



HAL
open science

Traitement des douleurs neuropathiques : évaluation préclinique de la combinaison THN101, entre amitriptyline et méfloquine.

Baptiste Letellier

► To cite this version:

Baptiste Letellier. Traitement des douleurs neuropathiques : évaluation préclinique de la combinaison THN101, entre amitriptyline et méfloquine.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ007 . tel-03398710

HAL Id: tel-03398710

<https://theses.hal.science/tel-03398710>

Submitted on 23 Oct 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE présentée par :
Baptiste LETELLIER

Soutenue le **24 février 2020**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences de la vie et de la santé**

Spécialité : **Neurosciences**

**Traitement des douleurs neuropathiques :
Évaluation préclinique de la combinaison THN101,
entre amitriptyline et méfloquine.**

Thèse dirigée par :

M. Michel BARROT

Directeur de recherche, CNRS UPR3212

RAPPORTEURS :

Mme Lauriane ULMANN

Maître de conférences à l'Université de Montpellier, CNRS UMR 5203

M. Cyril RIVAT

Maître de conférences à l'Université de Montpellier, Inserm UMR 1051

EXAMINATEUR :

M. Frédéric SIMONIN

Directeur de recherche, CNRS UMR7242

MEMBRE INVITÉ :

M. Mathieu CHARVÉRIAT

Directeur scientifique, Theranexus

**Traitement des douleurs neuropathiques :
Évaluation préclinique de la combinaison THN101, entre amitriptyline et méfloquine.**

Résumé

Les douleurs neuropathiques représentent un enjeu de santé important dans les pays vieillissants comme la France. En effet, leur survenue impacte significativement la qualité de vie des patients, tant sur le plan privé que professionnel. De nos jours, la prise en charge médicale de ces douleurs se fait en première intention avec des antiépileptiques ou des antidépresseurs, dont l'amitriptyline. Néanmoins, ces traitements, dont le délai thérapeutique peut être long, ne sont pas systématiquement efficaces ou entraînent des effets indésirables parfois invalidants. Par conséquent, les recherches menées actuellement visent à mieux connaître la physiopathologie des douleurs neuropathiques et les mécanismes d'action de leurs traitements.

Un certain nombre d'études chez l'animal ont mis en évidence un remodelage glial lors de la mise en place des neuropathies, impliquant les jonctions communicantes. Or, la modulation des protéines transmembranaires qui les composent a montré des effets bénéfiques sur les symptômes douloureux dans de nombreux modèles. Aussi, la co-administration d'amitriptyline et de méfloquine (modulateur glial) permet d'améliorer significativement les effets induits par le traitement de référence seul, dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*. L'objectif de cette thèse a été d'en déterminer les mécanismes d'action dans un modèle préclinique.

Mots-clés : Douleur Neuropathique ; Pharmacothérapie ; Amitriptyline ; Méfloquine ; THN101

**Neuropathic pain treatment:
Preclinical study of the THN101 combination, between amitriptyline and mefloquine**

Abstract

Neuropathic pain is a health issue in aging countries such as France. Indeed, it has a significant impact on patients' quality of life, both privately and professionally. Nowadays, first-line treatments are antiepileptics or antidepressants, notably amitriptyline. However, these treatments, which may take a long time to treat, are not systematically effective and may have disabling side effects. Therefore, the research aims to better understand the mechanisms of neuropathic pain and the mechanisms of action of its treatment.

Several animal studies have shown glial remodeling during neuropathies involving gap junctions. However, the modulation of their transmembrane proteins has shown beneficial effects on painful symptoms in many models. Also, co-administration of amitriptyline and mefloquine (glial modulator) significantly improves the effects induced by amitriptyline alone, *in vitro*, or *in vivo*. The goal of this thesis was to determine the mechanisms of action of this combination in a preclinical model.

Keywords: Neuropathic pain; Pharmacotherapy; Amitriptyline; Mefloquine; THN101

À mes parents, pour leur amour et leur soutien,
indéfectibles et inconditionnels malgré les épreuves.

À mes sœurs, pour leurs encouragements,
aux moments privilégiés que nous partagerons ;

À celle qui partage ma vie et qui l'ensoleille chaque jour.

À tous les autres, famille, amis, félins ou arachnides, dont les gestes ou les mots
ont rendu ce parcours possible, plus passionnant, plus doux ou plus fou.

À ceux qui partent toujours trop tôt...

Que cet aboutissement vous soit dédié.

Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.

François Rabelais (1483 - 1553)

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser de vifs remerciements aux membres du jury, la Dre Laurianne Ulmann et le Dr Cyril Rivat. Merci d'avoir accepté d'apporter votre expertise dans l'examen et la discussion de ces travaux. De la même manière, je remercie sincèrement le Dr Frédéric Simonin pour avoir accepté de faire à nouveau cet exercice dans le cadre de cette thèse. Elle est le fruit des moyens mis en œuvre pour répondre aux questions scientifiques développées dans ce manuscrit. Adaptés aux contraintes matérielles, humaines ou temporelles que chaque doctorant rencontre, ils n'auraient pas pu se déployer sans les forces d'un collectif, dont l'implication souvent si louable est parfois difficilement descriptible.

Tout d'abord, à mes directeurs.

Au Dr Michel Barrot, merci pour avoir guidé ce projet et pour m'avoir accepté dans ton équipe. A tes côtés, je pense avoir pu développer un sens certain de la rigueur et du dépassement de soi, ô combien utiles. Au Dr Mathieu Charvériat, merci pour m'avoir permis de rejoindre la famille Theranexus. Avec toi, j'ai pu bénéficier d'une liberté certaine dans la conduite de cette thèse, formatrice bien que parfois vertigineuse, mais surtout gage de confiance, pour laquelle je te suis reconnaissant.

Aux membres de l'équipe de recherche.

Je tiens à remercier en particulier la Dre Ipek Yalcin, à la fois pour son aide et ses recommandations précieuses, ainsi que pour sa sympathie, son dynamisme et son optimisme rayonnants ; et Mme Betty Waltisperger, pour l'indispensable renfort technique et logistique qu'elle a prodigué avec dévouement. Je remercie chaleureusement Mme Nolwenn Couqueberg et M. Quentin Leboulleux, qui m'ont aidé dans les dernières vagues de *manips* ; ainsi que les Dres Dominique Massotte, Jennifer Kaufling, Fanny Faivre et le Pr Pierre Veinante, dont la disponibilité et les conseils ont toujours été utiles et estimés. Au Pr Éric Salvat, un grand merci pour la supervision bienveillante dont tu m'as fait bénéficier à mes débuts, pour m'avoir guidé en m'apportant ton précieux regard de clinicien et pour ton soutien amical. Aux *alumni*, Mme Nathalie Petit-Demoulière, MM. Benoît Rose et Xavier Wurtz, merci pour votre présence et votre générosité qui ont su adoucir le quotidien. Aussi, je remercie amicalement Mmes Léa Christnacher et Marion Schott pour avoir partagé quelques mois de neurosciences à mes côtés durant leur stage, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

A mes collègues de Theranexus.

J'adresse ma gratitude, particulièrement à la Dre Marine Droguerre, pour son écoute et ses conseils, et au Dr Franck Mouthon, pour les discussions toujours très inspirantes que nous avons partagées.

Pour leur contribution aux expériences de spectrométrie, merci au Dr Yannick Goumon, pour m'avoir apporté son expertise, ainsi qu'à Mme Virginie Chavant et M. Florian Gabel. Pour m'avoir épaulé dans le suivi des lignées transgéniques, je remercie vivement Mme Sebahat Ozkan et M. Stéphane Doridot. Pareillement, je souhaite adresser ma profonde reconnaissance à la Dre Dominique Ciocca, pour m'avoir apporté avec ardeur et mansuétude son appui, plus spécifiquement dans les rédactions des saisines éthiques liées à mes projets.

A *nos voisins du 3^{ème}*, notamment la Dre Perrine Inquimbert et le Dr Sylvain Hugel pour l'aide apportée, ainsi que le Pr Rémy Schlichter, trouvez ici ma reconnaissance, pour votre gentillesse et vos éclairages.

Pour leur soutien et leur aide apportée à la relecture de ce manuscrit, j'adresse mes remerciements les plus sincères et chaleureux à Mme Claire Terzulli et au Dr Maxime Sartori.

Je souhaite aussi exprimer ici ma plus grande gratitude à deux collègues, deux amies, dont le concours fut indispensable à la fois aux expériences menées et au déroulement de ce doctorat.

Tout d'abord, à la Dre Mélanie Kremer, un merci infini : après ta thèse, tu as traversé la mienne avec ses moments de succès et d'allégresse, ses moments de doute et de frustration, mais tu as toujours été là, disponible et enthousiaste. Pour ton aide incalculable, je te serai toujours reconnaissant.

Enfin, à la future Dre Léa Becker, un merci tout aussi grand : parce que j'ai trouvé une partenaire de *labo* remarquable, mais aussi parce que j'ai pris un réel plaisir à partager avec toi les *extras* de cette thèse, notamment le démarrage de la nouvelle vie associative de Doctoneuro, si riche, si stimulante et si théâtrale, dont je sais que le flambeau sera transmis de la meilleure des façons. Je sais qu'avec toi, les projets sur lesquels nous avons travaillé ont de beaux jours devant eux. Pour avoir pris part à ce quotidien exaltant, et pour avoir su partager ces moments dont seul le voisinage de bureau tient le secret, je te garderai toujours une estime singulière.

Publications et communications

Publications liées aux travaux de thèse

Connexins and pannexins in pain models and treatment.

Letellier B., Yalcin I., Charvériat M., Barrot M.

Revue, en préparation.

Mechanism of action of mefloquine/amitriptyline THN101 combination on neuropathic mechanical hypersensitivity in mice.

Letellier B., Kremer M., Becker L.J., Goumon Y., Chavant V., Waltisperger E., Yalcin I., Droguerre M., Charvériat M., Barrot M.

Article, en préparation.

Phenylpyridine-2-ylguanidines and rigid mimetics as novel inhibitors of TNF α overproduction: Beneficial action in models of neuropathic pain and of acute lung inflammation.

Bollenbach M., Salvat E., Daubeuf F., Wagner P., Yalcin I., Humo M., Letellier B., Becker L.J., Bihel F., Bourguignon J.-J., Villa P., Obrecht A., Frossard N., Barrot M., Schmitt M. Review, Eur J Med Chem, 2018, 147:163-182.

Communications affichées

Amplification of amitriptyline action in a neuropathic pain model by the THN101 drug combination.

Letellier B., Kremer M., Becker L.J., Waltisperger E., Wurst X., Yalcin I., Droguerre M., Mouthon F., Charvériat M., Barrot M. Congrès Neurex “Novel aspects in pain integration and modulation”, Strasbourg, 3-4 octobre 2018.

Profil anti-allodynique du candidat médicament THN101 dans le modèle du cuff chez la souris.

Letellier B., Kremer M., Becker L.J., Waltisperger E., Wurst X., Yalcin I., Droguerre M., Mouthon F., Charvériat M., Barrot M. Congrès de la Société Française pour l'Étude et le Traitement de la Douleur, Lille, 14-16 novembre 2018.

Adrenergic-dependent mechanism of action of THN101 in a rodent neuropathic pain model.

Letellier B., Kremer M., Becker L.J., Yalcin I., Droguerre M., Mouthon F., Charvériat M., Barrot M. Congrès de la fédération européenne de la douleur (EFIC), Valence (Espagne), 4-7 septembre 2019.

Communication orale

Évaluation préclinique des mécanismes d'action du THN101 dans le traitement de la douleur neuropathique.

Congrès de la Société Française pour l'Étude et le Traitement de la Douleur, Strasbourg, 29 novembre 2019. 2^e prix Ugo-Basile – Data blitz jeunes chercheurs.

Abréviations

- AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AIT : accident ischémique transitoire
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
- ARNm (ou mRNA) : acide ribonucléique messenger
- ATP : adénosine triphosphate
- AVC : accident vasculaire cérébral
- BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau
- CCI : lésion par constriction chronique
- CFA : adjuvant complet de Freund
- CGRP : peptide relié au gène calcitonine
- CORM-2 : donneur de monoxyde de carbone
- CREMEAS : comité d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg
- CSF-1 : colony stimulating factor 1
- Cx : connexine
- DN4 : douleur neuropathique en quatre questions
- EFIC : fédération européenne de la douleur
- EFNS : fédération européenne des sociétés de neurologie
- FDA : agence américaine du médicament et de l'alimentation
- FGF : facteur de croissance des fibroblastes
- GABA : acide γ -aminobutyrique
- GDNF : facteur neurotrophique dérivé de la glie
- GFAP : protéine acide fibrillaire gliale
- HC : hémicanal
- IASP : association internationale pour l'étude de la douleur
- IFN- γ : interféron gamma
- IL-1 β : interleukine bêta 1
- IL-6 : interleukine 6
- IMAO : inhibiteurs de monoamines oxydase
- ISRDNa : inhibiteurs sélectifs de la recapture de dopamine et de noradrénaline
- ISRNa : inhibiteurs sélectifs de la recapture de noradrénaline

ISRS : inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine
ISRSNa : inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine et de noradrénaline
JNK : kinase c-Jun N-terminale
KCC2 : potassium chloride cotransporter 2
LPS : lipopolysaccharide
MCP-1/CCL2 : monocyte chemoattractant protein 1/chemokine ligand 2
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NeuroPSIG : groupe d'intérêt sur les douleurs neuropathiques
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : monoxyde d'azote
NST : nombre de sujets à traiter
OMS : organisation mondiale de la santé
Panx : pannexine
PIB : produit intérieur brut
PSNL : ligature partielle du nerf sciatique
SCI : lésion de la moelle épinière
SFETD : société française pour l'étude et le traitement de la douleur
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SNI : lésion nerveuse épargnée
SNL : ligature du nerf sciatique
TNF- α : facteur tumoral de nécrose α
TrkB : tropomyosin receptor kinase B
TRPV1 : transient receptor potential vanilloide 1
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Table des matières

Résumé	3
Abstract	3
Abréviations	12
Liste des tableaux	17
Liste des figures	18
Liste des annexes	19
Avant-propos	20
Première partie – Introduction	22
1 Les douleurs neuropathiques	23
1.1 La douleur	23
1.2 Étiologie.....	25
1.3 Symptômes	26
1.4 Diagnostic.....	27
1.5 Modèles animaux.....	28
1.6 Physiopathologie	30
2 Traitement des douleurs neuropathiques	33
2.1 Recommandations des sociétés savantes	33
2.1.1 Traitements de première intention	33
2.1.2 Traitements de deuxième et troisième intention	34
2.2 Les antidépresseurs, traitements de première intention	34
2.2.1 Dans la dépression	35
2.2.2 Traitement des douleurs neuropathiques	36
2.3 Focus sur l'amitriptyline	37
2.3.1 En clinique	37
2.3.2 Mécanismes d'action.....	38
3 La méfloquine, de l'antipaludéen au repositionnement thérapeutique	43
3.1 Traitement du paludisme	43
3.1.1 Utilisation de la méfloquine.....	44
3.1.2 Effets indésirables de la méfloquine	44
3.1.3 Métabolisme de la méfloquine	45
3.2 Effets de la méfloquine dans le système nerveux.....	46
4 Connexins and pannexins in pain models and treatment	47
4.1 Abstract.....	47
4.2 Introduction	48

4.3	Connexins in inflammatory pain.....	50
4.3.1	Connexins in trigeminal inflammation	50
4.3.2	Connexins in other models.....	51
4.4	Connexins in neuropathic pain	54
4.4.1	Cx43 in the model of sciatic nerve chronic constriction injury (CCI).....	54
4.4.2	Cx43 in spinal nerve ligation (SNL) models	55
4.4.3	Cx43 in models of spinal cord injury (SCI).....	55
4.4.4	Cx43 in trigeminal neuropathic pain models	56
4.4.5	Cx43 in other models	56
4.4.6	Other connexins in neuropathic pain models	57
4.5	Pannexins and pain	59
4.6	Discussion	62
5	Objectifs de la thèse	65
Deuxième partie – Travaux de thèse.....		66
1	Lancement des travaux de thèse.....	67
1.1	Contexte.....	67
1.2	Matériel et méthodes	68
1.2.1	Animaux	68
1.2.2	Chirurgie.....	68
1.2.3	Tests	69
1.2.4	Traitements	70
1.2.5	Chronologie	70
1.3	Résultats.....	71
1.3.1	Première expérience.....	71
1.3.2	Deuxième expérience	73
1.3.3	Troisième expérience.....	74
1.3.4	Quatrième expérience.....	76
1.3.5	Cinquième expérience	77
2	Article de thèse : Mefloquine amplifies amitriptyline action on neuropathic mechanical hypersensitivity in mice	80
2.1	Abstract.....	80
2.2	Introduction	81
2.3	Material and methods	82
2.3.1	Animals	82
2.3.2	Cuff surgery.....	82
2.3.3	Treatments	83
2.3.4	Behavioral testing.....	84
2.3.5	Mass spectrometry	84
2.3.6	Lesions	86

2.3.7	<i>In vitro</i> pharmacology	86
2.3.8	Statistics	87
2.4	Results	87
2.4.1	Amitriptyline and mefloquine effects on mechanical hypersensitivity	87
2.4.2	Drug concentrations	90
2.4.3	Contribution of descending controls of pain in THN101 and mefloquine action.....	92
2.4.4	Adrenergic mechanism of action of THN101 combination	93
2.4.5	Contribution of mefloquine in the mechanisms of action of THN101	95
2.5	Discussion	97
3	Travaux complémentaires.....	100
3.1	Analyse de l'impact du THN101 dans la moelle épinière	100
3.1.1	Contexte	100
3.1.2	Matériel et méthodes	100
3.1.3	Résultats.....	101
3.2	Traitements chroniques : évaluation de l'impact de la connexine 43 dans l'action du THN101 dans la douleur neuropathique.....	101
3.2.1	Mise en place d'une autre approche chronique	102
3.2.2	Analyse moléculaire des cibles de l'amitriptyline.....	102
3.2.3	Mise en place d'une lignée transgénique.....	102
4	Discussion générale	104
4.1	De la mise au point à l'étude mécanistique : validité des approches	105
4.2	Analyse mécanistique du THN101.....	108
4.2.1	Contrôles descendants de la douleur et action spinale.....	108
4.2.2	Cibles pharmacologiques de la combinaison	110
5	Conclusion	114
	Bibliographie.....	115
	Annexes	148

Liste des tableaux

Table 1. Principaux symptômes accompagnant les douleurs neuropathiques.....	27
Table 2. Questionnaire DN4.....	28
Table 3. Antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques	37
Table 4. Sélectivité de l'amitriptyline et de la nortriptyline pour les transporteurs de sérotonine et de noradrénaline.....	42
Table 5. Changes in connexin expression and function in in vitro or in vivo models of inflammatory pain.....	53
Table 6. Changes in connexin and pannexin expression and function in in vivo models of neuropathic pain.....	58
Table 7. Impact of gap junction modulators, and connexin or pannexin modulators in pain models.....	62

Liste des figures

Figure 1. Modèles précliniques de neuropathies couramment utilisés en recherche.....	29
Figure 2. Physiopathologie des douleurs neuropathiques.....	32
Figure 3. Mécanisme d'action aiguë de l'amitriptyline dans la moelle épinière.....	40
Figure 4. Mécanisme d'action chronique de l'amitriptyline	41
Figure 5. Métabolisme de l'amitriptyline	42
Figure 6. Métabolisme de la méfloquine.	45
Figure 7. Connexins and pannexins are transmembrane proteins sharing similar properties.....	50
Figure 8. Première expérience de mise au point.....	72
Figure 9. Deuxième expérience de mise au point	74
Figure 10. Troisième expérience de mise au point.....	75
Figure 11. Quatrième expérience de mise au point	77
Figure 12. Cinquième expérience de mise au point	78
Figure 13. Effect of amitriptyline and mefloquine combination on mechanical hypersensitivity in mice with neuropathic pain.	89
Figure 14. THN101 action on mechanical hypersensitivity.	90
Figure 15. Evaluation of mefloquine, amitriptyline and nortriptyline concentrations by mass spectrometry after amitriptyline or THN101 treatment.	91
Figure 16. Central descending controls of pain are necessary to the action of THN101 and of mefloquine	93
Figure 17. THN101 anti-allodynic action is mediated by $\alpha 2$ -adrenoceptors in mice.	94
Figure 18. Evaluation of mefloquine pharmacological potential targets <i>in vitro</i>	96
Figure 19. Evaluation of mefloquine pharmacological potential targets <i>in vivo</i>	97
Figure 20. Densité du marquage GFAP dans la corne dorsale de la moelle épinière	101

Liste des annexes

Annexe 1. Partie supplémentaire de l'article de thèse	149
Annexe 2. Participation à d'autres travaux.....	159

Avant-propos

Avant-propos

Mon doctorat s'est déroulé au sein de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR3212 – 8, Allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg), en Convention Industrielle de Formation par la Recherche avec l'entreprise Theranexus (Centre de l'Énergie Atomique, Fontenay-aux-Roses). Mes travaux de thèse ont été soutenus par le Centre National de la Recherche Scientifique, l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie ainsi que l'Université de Strasbourg (École Universitaire de Recherche EURIDOL, ANR-17-EURE-0022).

Ce manuscrit de thèse, écrit en deux parties, s'articule en premier lieu autour d'une revue de la littérature, axée sur les modifications de certaines protéines transmembranaires (que nous détaillerons par la suite) décrites dans des modèles précliniques de douleur et qui peuvent être impactées par des traitements comme par exemple la méfloquine.

En second lieu, il s'articule autour d'un article scientifique constituant la synthèse des travaux réalisés au cours de ce doctorat et qui vont être décrits au long de ce manuscrit.

La revue, en première partie, permet de compléter l'introduction en apportant des éléments moléculaires et cellulaires de compréhension quant à l'utilisation de la méfloquine dans le traitement des douleurs neuropathiques, en combinaison avec l'amitriptyline.

L'article scientifique, en deuxième partie, illustre les expériences qui ont été menées pour déterminer les mécanismes d'action du composé THN101. Il sera introduit par une synthèse des travaux de mise au point, qu'il a été nécessaire de réaliser en amont, et sera complété par la synthèse des autres approches expérimentales qui ont été tentées au cours du doctorat afin d'apporter d'autres éléments de compréhension à ce travail de thèse.

La revue et l'article seront soumis à publication dans des journaux internationaux à comités de lecture.

Première partie – Introduction

1 Les douleurs neuropathiques

1.1 La douleur

La douleur est définie comme étant une « expérience **sensorielle** et **émotionnelle** désagréable liée à une lésion tissulaire potentielle ou réelle, ou décrite en ces termes » (IASP, *International Association for the Study of Pain*). Premièrement, elle survient normalement à la suite d'un évènement lésionnel (traumatisme, inflammation, brûlure etc.), qui sera détecté comme une agression par l'organisme. Le système sensoriel de détection et les voies de transmission de l'information nociceptive (du latin *noceo*, « nuisance ») sont impliqués. On parle alors de **nociception**. Face à elle, le système nerveux engage divers processus pour protéger l'organisme, comme par exemple par un réflexe spinal de retrait. Le système cognitif limbique permet d'ancrer cette expérience, et peut associer une valence négative au souvenir de celle-ci, pour éviter une aggravation ou pour éviter sa survenue à l'avenir. Aussi, l'expérience douloureuse sera vécue différemment selon la culture ou l'éducation (Borelli et al., 2018 ; Latimer et al., 2014 ; Roberts et al., 2003).

