involve allergic mechanisms and should thus be distinguished from skin sensitization. Instead, impairement of skin barrier function and cutaneous neurogenic inflammation (CNI) may be involved and could be secondary to repeated exposure to cosmetic ingredients. IENF are somatic nerve fibers (NFs) that mediate the cutaneous sensory informations of pain, itch and thermal sensations. CNI is the non-specific inflammation induced by the release, from activated sensory NFs, of neuropeptides (substance P, SP and CGRP) that in turn lead to skin inflammation which mediators further activate or sensitize NFs. Sensory NF activation can be elicited by exogenous stimuli among which numerous ingredients used in cosmetic products. Our laboratory has developed a co-culture model of sensory neurons and human keratinocytes able to release SP and CGRP in response to agonists of key receptors involved in the CNI. The co-culture is exposed to the substance or to its vehicule for 90 minutes. SP and/or CGRP levels in the collected supernatants are quantified by enzyme immunoassay and expressed in percentage of the release induced by a positive control substance. We use this co-culture model for years to study molecular mediators of CNI and screen CNI inhibitors. Given the high prevalence of sensitive skin and the increasing human cutaneous exposure to chemicals, it would be pertinent to use it to identify and characterize the potential of chemicals to sensitize skin through a neurogenic mechanism, after acute or repeated exposure. Results of concentration-response relationship study of phenoxyethanol and cocamide monoethanolamine will be presented has been accepted for a poster presentation, in the section « Emerging technologies for in vitro tissue/organ toxicity testing». The poster board allocated to your work is #203.

Co-auteur de Communication orale (CARD 2016), Paris,

France.

Résumé publié prochainement.

Congrès Annuel de Recherche Dermatologique 2016 PARIS 5 et 7 décembre 2016

SRD

Société de Recherche Dermatologique

JD P2016/CARD-2916

Rôle inflammatoire et vole de signalisation intracellulaire de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés

Olivier Gouin^{* 1, a}, Olivier Mignen^a, Killian L'Herondelle¹, Raphaele Le Garreo¹, Christelle Le Gall-lanotto¹, Mehdi Sakka¹, Raphael Leschiera¹, Matthieu Talagas¹, Virginie Buhé¹, Emanuelle Plée-Gautier¹, Jean-Luc Carré¹, Luc Lefeuvre⁴, Nicolas Lebonvallet¹, Laurent Misery¹

¹EA4685, Laboratoire de Neurosciences de Brest, Brest, ²Laboratoires de Dermatologies d'Uriages, Courbevoie, ³ INSERM U1078, Canalopathies et Signalisation Calcique, Brest, ⁴Laboratoires Dermatologiques d'Uriage, Courbevoie, France

Publication du résumé accepté: Si mon résumé est accepté, j'accepte qu'il soit publié dans le livre des résumés et sur le site Inte

Introduction: L'activation de PAR-2 dans les kératinocytes basaux renforce l'inflammation cutanée et le prurit par des mécanismes dépendants du calcium et la production de cytokines inflammatoires telles que la TSLP et le TNF-ø. Cependant, dans la plupart des études, seuls les kératinocytes primaires issus de la couche basale de l'épiderme sont utilisés pour analyser le rôle de PAR-2 dans l'inflammation cutanée et le prurit. Nous avons étudié sur des cultures primaires de kératinocytes différenciés l'implication de PAR-2 sur la régulation des voies calciques et par conséquent la modulation de gènes impliqués dans l'inflammation.

Résultats: Les enregistrements des variations calciques intracellulaires sans Ca²⁺ extracellulaire ont montré que le SLIGKV, l'agoniste peptide de PAR-2, induisait la libération des réserves calciques. Cette libération était totalement inhibée par l'antagoniste de la PLC (U73122), de l'InsP₃R (xestospongine C) et du canal calcique TRPV1 (AM G9810). Après transfection d'un vecteur rapporteur luciférase comprenant le promoteur du NF-κB, nous avons montré que le SLIGKV augmentait l'activité transcriptionnelle du NF-κB. Cette élévation d'activité était inhibée par les antagonistes de TRPV1, de InsP₃R et de la PLC. Par la suite, nous avons démontré par RT-qPCR et ELISA que le SLIGKV augmentait l'expression et la sécrétion de la TSLP et du TNF-α. Par ailleurs, le blocage de TRPV1, de l'IP3R et de la PLC inhibait autant l'expression que la sécrétion de nos deux molécules cibles modulées à la hausse par PAR-2.

Conclusion: Nos travaux ont démontré pour la première fois que l'activation de PAR-2 dans les kératinocytes différenciés pouvait favoriser l'inflammation de la peau et le prurit par l'expression et la sécrétion de TSLP et de TNF-α par des mécanismes dépendants de la PLC, du NF-κB et de la libération des réserves calciques à la fois viæ les canaux InsP₃R et TRPV1

Confits d'Intérêts: Aucun conflit à déclarer

Nots-tiés: Inflammation cutanée , kératinocytes différenciés, PAR-2

Co-auteur de Communication orale (2015) – SFR SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.