On peut penser, d'après les premières traces qui l'évoquent, que l'être humain a toujours connu la douleur. C'est la seule espèce à avoir pu représenter, par les arts ou les mots, la douleur. Elle l'a toujours intrigué : au départ, elle était même associée à des phénomènes mystiques, des manifestations divines, de par sa nature inévitable et inextricable (Rey, 1993). Reconnue comme pouvant être une pathologie à part entière, la douleur est l'objet d'investigations de nombreux centres d'études cliniques et instituts de recherche. A l'échelle internationale, une société savante rassemble ainsi la communauté scientifique autour de ce sujet : l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP). À ce titre, elle regroupe également les chercheurs à échelle européenne *via* l'association européenne de la douleur (EFIC) ; et française *via* un chapitre français, la Société Française pour l'Étude et le Traitement de la Douleur (SFETD). Leur travail permet de mettre à disposition des cliniciens et des chercheurs des outils de diagnostic, pédagogiques, ainsi que des mises à jour concernant les classifications des différents types de douleur qui ont été caractérisés. L'IASP a donc défini trois catégories de douleur : i) **la douleur nociceptive**, qui résulte d'une lésion réelle ou probable d'un tissu non neuronal et qui est due à l'activation de nocicepteurs ; ii) **la douleur nociplastique**, qui résulte d'une altération de la nociception, malgré l'absence de preuve évidente d'une lésion tissulaire réelle ou probable, provoquant l'activation des nocicepteurs périphériques, ou malgré l'absence de preuve de maladie

ou de lésion du système somatosensoriel à l'origine de la douleur ; iii) **la douleur neuropathique**, définie ci-après.

Plus communément, on peut distinguer deux grands types de douleur : la douleur aiguë et la douleur chronique. La douleur aiguë, douleur physiologique dite « par excès de nociception », dépend de la nature de l'atteinte et dure généralement jusqu'à disparition du stimulus nociceptif ou jusqu'à guérison. Par exemple, la douleur inflammatoire, parfois liée aux processus de cicatrisation mais aussi à des pathologies rhumatismales dégénératives ou auto-immunes, est induite par la libération de médiateurs immuns qui sont impliqués localement dans les phénomènes de rougeur, de gonflement et de chaleur. Cette douleur est essentielle à la protection de la zone atteinte.

Par opposition à la douleur aiguë, la douleur chronique se met en place par des mécanismes de plasticité et de désadaptations du système somatosensoriel. Récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé a intégré ce type de douleur dans la onzième révision du classement international des maladies (OMS, MG30, ICD-11). La douleur chronique se traduit par des manifestations douloureuses récurrentes ou persistantes durant trois mois ou plus. Elle englobe i) la douleur chronique primaire, caractérisée par une détresse émotionnelle ou une gêne significative dans les tâches quotidiennes et/ou la vie sociale, liées à l'atteinte d'une ou plusieurs régions anatomiques (Nicholas et al., 2019) ; ii) la douleur chronique liée au cancer, c'est-à-dire liée à la tumeur, aux métastases, ou à ses traitements ; et iii) la douleur neuropathique. En France et en Europe, environ 20% de la population souffrent de douleurs chroniques d'intensité modérée à forte (Bouhassira et al., 2008 ; Breivik et al., 2006). Certains facteurs de risques sont associés à l'apparition d'une douleur chronique et ont été répertoriés dans le guide européen de la douleur. Parmi eux, on retrouve par exemple l'âge, le genre, l'environnement socio-économique, la présence de troubles anxio-dépressifs, la sédentarité ou la multiplication des interventions médicales (Eccleston, Wells, et Morlion, 2018).

Au-delà de l'impact important qu'elle a sur la qualité de vie des patients, en multipliant par trois le risque de tentative de suicide (Stenager et al., 2014), la douleur chronique représente un enjeu de santé et de société, notamment car elle représente un coût socio-économique important dans les pays occidentaux. Cela englobe les frais d'hospitalisation, de traitements, d'équipements d'amélioration de la vie quotidienne, ou moins directement les coûts engendrés par l'absentéisme ou la baisse de productivité au travail (Nielsen, 2013 ; Valentin et al., 2016). Aux États-Unis, le coût de la douleur chronique est estimé à 4% du produit intérieur brut (PIB), soit davantage que les maladies cardiovasculaires, le cancer ou le diabète (Gaskin et Richard, 2012). Aucune étude globale ne permet de déterminer le coût de la douleur chronique en Europe mais, à titre

d'exemple, cette dépense en Irlande est estimée à 3% du PIB (Raftery et al., 2012). En Suède, elle atteindrait 10% du PIB (Breivik, Eisenberg, et O'Brien, 2013 ; Gustavsson et al., 2012). En France, le surcoût annuel imputé aux consultations supplémentaires liées la douleur a été évalué à près d'un milliard d'euros (Mick et al., 2013).

En France, 6,9% de la population présentent des douleurs chroniques qui ont une composante neuropathique (Bouhassira et al., 2008). La douleur neuropathique est définie comme étant « due à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel » (IASP, OMS), et peut être d'origine centrale ou périphérique (Scholz et al., 2019). Le diagnostic de la douleur neuropathique suit un algorithme restrictif. Cela permet d'inclure seulement les patients dont l'historique de santé et de soin, ainsi que la distribution spatiale et temporelle des douleurs (ou des changements sensoriels), sont neuro-anatomiquement corrélés ; c'est-à-dire qu'il existe une correspondance entre le territoire neurologique atteint et les symptômes décrits et mesurés (Finnerup et al., 2015).

1.2 Étiologie

Qu'elles soient périphériques ou centrales, les douleurs neuropathiques peuvent avoir des origines diverses (Scholz, et al., 2019). Les douleurs neuropathiques centrales peuvent être consécutives à une ou plusieurs **lésions de la moelle épinière**, ou par une ou plusieurs **lésions du cerveau** faisant par exemple suite à un accident vasculaire cérébral (AVC) ou un accident ischémique transitoire (AIT), affectant les régions impliquées dans la transmission, la réception et l'intégration de l'information nociceptive (Haroutounian et al., 2018). Certaines maladies neurologiques inflammatoires ou auto-immunes comme la sclérose en plaques font également partie des conditions pouvant conduire à l'apparition de douleurs neuropathiques (Finnerup et al., 2015).

Au niveau périphérique, des **maladies métaboliques**, comme le diabète ou la carence en vitamines du groupe B, peuvent entraîner une polyneuropathie douloureuse ; à l'instar de **maladies infectieuses** comme le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), induit par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont la principale complication neurologique est une démyélinisation des fibres nerveuses. Le virus *herpes zoster* est quant à lui à l'origine de la neuralgie post-herpétique du zona, lié à la réactivation du virus de la varicelle resté jusqu'alors quiescent dans la chaîne ganglionnaire neuro-anatomiquement reliée. Par ailleurs, certaines **maladies génétiques**, comme la maladie de Charcot-Marie Tooth ou la maladie de Fabry, s'accompagnent aussi de douleurs neuropathiques. De plus, l'exposition à des **substances neurotoxiques**,

comme l'alcool ou des traitements anticancéreux utilisés en chimiothérapie, peut aussi entraîner l'apparition de douleurs neuropathiques périphériques.

Enfin, une **lésion nerveuse** traumatique peut également affecter la région anatomique innervée, à l'image des douleurs fantômes, qui peuvent être ressenties après la perte d'un membre ; de la radiculopathie douloureuse, induite par compression des racines nerveuses ; ou de la neuralgie trijéminal, affectant la sphère oro-faciale. Du fait de cette étiologie variée et de leur symptomatologie complexe, les cliniciens rapportent *des* douleurs neuropathiques. Néanmoins, on parle souvent de *la* douleur neuropathique en tant que sujet d'études.

1.3 Symptômes

La douleur neuropathique se caractérise par des troubles sensoriels qui peuvent s'avérer gênants voire invalidants. Les plus tolérés par les patients sont généralement les symptômes dits déficitaires, ou « négatifs », c'est-à-dire entraînant une diminution ou une perte de sensibilité au niveau de la région affectée. On parle alors d'hypoesthésie, d'hypoalgésie ou d'analgésie. Des traumatismes peuvent donc passer inaperçu, ce qui représente un risque pour l'état de santé des patients. *A contrario*, la douleur neuropathique peut s'accompagner de symptômes plus inconfortants, dits irritatifs ou « positifs » : en l'occurrence, cela signifie qu'ils entraînent une augmentation de la sensibilité ou l'apparition de sensations inattendues. Il peut s'agir de douleur spontanée (paroxystique ou diffuse), de dysesthésie ou d'engourdissements, d'hyperesthésie (picotements, sensations de brûlure, fourmillements...), d'hyperalgésie, ou d'allodynie (typiquement, la sensation douloureuse du port d'un vêtement sur une brûlure induite par la surexposition solaire). Ces symptômes peuvent affecter les modalités thermique ou mécanique (voir **Table 1**). Par-delà la composante sensorielle, la douleur chronique entraîne une souffrance, qui peut avoir un impact plus délétère sur l'humeur au long terme. En effet, il existe une comorbidité importante entre la douleur chronique et les états anxio-dépressifs ([IsHak et al., 2018](#) ; [Martini et Hoffmann, 2018](#) ; [Yalcin et Barrot, 2014](#)).

Symptômes déficitaires ou « négatifs »		Symptômes irritatifs ou « positifs »	
Hypoesthésie	Diminution de la sensibilité à la stimulation	Paresthésie	Sensation anormale spontanée ou évoquée
Hypoalgésie	Diminution de la douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux	Hyperalgésie	Augmentation de la douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux
Analgésie	Absence de douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux	Allodynie	Douleur en réponse à un stimulus normalement non douloureux

Table 1. Principaux symptômes accompagnant les douleurs neuropathiques

1.4 Diagnostic

Le diagnostic des douleurs neuropathiques se fait sur la base du corrélat neuro-anatomique de la gêne, des symptômes déficitaires ou de la douleur ; et par le contexte entourant la survenue des symptômes. En France, l'utilisation du questionnaire « Douleur neuropathique en quatre questions » (DN4) (*cf. Table 2*) est associé à l'examen clinique pour établir le diagnostic ([Attal et Bouhassira, 2015](#) ; [Martinez et al., 2010](#)). L'étendue de la zone atteinte pourra être déterminée par la recherche d'éventuels déficits au niveau des sensibilités thermiques (chaud ou froid) et/ou mécaniques (statique ou dynamique), par comparaison aux zones non atteintes. Les dispositifs de diagnostic utilisés pour évaluer la réponse du patient aux douleurs évoquées sont une brosse ou un pinceau (pour l'allodynie mécanique dynamique), des filaments de von Frey (pour l'allodynie mécanique statique), ou une thermode chaude ou froide pour l'hyperalgésie thermique au chaud ou l'allodynie thermique au froid. En complément, en cas de suspicion de douleurs neuropathiques à petites fibres (liées à un défaut fonctionnel ou structural des fibres nerveuses de faible diamètre), des biopsies cutanées peuvent confirmer le diagnostic par évaluation de la densité de fibres nerveuses dans l'épiderme.

1. La douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ? (Interrogatoire)		
Brûlure	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Sensation de froid douloureux	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Décharges électriques	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
2. La douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ? (Interrogatoire)		
Fourmillements	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Picotements	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Engourdissement	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Démangeaisons	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
3. La douleur est-elle localisée dans le territoire ou l'examen met en évidence : (examen)		
Hypoesthésie au tact	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Hypoesthésie à la piquûre	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
4. La douleur est-elle provoquée ou augmentée par : (examen)		
Le frottement	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non

Table 2. Questionnaire DN4

Adapté depuis Martinez et al., 2010. Le patient doit répondre à chaque item des 4 questions ci-dessus par « oui » (1 point) ou par « non » (0 point). Valeur seuil = 4/10

1.5 Modèles animaux

La plus grande partie des études précliniques menées sur les mécanismes physiopathologiques et les traitements des douleurs neuropathiques utilise des modèles de rongeurs, rats ou souris, sur lesquels les causes (validité étiologique) et la symptomatologie (validité d'aspect) de ces douleurs sont reproduites.

Ainsi, des modèles de neuropathies diabétiques peuvent être obtenu par l'administration de streptozotocine, un antibiotique cytotoxique pour les cellules β du pancréas productrices d'insuline, conduisant donc à une hyperglycémie neurotoxique ; ou par l'induction d'une obésité morbide par un régime gras et/ou sucré ; ou même chez des lignées transgéniques ayant par exemple un déficit de leptine ou de son récepteur, impliqués dans le contrôle de la satiété (Yorek, 2016). Des modèles de neuropathies induites par des agents neurotoxiques, comme l'oxaliplatine ou le paclitaxel, permettent également d'étudier l'impact des chimiothérapies sur le système somatosensoriel. D'autre part, il existe un certain nombre d'études qui ont recours à des lésions centrales pour modéliser la douleur neuropathique chez l'animal, par section mécanique ou par

compression directe de la moelle épinière (Kjell et Olson, 2016), ou alors par excitotoxicité pharmacologique (Burma et al., 2017).

De plus, d'autres modèles sont basés sur des lésions du système somatosensoriel et quelques-uns d'entre eux sont représentés en **Table 6** et résumés en Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Parmi eux sont retrouvés les modèles de douleurs neuropathiques induites par lésion de nerfs périphériques, dont la plupart font suite à des lésions au niveau du nerf sciatique ou de ses embranchements (pour revue, voir Barrot, 2012). Ces modèles peuvent être induits par axotomie (ou section) nerveuse, et/ou par une ou plusieurs ligatures du nerf, à l'image du modèle de douleur neuropathique induite par la ligature de deux des trois branches du nerf sciatique (en l'occurrence les nerfs tibial et péronéal) précédée de leur section (Decosterd et Woolf, 2000 ; Shields, Eckert, et Basbaum, 2003). La ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer, Dubner, et Shir, 1990) ou la ligature de nerfs spinaux (situés les ganglions dorsaux rachidiens et la branche commune du nerf sciatique) sont aussi utilisées dans l'étude de la douleur neuropathique (Kim et Chung, 1992). Des modèles de douleur neuropathiques trigéminales existent également, induits par ligature du nerf infraorbital par exemple (Vos, Strassman, et Maciewicz, 1994).

Enfin, les lésions peuvent être faites par des ligatures de la branche commune du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988), ou par compression à l'aide d'un manchon de polyéthylène (Mosconi et Kruger, 1996), comme c'est le cas dans le modèle du *cuff* avec lequel nous travaillons dans mon équipe d'accueil (Benbouzid et al., 2008 ; Yalcin et al., 2014).

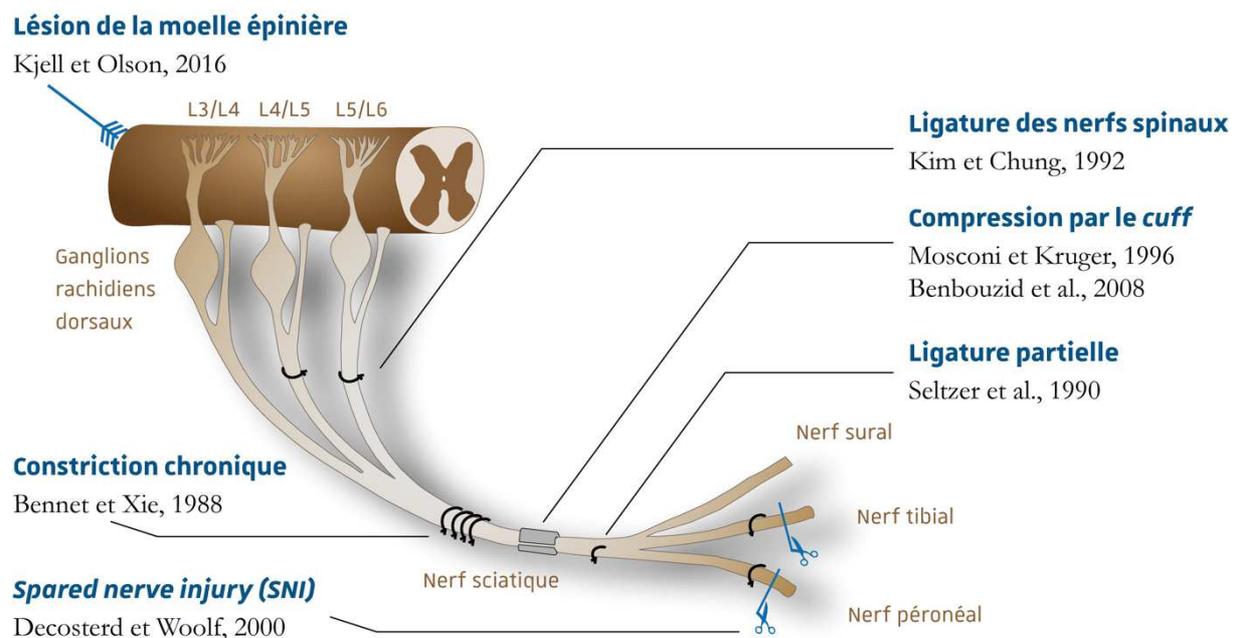


Figure 1. Modèles précliniques de neuropathies couramment utilisés en recherche.

1.6 Physiopathologie

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques et sont retrouvés le long des voies de la nociception. Les premiers intervenants qui permettent la détection de l'information nociceptive sont appelés nocicepteurs. Ils sont situés dans la plupart des tissus de l'organisme sur les terminaisons libres des neurones de fibres afférentes primaires périphériques, dont le corps cellulaire est situé dans les ganglions rachidiens dorsaux ou les ganglions crâniens. Ces détecteurs présentent un seuil d'activation élevé, supérieur à celui des cellules de détection de stimuli mécaniques ou thermiques non nocifs, et peuvent être sensibilisés par des facteurs chimiques tels que ceux impliqués dans l'inflammation (pour revue, voir [Julius, 2013](#)).

Le message nociceptif est véhiculé le long de fibres nerveuses de groupe A δ (faiblement myélinisées ; diamètre moyen : 1 à 5 μm ; vitesse de conduction : 3 à 30 m/s ; modalités mécaniques ou thermiques), ou de fibres nerveuses de groupe C (non myélinisées ; diamètre moyen : 0,2 à 1,5 μm de diamètre, vitesse de conduction : 0,5 à 2 m/s ; modalités mécaniques, thermiques et chimiques). Les fibres nerveuses A β ne sont normalement pas impliquées dans la transmission du message nociceptif. Leur gros diamètre permet une vitesse de conduction plus rapide et la transduction de stimuli mécaniques non nociceptifs. Paradoxalement, certaines fibres C permettent la transmission de stimuli mécaniques très légers pouvant être considérés comme agréables ([Olausson et al., 2010](#)).

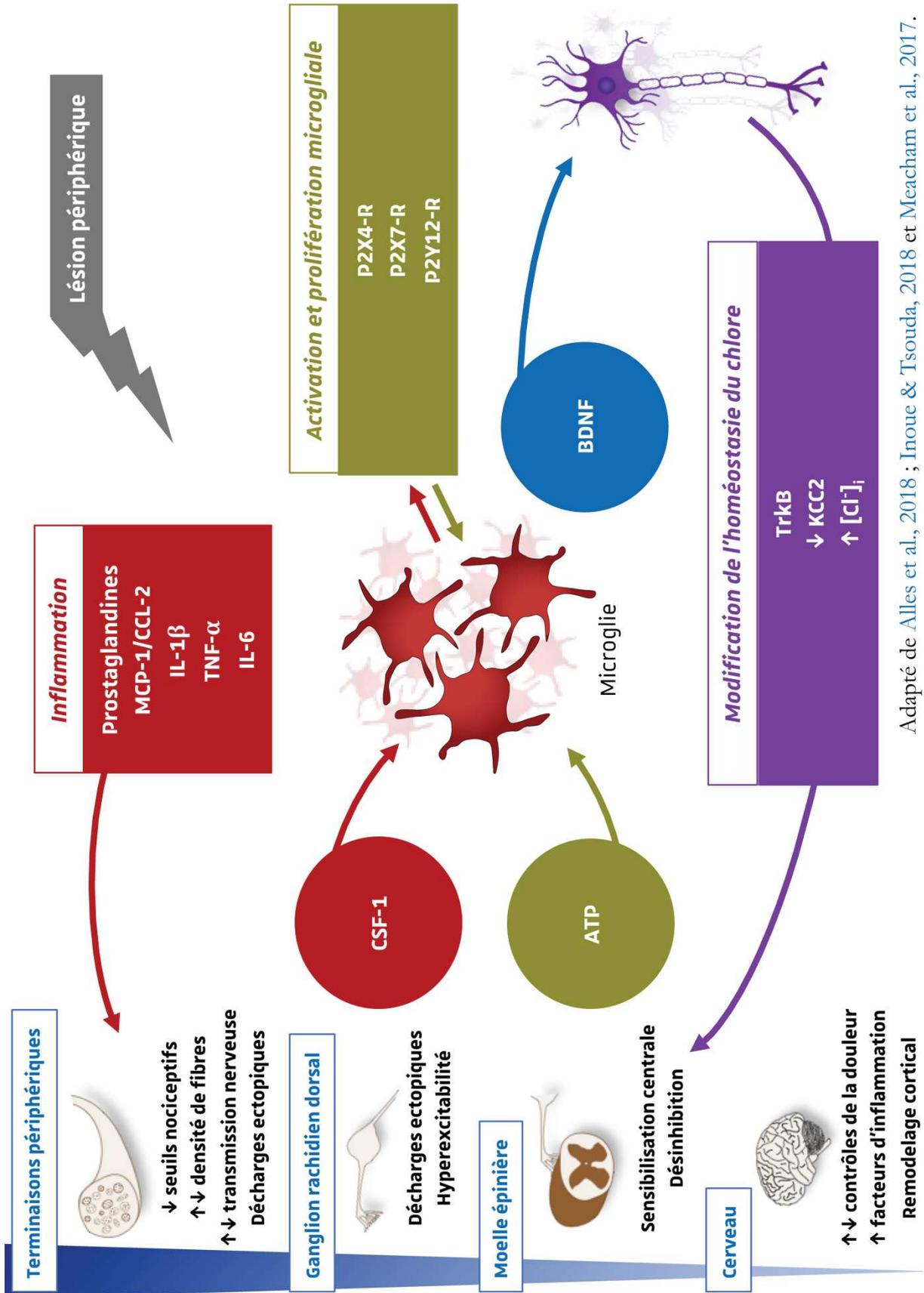
Le message nociceptif atteint ensuite la corne dorsale de la moelle épinière où les premières synapses des neurones primaires avec des interneurons ou des neurones de convergence se font dans les laminae superficielles I et II, permettant une première intégration des informations sensorielles (pour revue, voir [Cordero-Erausquin et al., 2016](#) ; [Todd, 2002](#)). Le signal est ensuite transmis à des neurones de projection pour être véhiculé vers des régions cérébrales telles que le thalamus, l'insula ou le cortex cingulaire antérieur, qui participeront à l'intégration supra-spinale du message nociceptif et au traitement cognitif de la douleur. Par ailleurs, des voies de facilitation (sérotonergiques) ou d'inhibition (noradrénergiques) de l'information nociceptive, provenant de centres supraspinaux comme le locus cœruleus, permettent de moduler l'intégration du message nerveux et peuvent être dérégulés dans le cas de douleurs neuropathiques ([Bannister et al., 2017](#) ; [Millan, 2002](#) ; [Ossipov, Morimura, et Porreca, 2014](#)).

Les dérèglements à l'origine des douleurs neuropathiques peuvent être retrouvés à toute étape de la transmission du message nociceptif mentionnée précédemment (*cf.* **Figure 2**, d'après [Alles et Smith, 2018](#) ; [Inoue et Tsuda, 2018](#) ; [Meacham et al., 2017](#)). Une lésion du système somatosensoriel périphérique conduit à la libération de médiateurs de la neuro-inflammation, tels

que des prostaglandines, la cytokine chimio-attractrice de monocytes MCP-1/CCL2, les interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 ainsi que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). La neuro-inflammation qui en résulte provoque une diminution des seuils nociceptifs ainsi qu'une modification de la transmission nerveuse du fait d'une dérégulation des canaux ioniques (sodium, calcium, chlorures notamment) au niveau des terminaisons périphériques, où une modification de la densité de fibres peut aussi être décrite dans ces conditions. Des décharges ectopiques ont alors lieu et sont véhiculées jusqu'au ganglion rachidien dorsal. En conséquence, l'hyperexcitabilité locale induit la libération du facteur stimulant de colonies de macrophages CSF-1 par les fibres afférentes primaires, capable de provoquer l'infiltration, la prolifération et l'activation de cellules microgliales. Sous l'influence du CSF-1, les cellules microgliales peuvent sur-exprimer certains récepteurs purinergiques membranaires tels que P2X4, P2X7 et P2Y12. Or, l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels de la couche dorsale de la moelle épinière y favorise la libération d'ATP par ceux-ci, agissant sur ces récepteurs pour conduire à la libération microgliale du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).