« Rôle pivot de TRPV1 dans la libération de Ca²⁺ intracellulaire et la production de médiateurs inflammatoires induites par PAR-2 dans les kératinocytes différenciés »

O. Gouin1, O.Mignen, K. L'Herondelle, R. Le Garrec, C. Le Gall-Ianotto, M. Sakka, R. Leschiera, M. Talagas, V. Buhé, E. Plée-Gautier, J. L. Carré, L. Lefeuvre, L. Misery, N. Lebonvallet

Abstract

L'activation de PAR-2 dans les kératinocytes renforce l'inflammation par des mécanismes dépendants du calcium et la production de cytokines inflammatoires telle que la TSLP. Cependant, seuls les kératinocytes primaires de la couche basale de l'épiderme sont utilisés pour analyser le rôle de PAR-2 dans l'inflammation cutanée et le prurit. Nous avons étudié l'implication de PAR-2 à partir de cultures primaires kératinocytes différenciés sur la régulation des voies calciques et par conséquent la modulation de gènes impliqués dans l'inflammation. Les enregistrements des variations calciques intracellulaires sans Ca2+ extracellulaire ont montré que l'agoniste de PAR-2 (SLIGKV) induisait la libération de Ca²⁺ à partir des réserves du réticulum endoplasmique. Cette libération calcique était totalement inhibée par l'antagoniste de la PLC (U73122). Les antagonistes de l'InsP3R (xestospongin C) et TRPV1 (AMG9810) diminuaient partiellement libération de Ca²⁺ induite par PAR-2. Cependant, en combinaison la xestopongin C et l'AMG9810 inhibaient entièrement la réponse calcique de PAR-2. Nous avons également démontré par RT-qPCR que le SLIGKV induisait une régulation à la hausse de 13-fois l'expression de la TSLP et par deux-fois l'expression d'IL1-β, TNF-α et CXCL2. Par ailleurs, le blocage de TRPV1 avec des antagonistes (AMG9810, SB366791 et Capsazepin) ou avec un siARN de TRPV1 diminuait l'expression des gènes modulés par le SLIGKV. Nos travaux ont démontré pour la première fois que PAR-2, dans les kératinocytes différenciés, favorise l'inflammation de la peau par l'expression de gènes inflammatoires par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de la PLC et de la libération des réserves calciques à la fois par les canaux IP3 et TRPV1.

Co-auteur de Présentation poster (2015) – SFR

SCINBIOS/IBSAM, Brest, France.



Présentation Poster-walk (2015) – 46th Annual Euopean



Présentation Poster (2014) - Journée des Doctorants, Brest,

France.



Ces résultats suggèrent que les cellules issus des PC12 semble être des neurones sensoriels. Cependant, ont-elles un profil sécrétoire?

Ces résultats suggèrent que les PC12 peuvent être activées soit par la capsaicine via TRPV1 soit par la tryptase via PAR2.

Conclusion

Ces résultats préliminaires ont permis de montrer que les PC12 différenciées expriment l'ensemble des marqueurs des neurones sensoriels. De plus, par la présence de neuropeptides (SP et CGRP) et de récepteurs (TRPV1 et PAR2) spécifiques de l'INC et du prurit, les PC12 pourraient être un bon modèle de l'INC.

Cependant, il sera intéressant de vérifier les capacités d'activation des PC12 différenciées ainsi que leur niveau de sécrétion de neuropeptides afin de définir un modèle fonctionnel.

Composition du jury de thèse :

- <u>Directeur de thèse</u>: MISERY Laurent, Docteur, HDR, PU-PH, Université de Bretagne Occidentale – Laboratoire Interaction Epithélium Neurones (ex LNB), EA4685; CHRU de Brest, Service Dermatologie, 5 avenue Foch, 29200 Brest.
- <u>Co-encadrante de thèse</u>: LE GARREC Raphaële, Docteur, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale - Laboratoire de Neurosciences de Brest, 22 rue Camille Desmoulins, 29200 Brest,
- <u>Rapporteur</u>: Evelyne BENOIT, Docteur, HDR, Chargée de Recherche CNRS, LTMB
 DSV/IBITECS CEA Saclay, 91191 Gif-Sur-Yvette cedex France,
- <u>Rapporteur</u>: COIFFARD Laurence, Docteur, HDR, PU Université de Nantes LPiC -MMS, EA2160, UFR de Pharmacie, 9 rue Bias, 44000 Nantes, France,
- Président du jury : PAUILLAC Serge, Docteur, HDR, Chargé de Recherche, Institut Pasteur Paris, Unité de Recherche et d'Expertise Bactéries Anaérobies et Toxines, 25-28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France,
- <u>Examinateur</u>: MARCORELLES Pascale, Docteur, HDR, PU-PH Université de Bretagne Occidentale, CHRU de Brest, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, 5 avenue Foch, 29200 Brest.