Le BDNF ainsi produit peut interagir avec les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et en modifier l'homéostasie du chlore ; par une interaction sur le récepteur tropomyosine kinase B (TrkB), une diminution de l'expression du transporteur (exportateur) potassium-chlore KCC2 et ce faisant une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions chlorure (Cl⁻). Bien que le mécanisme de libération microgliale du BDNF décrit ci-dessus a été identifié comme étant propre aux mâles chez les rongeurs, la dérégulation de l'homéostasie du chlore via une sous-expression de KCC2 a été décrite chez les femelles ([Mapplebeck et al., 2019](#))

Des phénomènes de plasticité comme la réorganisation des récepteurs neuronaux post-synaptiques (AMPA ou NMDA) sont reportés suite à l'augmentation de la concentration de glutamate dans les synapses ([Inquimbert et al., 2012](#)). Ces mécanismes de plasticité et d'inflammation ainsi que la diminution du tonus inhibiteur au sein de la couche dorsale de la moelle épinière participent à une sensibilisation centrale, qui a lieu également dans des régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information douloureuse ([Woolf, 2011](#) ; [Zhuo, 2016](#)), et favorisent l'apparition et le maintien de douleurs neuropathiques.



Adapté de Alles et al., 2018 ; Inoue & Tsouda, 2018 et Meacham et al., 2017.

Figure 2. Physiopathologie des douleurs neuropathiques

Adapté depuis Meacham et al., 2017.

2 Traitement des douleurs neuropathiques

2.1 Recommandations des sociétés savantes

2.1.1 Traitements de première intention

En clinique, l'utilisation d'antalgiques courants tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou le paracétamol n'est pas suffisamment efficace pour soulager les douleurs neuropathiques. Il faut donc recourir à d'autres classes médicamenteuses, recommandées par des organisations scientifiques telles que la Fédération Européenne des Sociétés de Neurologie (EFNS) ou le Groupe d'Intérêt sur les douleurs neuropathiques (NeuroPSIG) de l'IASP ([Attal et al., 2010](#) ; [Finnerup et al., 2015](#)). Les patients atteints de douleurs neuropathiques peuvent se voir prescrire en première intention certains antidépresseurs, détaillés dans le chapitre 2.2, ou des antiépileptiques, qui sont brièvement détaillés ci-après.

Les antiépileptiques de type gabapentinoïdes sont ainsi recommandés en traitement de première intention pour les douleurs neuropathiques, à l'image de la gabapentine (Neurontin[®]) ou de la prégabaline (Lyrica[®]), qui ont une efficacité reconnue dans le traitement des douleurs neuropathiques. Le nombre de sujets à traiter (NST)* est évalué entre 7 et 8 pour ces deux molécules ([Finnerup et al., 2015](#)). Les gabapentinoïdes sont des analogues de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) mais n'ont pas d'action connue sur ses récepteurs. Leur action thérapeutique est médiée en premier lieu par une liaison à la sous-unité $\alpha_2\delta_1$ des canaux calciques voltage-dépendant, diminuant la neurotransmission excitatrice ainsi que la sensibilisation spinale (pour revue, voir [Kremer et al., 2016](#)). La carbamazépine (Tegretol[®]) bloque les canaux sodiques voltage-dépendant et n'est utilisée que dans les indications de névralgies de la face ou de neuropathies centrales ([Jensen, 2002](#)). Depuis peu, l'usage de la prégabaline fait l'objet de réévaluations du fait d'une balance bénéfique/risque moins favorable (par rapport aux autres traitements de première ligne) et d'un risque de mésusage. Les dernières recommandations de la SFETD suggèrent même d'utiliser la prégabaline en deuxième intention, après la gabapentine ([Moisset et al., 2020, sous presse](#)), bien qu'une récente méta-analyse démontre son efficacité dans le traitement des douleurs neuropathiques post-herpétiques, diabétiques ou mixtes ([Derry et al., 2019](#)). Par ailleurs, d'autres antiépileptiques peuvent être prescrits hors autorisation de mise sur le

* L'indice du NST (ou NNT en anglais pour *Number Needed to Treat*) permet d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Sur la base d'un échantillon de population, il indique le nombre de patients à traiter pour qu'un seul patient soit soulagé à hauteur d'au moins 50%. Idéalement, le NST devrait donc être proche de 1.

marché (AMM), comme la lamotrigine (Lamictal[®]), appartenant à la famille des antiépileptiques qui bloquent les canaux sodiques, et qui est efficace dans les névralgies du nerf trijumeau (Jensen, 2002). Cette dernière est néanmoins agréée par l'agence américaine de l'alimentation et du médicament (FDA, pour *Food and Drug Administration*) dans la même indication.

2.1.2 Traitements de deuxième et troisième intention

Lorsque les premiers traitements ne sont pas ou plus efficaces, ou lorsque leurs effets indésirables nécessitent l'arrêt des traitements, d'autres stratégies thérapeutiques sont envisagées. Le tramadol, agoniste des récepteurs μ opioïdiques et inhibiteur de la recapture de noradrénaline et de sérotonine (Vazzana et al., 2015), est une alternative aux traitements de première intention (Attal, 2019 ; Finnerup et al., 2015). Sinon, l'utilisation de traitement topiques (patchs cutanés) de capsaïcine ou de lidocaïne peut être envisagée dans le cadre des neuropathies périphériques. Cette approche est basée sur les propriétés pharmacologiques des principes actifs, comme pour la lidocaïne, qui induit une anesthésie locale par le blocage des canaux sodiques voltage-dépendants (Attal, 2019). La capsaïcine, agoniste des récepteurs TRPV1, activés par la chaleur, a un potentiel neurotoxique qui lui permet de provoquer une désensibilisation des fibres C, qui véhiculent le message nociceptif. Les patchs de capsaïcine ont un potentiel thérapeutique plus fort que la lidocaïne, qui reste cependant moins élevé que celui du tramadol (Attal, 2019).

En cas d'échec de ces traitements, des opiacés forts tels que la morphine et l'oxycodone peuvent être utilisés en dernier recours. Cependant, les effets d'accoutumance et de dépendance qu'ils peuvent entraîner sont à prendre en considération, d'autant que les opiacés sont la source d'un mésusage épidémique aux États-Unis (Beheshti, 2019). Enfin, de récentes études ont soulevé le potentiel thérapeutique de la toxine botulique, sur la base de son action inhibitrice de l'exocytose synaptique, par voie injectable topique avec un faible NST (Attal, 2019), ouvrant la voie à de nombreuses pistes de recherche.

2.2 Les antidépresseurs, traitements de première intention

C'est dans un article issu de la *Revue Neurologique* (Paoli, Darcourt, et Cossa, 1960) qu'est reportée la première utilisation d'un antidépresseur dans le traitement de la douleur. Au départ, trois patientes ; deux d'entre elles étaient atteintes de sclérose en plaques et étaient suivies pour des douleurs « violentes », multi-localisées pour l'une et localisées à la cheville pour l'autre, la troisième patiente souffrait d'une sciatalgie (ou « sciatique »), liée à la présence d'une hernie lombaire, et présentait un point commun avec les deux premières : la dépression. Pour soigner l'« état mental » de ces femmes, les neurologues décidèrent d'engager un traitement

antidépresseur, en utilisant l'imipramine. Finalement, les médecins ont constaté l'amélioration de leur humeur mais aussi la diminution des symptômes douloureux. Y avait-il un lien de causalité entre le traitement donné et le soulagement des douleurs ? Par-delà les prémices qu'on aurait pu relever sur les liens de comorbidité entre douleur et dépression, ils décidèrent de tester l'hypothèse sur d'autres patients douloureux, non affectés par la dépression. Sur 21 personnes traitées, 14 ont connu des améliorations notables, tant sur le plan douloureux que sur le plan général. Plus tard, l'expérience a été menée sur d'autres patients à Bordeaux avec des résultats similaires, confirmant l'intérêt d'utiliser l'antidépresseur dans l'indication neuropathique. Dans les années 1970, cette action de certains antidépresseurs sur la douleur neuropathique a été confirmée par des études contrôlées ([Gringras, 1976](#)), et ces médicaments sont depuis devenus des traitements de référence.

2.2.1 Dans la dépression

L'essentiel des antidépresseurs agit sur la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline ([Ruhé, Mason, et Schene, 2007](#)). Les premiers traitements utilisés contre la dépression font partie de la famille des inhibiteurs de monoamines oxydase (IMAO), qui empêchent la dégradation des monoamines dans la fente synaptique. De la même manière, les antidépresseurs tricycliques et tétracycliques, nommés ainsi en raison de leur structure chimique, ont des mécanismes d'action variés dont la recapture de monoamines. Les antidépresseurs tricycliques sont aussi utilisés en première intention dans le traitement des douleurs neuropathiques et sont détaillés dans la section 2.2.2 ci-après. Cependant, même si ces molécules bloquent la recapture de sérotonine et de noradrénaline, elles sont assez peu sélectives et ont des cibles secondaires à l'origine d'effets indésirables.

Depuis, la majorité des traitements antidépresseurs agissent donc plus sélectivement sur les sites de recaptures des monoamines. Parmi eux, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (ISRS) sont souvent donnés en première intention, comme la fluoxétine, la sertraline ou le citalopram, mais ils sont inefficaces dans le traitement de la douleur neuropathique ([Finnerup et al., 2015](#)). D'autres médicaments, agissant de manière plus sélective sur les récepteurs sérotonergiques, comme la trazozone, sont aussi utilisés. Comme la plupart des antidépresseurs, ils peuvent occasionner un certain nombre d'effets indésirables, parmi lesquels sont rapportées dyskinésies (tremblements), insomnies, nausées, diarrhées, œsophagites, hypersudations, diminution de la libido ou éruptions cutanées.

Des inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine et de noradrénaline (ISRSNa) comme la duloxétine ont également été développés, et permettent la prise en charge de la dépression avec

moins d'effets indésirables que ceux obtenus avec les antidépresseurs tricycliques. Par ailleurs, la duloxétine est également utilisée dans le traitement des douleurs neuropathiques (*cf.* section 2.2.2).

Enfin, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de noradrénaline (ISRN_a) comme la réboxétine peuvent être administrés. La réboxétine a des propriétés anti-nociceptives chez l'animal (Yalcin *et al.*, 2009), mais son utilisation clinique dans la dépression est discutée voire considérée comme potentiellement toxique (Eyding *et al.*, 2010). Des inhibiteurs sélectifs de la recapture de dopamine et de noradrénaline (ISRD_{Na}) aux propriétés psychostimulantes, comme le bupropion, sont également utilisés.

Depuis les débuts de leur utilisation en clinique, les traitements de la dépression ont peu évolué, mais des recherches sont actuellement menées pour déterminer le potentiel thérapeutique des antagonistes des récepteurs NMDA comme la s-kétamine (ou eskétamine), récemment approuvée dans cette indication par la FDA.

2.2.2 Traitement des douleurs neuropathiques

De nos jours, les antidépresseurs sont prescrits à environ 30% des patients souffrant de douleurs neuropathiques en Europe*, pendant une durée supérieure à trois ans pour plus d'un tiers d'entre eux (soit plus de 10% des patients) (McDermott *et al.*, 2006). Seuls certains antidépresseurs peuvent être prescrits dans cette indication (*cf.* **Table 3**) : i) les antidépresseurs tricycliques, comme l'amitriptyline (Laroxyl®), l'imipramine (Tofranil®), la clomipramine (Anafranil®) ou la désipramine (Pertofran®) ; et ii) les ISRS_{Na}, comme la duloxétine (Cymbalta®), la venlafaxine (Effexor®), ou le milnacipran (Ixel®), qui est utilisé hors AMM dans la prise en charge des fibromyalgies†. Les antidépresseurs tricycliques ont un NST évalué à 3,6 pour le soulagement d'une douleur au moins modérée, sauf dans le cas des douleurs neuropathiques liées au SIDA où ils sont inefficaces (Saarto *et Wiffen*, 2007). Le NST des ISRS_{Na} a quant à lui été évalué à 6,4 (Finnerup *et al.*, 2015). De ce fait, il est considéré que les antidépresseurs tricycliques, en particulier l'amitriptyline – qui détient le plus d'évidences cliniques, sont les candidats de premier choix pour le traitement des douleurs neuropathiques, bien qu'ils soient moins bien tolérés que les ISRS_{Na} (Mico *et al.*, 2006).

* Étude menée sur des patients en France, Royaume-Uni, Pays-Bas, Italie, et en Espagne.

† La fibromyalgie est définie par l'IASP comme étant un syndrome rhumatologique, dont la physiopathologie est encore mal connue, caractérisé par des douleurs et des troubles de la sensibilité chroniques et diffus, accompagnées de troubles du sommeil et de fatigue ayant un fort retentissement sur la qualité de vie.

Antidépresseurs tricycliques	Amitriptyline	NST = 3,4 Sauf VIH
	Imipramine	
	Clomipramine	
	Désipramine	
IRSNa	Duloxétine	NST = 6,4
	Venlafaxine	
	Milnacipran	
	(hors AMM)	

Table 3. Antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques

2.3 Focus sur l'amitriptyline

2.3.1 En clinique

Au milieu du XX^e siècle, la chlorpromazine était la principale molécule antipsychotique utilisée en médecine. Cette molécule, appartenant à la famille des phénothiazines – composées d'un cycle de thiazine entouré de deux cycles de benzène (d'où leur appellation *tricycliques*), a été produite à la suite de nombreux travaux étudiant les propriétés sédatives des antihistaminiques de synthèse, que l'on souhaitait optimiser (Fagan et Warden, 1996 ; Sneader, 2005). A l'aube des années 1960, l'imipramine est développée sur une base analogue à celle d'un dérivé antihistaminique, et à laquelle une chaîne moléculaire a été ajoutée, identique à celle de la chlorpromazine. Suite aux satisfecit donnés à l'imipramine, l'amitriptyline est synthétisée peu de temps après, à l'issue de nombreux travaux concurrentiels ayant donné naissance à d'autres composés tricycliques. L'amitriptyline démontrera plus tard son efficacité dans la dépression (Garry et Leonard, 1963), puis sera évoquée dans la prise en charge de la douleur (sciatique) (Lacour, Pélissier, et Guidoum, 1965).

Ensuite, l'amitriptyline a prouvé son efficacité dans le traitement des douleurs neuropathiques chez des patients diabétiques, sans le moindre impact sur leur humeur (Max et al., 1987), et chez des patients avec d'autres types de douleurs chroniques* avec une efficacité supérieure au placebo (Onghena et Van Houdenhove, 1992). Bien qu'efficace dans la plupart des conditions neuropathiques, l'amitriptyline ne permet cependant pas de traiter les douleurs

* Douleurs neuropathiques post-herpétiques ; douleurs neuropathiques post-AVC ou post-AIT ; migraines ; céphalées de tension ; fibromyalgies.

chroniques liées au cancer (Moore et al., 2015), en plus de celles liées au VIH, à l'instar des autres antidépresseurs tricycliques.

Dans l'indication douloureuse, la posologie de l'amitriptyline commence à partir de 25 mg par jour et peut aller jusqu'à 150 mg (Finnerup et al., 2015 ; Moore et al., 2015). L'amitriptyline peut être utilisée jusqu'à 300 mg dans les indications de dépression ou de troubles alimentaires (Jennings, 2018). Préférentiellement, le traitement doit être pris le soir en raison de sa composante anticholinergique sédatrice. Aussi, l'amitriptyline peut modifier la conductance cardiaque et est contre-indiquée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ou ceux à risque de développer un infarctus du myocarde (Upward et al., 1988 ; Wenger, Cohn, et Bustrack, 1983). L'amitriptyline peut présenter d'autres effets indésirables et occasionner des vertiges, une rétention d'eau (prise de poids, rétention des urines, risque d'œdème, sécheresse de la bouche), des maux de tête ou confusions (Attal, 2019). Par ces aspects, elle est contre-indiquée chez les patients qui présentent un risque de développer un glaucome. Enfin, comme tous les tricycliques, une surveillance particulière doit être apportée pendant le traitement pour limiter les risques d'amplification de l'état anxieux, d'inversion rapide de l'humeur, d'épisode maniaque, ou de levée d'inhibition (risque de suicide).

2.3.2 Mécanismes d'action

Pour traiter la douleur neuropathique, l'amitriptyline n'est efficace chez l'humain que si elle est administrée de façon chronique par voie orale (Sindrup et al., 2005). De la même manière, l'amitriptyline est efficace dans le modèle préclinique du *cuff*, dont la neuropathie est induite par compression du nerf sciatique chez la souris, avec lequel nous travaillons (Benbouzid et al., 2008). Néanmoins, l'amitriptyline entraîne des effets antalgiques de manière aiguë à plus fortes doses, *via* des mécanismes différents (Berrocoso et al., 2011 ; Kremer et al., 2018).

a) Mécanisme d'action aiguë

L'amitriptyline bloque la recapture présynaptique de sérotonine et de noradrénaline (*cf.* **Table 4**, d'après Owens et al., 1997 et Tatsumi et al., 1997), par inhibition de leurs transporteurs (Finnerup, Sindrup, et Jensen, 2007). L'action analgésique aiguë induite par l'administration d'amitriptyline est médiée par la stimulation du système noradrénergique, due à l'accumulation de noradrénaline au sein des voies noradrénergiques du contrôle de la douleur, principalement depuis des projections du locus coeruleus (Kremer et al., 2016). Cette accumulation va provoquer une sur-activation des récepteurs adrénergiques α_{2a} au sein de la corne dorsale de la moelle épinière (Ghelardini, Galeotti, et Bartolini, 2000 ; Kremer et al., 2018), à l'origine de l'analgésie

(Di Cesare Mannelli et al., 2016). Dans une moindre mesure, l'amitriptyline peut moduler d'autres récepteurs, parmi lesquels les récepteurs muscariniques, cholinergiques, nicotiniques, histaminergiques, purinergiques et NMDA ; ou les canaux perméables au sodium, au potassium et au calcium (Casale, Symeonidou, et Bartolo, 2017). Le blocage des canaux ioniques induit par l'amitriptyline a par ailleurs été mis en évidence, à la suite d'une administration locale en crème intrathécale chez les rongeurs (Haderer et al., 2003 ; Kiani et al., 2015). De plus, l'approche locale a aussi montré une action analgésique chez l'Homme (Gerner et al., 2003), néanmoins la survenue d'effets indésirables tels qu'irritations ou prurit limite l'usage du procédé en clinique.

Dans des modèles *in vitro*, l'application d'amitriptyline entraîne aussi des modifications gliales, comme l'augmentation de la production du facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF) (Hisaoka-Nakashima et al., 2015) ou l'augmentation de production d'autres facteurs neurotrophiques comme le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) ou le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) dans les astrocytes (Kajitani et al., 2012). Par ailleurs, des travaux ont relevé que l'amitriptyline modulait l'expression de la connexine 43 (Jeanson et al., 2016 ; Morioka et al., 2014), impliquée dans la formation de jonctions communicantes et en outre dans les interactions neurones-glie (*cf.* section 4, Letellier et al., en préparation).

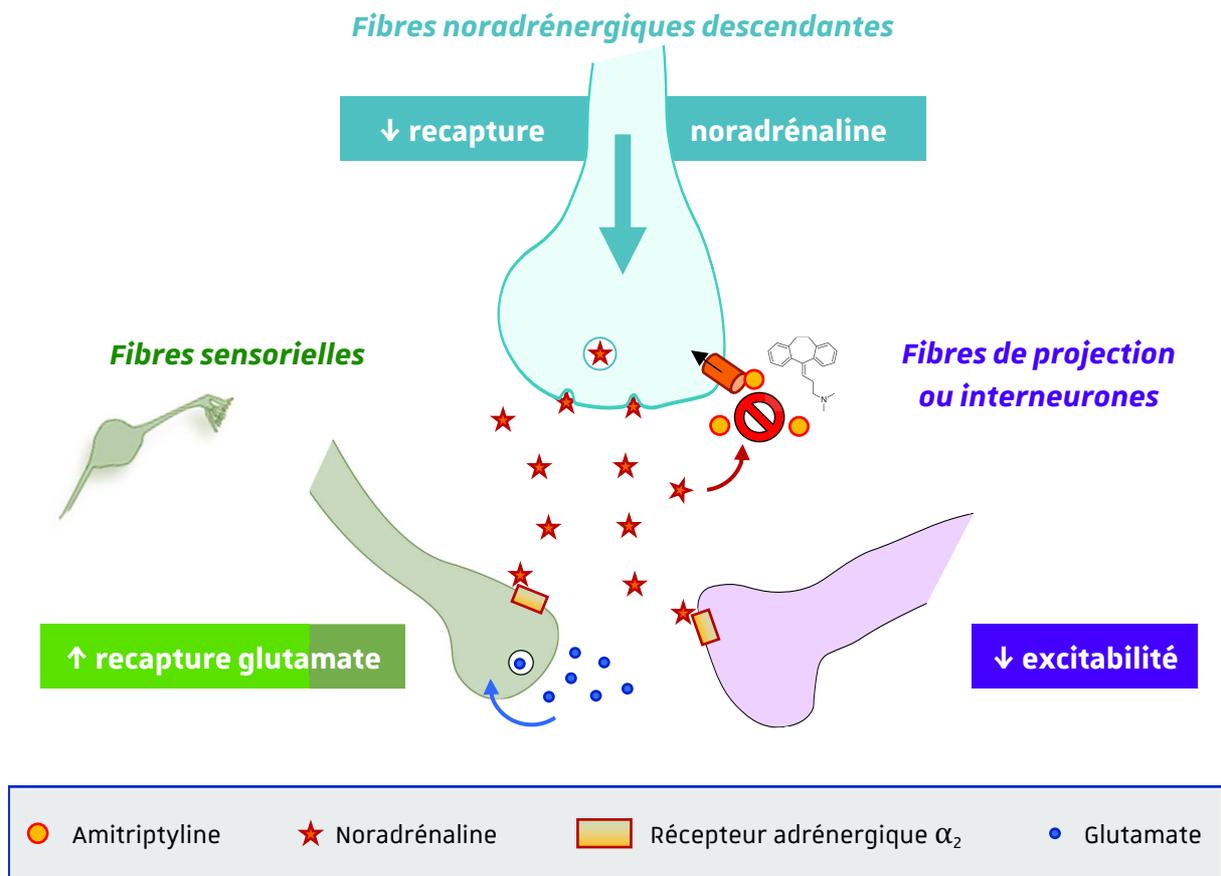


Figure 3. Mécanisme d'action aiguë de l'amitriptyline dans la moelle épinière

b) Mécanisme d'action chronique

L'amitriptyline met en jeu des mécanismes de plasticité au sein du système nerveux, à l'origine de son efficacité au long cours (Kremer et al., 2016). L'action chronique de l'amitriptyline est due à une activation des récepteurs adrénergiques β_2 des cellules gliales satellites, localisées dans les ganglions dorsaux rachidiens. Cette activation, liée au recrutement de la noradrénaline au sein des terminaisons sympathiques, entraîne la diminution du TNF- α , acteur majeur de la signalisation inflammatoire pro-nociceptive (Kremer et al., 2018 ; Yalcin et al., 2009). Aussi, l'administration chronique d'amitriptyline chez l'animal induit l'augmentation des transporteurs d'acides aminés excitateurs et des récepteurs GABA_B dans la corne dorsale de la moelle épinière, et diminue l'expression du sous-type 2B des transporteurs au NMDA (Kremer et al., 2016). Enfin, il est à noter que les récepteurs opioïdes δ sont indispensables à l'action chronique de l'amitriptyline (Benbouzid et al., 2008).

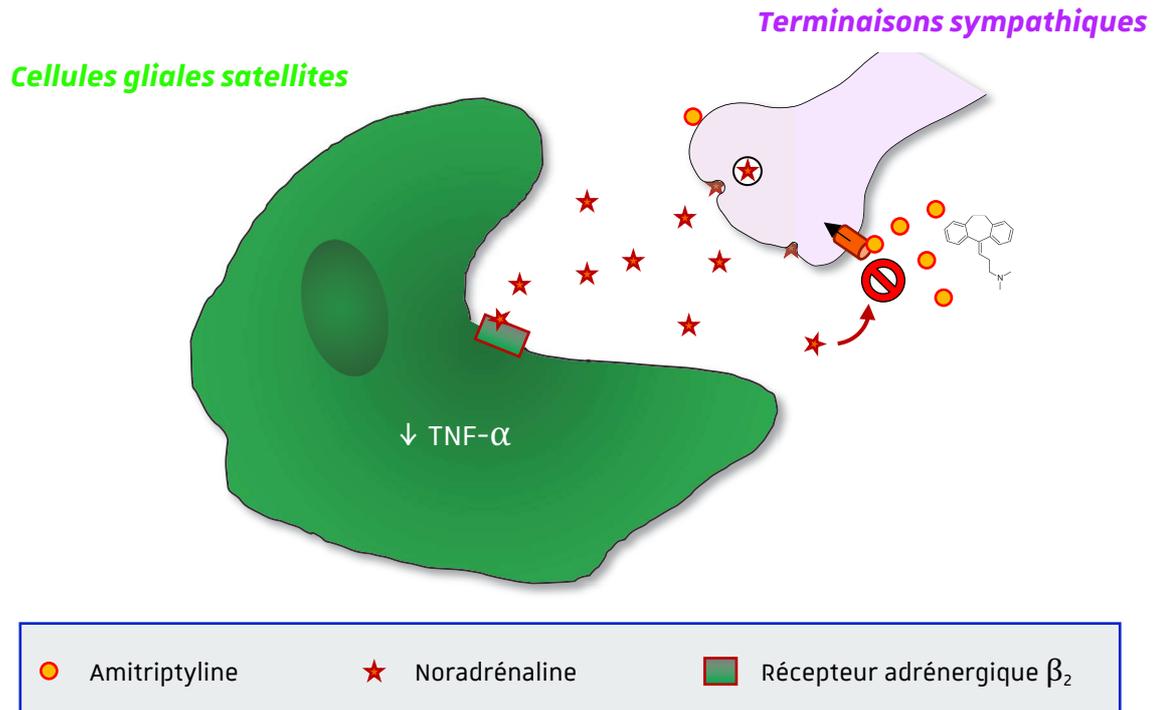


Figure 4. Mécanisme d'action chronique de l'amitriptyline

c) Métabolisme

L'amitriptyline est métabolisée dans le foie par le système cytochrome P450, où elle est transformée par déméthylation en nortriptyline. Ce métabolite actif présente des propriétés analgésiques, médiées par le blocage de la recapture de noradrénaline (Gillman, 2007 ; Walker et al., 1991). La demi-vie de l'amitriptyline est estimée entre 9 et 46 heures chez l'Homme (Cohen et De Vane, 1996) et à environ 5 heures chez l'animal (chien) après une administration par voie orale, avec un pic de concentration atteint en 1 heure (Norkus, Rankin, et KuKanich, 2015).

La demi-vie de la nortriptyline, après administration d'amitriptyline, est estimée entre 18 et 48 heures chez l'Homme (Cohen et De Vane, 1996) et à environ 6 heures chez l'animal (Norkus, Rankin, et KuKanich, 2015).

La nortriptyline est déméthylée en déméthylnortriptyline. Ces déméthylations sont principalement catalysées par l'enzyme CYP2C19, avec la participation d'autres formes enzymatiques du cytochrome à des concentrations plus élevées (CYP1A2, 3A4, 2C9) (Olesen et Linnet, 1997).

Le CYP2D6 est la seule enzyme médiatrice de l'hydroxylation de l'amitriptyline (Linden et al., 2008). Ainsi, l'hydroxylation de l'amitriptyline conduit à la formation de E-10-hydroxyamitriptyline et de Z-10-hydroxyamitriptyline. La nortriptyline est également hydroxylée

en E-10-hydroxynortriptyline et Z-10-hydroxynortriptyline. Enfin, le CYP3A4 joue un rôle relativement mineur dans la clairance de l'amitriptyline *in vivo* (Venkatakrisshnan et al., 2001).

Molécule	Transporteur de noradrénaline (K _i en nM)	Transporteur de sérotonine (K _i en nM)
Amitriptyline	15 – 18	2,8 – 4,3
Nortriptyline	1,8 – 4,4	19 – 35

Table 4. Sélectivité de l'amitriptyline et de la nortriptyline pour les transporteurs de sérotonine et de noradrénaline

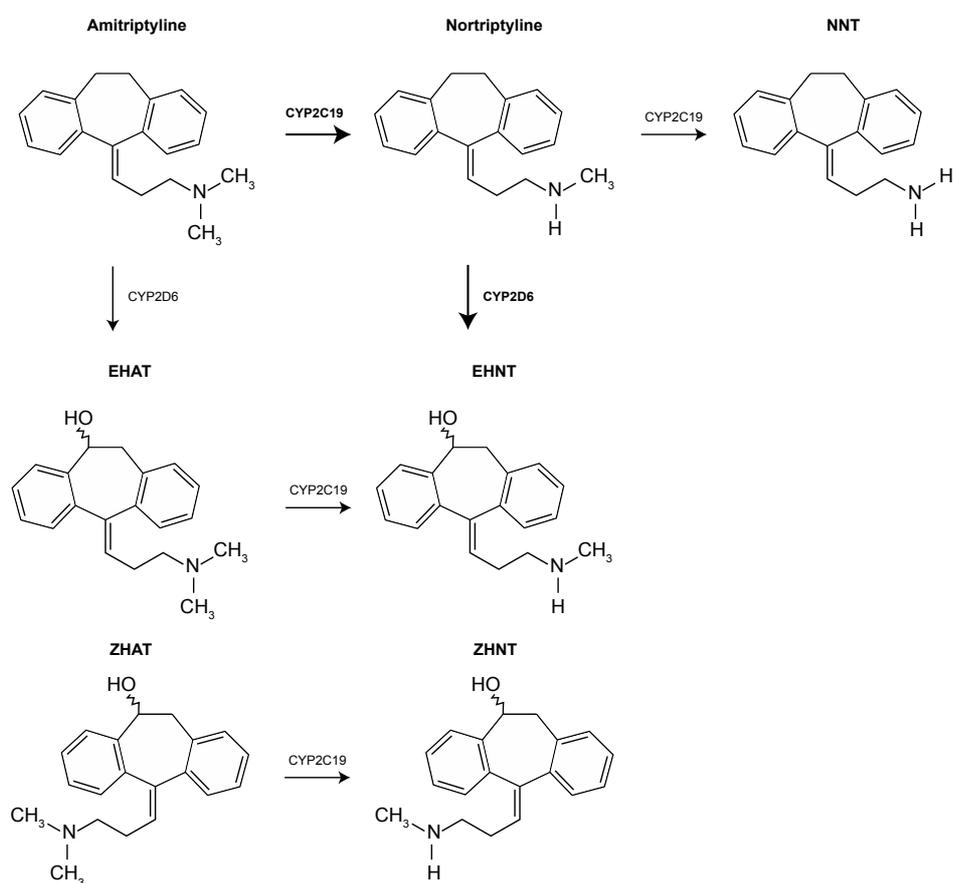


Figure 5. Métabolisme de l'amitriptyline

NNT : déméthylnortriptyline ; EHAT : E-10-hydroxyamitriptyline ; EHNT : E-10-hydroxynortriptyline ; ZHAT : Z-10-hydroxyamitriptyline ; ZHNT : Z-10-hydroxynortriptyline.

3 La méfloquine, de l'antipaludéen au repositionnement thérapeutique

3.1 Traitement du paludisme

Le paludisme, ou *malaria*, est une maladie infectieuse causée par des parasites du genre *Plasmodium*, dont quatre espèces sont impliquées dans les formes humaines (hôtes) de la maladie*. Ces parasites sont transmis par la piqûre de moustiques femelles hématophages du genre *Anopheles* (vecteurs). Arrivés dans la circulation sanguine, les parasites non différenciés peuvent se loger dans les cellules du foie afin de s'y reproduire, puis s'y différencier. Dès lors, ils peuvent rejoindre leur cible finale : les globules rouges (érythrocytes). Les premiers symptômes du paludisme sont des accès de fièvre paroxystiques qui surviennent lorsque les parasites sont en phase de reproduction. Les zones géographiques principalement concernées par le paludisme sont l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-est, l'Amérique du Sud et le Moyen-Orient. Dans le monde, on estime que 214 millions de personnes en sont atteintes, et que 438 000 personnes en sont mortes en 2015, chiffre en diminution de 48% depuis les années 2000 (OMS, 2016).

Jusque dans les années 1920, la quinine était utilisée pour traiter le paludisme. Extraite d'arbres ou arbustes du genre *Cinchona* pour ses propriétés antipyrétiques (diminuer la fièvre) depuis le XVII^e siècle, elle a fait place à l'utilisation de chloroquine, traitement phare contre paludisme à partir des années 1940. L'action antiparasitaire de ces traitements, mal connue, peut notamment s'expliquer par le blocage de la production d'hémozoïne, issue de la digestion de l'érythrocyte par le parasite, ce qui favorise l'accumulation d'hème cytotoxique dans le *Plasmodium*, néfaste pour lui (Foley et Tilley, 1997). Cependant, des phénomènes de pharmacorésistance ont commencé à apparaître et ont été confirmés dans les années 1970-1980. Aussi, l'artémisinine a été isolée à partir d'extraits de plantes médicinales utilisées en médecine chinoise depuis des millénaires ; et la découverte de ses propriétés antipaludéennes a valu à la chercheuse Tu Youyou le prix Nobel de médecine en 2015. Dans le même temps, les groupes pharmaceutiques de l'époque développaient des dérivés de la famille des amino-4-quinoléines, dont fait partie la chloroquine. C'est là que la méfloquine a été synthétisée et a fait son entrée parmi les traitements de référence contre le paludisme depuis les années 1970 (Antuñano et Wernsdorfer, 1979 ; Karbwang et White, 1990).

* *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*. Des cas d'infection à *P. knowlesi* ont été recensés, mais ne sont a priori pas transmis entre humains : il s'agirait d'une zoonose transmise par des moustiques ayant préalablement piqué des singes infectés (OMS, 2016).

3.1.1 Utilisation de la méfloquine

La méfloquine est principalement commercialisée sous la forme Lariam[®], mais est disponible sous forme générique. Elle s'administre par voie orale, sous la forme de comprimés de 250 mg, sécables.

Le traitement n'élimine que les parasites intra-érythrocytaires. En effet, la méfloquine n'a pas d'action sur les parasites exo-érythrocytaires qui sont localisés dans le foie. Elle peut être prescrite de façon prophylactique, c'est-à-dire en amont d'une exposition au parasite, pour empêcher son développement. Dans ce cas, la posologie est de 5 mg/kg (soit 1 comprimé pour un adulte de 50 kg), en une prise par semaine, à prendre une à deux semaines avant le voyage dans une zone concernée par le paludisme (medicaments.gouv.fr).

Sinon, la méfloquine peut être administrée dans une optique curative, lorsque le paludisme est déclaré. En cas d'accès palustre la posologie est établie à 25 mg/kg, à prendre sur 24 heures. Néanmoins, une résistance à la méfloquine a été observée dans certaines régions, comme le Cambodge depuis les années 1980 ([Giboda et Denis, 1988](#)). Par ailleurs, la pharmacorésistance aux traitements antipaludéens devenant de plus en plus diverse, des co-traitements avec l'artésunate, dérivée de l'artémisinine, ont été par la suite administrés.

3.1.2 Effets indésirables de la méfloquine

Largement donnée aux soldats de l'armée américaine pendant de la guerre du Vietnam, la méfloquine ne leur est plus donnée depuis 2009. Cette décision outre Atlantique tient surtout du fait qu'aux doses utilisées dans le paludisme, la méfloquine peut provoquer certains effets indésirables invalidants qui peuvent survenir bien après la prise du médicament et être difficilement réversibles. Parmi ces effets indésirables, on note des effets cardio-dépresseurs ([Jaeger et al., 1987](#)). De même, des douleurs abdominales et des vertiges sont reportés ([Sowunmi et al., 1990](#)), ainsi que des démangeaisons ([Hoebe, de Munter, et Thijs, 1997](#)). Par ailleurs, même lorsqu'elle est administrée en co-traitement avec l'artésunate, 90% des personnes traitées subissent des effets indésirables en essais cliniques : vomissements, maux de tête ou diarrhées ([Keiser et al., 2014](#)).

Cela dit, les effets non désirés de la méfloquine les plus connus sont ceux qui ont un impact sur l'humeur et l'état mental. En effet, dans les années 1990, des cas de dépression ont commencé à être reportés après un traitement à la méfloquine ([Caillon, Schmitt, et Moron, 1992](#)). D'autres symptômes neurologiques semblent être induits par celle-ci, comme des cauchemars ou des troubles sensitifs ([Burke, 1993](#)), des hallucinations ou des psychoses ([Dietz et Frölich, 2002](#) ; [Wooltorton, 2002](#)). En France, un cas a été récemment médiatisé : celui du chanteur belge

Stromae (Fourny, 2017), pour qui la prise de méfloquine lors d'une tournée en Afrique a entraîné des désordres psychiques importants. D'autre part, chez la souris, un effet anxiogène de la méfloquine a été observé (Heshmati et al., 2016). Afin de palier à ces effets indésirables, d'autres approches thérapeutiques ont été développées, notamment des co-thérapies administrant de l'atovaquone avec du proguanil (deux antiparasitaires), en complément de doxycycline (antibiotique). Il est ici à noter que ces effets sont liés à l'utilisation actuelle de la méfloquine, c'est à dire à dose relativement forte.

3.1.3 Métabolisme de la méfloquine

La méfloquine est métabolisée dans le foie et excrétée principalement dans la bile et les selles (Karbwang et White, 1990). Elle est métabolisée par le complexe cytochrome P450, en particulier par l'enzyme CYP3A4, puis transformée carboxyméfloquine et dans une moindre mesure en hydroxyméfloquine (Fontaine et al., 2000) qui sont des métabolites inactifs contre le paludisme. Un rôle possible du CYP2E1 dans la métabolisation de la méfloquine a été identifié, mais non confirmé. D'autres études ont proposé une implication du CYP2B et du CYP2C dans le métabolisme de la méfloquine mais aucun de ces résultats n'a été confirmé en raison du manque d'inhibiteurs spécifiques de ces sous-familles (Fontaine et al., 2000).

La carboxyméfloquine est retrouvée dans le plasma 2 à 4 heures après l'administration d'une dose orale unique (Schwartz et al., 1982 ; Schwartz et al., 1980), d'une dose fractionnée (Franssen et al., 1989) et de doses multiples de méfloquine (Mimica et al., 1983). Les concentrations plasmatiques maximales, environ 50% plus élevées que celles de la méfloquine, sont atteintes deux semaines après administration. Par la suite, les concentrations plasmatiques du métabolite principal et de la méfloquine diminuent à un rythme similaire.

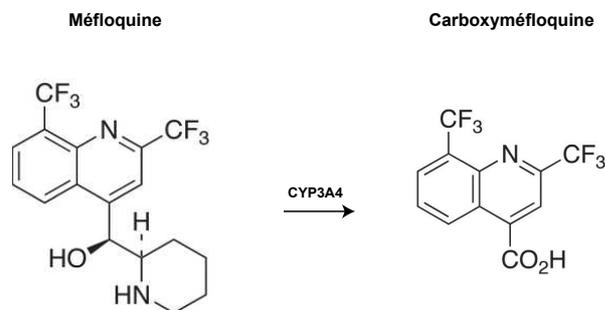


Figure 6. Métabolisme de la méfloquine.

3.2 Effets de la méfloquine dans le système nerveux

En dehors de son utilisation dans le traitement du paludisme pour ses effets schizonticides, la méfloquine a montré d'autres actions pharmacologiques. En effet, une étude de cas récente a montré que l'utilisation de méfloquine en co-traitement avec de la mirtazapine (un antidépresseur tétracyclique) pourrait permettre le traitement de la leucoencéphalopathie multifocale progressive démyélinisante induite par le SIDA chez un homme de 64 ans ([Hamaguchi et al., 2019](#)).

Chez l'animal, diverses interactions possibles de la méfloquine avec le système nerveux ont été reportées. Ainsi, certaines études ont mis en évidence le fait que la méfloquine était un inhibiteur potentiel de cholinestérase et qu'elle permettait l'augmentation d'acétylcholine au sein des synapses neuromusculaires ([McArdle et al., 2006](#)). D'autres travaux ont montré que cette activité anticholinestérasique permettait l'augmentation du relargage de GABA dans des neurones en culture ([Zhou, 2006](#)). Par ailleurs, certaines études ont mis en évidence l'action anti-nociceptive des inhibiteurs de cholinestérase ([Eldufani et Blaise, 2019](#)). Toutefois, cette action a été relevée pour des concentrations locales de méfloquine relativement élevées (à partir de 10 μM).

Une autre cible identifiée de la méfloquine serait à travers le blocage des jonctions communicantes (*cf.* section 4, [Letellier et al., en préparation](#)), et notamment les connexines, protéines importantes dans la formation de ces jonctions. Chez l'Homme, cette action a interrogé quant aux risques de fausse couche dans le cadre du traitement antipaludéen ([Nevin, 2011](#)), mais une récente méta-analyse indique que la méfloquine ne présente pas de risque durant la grossesse ([González et al., 2018](#)).

Chez l'animal, il a été montré que le blocage des connexines par la méfloquine pouvait affecter l'expression circadienne du gène PER2 ([Koo et al., 2015](#)), impliqué dans l'horloge biologique, et diminuer la durée du sommeil paradoxal après une co-thérapie avec l'amitriptyline (données Theranexus). D'autre part, cette action sur les connexines et les jonctions communicantes a aussi été proposée comment pouvant être anti-nociceptive ([Chen et al., 2018](#) ; [Ouachikh et al., 2018a](#)) et pouvant amplifier les effets de l'amitriptyline dans le traitement des douleurs neuropathiques ([Jeanson et al., 2016](#)), avec des doses de méfloquine bien plus faibles que celles utilisées contre le paludisme.

C'est cet effet de la méfloquine qui constitue le cœur de mon travail expérimental de thèse. La section suivante, sous la forme d'une revue, détaille les connaissances actuelles sur les protéines transmembranaires, que sont les connexines et les pannexines, et leur influence potentielle sur la douleur et son traitement.

4 Connexins and pannexins in pain models and treatment

Baptiste Letellier^{a,b}, Ipek Yalcin^a, Mathieu Charvériat^b, Michel Barrot^{a,*}

^a *Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France*

^b *Theranexus, F-69008 Lyon, France*

La méfloquine étant un bloqueur potentiel des connexines et des pannexines, il apparaissait essentiel de faire le point sur ce qui était connu de ces protéines dans la douleur. Une revue de la littérature a donc été réalisée et est présentée dans cette section.

4.1 Abstract

Connexins and pannexins are important transmembrane proteins involved in cell signaling and communication. Forming hemichannels and gap junctions, they contribute to the intercellular diffusion of ions and small molecules. In neurons and in glial cells, the expression and function of these proteins are dysregulated during pain induction and maintenance, in brain, spinal cord and dorsal root ganglia. Moreover, the modulation of gap junctions, or more directly of connexins or pannexins, can reduce painful symptoms in animal models. This review of the literature highlights studies addressing the implication of connexins and pannexins in animal models of pain, and the impact of treatments targeting these transmembrane proteins on pain symptoms.

4.2 Introduction

Chronic pain is a significant public health issue. For patients, chronic pain can be a burden affecting various aspects of life, from health to professional and social life. For the society, it has a high socio-economic cost, concerning not only healthcare but also work productivity and absenteeism. At some point in their life, 20 to 30% of the population is affected by chronic pain, with an estimated socio-economic cost in the USA superior to cardiovascular conditions, cancer or diabetes (Gaskin and Richard, 2012). Unfortunately, the therapeutic solutions offered to chronic pain patients are endowed with limited efficacy and frequent adverse effects (Bialas et al., 2019; Dale and Stacey, 2016; Stein and Kopf, 2019). Moreover, therapeutic progress remains slow and limited, highlighting the necessity for scientific progress in our understanding of pain and in developing new therapeutic strategies.

Over the past twenty years, studies have shown that the neurological processes contributing to the development and maintenance of various types of chronic pain involve inflammatory and plasticity phenomena; and some of these studies suggested an involvement of the transmembrane proteins that constitute the gap junctions, in particular connexins. Accordingly, modulating connexin function could also contribute to pain relief (Jeanson et al., 2016; Lee-Kubli et al., 2016a; Willebrords et al., 2017; Xu et al., 2014). This review is covering the studies that have addressed the involvement of transmembrane proteins, connexins but also their analogs pannexins, in pain processing and in pain relief.

Firstly described in the 1970s, connexins are the major component of gap junctions, which are transmembrane protein complexes expressed in a wide variety of tissues in chordates (Okamura et al., 2005; Sasakura et al., 2003), such as the liver (Goodenough, 1974), the heart (Lambiase and Tinker, 2015) or the nervous system (Willebrords et al., 2017). Now mostly denominated according to their molecular weight (in kDa), connexins include four transmembrane domains and can group to form sets of six connexins (same or different) named *connexon* (Laird and Lampe, 2018) (Figure 7). At this stage, a connexon can form a hemichannel, a pore allowing the passive diffusion of small molecules (less than 1 kDa) such as ATP, glutamate, D-serine and NAD⁺ and ions, including potassium and calcium (Sáez et al., 2005; Wang et al., 2013). Those hemichannels are physiologically preferentially closed, but can open depending on calcium concentration (Decrock et al., 2011), and their width is also sensitive to membrane potential and to post-translational modifications such as phosphorylation (Hervé and Derangeon, 2013).

Phosphorylation of connexins can have a significant role in their trafficking and can also interfere with the interactions that connexins may have with other proteins, such as calmodulin

or P2X7 purinergic receptors for connexin 43 (Cx43) (Hervé et al., 2012). Depending on the involved phosphorylation pathway, the impact on connexin hemichannel function may be slight or significant, although connexin phosphorylation tends to inhibit hemichannel opening (Johnstone et al., 2012).

Connexons from different cells can also associate to form a gap junction (Laird and Lampe, 2018). In the nervous system, electrophysiological communication between cells occurs through chemical synapses and the release of transmitters induced by electrical activity, or through electrical synapses composed of gap junctions. Numerous connexins are expressed in the nervous system and are generally not specific to a cellular type. While the main neuronal connexin is connexin 36 (Cx36), connexin 32 (Cx32) is expressed by neurons, oligodendrocytes and microglia; astrocytes mainly express connexin 43 (Cx43), connexin 30 (Cx30) and to a lesser extent connexin 26 (Cx26) (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). Connexins participate in communication between cells of the nervous system by forming neuron-neuron, neuron-glia, or glia-glia gap junctions (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). Hence, gap junction-coupled neurons contribute to synchronization activity and form a dynamic network within the nervous system. Connexins play an essential role in sleep (Charvériat et al., 2017; Clasadonte et al., 2017) and in the maintenance of brain activity (Dere and Zlomuzica, 2012), and may therefore be involved in pathologies when dysregulation of such coupling occur (Hansson and Skiöldebrand, 2015; Xing et al., 2019); they have been considered as new therapeutic targets in various neurological indications (Charvériat et al., 2017; Duchêne et al., 2016; Jeanson et al., 2016; Sauvet et al., 2019).

Pannexins have a different gene sequence than connexins but have a similar secondary and tertiary structure, and they also share properties with innexins, which are transmembrane proteins that constitute gap junctions in invertebrates (Baranova et al., 2004; Bruzzone et al., 2003; Phelan and Starich, 2001). While it is commonly accepted that pannexins cannot form gap junctions (Sosinsky et al., 2011), they form channels that can diffuse ATP (Iglesias et al., 2009) and ions that are preferentially negative (Ma et al., 2012; Nielsen et al., 2019), and their activity is sensitive to several stimuli such as potassium or calcium buffering (Chiu et al., 2017).

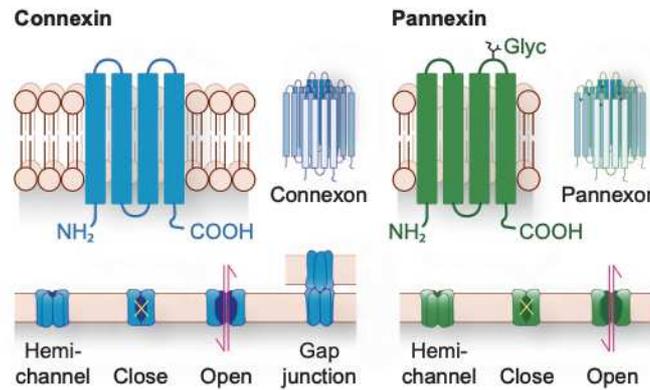


Figure 7. Connexins and pannexins are transmembrane proteins sharing similar properties.