Killian L'HERONDELLE

Etude sur neurones sensoriels et kératinocytes des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le prurit de la ciguatéra

La ciguatéra est une forme d'intoxication faisant suite à l'ingestion de poissons contaminés par des toxines appelées « ciguatoxines ». Cette intoxication endémique des régions tropicales est un problème économique et de santé non négligeable qui tend à prendre de plus en plus d'ampleur. L'essor du tourisme, le réchauffement climatique et la hausse des exportations internationales de poissons tropicaux favorisent l'expansion de la ciguatéra aux parties du globe au climat tempéré, jusqu'alors peu concernées par cette maladie. Les enjeux thérapeutiques et économiques de la ciguatéra sont de taille puisqu'il n'existe aucun moyen rapide et fiable de détecter un poisson contaminé et qu'aucun traitement efficace permettant sa prise en charge n'a actuellement été établi.

Le prurit, terme médical désignant les démangeaisons est un symptôme notamment associé aux maladies de peau qui impacte grandement la qualité de vie des patients qui en souffrent. Ces dernières décennies, de nombreuses études scientifiques ont permis de mieux comprendre sa physiopathologie. Le prurit est un symptôme fréquemment observé chez les personnes atteintes de ciguatéra, d'où l'appellation « la Gratte », souvent employée pour faire référence à la pathologie.

Dans le but d'étudier les mécanismes cellulaires à l'origine du prurit et des autres troubles sensoriels cutanés survenant lors de la ciguatéra, nous avons étudié l'effet des ciguatoxines sur un modèle *in vitro* de neurones sensoriels cocultivés avec des kératinocytes. Nous avons mis en évidence la libération dans le surnageant des neuropeptides de l'inflammation neurogène, SP et CGRP. L'effet d'antagonistes sélectionnés a été testé afin mettre en évidence les médiateurs impliqués dans la libération de neuropeptides. Par ailleurs, la signalisation cellulaire sous-jacente de cette sécrétion de neuropeptides a été étudiée par des expériences d'imagerie calcique réalisées sur neurones et kératinocytes.

Les résultats obtenus valident notre coculture en tant que modèle de choix pour l'étude *in vitro* des mécanismes cellulaires, et plus généralement, dans les troubles neurocutanés impliqués dans le prurit ciguatérique. Parmi les antagonistes testés, une molécule s'est avérée particulièrement intéressante pour inhiber les effets constatés de la toxine. Ces résultats originaux, obtenus avec l'antagoniste d'un médiateur du prurit, présentent une perspective thérapeutique nouvelle et prometteuse, pour répondre à un enjeu de santé publique futur.

Mots-clés :

Ciguatéra – Ciguatoxines – Neuropeptides – SP – CGRP – Kératinocytes – Neurones sensoriels – Coculture

Killian L'HERONDELLE

Study on neurons and keratinocytes of molecular and cellular mechanisms involved in ciguatera fish poisoning pruritus

Ciguatera fish poisoning (CFP) is a seafood poisoning occurring after contaminated fish fleshes ingestion containing toxins called « ciguatoxines » (CTXs). This illness, originating from tropical and subtropical areas, is an economic and health problems which becomes substantial in relation to international tropical fishes export and tourism development, as well as global warming rise. Those factors contribute to CFP sprouting in non-endemic temperate climate regions which were not until then concerned by CFP. Economic and health stakes of CFP are important since no reliable and ready-to-use detection system for CTXs in fishes have been developed, along with no relevant cure has been established to treat CFP.

Pruritus, medical term refer to itch, is a clinical sign usually associated to skin diseases which strongly alter patients' quality of life. Last decades, several studies allowed to better understand pruritus pathophysiology. Interestingly, people suffering from CFP frequently present pruritus, hence designation "La Gratte" or "La Gratel (le)" employed in endemic areas. The aim of these works was to study cellular and molecular mechanisms of CTXs at the root of neurological cutaneous troubles occurring in CFP. Here, we evaluated CTXs effects on *in vitro* model composed of sensory neurons cocultived with primary keratinocytes, quantifying neuropeptides known to be involved in pruritus. Compiling knowledges about CFP and pruritus pathophysiology, some antagonists were tested to neutralize CTXs-mediated neuropeptide release. To deal with signaling pathways in depth of neuropeptide exocytosis induced by CTXs, mechanism known to be accurately regulated by calcium homeostasis, calcium imaging experiments were performed.

Results obtained in this project confirm the use of such a model to elucidate cellular mechanism of CFP pruritus, but also constitute an alternative in vitro tool to study chemicals inducing abnormal cutaneous senses. Among antagonists tested, one stands out from the crowd and was proved to be effective to inhibit CTXs-evoked effects studied. Those originals results, collected with antagonist of pruritus mediator, show new and promiscuous therapeutic prospects for future health concern.

Keywords:

Ciguatera – Ciguatoxins – Neuropeptides – SP – CGRP – Keratinocytes – Sensory neurons – Coculture