Connexins have four transmembrane domains, two extracellular loops and one intracellular loop, and intracellular N- and C-terminal extremities. The assembly of six connexins constitutes a connexon, which forms a hemichannel allowing the passage of molecules below 1 kDa when opened. Connexons from different cells can be associated to form structures called gap junctions. Pannexins share similar conformations with connexins but present a glycosylation site on one of the two extracellular loops. A pannexon forms a hemichannel notably allowing the exchange of ATP.

4.3 Connexins in inflammatory pain

Inflammation is a biological response of the body tissues to harmful stimuli. It involves an activation of the immune system, manifests in various ways, such as redness, heat and swelling, and is frequently associated with pain, including both hyperalgesia and allodynia. In experimental models of inflammatory pain, the expression of connexins can be impacted, in particular Cx43, potentially in relation with actors of the inflammatory signaling pathways (**Table 5**).

4.3.1 Connexins in trigeminal inflammation

The trigeminal system is composed of i) the trigeminal nerve, which is divided in ophthalmic, maxillary and mandibular nerves, ii) the trigeminal ganglion, which is the equivalent of dorsal root ganglia for spinal cord, and iii) trigeminal nuclei, which are located in the pons. This ensemble controls sensory and motor functions of the innervated parts of the face. An inflammation affecting trigeminal areas can lead to a change in connexin expression. Indeed, the injection of capsaicin or of complete Freund adjuvant (CFA) into the temporomandibular joint leads to increased expression of connexins 26, 36 and 40, but not Cx43, in the trigeminal ganglion ([Garrett and Durham, 2008](#)). An increase in Cx43 levels was however found in a trigeminal nucleus following CFA injection in the masseter muscle ([Guo et al., 2007](#)). CFA

injection in the dental pulp of the upper second molar also increased the co-labeling of Cx43 and of the glial fibrillary acidic protein (GFAP), in the satellite glial cells of the trigeminal ganglion (Komiya et al., 2018). In addition, the neuron-glia coupling in dissociated cell culture prepared from the trigeminal ganglion was strongly enhanced following systemic lipopolysaccharide (LPS) injection, which was suppressed by applying a broad blocker of gap junctions (carbenoxolone) to the cell culture (Spray et al., 2019).

Together, these data indicate that inflammatory conditions in the trigeminal system can increase the expression of some connexins. Such increase could explain the increase in neuron-glia coupling, and thus contribute to trigeminal pain by changing the ionic balance that promotes neuronal excitability.

4.3.2 Connexins in other models

Connexins have been studied in animal models of inflammation using CFA, formalin (Fischer, 1905) or carrageenan (Benitz and Hall, 1959).

After an injection of formalin into the hindpaw of the rat, an increase in the coupling of the gap junctions between oligodendrocytic Cx32 and astrocytic Cx43 was shown at the lumbar level of the spinal cord compared to control animals (Qin et al., 2006). In this study, intrathecal administration of fluorocitrate (a blocker of astrocyte metabolism) or of the gap junction blocker carbenoxolone increased paw withdrawal latency to heat after formalin injection, which showed an impact of glial cells and connexins in the relief of formalin-induced pain. On the other hand, an unilateral intraplantar injection of carrageenan in rats led to the rapid development of an ipsilateral mechanical hypersensitivity, which became bilateral within 5 days and lasted up to 10 days in rats (Choi et al., 2017). In this condition, Cx43 and GFAP expressions were increased compared to sham animals in the dorsal horn of the spinal cord, 5 days and 10 days after injection, an effect antagonized by the interleukine 1 β (IL-1 β). In the same model, the blockade of gap junctions by carbenoxolone or by Gap26 (a Cx43 blocking peptide) suppressed the contralateral increase in D-serine in the lumbar spinal cord during the late phase of inflammation (Choi et al., 2018), further involving astrocyte signaling and connexins in the spinal treatment of inflammatory pain.

Connexins can also be modulated by other types of inflammation, independently of the localization of the inflammation. As example, in a model of cyclophosphamide-induced bladder inflammation (cystitis) in mice, Cx43 RNA levels in the bladder were increased 6 hours after treatment and protein levels at 24 hours after treatment (Okinami et al., 2014).

This influence of inflammation can also be found in *ex vivo* culture experiments. Indeed, an introduction of LPS in a culture of enteric glial cells from mice chronically treated with morphine (at doses from 1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased Cx43 mRNA levels, concomitantly with an increase in extracellular levels of ATP that could be reduced by carbenoxolone application (Bhave et al., 2017). In this study, increases in mRNAs of P2X4 and P2X7 purinergic receptors and in IL6 and IL-1 β interleukins suggested that inflammation in this model may be supported by these actors. In addition, the activation of purinergic receptors by ATP in the enteric glia has been shown to be responsible for an increase in intracellular calcium mediated by Cx43 and nitric oxide (NO), resulting in cell death of enteric neurons (Brown et al., 2016; Delvalle et al., 2018). Interestingly, when human keratinocytes in culture are removed from their environment and exposed to air, this cellular stress induces a release of ATP and an increase in hemichannel activity, as shown by an increase in the recapture of yellow lucifer dye (Barr et al., 2013). This release of ATP was shown to be concomitant with an increase in Cx43 RNA levels, and treatment of the culture with carbenoxolone reduced this ATP release. These various data from cell culture experiments illustrate the modulation of Cx43 by inflammatory or stress factors, and highlight a reciprocal interaction between ATP signaling and connexin-mediated cell coupling in an inflammatory context

Links between inflammatory signaling, changes in connexin expression and pain have also been evidenced in cancer-related pain models. Indeed, in a rat model of bone cancer, an inoculation of cancerous cells in the tibia caused a mechanical hypersensitivity which was accompanied by an increase in the phosphorylated form of Cx43 as well as in chemokine CXCL12 in the dorsal horn of the spinal cord (Hang et al., 2016), and both increases were suppressed by the selective Cx43 blocker Gap26. In a model where cancer cells were administered in the femur of mice, authors found an increase in a marker of astrocytes (GFAP) and in Cx43 levels. However, at the same time, this model displayed a decrease in the phosphorylated form of Cx43, and treatment with the Cx43 blocker Gap26 reduced mechanical hypersensitivity without changing the total Cx43/phosphorylated Cx43 ratio (Li et al., 2017). In the same model, spontaneous pain and mechanical hypersensitivity were accompanied with an increase in GFAP and Cx43 levels in spinal astrocytes, where co-localization with the phosphorylated form of the NR2B NMDA receptor subunit was shown (Yang et al., 2018). In this case, carbenoxolone treatment decreased the expression of GFAP, Cx43 and the NMDA subunit, as well as painful symptoms. Furthermore, in a mouse model of cancer-induced bone pain, chronic carbenoxolone delayed movement-evoked and on-going pain (Falk, 2018), leading to propose it for cancer pain therapy. Beyond pain, connexins have been recently suggested to

more broadly serve as potential biomarkers for cancer prognosis and as therapeutic targets for intervening on metastasis and chemoresistance (Aasen et al., 2019; Wu and Wang, 2019).

Models of inflammatory pain (localization)	Spinal cord 	DRG 	Periphery 
Trigeminal inflammation			
<u>Capsaicin</u> or CFA, (temporomandibular joint)		↑Cx26 ↑Cx36 ↑Cx40 (protein) Trigeminal ganglion Garrett and Durham, 2008	
<u>CFA</u> (masseter muscle)	↑Cx43 (protein) Trigeminal nucleus Guo et al., 2007		
<u>CFA</u> (dental pulp)		↑Cx43 (protein) Trigeminal ganglion Komiya et al., 2018	
Peripheral inflammation			
<u>Formalin</u> , (hind paw)	↑Cx43-Cx32 coupling Qin et al., 2006		
<u>Carrageenan</u> , (intraplantar)	↑Cx43 (protein) Choi et al., 2017		
<u>Cyclophosphamide</u> , (bladder)			↑Cx43 (mRNA) Okinami et al., 2014
Cell culture			
<u>Lipopolysaccharide (LPS)</u>		↑neuron-glia coupling Trigeminal ganglion dissociated cells Spray et al., 2019	↑Cx43 (mRNA) Enteric glial cells Bhave et al., 2017
<u>TNF-α</u> or IFN- γ	↓Cx43 (mRNA), ↓dye coupling Spinal astrocytes Zhang et al., 2013		
<u>TNF-α</u>			↓Cx46 (protein) Schwann cells Chandross et al., 1996
<u>Air exposure</u>			↑Cx43 (mRNA), ↑HC activity Keratinocytes Barr et al., 2013

Table 5. Changes in connexin expression and function in in vitro or in vivo models of inflammatory pain.

Cx: connexin; CFA: complete Freund adjuvant; DRG: dorsal root ganglia; HC: hemichannel; IFN- γ : interferon γ ; TNF- α : tumor necrosis factor α .

4.4 Connexins in neuropathic pain

Neuropathic pain arises as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system. It can thus be consecutive to nerve injuries (such as nerve sections or compression), metabolic diseases (such as diabetes), infectious diseases (as for post-herpetic neuralgia), and to exposure to neurotoxic compounds (such as chemotherapy drugs). In neuropathic pain models, connexins can be dysregulated at various levels in the somatosensory system, and their modulation can impact neuropathic pain symptoms (**Table 6**).

4.4.1 Cx43 in the model of sciatic nerve chronic constriction injury (CCI)

The CCI surgery consists in surrounding the main branch of the sciatic nerve by “loosely tied” ligatures ([Bennett and Xie, 1988](#)). In this model, the induction of nociceptive symptoms is accompanied by an increase in Cx43 levels. Indeed, in rats, there are increased levels of Cx43 protein (but not necessarily mRNA) in the sciatic nerve and in the related dorsal root ganglia on the 12th day post-surgery ([Neumann et al., 2015](#)). In the spinal cord, such increase can already be detected 3 days after surgery, but is no more present 20 days later ([Wu et al., 2011](#)). However, the phosphorylated form of Cx43 remains high in the spinal cord over this 3-week period, concomitantly with a gradual decrease in ATP-sensitive potassium channels ([Wu et al., 2011](#)). Intrathecal delivery of an ATP-sensitive potassium channel opener (cromakalim) transiently alleviates thermal and mechanical hypersensitivity, and antagonizes the increase in Cx43 phosphorylation ([Wu et al., 2011](#)).

In CCI mice, levels of Cx43 also increase in the spinal cord, concomitantly with GFAP ([Chen et al., 2014](#); [Tonkin et al., 2018](#)). This increase concerns both male and female mice ([Chen et al., 2018](#)) lasts over 3 weeks post-surgery ([Chen et al., 2014](#)). In primary cultures of astrocytes, TNF α treatment increased Cx43 levels (Western blot), hemichannel activity (dye coupling) and induced the release of the chemokine CXCL1. This release was reversed in the astrocyte culture by the gap junction pharmacological blocker carbenoxolone, by selective peptidic Cx43 blockers (Gap27 and Gap26) and by Cx43-siRNA ([Chen et al., 2014](#)), suggesting potential interactions between Cx43 and inflammatory processes that may also occur in neuropathic pain. Accordingly, the intrathecal delivery of the Cx43 mimetic Peptide5, which inhibits Cx43 hemichannel function by interfering with one of its extracellular loop ([Kim et al., 2017](#)), decreased CCI-induced mechanical hypersensitivity, Cx43 over-expression, spinal glial activation, ATP release, as well as inflammasome protein levels, 8 hours after injection ([Tonkin et al., 2018](#)). Similarly, the intrathecal delivery of carbenoxolone or of peptidic Cx43 blockers (Gap27 and Gap26) also

restored sensitivity thresholds in CCI mice (Chen et al., 2014), further confirming the interest of targeting Cx43 to reduce symptoms in pain induced by nerve constriction.

4.4.2 Cx43 in spinal nerve ligation (SNL) models

The SNL model is based on a ligation of the L5 and L6 spinal nerve (Kim and Chung, 1992). In the rat SNL, an increase in GFAP immunoreactivity is observed ipsilaterally in the spinal cord dorsal horn, at post-injury days 1, 3, 7 (Wang and Sun, 2017) and 14 (Wang and Sun, 2017; Xu et al., 2014), but data are yet inconsistent concerning Cx43 levels. Indeed, one study reported that the expression of Cx43 as well as its hemichannel activity increased 7 days after surgery (Wang et Sun, 2017), while another study reported a bilateral decrease compared to sham animals (Xu et al., 2014). Nevertheless, decreasing Cx43 levels by long-term intrathecal delivery of a carbon monoxide (CO)-releasing molecule (CORM-2) partially inhibited mechanical and thermal hypersensitivity (Wang and Sun, 2017). Moreover, a more direct inhibition of Cx43 expression by the intrathecal delivery of an anti-Cx43 siRNA in SNL rats also decreased ipsilateral Cx43 protein levels in the dorsal horn of the spinal cord, and reduced mechanical hypersensitivity (Xu et al., 2014). In this model, inflammatory processes may contribute to Cx43 regulation. Indeed, protein expression of chemokine CXCL12 and of its receptor CXCR4 were upregulated in the spinal cord after SNL (Liu et al., 2019), and the intrathecal delivery of a CXCR4 antagonist decreased Cx43 mRNA levels and transiently and partially alleviated thermal and mechanical hypersensitivity.

In this model, while it is clearly established that blocking of Cx43 reduces painful symptoms, further studies would be required to clarify Cx43 expression changes and whether these changes may evolve over time.

4.4.3 Cx43 in models of spinal cord injury (SCI)

In female rats at 4 weeks after T3 transection, Cx43 expression was increased in C6-C8 cervical dorsal horn, together with glial and plasticity markers, such as GFAP or Iba1 (Lee-Kubli et al., 2016). Beyond the spinal cord, Cx43 and GFAP expression also increased in the satellite glial cells of the corresponding dorsal root ganglia. In this model, carbenoxolone, or the Gap26 and Gap27, selective Cx43 peptidic blockers, decreased transiently the tactile hypersensitivity. Moreover, early intraperitoneal treatment at surgery time with Peptide5, reduced the volume of spinal cord lesion, together with a reduction in GFAP, Iba1 and Cx43 immunolabelling (but an increase in phosphorylated Cx43) (Mao et al., 2016; Mao et al., 2017).

In female mice, the transgenic deletion of Cx43 and Cx30 prevented the increase in levels of GFAP and Iba1 and the development of nociceptive symptoms after T11 spinal cord injury (Chen et al., 2012). Comparably, in male mice, a T11-12 hemisection increased GFAP and Cx43 levels in the lumbar dorsal horn from 7 to 28 days after injury; and fluorocitrate (blocker of astrocyte metabolism), carbenoxolone, and Gap26, all transiently reduced SCI-induced mechanical hypersensitivity (Choi et al., 2016).

4.4.4 Cx43 in trigeminal neuropathic pain models

In the rat model of orofacial pain induced by infraorbital nerve constriction (CCI-ION), Cx43 expression, together with GFAP expression, has been shown to increase in satellite glial cells after surgery (Vit et al., 2006; Ohara et al., 2008). In these rats, blocking the function of Cx43 by RNA interference in trigeminal nuclei reduced eye blinking, a measure of spontaneous nociceptive behavior, as well as mechanical hypersensitivity as measured by von Frey filaments (Ohara et al., 2008; Jasmin et al., 2010).

After inferior alveolar nerve transection, Cx43 expression also increased in satellite glial cells; and its reduction by Gap27 reduced mechanical hypersensitivity (Kaji et al., 2016).

4.4.5 Cx43 in other models

In most models, Cx43 has been reported to be upregulated in nociceptive pathways after injury. After perineural horizontal incision of the sciatic nerve in rats, such increase has been observed in the sciatic nerve itself (Ohta et al., 2005). In the model of spared nerve injury (SNI), which consists in ligaturing tightly two of the three branches of the sciatic nerve, before doing a distal axotomy of these two branches (Decosterd and Woolf, 2000; Shields et al., 2003), Cx43 levels were upregulated in the spinal cord (Zhou et al., 2017). In this model, the expression of the K⁺ channel TRESK (*kcnk18*) by intrathecal viral-mediated gene transfer partially prevented the increase in Cx43, as well as in GFAP and Iba1, and decreased mechanical hypersensitivity. In a rat model of oxaliplatin chemotherapy-induced neuropathic pain, Cx43 levels also increased in the spinal cord (Yoon et al., 2013), and a repeated treatment with intrathecal carbenoxolone prevented the development of mechanical hypersensitivity, as well as the increase in GFAP protein levels.

Reported findings however differed in the partial sciatic nerve ligation (PSNL) model in the mouse. This model is obtained by partially ligaturing the main branch of the sciatic nerve after passing a silk thread through the nerve and tightening it to 1/3 to 1/2 of the nerve diameter (Seltzer, Dubner, and Shir, 1990). In this model, Cx43 expression has been reported to decrease

after surgery; and up-regulating its expression by a viral-mediated gene transfer partially alleviated mechanical hypersensitivity (Morioka et al., 2015). Furthermore, an anti-TNF α treatment (lycopene) partially reversed PSNL-induced Cx43 protein down-regulation in mice, as well as mechanical hypersensitivity; likewise lycopene also reversed the TNF α -induced Cx43 protein under-expression in rat spinal astrocytes culture, without affecting Cx43 mRNA levels (Zhang et al., 2016). In line with these findings, the L5-L6 intrathecal inhibition of Cx43 by siRNA injection in naïve animals was reported to be sufficient to induce mechanical hypersensitivity (Morioka et al., 2015; Morioka et al., 2018). Moreover, blocking the Cx43 expression by Cx43-siRNA increased pronociceptive interleukin-6 (IL-6) as well as cyclooxygenase-2 (COX-2) protein levels in rat spinal astrocytes culture (Morioka et al., 2018).

Taken together, these results indicate that Cx43 and inflammatory processes in neuropathic pain may influence each other. Moreover, results of Cx43 manipulation in naïve animals are supportive of observations also done in a trigeminal-related study (Vit et al., 2006), suggesting that Cx43 influence on nociception may vary depending on the presence or no of a pain state.

4.4.6 Other connexins in neuropathic pain models

Besides Cx43, the other most studied connexin in models of neuropathic pain has been Cx36. Cx36 immunolabelling has been reported as increased in the spinal cord following SNI in rats (Zhou et al., 2017). Similarly, after CCI, levels of Cx36 were upregulated in the anterior cingulate cortex; and a downregulation by preventive siRNA injections blocked the development of mechanical hypersensitivity (Chen et al., 2016a). In the same study, gap junction inhibition by repeated intracerebroventricular microinjections of mefloquine or of carbenoxolone decreased SNI-induced mechanical and thermal hypersensitivity, and intraperitoneal treatment with mefloquine delayed the development of mechanical hypersensitivity. After CCI-ION in rats, an increase in Cx36 has also been observed, mainly in GABAergic neurons in several laminae of the medullary dorsal horn; and mefloquine treatment was shown to decrease mechanical allodynia (Ouachikh et al., 2018b).

Contrary to the above results, Cx36 levels were reported to be decreased in the spinal dorsal horn in the PSNL mouse model (Nakamura et al., 2015), similar to data of the same research group concerning Cx43 (Morioka et al., 2015). They also showed, in naïve mice, that Cx36 siRNA injections were sufficient to induce a mechanical hypersensitivity (Nakamura et al., 2015). Along with these observations, Cx36 mRNA levels were decreased in rat L4 dorsal root ganglia after sural spared nerve injury (Pérez Armendariz et al., 2018).

Apart from Cx43 and Cx36, few studies have explored other connexins in pain models. In a rat model of nerve lesion (crush injury), an increase in the level of expression of Cx37 mRNAs in the sciatic nerve accompanied thermal hypersensitivity. However, this change did not occur in the spinal cord (Lin et al., 2002).

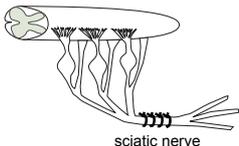
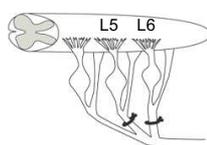
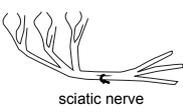
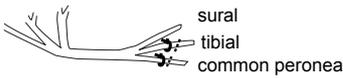
Models of neuropathic pain	Brain	Spinal Cord	DRG	Nerve
CCI, nerve chronic constriction injury Bennett and Xie, 1988 	↑Cx36 (protein, ACC) Chen et al., 2016	↑Cx43 (protein) Wu et al., 2011, Chen et al., 2014, Tonkin et al., 2014	---- ↑Cx43 (protein) ---- DRG and Nerve Neumann et al., 2015	
CCI-infraorbital nerve		↑Cx36 (protein) Ouachikh et al., 2018	↑Cx43 (protein) Vit et al., 2006, Ohara et al., 2008	
SNL, spinal nerve ligation Ho Kim and Mo Chung, 1992 		↑Cx43 (protein), ↑HC activity, d7 Wang and Sun, 2017 ↓Cx43 (protein), d14 Xu et al., 2014	↑Panx1 (mRNA) Zhang et al., 2015	
PSNL, partial sciatic nerve ligation Seltzer et al., 1990 		↓Cx43 (protein) Morioka et al., 2015 ↓Cx36 (protein) Nakamura et al., 2015		
SNI, spared nerve injury Decosterd and Woolf, 2000 Shields et al., 2003 		↑Cx43, ↑Cx36 (protein) Zhou et al., 2017	↓Cx36 (mRNA) Pérez Armendariz et al., 2018	
SCI, spinal cord injury 		---- ↑Cx43 (protein, T3) ---- Spinal cord and DRG Lee-Kubli et al., 2016 ↑Cx43 (protein, T11-12) Choi et al., 2016		
Oxaliplatin-induced neuropathy 		↑Cx43 (protein) Yoon et al., 2013		
Inferior alveolar nerve transection			↑Cx43 (protein) Kuji et al., 2016	
Perineural nerve incision				↑Cx43 (protein) Ohta et al., 2005 ↑Cx37 (mRNA) Lin et al., 2002

Table 6. Changes in connexin and pannexin expression and function in in vivo models of neuropathic pain.

ACC: anterior cingulate cortex; Cx: connexin; d: day; DRG: dorsal root ganglia; HC: hemichannel; Panx: pannexin.

4.5 Pannexins and pain

Pannexins are transmembrane proteins that share secondary and tertiary homologies with connexins in vertebrates and therefore contribute to the formation of transmembrane channels that allow the diffusion of small molecules between the intracellular and the extracellular space. As for now, there is controversy about the ability of pannexins to form cell-cell junctions, although it has been seldomly reported (Ishikawa et al., 2011; Tang et al., 2008). Three pannexins (Panx) have been identified, Panx1, Panx2 and Panx3, but data involving pannexins in pain is currently limited to Panx1, which is expressed from the early stages of embryonic development within the central and peripheral nervous system (Raslan et al., 2016). Panx1 contributes to ATP and glutamate release and is an important contributor to calcium signaling via interactions with neuronal NMDA receptors and glial P2X7 receptors (Bravo et al., 2015). Also, Panx1 is regulated by ATP, which can induce its internalization (Boyce et al., 2015). Morphine is a pain treatment whose cessation causes a withdrawal syndrome. It has been shown that symptoms of withdrawal are accompanied by the release of ATP by microglia and that the activation of Panx1 was necessary for this release (Burma et al., 2017). Furthermore, blocking Panx1 by using either the 10Panx mimetic peptide, probenecid or mefloquine reduced the morphine withdrawal scores and thus led to propose Panx1 as a potential therapeutic target to treat morphine withdrawal (Burma et al., 2017).

In animal models of pain, pannexins' expression is dysregulated and contributes to the pathophysiology of pain. Indeed, in the SNL rat model, Panx1 mRNA levels increased after surgery in the dorsal root ganglia (but not in the spinal cord) (Zhang et al., 2015), and the intrathecal administration of 10Panx or of carbenoxolone transiently relieved mechanical hypersensitivity in a dose-dependent manner. Similarly, in the model of rat sural nerve transection, a modified model inspired by the SNI, the intrathecal treatment of 10Panx partially blocked the injury-induced decrease in C-reflex (a measure of leg muscle response, evoked by electrical stimulation of tibial and peroneal nerves), and provided a temporary relief of mechanical hypersensitivity in a dose-dependent manner (Bravo et al., 2014). In this study, carbenoxolone and probenecid, which also blocks Panx1, had similar effects on mechanical sensitivity relief. Interestingly, genetic manipulation of pannexins in animals can also affect nociceptive manifestations. Indeed, a global deletion of Panx1 prevented the development of mechanical hypersensitivity in a mouse model of orofacial CFA injection (Hanstein et al., 2016). Moreover, the targeted deletion of Panx1 in GFAP-positive cells completely prevented the development of mechanical hypersensitivity after CFA administration, whereas the targeted

deletion of Panx1 in neurons partially decreased it and accelerated the recovery ([Hanstein et al., 2016](#)).

In a model of chemotherapy-induced neuropathic pain, the mechanical hypersensitivity and thermal hypersensitivity induced by repeated oxaliplatin treatment were dose-dependently suppressed by the intrathecal administration of 10Panx ([Di Cesare Mannelli et al., 2015](#)). In this study, oxaliplatin increased glutamate release induced by P2X7 receptor activation in synaptosome preparations; and this increase was blocked by treatment with P2X7 receptor inhibitors or with Panx1 blockers (carbenoxolone, erioglaucine and 10Panx), corroborating the implication of Panx1/P2X7 interactions in this model. Such interaction has been shown both in rats and mice, as illustrated by pharmacological or genetic manipulation of the P2X7-Panx1 complex which modified cortical depolarization properties as well as the expression of inflammatory markers such as the calcitonin gene-related peptide (CGRP) and IL-1 β ([Chen et al., 2017](#)).

Similarly to Cx43, Panx1 appears to also be involved in inflammatory processes. Indeed, histamine, an inflammatory mediator, increases calcium release in cultured fibroblasts and ATP release, which is mediated by Panx1 hemichannels ([Pinheiro et al., 2013](#)). Also, the application of the proinflammatory fibroblast growth factor FGF-1 modulates calcium release and promoted the release of ATP, which activated P2X7 receptors, the opening of Panx1 hemichannels and of Cx43 hemichannels, further increasing ATP release in rat spinal astrocytes culture ([Garre et al., 2016](#)). Although this study did not determine the involvement of Panx1 or Cx43 in pain, it did support mechanistic interactions between these two proteins during inflammatory phenomena in the spinal cord.

Première partie – Introduction

Treatment	Function	Model	Route	Modifications	Symptoms	Source
Carbenoxolone	Gap junction blocker	SCI	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Lee-Kubli et al., 2016
					↓ mechanical hypersensitivity	Choi et al., 2016
		SNI	i.c.v.		↓ thermal and mechanical hypersensitivity	Chen et al., 2016
		SNL	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Zhang et al., 2015
		Sural nerve transection	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Bravo et al., 2014
		CIPN	i.t.	No GFAP increase	No hypersensitive symptom	Yoon et al., 2013
		Cancer-induced bone pain	i.p.	↓ glutamate release	↑ limb use and weight bearing scores	Falk, 2018
		Formalin	i.t.		↓ thermal hypersensitivity	Qin et al., 2006
		Carrageenan	i.t.	No increase of spinal D-serine		Choi et al., 2018
		Cell culture with LPS	Application	↓ Cx43	Suppressed neuron-glia coupling	Bhave et al., 2017
Cell culture exposed to air	Application		↓ ATP release	Barr et al., 2013		
Cell culture	Application		↓ CXCL1 release	Chen et al., 2014		
Mefloquine	Gap junction blocker	SNI	i.c.v.		↓ thermal and mechanical hypersensitivity	Chen et al., 2016
		CCI	i.p.	↓ Cx43 HC activity	enhanced chronic amitriptyline anti-hyperalgesic-like effect	Jeanson et al., 2016
		CCI-ION	Intracisternal		↓ mechanical hypersensitivity	Ouachikh et al., 2018
Gap26	Cx43 blocker	SCI	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Lee-Kubli et al., 2016
					↓ mechanical hypersensitivity	Choi et al., 2016
		Cancer pain	i.t.	↓ Cx43 phosphorylation and CXCL12 expression		Hang et al., 2016
		Carrageenan	i.t.	No increase of D-serine in spinal cord	↓ mechanical hypersensitivity	Li et al., 2017
Cell culture	Application		↓ CXCL1 release	Choi et al., 2018		
				Chen et al., 2014		
Gap27	Cx43 blocker	SCI	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Lee-Kubli et al., 2016
		CIBP	i.t.		↑ limb use and weight bearing scores	Falk, 2018
		Inferior alveolar nerve transection	Trigeminal canulation		↓ mechanical hypersensitivity	Kaji et al., 2016
		Cell culture	Application		↓ CXCL1 release	Chen et al., 2014
Peptide5	Cx43 blocker	CCI	i.t.	↓ Cx43 overexpression, ↓ glial activation, ↓ ATP release, ↓ inflammasome proteins	↓ mechanical hypersensitivity	Tonkin et al., 2018
		SCI	i.p.	↓ Cx43, ↓ spinal cord lesion volume, ↓ GFAP, ↓ Iba1, ↑ phosphorylated Cx43	↑ Basso-Beattie-Bresnahan score	Mao et al., 2016, Mao et al., 2017

10Panx	Panx1-mimetic peptide	SNL	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Zhang et al., 2015
		Sural nerve transection	i.t.	↓ C-reflex	↓ mechanical hypersensitivity	Bravo et al., 2014
		CIPN	i.t.	↓ glutamate release	↓ thermal and mechanical hypersensitivity	Di Cesare Mannelli et al., 2015
Probenecid	Panx1 inhibitor	Sural nerve transection	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Bravo et al., 2014
Erioglaucine	Panx1 antagonist	CIPN	i.t.	↓ glutamate release	↓ thermal and mechanical hypersensitivity	Di Cesare Mannelli et al., 2015
P2X7 receptor inhibitors (BBG and A-438079)		CIPN	i.t.	↓ glutamate release	↓ thermal and mechanical hypersensitivity	Di Cesare Mannelli et al., 2015
RNA interference against Cx43		SNL	i.t.	↓ Cx43	↓ mechanical hypersensitivity	Xu et al., 2014
		CCI-ION	Trigeminal canulation		↓ spontaneous nociceptive behaviour and mechanical hypersensitivity	Ohara et al., 2008, Jasmin et al., 2010
		Naive	Trigeminal canulation		↑ spontaneous nociceptive behaviour and mechanical hypersensitivity	Vit et al., 2006
		Naive	i.t.		↑ mechanical hypersensitivity	Morioka et al., 2015
		Naive	i.t.	↑ IL-6 and COX-2 (cell culture)	↑ mechanical hypersensitivity	Morioka et al., 2018
		Cell culture	Application	↓ CXCL1 release		Chen et al., 2014
RNA interference against Cx36		CCI	i.c.v.		No mechanical hypersensitivity	Chen et al., 2016
		Naive	i.t.		↑ mechanical hypersensitivity	Nakamura et al., 2015
Upregulation of Cx43 by gene transfer		PSNL	i.t.		↓ mechanical hypersensitivity	Morioka et al., 2015
Cx43-Cx36 transgenic Knock-Out		SCI		No GFAP and Iba1 increase	No hypersensitive symptom	Chen et al., 2012
Panx1 transgenic Knock-Out		CFA			Prevented mechanical hypersensitivity	Hanstein et al., 2016

Table 7. Impact of gap junction modulators, and connexin or pannexin modulators in pain models.

CCI: chronic constriction injury; CCI-ION: chronic constriction injury of the infraorbital nerve; CIBP: cancer-induced bone pain; CIPN: chemo-induced neuropathy; Cx: connexin; HC: hemichannel; i.c.v.: intracerebroventricular; i.p.: intraperitoneal; i.t.: intrathecal; LPS: lipopolysaccharide; SCI: spinal cord injury; SNI: spared nerve injury; SNL: spinal nerve ligation.

4.6 Discussion

It has been repeatedly shown in rodent models that pain affects the expression and function of connexins, in particular Cx43 (Table 5 and Table 6). Indeed, most studies published on the topic reported an increase in the expression of this connexin in nociceptive pathways, associated to the presence of thermal or mechanical hypersensitivity. This increase occurred in parts of the nociceptive pathways (dorsal root ganglia and/or spinal cord) that are associated to the injury/inflamed site in neuropathic pain or inflammatory pain models. Such increase in Cx43 expression would potentially promote the formation of gap junctions, and thus astrocyte communication. Beside changes in expression, the function of Cx43 hemichannels is also modulated in models of neuropathic or inflammatory pain. The modification of the ionic, electrical and molecular balance induced by connexin changes could therefore contribute to the onset or maintenance of pain, which is known to be associated with ectopic activity of spinal

neurons in the pathophysiology of neuropathic pain ([Inquimbert et al., 2012](#); [North, Lazaro, and Dougherty, 2018](#)).

Some studies, however, reported a decrease in connexin expression in two *in vivo* models of neuropathic pain and in one model of inflammation in cell culture. Two studies from the same research team showed a decrease in Cx43 ([Morioka et al., 2015](#)) and in Cx36 ([Nakamura et al., 2015](#)) in the PSNL model of neuropathic pain. Those findings, which differ from the other reports in neuropathic pain models, may reflect a model specificity and would thus require independent confirmation. In addition, potential contradictory data concerning Cx43 were also reported in the SNL model ([Xu et al., 2014](#); [Wang and Sun, 2017](#)), but the assessment of Cx43 expression was not done at the same time point after surgery in these two studies, which could suggest that the expression pattern of Cx43 may vary during the course of neuropathic pain in this model.

While a large part of the studies was conducted in models of neuropathic pain, it appears that Cx43 expression and its hemichannel function are also sensitive to inflammatory mediators, such as chemokines, leading to pain expression in mice and rats. Cx43 changes have also been related to changes in calcium, ATP, glutamate and D-serine glial signaling pathways. Some authors also explored the changes in the phosphorylated and non-phosphorylated forms of Cx43. The ratio between the expressions of both forms seems to vary in pain models over time and is also sensitive to selective Cx43 blockers such as Gap26 or Peptide5, or treatments acting on potassium currents such as cromakalim. However, understanding the mechanistic cascades linking these various molecular actors and their precise place in the pathophysiology of pain still require further investigations. Furthermore, while few studies mentioned other connexins in animal models of pain, it is questionable whether the main connexin involved in pain is the astrocytic Cx43 (and, for some studies, neuronal Cx36) only. Likely, research is yet to be conducted to study the involvement of other connexins in pain, including the mitochondrial ones, in particular in chemo-induced neuropathic pain in which cellular respiration might be disrupted ([Starobova et Vetter, 2017](#)).

The pharmacological and genetic approaches that targeted connexins in pain models aimed at suppressing/blocking the changes in connexin levels or function observed after pain induction. These treatments used gap junction blockers, such as carbenoxolone or mefloquine, or more specific peptidic Cx blockers such as Peptide5, Gap26 or Gap27, or interfering RNAs. These manipulations were however rarely systemic. Indeed, apart from cell culture studies, only three studies ([Falk, 2018](#); [Jeanson et al., 2016](#); [Mao et al., 2016](#); [Mao et al., 2017](#)) had a systemic (here, intraperitoneal) approach to treat animals. In all other studies (**Table 3**), treatments were

administered directly into the central nervous system, either intrathecally, intracisternally or through trigeminal cannulas. The pain-relieving outcome of these manipulations suggests that central connexins are likely critical in pain processing.

In addition, it has been shown in several studies that some neuropathic pain treatments can also have an impact on connexins, notably Cx43, whether on their expression or on gap junction or hemichannel function (for review, see [Charvériat et al., 2017](#)). Indeed, in cell culture models, the application of neuropathic pain first-line treatments, such as tricyclic antidepressants (amitriptyline, imipramine or clomipramine), can inhibit gap junction and hemichannel functions and increase connexin (protein or mRNA) expression depending on the dose used or the considered molecule. This action was also reported after the application of serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors such as duloxetine or venlafaxine, but not with the anticonvulsant drugs gabapentin and carbamazepine, which are also among recognized neuropathic pain treatments.

It is difficult to identify the role of a particular connexin when using general gap junction blockers. Indeed, most of these molecules have a significant number of targets, partly depending on the dose that was used. In the case of mefloquine, studies have for example reported an action of this drug on Cx36 ([Chen et al., 2016a](#); [Ouachikh et al., 2018b](#)) and Cx43 ([Cruikshank et al., 2004](#); [Jeanson, et al., 2016](#)), but also on Panx1 ([Iglesias et al., 2009](#)) and on other targets such as adenosine-related ones ([Gribble et al., 2000](#); [Milatovic et al., 2011](#)). The ongoing development of more selective inhibitors ([Picoli et al., 2019](#)) might offer new tools to test the role of specific transmembrane proteins. Moreover, despite the fact that most of the treatments used to block connexins, pannexins or gap junctions displayed significant efficacy against nociceptive symptoms (**Table 7**), few studies provided mechanistic insights concerning this action yet.

Beyond the observations of modifications caused by the induction of inflammatory or neuropathic pain, it is now crucial to understand the temporality and the actual role of transmembrane protein modifications in the pathogenesis of pain. Moreover, the therapeutic potential of targeting these proteins, including as adjuvant therapy ([Jeanson et al., 2016](#)), merits deeper preclinical assessment.

Acknowledgments

This work was supported by Theranexus, Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (Convention Industrielle de Formation par la Recherche 2016/0621), Centre National de la Recherche Scientifique (UPR3212), Université de Strasbourg, Agence Nationale de la Recherche (Euridol ANR-17-EURE-0022).

5 Objectifs de la thèse

Le but de la thèse a été de déterminer le mécanisme d'action de la combinaison THN101, composée d'amitriptyline et de méfloquine, dans le traitement de la douleur neuropathique dans un modèle préclinique chez la souris.

Au commencement de la thèse, nous disposions de pistes concernant le mécanisme d'action du THN101 dans la douleur neuropathique, comme par exemple la modulation des connexines par la méfloquine, la participation des cellules gliales à la douleur neuropathique et à l'effet de l'amitriptyline, ainsi que des données *in vitro* suggérant que les connexines – en particulier la Cx43 – influencent la réponse pharmacologique à l'amitriptyline. Dans ce contexte, le programme de thèse s'est articulé autour des objectifs suivants.

Le premier objectif a été de valider un protocole expérimental permettant d'observer chez la souris, dans le modèle du *cuff*, une diminution de l'hypersensibilité mécanique par la combinaison THN101. Pour ce faire, nous avons testé la sensibilité mécanique des souris avant et après chirurgie, pendant et après la phase de traitement. Nous avons utilisé une approche chronique et une approche aiguë pour traiter et tester les animaux.

Le second objectif a été de déterminer la pharmacocinétique des traitements administrés, une fois le premier objectif atteint, en réalisant une étude par spectrométrie de masse visant à déterminer les concentrations des traitements et de certains de leurs métabolites dans la circulation sanguine ou dans le système nerveux central.

Enfin, le troisième objectif a été de déterminer lesquelles des cibles de l'amitriptyline ou de la méfloquine étaient impliquées dans le mécanisme d'action de la combinaison dans nos conditions. Nous avons pour cela utilisé des approches pharmacologiques (utilisation d'antagonistes des voies concernées) pour bloquer spécifiquement des récepteurs ou mécanismes potentiellement ciblés par l'amitriptyline ou la méfloquine, ou des approches lésionnelles centrales ou périphériques pour déterminer plus précisément les sites d'actions du traitement.

Deuxième partie – Travaux de thèse

1 Lancement des travaux de thèse

1.1 Contexte

Avant le commencement de mes travaux, un contrat de collaboration entre Theranexus et l'équipe de recherche était en cours dans le but de réaliser chez l'animal un criblage de molécules qui pourraient présenter un intérêt thérapeutique, pour le traitement de la douleur neuropathique. A l'issue de ce travail et en parallèle des recherches menées au sein de l'entreprise, il apparaissait que la méfloquine était une molécule à fort potentiel et qu'il serait intéressant de mener de plus amples recherches. En effet, une étude menée par Theranexus avant mon arrivée a montré que la méfloquine potentialisait l'effet anti-hyperalgésique de l'amitriptyline après un traitement chronique dans un modèle de constriction chronique du nerf sciatique chez le rat (Jeanson et al., 2016). La combinaison entre amitriptyline et méfloquine a d'ailleurs été brevetée par Theranexus sous le nom THN101 (Jeanson, Charveriat, et Mouthon, 2018).

Dans le même temps, j'étais en stage de fin de master à l'INCI, sur un sujet qui entrait également dans la thématique du traitement des douleurs neuropathiques. Les techniques que j'y ai apprises m'ont permis de devenir le candidat sélectionné pour mener une thèse dans le cadre d'un Contrat Industriel de Formation par la Recherche.

Au sein de l'équipe, nous étudions la mise en place et le traitement des douleurs neuropathiques sur le temps long. En effet, comme dit précédemment, il faut plusieurs jours pour voir l'efficacité d'un traitement de la douleur neuropathique à la fois chez le patient et chez l'animal (cf. section 2 de l'Introduction). Chez la souris, cela prend généralement dix jours pour les traitements classiques comme la duloxétine et l'amitriptyline (Kremer et al., 2018). Avec la même idée, nous avons adopté une stratégie pour essayer de retrouver les effets du THN101 chez la souris, afin d'en déterminer le mécanisme d'action. Pour commencer, nos objectifs étaient de déterminer quelles doses devaient être utilisées dans notre modèle pour avoir à la fois un effet de l'amitriptyline, qui soit observé mais « potentialisable » dans la mesure où il s'agit de notre traitement de référence ; et une absence d'effet propre de la méfloquine, pour écarter les risques d'effet additionnel, tout en ayant une dose suffisante pour enclencher une potentialisation.

C'est donc par des expériences de mise au point que j'ai commencé mes travaux, pour évaluer les doses à utiliser mais également les voies d'administration des molécules d'intérêt. Ici, plusieurs approches ont été envisagées comme la voie intrapéritonéale, qui présente l'avantage de délivrer le traitement de façon systémique et directe et d'obtenir une circulation du médicament rapidement dans tout l'organisme. L'autre approche à laquelle nous avons pensé est la voie orale,

qui a l'avantage d'être moins invasive et de diminuer les risques d'infection liés aux injections. Nous avons opté pour cette dernière, afin de raffiner nos procédures et de nous rapprocher des conditions cliniques. Après sept mois de tentatives d'amélioration infructueuses et à la suite des difficultés rencontrées pour reproduire nos résultats, nous avons décidé d'arrêter l'approche chronique. Comme des travaux récents de l'équipe avaient montré un double mécanisme d'action de l'amitriptyline (Kremer et al., 2018), nous avons décidé de tenter une approche aiguë, sur laquelle nous avons focalisé nos travaux par après (cf. article de thèse). J'aborderai dans cette première section les travaux réalisés durant ce semestre de mise au point, dont les résultats sont représentés en section 1.3 ci-après.

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Animaux

Pour ces expériences, nous avons travaillé avec des souris C57BL/6J Ola Hsd provenant du fournisseur agréé Envigo (Gannat, France), qui ont été hébergées en cages (27 x 16 x 14 cm), avec une photopériode de douze heures de lumière (7-19h), des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, et la nourriture et la boisson fournies *ad libitum*. La litière, placée dans le fond des cages, était composée de sciure de bois et changée chaque semaine. Un enrichissement permettant aux souris de faire des nids (frisure de carton ou ouate) a également été introduit dans les cages. L'animalerie du laboratoire, unité Chronobiotron UMS3415, possède l'agrément n°D-67-2018-38, délivré par les services vétérinaires pour l'hébergement et l'expérimentation animale. Nos protocoles ont été validés selon les recommandations de l'IASP, et les responsables de l'animalerie ainsi que les responsables de ce projet sont autorisés à expérimenter sur animal vivant (niveau I). Nos protocoles ont reçu l'avis favorable du comité d'éthique de Strasbourg (CREMEAS, CEEA35 autorisation APAFIS#9881-2017051119025234). Tous les animaux ont bénéficié de deux semaines d'habituation aux locaux et aux environnements de test avant toute procédure. À la fin des protocoles, les souris ont été mises à mort par inhalation d'un mélange d'air et de dioxyde de carbone.

1.2.2 Chirurgie

Le but de la chirurgie est d'induire une neuropathie périphérique, en exposant le tronc commun du nerf sciatique droit afin d'y positionner un manchon (groupes « cuff ») (Benbouzid et al., 2008 ; Yalcin et al., 2014). Ces manchons, fabriqués à partir d'un tube de polyéthylène (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) ont été préparés de façon à ce qu'ils aient une longueur de

2 mm. Le diamètre externe du tube est de 1,09 mm et son diamètre interne de 0,38 mm. Pour pouvoir placer le manchon, une hémisection longitudinale est réalisée sur toute sa longueur, à l'aide d'une lame. Les groupes subissant la même chirurgie sans pose du *cuff* sont dits pseudo-opérés (groupes « sham »). Les chirurgies ont été réalisées sous anesthésie générale, par injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de kétamine (Imalgène® 1000, 87 mg/mL) et de xylazine (Rompun® 2%, 13 mg/mL), à raison de 5 mL/kg, en conditions d'asepsie. De l'Ocrygel® (Centravet, Taden, France) a été appliqué sur les yeux afin de garantir une protection et une hydratation optimale de ceux-ci pendant l'anesthésie des animaux.

Après avoir rasé la patte postérieure droite des souris, la peau est incisée à l'aide d'un scalpel de façon longitudinale sur une longueur d'environ 0,5 cm, à partir de la pointe fémorale supérieure. Ensuite, le tissu musculaire sous-jacent est scindé à l'aide de deux cure-dents stérilisés par autoclave. Le tronc commun du nerf sciatique est exposé en dehors du muscle à l'aide de ces mêmes cure-dents. Faisant office de support pour le nerf, les cure-dents sont alors espacés afin de permettre la pose du *cuff*. À l'aide d'une pince, le *cuff* est mis en place sur le tronc commun du nerf sciatique. Le nerf est enfin replacé et la peau est refermée par un ou deux points de suture suivant la longueur de l'incision. Les animaux sont ensuite surveillés pendant et après leur réveil et la bonne tenue des sutures est vérifiée.

1.2.3 Tests

Le test de von Frey consiste à appliquer sur la plante des pattes arrière des animaux des filaments calibrés de diamètre progressivement croissant (Aesthesio®, DanMic Global LLC, San Jose, CA, USA) de façon à appliquer une force de 0,4 à 10 grammes (seuil limite). L'application du filament est stoppée dès que le filament plie. Le seuil de sensibilité, exprimé en grammes, correspond à la force du premier filament qui a entraîné au moins 3 retraits de la patte sur 5 applications. Ces tests sont réalisés dans des conditions optimales, de façon à ne pas stresser les animaux (pas de bruit, de mouvements brusques et/ou d'autres expériences dans la salle). Les souris ont été habituées à l'environnement et aux tests de von Frey avant la chirurgie. Pour cela elles ont chacune été placées dans des boîtes de plexiglas transparent (7 x 9 x 7 cm), posées sur une grille métallique surélevée, durant une vingtaine de minutes. Les seuils de base (*baseline*, *B*) sont mesurés après les habituations de façon à connaître le seuil basal de sensibilité mécanique statique des souris avant la chirurgie. Une semaine après la chirurgie, des tests de von Frey ont à nouveau été effectués afin de mesurer l'évolution des seuils de sensibilité mécanique (seuils pré-traitement, *PT*). En période de traitement, ces tests ont été réalisés juste avant les traitements du jour.

1.2.4 Traitements

Pour tester et évaluer l'effet *in vivo* de l'amitriptyline, de la méfloquine, et de l'association des deux molécules, des groupes indépendants de souris ont été traités par voie orale (gavage oral, à raison de 10 mL/kg ou *via* l'eau de boisson fournie *ad libitum*). Nous avons utilisé du chlorhydrate d'amitriptyline (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24278073) de 6 mg/kg à 15 mg/kg en gavage oral ou de 100 à 200 µg/mL lorsque la molécule était administrée au travers de l'eau de boisson. Nous avons aussi utilisé du chlorhydrate de méfloquine (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24724536), de 0,3 mg/kg à 0,9 mg/kg par voie orale (gavage oral, à raison de 10 mL/kg) ou par voie intrapéritonéale, à raison de 10 mL/kg.

Les médicaments ont été dissous dans du NaCl stérile à 0,9 % (B. Braun, Dublin, Irlande) avec du DMSO de 0,02 % à 1 % (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 329757302) lorsqu'ils étaient administrés par voie intrapéritonéale. Les traitements administrés par voie orale étaient dissous dans l'eau de boisson à laquelle 0,1 à 2% de saccharine sodique (2,3-Dihydro-3-oxobenzisulfonazole sodium salt, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24899456) ont été ajoutés. La saccharine est un édulcorant non calorique qui permet de masquer l'amertume de certaines molécules, comme l'amitriptyline ou la méfloquine, en apportant un goût sucré à la préparation. Les traitements par gavage ou par voie intrapéritonéale ont été administrés quotidiennement à heures fixes durant 20 à 25 jours, à partir de deux semaines après la chirurgie *cuff*.

1.2.5 Chronologie

- a) Première expérience : administration des traitements par gavage, une fois par jour durant trois semaines avec les groupes suivant :
 - Amitriptyline à deux doses (7,5 mg/kg et 15 mg/kg, p.o.) ;
 - Méfloquine à une dose (0,3 mg/kg p.o.) ;
 - Amitriptyline et méfloquine co-administrées aux doses susmentionnées ;
 - Placebo constitué d'eau de boisson, de diméthylsulfoxyde (DMSO, 1 % dans l'eau) et de saccharine (2 % dans l'eau).

- b) Deuxième expérience : mise au point des doses d'amitriptyline seule.

Les traitements ont été administrés par gavage une fois par jour pendant trois semaines aux doses de 6 et 12 mg/kg ; ou *per os* en eau de boisson *ad libitum* pendant trois semaines

aux concentrations de 100 et 200 µg/mL. Les solutions ont été diluées dans l'eau de boisson de l'animalerie et de la saccharine (0,1 % dans l'eau).

- c) Troisième expérience : choix de l'eau de boisson *ad libitum* comme voie d'administration de l'amitriptyline et test de trois doses de méfloquine, co-administrée par voie intrapéritonéale quotidiennement pendant trois semaines.
- d) Quatrième expérience : ajout d'un groupe contrôle avec un traitement de méfloquine seule, à une dose choisie de 0,3 mg/kg.
- e) Cinquième expérience : tentative de reproduction de résultats suite aux doutes générés par l'expérience précédente.

1.3 Résultats

Ci-après, l'évolution du seuil de sensibilité mécanique des pattes arrière controlatérale (gauche) et ipsilatérale (droite) des souris est analysée, avant la chirurgie (ligne de base), après la chirurgie (seuil de prétraitement), et pendant le traitement.

1.3.1 Première expérience

Dans cette première expérience (voir **Figure 8**), les animaux du groupe sham ne présentent pas de différence de sensibilité mécanique entre les pattes controlatérale et ipsilatérale avant ou après chirurgie, à la différence des souris du groupe « cuff », qui présentent une chute de ce seuil après la chirurgie et ce jusqu'à la fin de l'expérience (ANOVA mesures répétées, « sham » vs « cuff », interaction chirurgie*patte*temps : $F_{19,342}=1,739$; $p=0,014$). Chez tous les animaux « cuff », le seuil de sensibilité mécanique chute après la chirurgie de manière ipsilatérale (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », effet patte : $F_{1,31}=396,357$; $p<10^{-6}$), et le seuil de sensibilité de la patte ipsilatérale n'évolue pas différemment selon les traitements administrés selon l'analyse globale (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », interaction Temps*Patte*Traitement : $F_{95,589}=396,357$; $p=0,085$).

Néanmoins, la méfloquine à 0,3 mg/kg *p.o.* provoque d'elle-même une hausse de la variabilité des seuils de sensibilité mécanique chez nos souris, sans soulagement de l'hypersensibilité mécanique des souris qui persiste pendant toute la durée du traitement sauf le 12^e jour (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,05$ tous les jours après la chirurgie *cuff* sauf au jour 12 de traitement).

Les souris traitées par l'amitriptyline à 7,5 mg/kg *p.o.* ont vu leur seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral augmenter à partir de 11 jours de traitement (patte controlatérale > patte

ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ jusqu'au 3^e jour de traitement, puis $p < 0,05$ le 9^e jour de traitement). En combinaison avec la méfloquine à 0,3 mg/kg cet effet n'est pas totalement retrouvé même si les souris semblent soulagées à partir de 15 jours de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ jusqu'au 1^{er} jour, puis du 5^e au 11^e jour de traitement, $p < 0,05$ les 15^e et 16^e jours de traitement).

Le traitement par l'amitriptyline à une dose de 15 mg/kg *p.o.* n'a pas eu d'effet significatif supérieur sur le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris par rapport à la dose de 7,5 mg/kg, bien qu'il y ait eu une absence de différence de seuils entre les deux pattes aux 11^e et 16^e jours de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ jusqu'au 9^e jour de traitement après la chirurgie, puis $p < 0,05$ du 12^e au 15^e jour de traitement et du 18^e au 19^e jour de traitement). En combinaison avec la méfloquine à 0,3 mg/kg, aucune différence majeure n'a été relevée en comparaison avec les autres groupes (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,001$ jusqu'au 1^{er} jour de traitement et au 18^e jour de traitement, puis $p < 0,01$ aux 5^e et 11^e jours de traitement, et $p < 0,05$ les 12^e et 16^e jours de traitement).

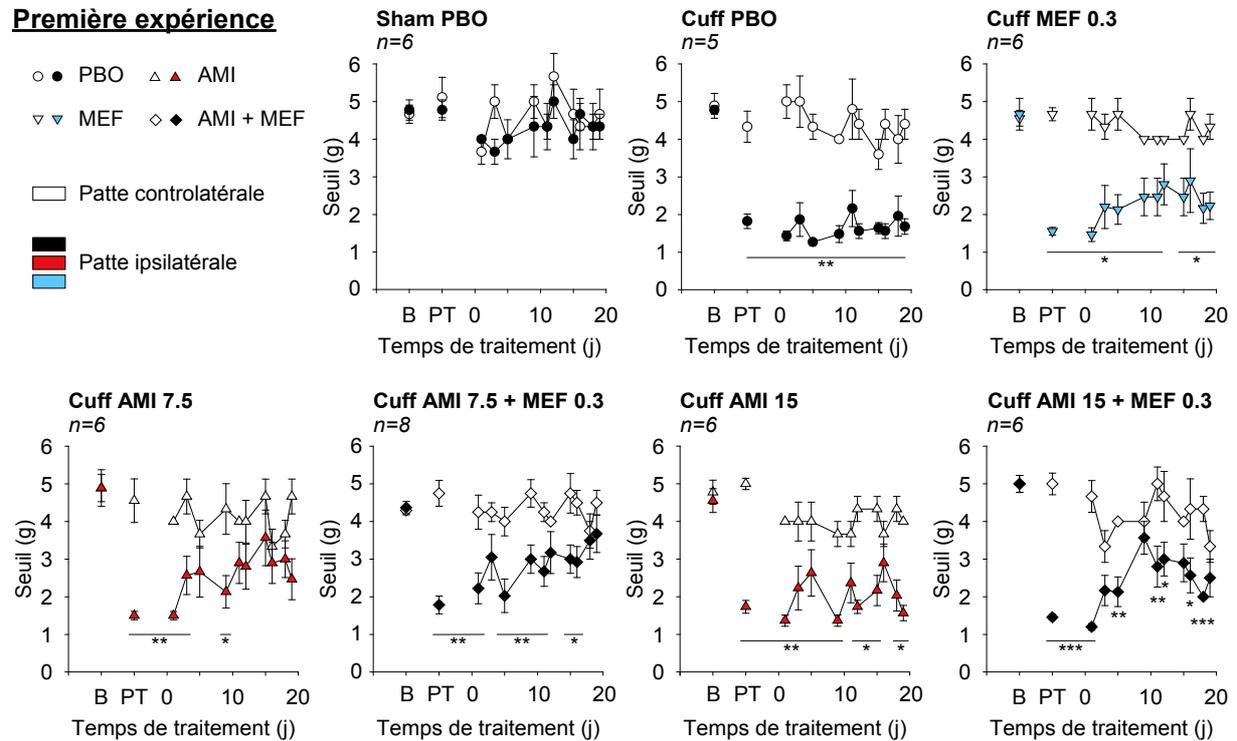


Figure 8. Première expérience de mise au point

B : seuil de base ; PT : seuil pré-traitement ; PBO : placebo ; AMI : amitriptyline ; MEF : méfloquine. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les doses d'amitriptyline et de méfloquine sont exprimées en mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyennes, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.

1.3.2 Deuxième expérience

Nous avons considéré que les résultats de la première expérience étaient décevants, car elle ne permettait pas de mettre en évidence un effet-dose de l'amitriptyline, ni de bénéfice évident de l'association entre l'amitriptyline et la méfloquine. De plus, les résultats présentaient des variabilités importantes d'un jour à l'autre, sans l'évolution régulière des seuils de sensibilité mécanique retrouvés dans de précédents travaux de l'équipe. Le but de l'expérience suivante a donc été de déterminer les conditions nécessaires pour établir un effet propre de l'amitriptyline chez nos animaux et de chercher une dose seuil permettant d'observer une amplification. Pour ce faire, nous avons réalisé deux procédures, l'une par une administration quotidienne de l'amitriptyline en gavage à 6 et 12 mg/kg, et la deuxième par administration d'amitriptyline dans l'eau de boisson à 100 et 200 µg/mL.

L'analyse de la deuxième expérience (voir **Figure 9**) indique que tous les groupes d'animaux « cuff » présentent une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral après la chirurgie (ANOVA mesures répétées, tous les groupes, effet patte : $F_{1,28}=680,6$; $p<10^{-6}$). Cependant, comme lors de la première expérience, l'analyse globale ne permet pas de dégager de différences inter-groupes (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », interaction Temps*Patte*Traitement : $F_{64,448}=396,357$; $p=0,843$).

L'amitriptyline, administrée par gavage oral chronique aux doses de 6 et 12 mg/kg, n'a pas eu d'effet sur le seuil de sensibilité mécanique des souris (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,001$ jusqu'au dernier jour de traitement pour l'amitriptyline à 6 mg/kg ; $p<0,05$ pour l'amitriptyline à 12 mg/kg). Cependant, les traitements d'amitriptyline administrés *via* l'eau de boisson ont permis de restaurer le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris, après 18 jours de traitement à une dose de 100 µg/mL (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,01$ jusqu'au 18e jour de traitement) et à partir de 17 jours de traitement pour la dose de 200 µg/mL (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,001$ jusqu'au 18e jour de traitement).

Deuxième expérience

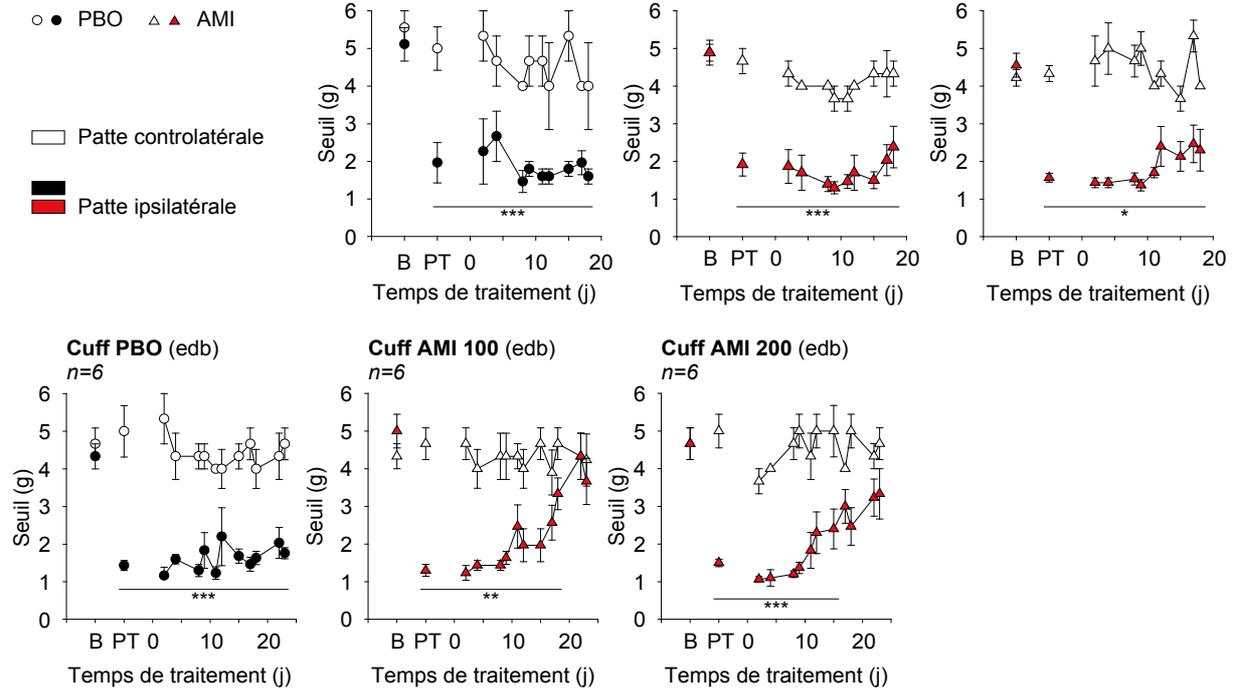


Figure 9. Deuxième expérience de mise au point

B : seuil de base ; PT : seuil pré-traitement ; PBO : placebo ; AMI : amitriptyline ; edb : eau de boisson. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les doses d'AMI sont exprimées en mg/kg ou en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (edb). Les résultats sont exprimés en moyennes, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.

1.3.3 Troisième expérience

Pour la troisième expérience (voir **Figure 10**), le traitement par eau de boisson a été privilégié pour l'amitriptyline, qui a été administrée à une concentration de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, avec ou sans méfloquine, administrée une fois par jour à la mi-journée, par voie intrapéritonéale à des doses allant de $0,3$ à $0,9 \text{ mg}/\text{kg}$. Comme pour les expériences précédentes, la chirurgie induit chez tous les groupes une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique de la patte ipsilatérale des animaux (ANOVA mesures répétées, tous les groupes, effet patte : $F_{1,22}=132,99$; $p < 10^{-6}$). Contrairement aux deux expériences précédentes, l'analyse globale permet de mettre en évidence une différence significative dans l'évolution du seuil de sensibilité mécanique des souris selon les traitements administrés (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », interaction Temps*Patte*Traitement : $F_{64,332}=1,655$; $p=0,0024$).

Les souris « cuff » non traitées (placebo) montrent une chute du seuil de sensibilité mécanique ipsilatérale durant toute la durée du traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ après la chirurgie, jusqu'à la fin du traitement).

A la concentration de 100 µg/mL, l'amitriptyline n'a pas modifié la sensibilité mécanique des souris durant toute la durée du traitement (patte controlatérale>patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,05$ après la chirurgie, jusqu'à la fin du traitement).

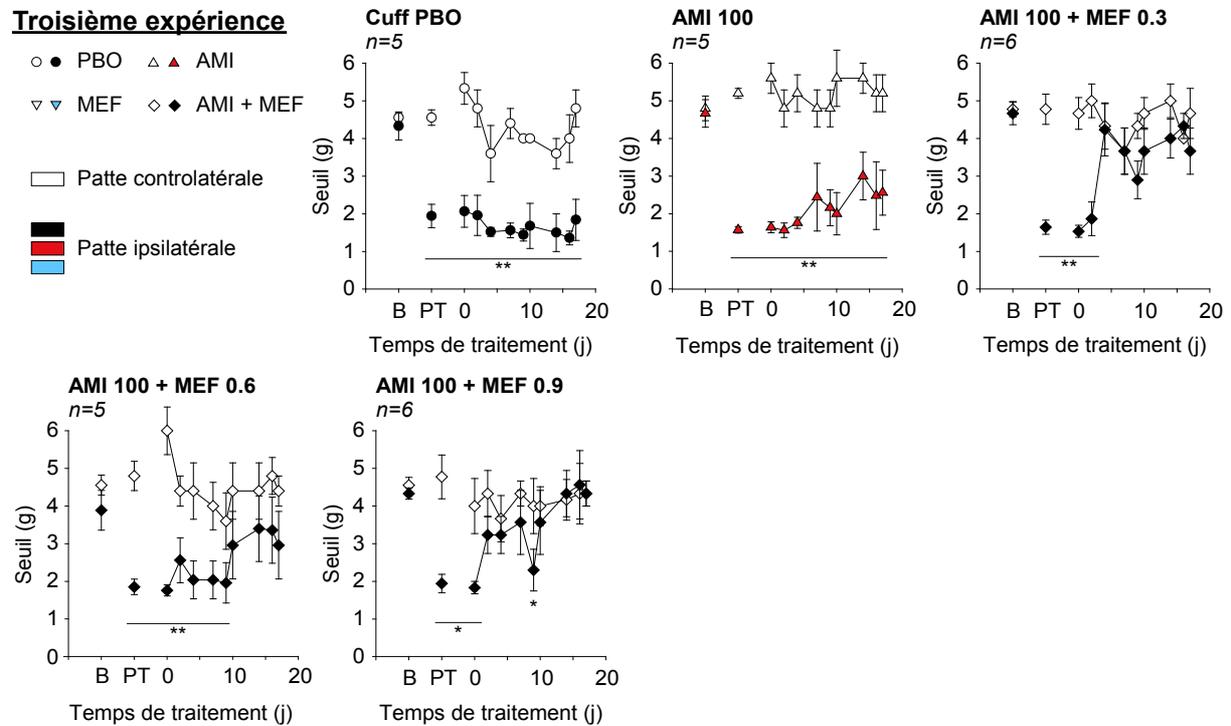


Figure 10. Troisième expérience de mise au point

B : seuil de base ; PT : seuil pré-traitement ; PBO : placebo ; AMI : amitriptyline ; MEF : méfloquine. *** : $p<0,001$; ** : $p<0,01$; * : $p<0,05$. Les doses de méfloquine sont exprimées en mg/kg. Les doses d'amitriptyline sont exprimées en µg/mL. Les résultats sont exprimés en moyennes, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.

Lorsque la méfloquine a été injectée en co-traitement avec l'amitriptyline, le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris est revenu au niveau du seuil de sensibilité mécanique controlatéral, de façon plus ou moins rapide selon les doses administrées. En effet, le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris traitées à l'amitriptyline et la méfloquine à 0,3 mg/kg est revenu au niveau du seuil de la patte controlatérale à partir de 4 jours de traitement (patte controlatérale>patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,01$ après la chirurgie, jusqu'au 2^e jour de traitement). D'autre part, le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris traitées à l'amitriptyline et la méfloquine à 0,6 mg/kg est revenu au niveau du seuil de la patte controlatérale à partir de 10 jours de traitement (patte controlatérale>patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p<0,01$ après la chirurgie, jusqu'au 9^e jour de traitement). Enfin, le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris traitées à l'amitriptyline et la méfloquine à 0,9 mg/kg est revenu

au niveau du seuil de la patte controlatérale à partir de 3 jours de traitement, avec une rechute au 9^e jour de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ après la chirurgie, jusqu'au 2^e jour de traitement et au 9^e jour de traitement).

Sur la base de cette expérience, les résultats obtenus nous semblaient prometteurs, puisque nous observions une amplification potentielle par la méfloquine d'un effet antinociceptif. Cependant, le fait de ne pas observer un effet-dose avec les doses de méfloquine utilisées pose question, d'autant que l'effet antinociceptif de la combinaison semble moins fort à la dose intermédiaire de méfloquine de 0,6 mg/kg. De plus, nous disposions d'un nombre d'animaux insuffisant dans l'expérience pour inclure un groupe contrôle traité à la méfloquine seule, nous empêchant d'analyser avec précision les différents types de réponses observées chez nos animaux dans cette expérience.

1.3.4 Quatrième expérience

Nous avons réalisé cette expérience pour tenter de reproduire les résultats précédents avec l'ajout d'un groupe contrôle, traité à la méfloquine seule à 0,3 mg/kg (voir **Figure 11**). Ici, la chirurgie *cuff* a entraîné chez tous les groupes une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique de la patte ipsilatérale des animaux (ANOVA mesures répétées, tous les groupes, effet patte : $F_{1,20}=465,683$; $p < 10^{-6}$). L'analyse globale permet également de mettre en évidence une différence significative dans l'évolution du seuil de sensibilité mécanique des souris selon les traitements administrés (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », interaction Temps*Patte*Traitement : $F_{51,340}=1,391$; $p=0,0477$).

L'administration du placebo n'a pas provoqué de modifications du seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral, qui chute significativement après la chirurgie et qui reste stable durant toute la durée du traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ après la chirurgie).

Les souris traitées à l'amitriptyline seule à 100 µg/mL conservent un seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral réduit depuis la chirurgie, jusqu'au 18^e jour de traitement où ce seuil rejoint celui de la patte controlatérale (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,05$ après la chirurgie jusqu'au 16^e jour de traitement). Le même profil d'évolution a été analysé chez les souris soumises au co-traitement amitriptyline et méfloquine à 0,3 mg/kg (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ après la chirurgie jusqu'au 16^e jour de traitement). Cependant, les souris ayant reçu le traitement de méfloquine seule à 0,3 mg/kg ont vu leur seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral revenir au niveau de celui de la patte

controlatérale plus tôt, à partir du 7^e jour de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,01$ après la chirurgie jusqu'au 4^e jour de traitement).

Quatrième expérience

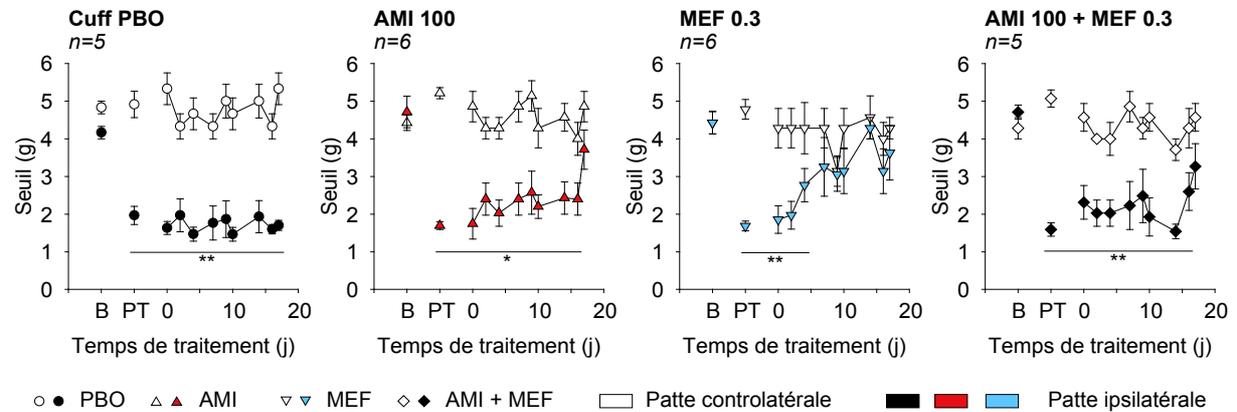


Figure 11. Quatrième expérience de mise au point

B : seuil de base ; PT : seuil pré-traitement ; PBO : placebo ; AMI : amitriptyline ; MEF : méfloquine. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les doses de méfloquine sont exprimées en mg/kg. Les doses d'amitriptyline sont exprimées en $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont exprimés en moyennes, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.

Sur cette expérience, l'amplification attendue de l'effet antinociceptif de la combinaison n'a pas été observé, soulevant une possible difficulté dans la reproduction des résultats obtenus dans l'expérience précédente. L'observation d'un effet propre de la méfloquine à cette dose nous a également posé question, c'est pourquoi nous avons décidé de reproduire la même expérience.

1.3.5 Cinquième expérience

Enfin, la dernière expérience de mise au point (voir **Figure 12**) a été réalisée dans le but de dupliquer l'expérience précédente. Dans tous les groupes, la chirurgie provoque une diminution du seuil de sensibilité mécanique de la patte ipsilatérale des animaux (ANOVA mesures répétées, tous les groupes, effet patte : $F_{1,29}=228,921$; $p < 10^{-6}$). Selon les groupes, l'évolution du seuil de sensibilité mécanique des souris est également différente (ANOVA mesures répétées, tous les groupes « cuff », interaction Temps*Patte*Traitement : $F_{68,493}=2,191$; $p=10^{-6}$).

De la même manière, l'administration du placebo n'a pas modifié le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral, significativement réduit après la chirurgie et qui est stable durant toute la durée du traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,001$ après la chirurgie).

Le traitement à l'amitriptyline seule à 100 µg/mL *p.o.* a restauré le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris à partir de 14 jours de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,001$ après la chirurgie jusqu'au 7^e jour de traitement ; puis $p < 0,05$ jusqu'au 12^e jour de traitement).

Le traitement à la méfloquine seule à 0,3 mg/kg *i.p.* a entraîné une hausse de la variabilité du seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral, et l'a restauré au niveau de la patte controlatérale à partir de 14 jours de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,001$ après la chirurgie jusqu'au 1^{er} jour de traitement ; $p < 0,05$ le 3^e jour ; puis $p < 0,01$ du 5^e au 7^e jour ; puis $p < 0,05$ le 12^e jour de traitement).

Lorsque l'amitriptyline et la méfloquine ont été co-administrés, le seuil de sensibilité mécanique ipsilatéral des souris est revenu au niveau de celui la patte controlatérale à partir de 20 jours de traitement (patte controlatérale > patte ipsilatérale, post-hoc de Duncan, $p < 0,001$ après la chirurgie jusqu'au 1^e jour de traitement ; $p < 0,05$ le 3^e jour ; $p < 0,01$ du 5^e au 7^e jour ; $p < 0,05$ le 14^e jour et le 16^e jour).

Cinquième expérience

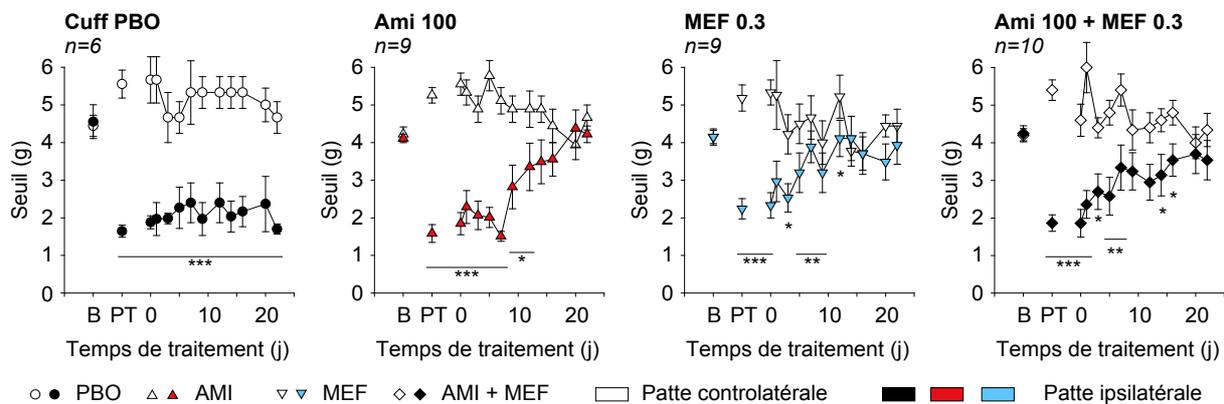


Figure 12. Cinquième expérience de mise au point

B : seuil de base ; PT : seuil pré-traitement ; PBO : placebo ; AMI : amitriptyline ; MEF : méfloquine. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les doses de méfloquine sont exprimées en mg/kg. Les doses d'amitriptyline sont exprimées en µg/mL. Les résultats sont exprimés en moyennes, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.

L'ensemble des données acquises durant ces sept mois d'expériences nous a interrogés sur la manière dont nous allons appréhender la suite des travaux. Les analyses réalisées ont permis de soulever un manque de stabilité et de reproductibilité des données obtenues, ce qui a empêché de considérer les protocoles utilisés en phase de mise au point pour les approches mécanistiques que nous souhaitions aborder.

Deuxième partie – Travaux de thèse

A l'issue de cette période, nous avons donc tenté de tester la combinaison selon un autre protocole, basé sur l'effet antinociceptif aigu de l'amitriptyline ([Kremer et al., 2018](#)). Ayant obtenu des résultats encourageants et répétés au fil des expériences, nos travaux ont abouti à l'écriture de l'article qui sera soumis à publication dans une revue scientifique internationale, que vous trouverez ci-après à la section 2.

2 Article de thèse :

Mefloquine amplifies amitriptyline action on neuropathic mechanical hypersensitivity in mice

Baptiste Letellier^{a,b}, Mélanie Kremer^a, Léa J. Becker^a, Yannick Goumon^a, Virginie Chavant^a, Nolwenn Couqueberg^a, Elisabeth Waltisperger^a, Ipek Yalcin^a, Franck Mouthon^b, Marine Droguerre^b, Mathieu Charvériat^b, Michel Barrot^{a,*}

^a *Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France*

^b *Theranexus, Lyon, France*

Keywords: neuropathic pain, amitriptyline, mefloquine

2.1 Abstract

Tricyclic antidepressants that inhibit serotonin and noradrenaline reuptake, such as amitriptyline, are a first-line treatment for neuropathic pain, which is caused by a lesion or disease affecting the somatosensory nervous system. These treatments are however not fully effective and still require improvements. Interactions between neurons and glial cells participate in neuropathic pain processes, and connexins contribute to these interactions. Mefloquine, an inhibitor of connexins and gap junctions, has been shown to potentiate the anti-hyperalgesic effect of amitriptyline in a neuropathic pain model in rats. In the present study, we further investigated this potentiation of amitriptyline action by mefloquine, using the cuff model of neuropathic pain in mice. Using the von Frey test, we observed that oral mefloquine co-treatment prolonged the action of amitriptyline on mechanical hypersensitivity up to 16 hours following a single administration. Mass spectrometry analysis of amitriptyline, its metabolite nortriptyline, and mefloquine, showed that this potentiation was not due to pharmacokinetic modifications. Lesional and pharmacological approaches showed that the prolonged effect was induced through noradrenergic descending pathways and the recruitment of α_2 (but not β) adrenergic receptors. The binding and functional analysis of putative mefloquine targets suggested that this drug may also act on serotonin transporters and on adenosine A_1 and A_{2a} receptors. However, contrary to the gap junction blocker carbenoxolone, drugs acting on these other targets did not amplify amitriptyline action. Together, our data indicate that concomitant pharmacological blockade of

gap junctions and aminergic transporter may lead to a potentiated therapeutic action in a neuropathic pain context.

2.2 Introduction

Neuropathic pain develops as a consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory nervous system (Treede et al., 2019), and is usually a chronic pain as its physical and moral discomfort lasts often more than three months, continuously or discontinuously (Scholz et al., 2019). As all forms of chronic pain, it is a major public health issue (Gaskin and Richard, 2012). Some antidepressant drugs constitute one of the first-line treatments for neuropathic pain, but despite the fact that they are one of the best therapeutic options their efficacy remains limited, with a number needed to treat around 3.6 to 6.4 (Finnerup et al., 2015; Saarto and Wiffen, 2007) and a pain relief that is usually partial. Improving antidepressant drug action on neuropathic pain might thus be of therapeutic interest.

From the periphery to the central nervous system, interactions between neurons and glial cells contribute to the encoding of sensory information (Charvériat et al., 2017; Eto et al., 2018; Ji et al., 2019), and connexins partly mediate these interactions (Charvériat et al., 2017). These transmembrane proteins form hexa-protein complexes to form hemi-channels or gap junctions, facilitating the passage of sodium, potassium, or small molecules such as glutamate (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). In the pathways involved in nociceptive processing, this interaction can occur in the dorsal root ganglia, the spinal cord and the brain. In various models of neuropathic pain, dynamic changes have been shown in the expression of connexins within these structures, correlated to the development or maintenance of painful symptoms (Chen et al., 2016b; Neumann et al., 2015; Wang et Sun, 2017). Drugs used to modulate gap junctions and connexins have shown some efficacy in animal models of neuropathic pain (Hang et al., 2016; Lee-Kubli et al., 2016a; Li et al., 2017; Tonkin et al., 2018), suggesting that it may be of interest to target neuro-glial mechanisms through connexin manipulation. One of these drugs, mefloquine, has been mostly used at high dose in the treatment of malaria (Sowunmi et al., 1990; Tickell-Painter et al., 2017). At milder dose, it however display inhibitory properties on gap junctions and connexins (Chen et al., 2016b; Ouachikh et al., 2018a). In some animal models of neuropathic pain, mefloquine has been shown to reduce nociceptive symptoms (Chen et al., 2016b; Ouachikh et al., 2018); and at a subthreshold dose to potentiate the anti-hyperalgesic effect of the tricyclic antidepressant amitriptyline in the chronic constriction injury model in rats (Jeanson et al., 2016).

In the present study, we further investigated this potentiation of amitriptyline action by mefloquine, using the cuff model of neuropathic pain in mice (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et

al., 2014). The aims were to reproduce in mice the potentiating action of this drug combination, designed as THN101, and to explore the amitriptyline-related and mefloquine-related components of the mechanism leading to the experimental relief of mechanical hypersensitivity in a neuropathic pain context.

2.3 Material and methods

2.3.1 Animals

C57BL/6J male mice (Charles River, L'Arbresle, France), 8-16 weeks old, were used for this study. They were habituated to the animal facility and to the testing environment prior to procedures. Mice were group housed with food and water *ad libitum*, in facilities with controlled temperature and hygrometry, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7 am). Animal killing, perfusion and/or tissue collection were done at the end of the protocols, using either controlled carbon dioxide exposure (automatic TEM SEGA system, 20% per min) or following an overdose of anesthetic (ketamine (Imalgene1000®, 300 mg/kg) / xylazine (Rompun 2%®, 20 mg/kg, Centravet, Tadden, France). The Chronobiotron (UMS3415) animal facility has an agreement for animal housing and experimentation, delivered by the French veterinary services (D-67-2018-38). Protocols were performed following the ethical European guidelines (EU 2010/63) and approved by the local ethical committee "Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg" (CREMEAS, CEEA35).

2.3.2 Cuff surgery

Surgeries were done under either ketamine (Imalgene1000®, 100 mg/kg) / xylazine (Rompun 2%®, 10 mg/kg, Centravet, Tadden, France) anesthesia; or under tiletamine-zolazepam (Zoletil50®, 80 mg/kg, Virbac Sante Animale, France) / xylazine (Rompun 2%®, 20 mg/kg, Centravet, Tadden, France) anesthesia, with atipemazole (Antisedan®, 0.2 mg/kg, Vetoquinol, France) delivered for anesthesia reversal at least 1 h after the induction. All compounds were delivered intraperitoneally (i.p.; 5 mL/kg). After having exposed the common branch of the right sciatic nerve (sham group), a hemisectioned 2 mm long PE-20 polyethylene cuff (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around the nerve to induce a compression (cuff group) according to previously published procedures (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et al., 2014). Skin was closed with one or two stitches along the length of the incision (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et al., 2014).

2.3.3 Treatments

To test and evaluate the effect of the combination of amitriptyline and mefloquine, independent groups of mice were treated *per os* (oral gavage, p.o.) with either amitriptyline hydrochloride (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24278073) from 5 mg/kg to 20 mg/kg or mefloquine hydrochloride (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24724536), from 0.05 mg/kg to 0.2 mg/kg, or with their combination (designed, regardless of doses, as THN101 throughout the manuscript). The drugs were dissolved in sterile 0.9% NaCl (B. Braun, Dublin, Ireland) with DMSO from 0.02% to 1% (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 329757302). For most experiments, mice received the treatments either i) in the morning for tests at 1, 2, 4, 7 and 30 h after administration or ii) at the end of the day for tests at 12, 16 and 20 h after administration.

To test the central effect of mefloquine, alone or in combination with amitriptyline, mice were firstly treated with amitriptyline 10 mg/kg or received a vehicle solution (p.o., 10 mL/kg). Then, under 3% isoflurane anesthesia, mice received a single dose of 3.6 µg mefloquine dissolved in 10 µL of vehicle solution (DMSO, 1% NaCl 0.9%, H₂O) or 10 µL of vehicle solution delivered intrathecally (i.t.) through a 27-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe.

To study the adrenergic component of THN101 and of mefloquine action at high dose, mice were treated with yohimbine hydrochloride (α_2 -adrenergic receptors antagonist, Tocris, Abingdon, United Kingdom, PubChem ID 6169), either i.p. (0.5 mg/kg) or p.o. dissolved in the drinking water (20 µg/mL); or with propranolol hydrochloride (β_2 -adrenergic antagonist receptors, Tocris, Abingdon, United Kingdom, PubChem ID 66366), given p.o. dissolved in the drinking water (50 µg/mL) (Kremer et al., 2018).

To evaluate the relevance of potential mefloquine pharmacological targets, mice were treated with either: i) fluoxetine hydrochloride (serotonin reuptake inhibitor; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 24278096), 10 mg/kg p.o.; ii) DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (A1 adenosine receptor antagonist; Tocris, Abingdon, United Kingdom, PubChem ID 1329) 1 mg/kg p.o.; iii) SCH58261, 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine (A2a adenosine receptor antagonist; Tocris, Abingdon, United Kingdom, PubChem ID 176408) 0.1 mg/kg p.o.; or iv) carbenoxolone, 3 β -Hydroxy-11-oxoolean-12-en-30-oic acid 3-hemisuccinate (blocker of gap junctions; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France, PubChem Substance ID 57654021), 5 nmol injected i.t. in 10 µL of solution similarly to mefloquine when injected to test its central effects (see above). These drugs were administered alone or in combination with amitriptyline, 10 mg/kg p.o.

(10 mL/kg), to test whether mefloquine action in THN101 could be mimicked by any of the above drugs.

2.3.4 Behavioral testing

Mechanical sensitivity was assessed using the von Frey test. Animals were placed into clear plexiglas boxes (7cm x 9cm x 7cm) on a metallic elevated grid. After habituation, ascending calibers of von Frey filaments (Aesthesio®, DanMic Global LLC, San Jose, CA, USA) were applied to the plantar surface of hindpaws until they just bent, as previously described (Benbouzid et al., 2008; Bohren et al., 2013; Yalcin et al., 2014). The paw withdrawal threshold (PWT), expressed in grams, corresponds to the first filament which resulted in at least 3 paw withdrawals out of 5 applications (Benbouzid et al., 2008; Bohren et al., 2013; Yalcin et al., 2014).

2.3.5 Mass spectrometry

The concentration of amitriptyline, of its metabolite nortriptyline, and of mefloquine were measured by mass spectrometry in blood, plasma and brain samples and in spinal cord lumbar sections taken from mice either treated with amitriptyline 10 mg/kg p.o. or by THN101 (amitriptyline at 10 mg/kg and mefloquine at 0.1 mg/kg) p.o..

a) Blood, plasma and tissue collection

Blood was collected from the tip of the tail, sectioned at its soft non-bone level with scissors, using heparinized capillaries of 20 µL (Minicap Capillary Pipette, Hirschmann Instruments™, ref 11772533) 1h, 2h, 4h and 7h after p.o. administration of amitriptyline or THN101. Immediately after collection, the blood was mixed with 10 µL of 5000 IU/mL sodium heparin (Sanofi, France) and stored at -80°C. After the last blood collection from the tail, 7 h after amitriptyline or THN101 administration, mice were anesthetized with a mixture of ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg (i.p., 5 mL/kg). Mice were then killed by cardiac exsanguination consisting in a total blood collection, performed by inserting a 26-gauge needle connected to a 2 mL syringe directly into the heart. The blood was then collected in vacuumed lithium-heparinized tubes with a plasma separating gel (BD Vacutainer LH PST II REF 367374). Blood samples were centrifuged at 425 x g for 10 minutes at 4°C and the resulting plasma was then taken and immediately frozen at -80°C. In parallel, brain and spinal cord were removed, collected in Eppendorf tubes on dry ice and placed immediately at -80°C.

b) Plasma and tissue measurements

Preparation of plasma and blood. Plasma (50 μL) and blood (20 μL) were spiked with 20 pmol of D3-amitriptyline, D3-nortriptyline and D10-mefloquine as internal control (Merck, Molsheim, France and Alsachim, Illkirch, France). Volumes were adjusted to 100 μL with ascorbic acid to obtain a final concentration of 50 μM . Then, samples were submitted to a solid phase extraction (SPE) using a positive pressure manifold (Thermo Electron, Villebon sur Yvette, France). Samples were loaded on Phree SPE-cartridges (1 cm^3 , Phenomenex, Le Pecq, France) and elution was performed with 300 μL of acetonitrile (ACN) 99%/1% formic acid (FA, v/v). Finally, eluted fractions were dried under vacuum and suspended in 10 μL of ACN 20%/0.1% FA prior to MS analysis.

Preparation of brain and lumbar spinal cord. Brains and spinal cords were homogenized with a tissue mixer in, respectively, 2 mL and 200 μL of 0.1 mM ascorbic acid. Homogenates were sonicated 10 s at 100 W and centrifuged (20,000 x g, 20 min, 4°C). Supernatant was recovered and the concentration of proteins was determined (Protein Assay, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). 100 μL of the supernatant were spiked with an internal standard containing 20 pmol of D3-amitriptyline, D3-nortriptyline and D10-mefloquine and extracted on Phree SPE-cartridges. Finally, eluted fractions were dried under vacuum and suspended in 10 μL of ACN 20%/0.1% FA prior to MS analysis.

c) LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

LC-analyses were used to determine the presence of amitriptyline, nortriptyline and mefloquine using the selected reaction monitoring mode (SRM). Analyses were performed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled with an Endura triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Electron). The system was controlled by Xcalibur v. 2.0 software (Thermo Electron). Dried samples were suspended in 10 or 5 μL of H_2O 99.9%/FA 0.1% (v/v) and 1 μL of the solution were loaded into an Luna Omega Polar reverse phase capillary column (#00D-4760-AF; 100 x 0.5 mm 3 μm , Phenomenex) heated at 40°C. Elutions were performed by applying linear gradient of buffers A/B. Buffer A corresponded to H_2O 98.9%/ACN 1%/ FA 0.1% (v/v/v), whereas buffer B was ACN 99.9%/FA 0.1% (v/v). A linear gradient of 0-20% of solvent B at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ over 13 min was applied followed by a washing step (1 min at 98% of buffer B) and an equilibration step (7 min of 100% buffer A).

The SRM mode was performed at 3500 V (positive mode) of liquid junction voltage and 276°C capillary temperature. The selectivity for both Q1 and Q3 was set to 0.7 Da (FWHM). The collision gas pressure of Q2 was set at 2 mTorr of argon. The selection of the monitored transitions and the optimization of the collision energy (CE) were manually determined.

The transitions and the corresponding collision energies used for SRM are reported in the supplemental method chapter.

The identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions and retention times obtained for amitriptyline, nortriptyline, mefloquine and the corresponding internal standard. Absolute quantifications of the compounds were done using the ratio of daughter ions response areas on the internal standards (isotopic dilution method).

2.3.6 Lesions

Under a 3% isoflurane anesthesia on 8-week old mice, lesions of noradrenergic fibers from the descending pathways were performed with intrathecal (i.t.) administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA; 20 µg *per* mouse, in 5 µL of 0.9% NaCl solution containing 100 µg/mL ascorbic acid). The skin of the back of anesthetized mice was shaved, and an incision was made at the T9-T11 level so that a 27-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe could be inserted into the space between the thoracic T12 and lumbar L1 vertebrae (Kremer et al., 2018). Two weeks later, mice underwent cuff surgery and, two weeks later, were treated with THN101 (amitriptyline 10 mg/kg and mefloquine 0.1 mg/kg) or mefloquine (0.4 mg/kg) in a single p.o. administration, after a post-surgery baseline was assessed. A control group of non-lesioned mice (solvent injection) underwent the same nerve cuffing procedure as the lesioned groups.

Peripheral pharmacological lesion, impacting sympathetic peripheral sprouting (Kremer et al., 2018), was done with five daily intraperitoneal injection of guanethidine monosulfate (30 mg/kg, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in a volume of 5 mL/kg, in 8-week old mice. Two weeks later, mice underwent cuff surgery and, two weeks later, were treated by THN101 (amitriptyline 10 mg/kg and mefloquine 0.1 mg/kg) in a single p.o. administration, after a post-surgery baseline was assessed. A control group of non-lesioned mice (0.9% NaCl injections) underwent the same nerve cuffing procedure as the lesioned groups.

2.3.7 *In vitro* pharmacology

To determine possible pharmacological targets for mefloquine, an *in vitro* pharmacological study was performed through the Contract Research Organization Eurofins CEREP (Lead ProfilingScreen® 2, Eurofins CEREP, Le Bois l'Evêque, France), which consisted in

identifying mefloquine activity on 80 transmembrane and soluble receptors. Radioligand binding and functional assays were performed with 1 μ M of mefloquine, diluted in DMSO (10^{-2} M). EC₅₀ and IC₅₀ of mefloquine on A₁ and A_{2A} adenosine receptors, and on serotonin uptake transporters, were also measured using mefloquine at several concentrations. Detailed method information as provided by the contractor are given in the supplemental section.

2.3.8 Statistics

Our data are displayed using means \pm SEM. Statistical analyses were performed with Statistica (Dell software, France). Variance analysis (ANOVA) with repeated measures (**Figure 13A, B, C, D, E, F; Figure 14A, B; Figure 16A, C, D; Figure 17; Figure 19A, B, C, D**), Student *t*-tests (**Figure 15B, C, D**), two-way ANOVA (**Figure 16B**) or one-way ANOVA (**Figure 13G**) were performed. The Duncan test was used for post-hoc analyses.

2.4 Results

2.4.1 Amitriptyline and mefloquine effects on mechanical hypersensitivity

To evaluate the potential synergy between amitriptyline and mefloquine, we first performed dose-response studies to find the appropriate THN101 combination for further investigations. As control, sham and cuff mice were treated with the vehicle solution (VEH). Mice from the vehicle-treated cuff group displayed mechanical hypersensitivity (Sham>Cuff, $F_{1,17}=54.75$, $p<10^{-5}$). Oral amitriptyline (**Figure 13A**) led to a dose dependent relief of mechanical hypersensitivity (group effect, $F_{4,47}=21.19$, $p<10^{-5}$; post-hoc: Sham>all other groups at $p<0.043$), with no significant effect at 5 mg/kg, a partial and transient recovery at 10 mg/kg ($F_{4,188}=5.51$, $p<0.001$; post-hoc AMI10>Cuff VEH, at 2 h $p=0.013$) and a more complete and transient recovery at 20 mg/kg ($F_{4,188}=5.51$, $p<0.001$; post-hoc: AMI20>Cuff VEH, at 2 h, $p<0.001$). The two doses tested for oral mefloquine (**Figure 13B**) had no significant action *per se* on the hypersensitivity (group effect, $F_{3,38}=64.02$, $p<10^{-5}$; post-hoc: Sham>all other groups at $p<4.10^{-6}$, and cuff VEH-treated group similar to cuff MEF-treated groups at $p>0.274$). We then decided to choose the two lowest amitriptyline doses (5 and 10 mg/kg) to evaluate the effect of the combination with mefloquine. Amitriptyline at 5 mg/kg led to a partial relief of hypersensitivity, limited within 4 h when combined with mefloquine 0.05 mg/kg (Group*Time, $F_{4,64}=3.47$, $p=0.013$; post-hoc: AMI5+MEF0.05>VEH, at 4 h $p=0.047$ post-hoc) (**Figure 13C**), and present at 7 h when combined with mefloquine 0.1 mg/kg (Group*Time, $F_{4,68}=6.99$, $p=9.10^{-5}$; post-hoc: AMI5+MEF0.1>VEH, at 7 h $p=9.10^{-5}$) (**Figure 13D**). Mefloquine further enhanced the action

of amitriptyline 10 mg/kg, with a partial and transitory improvement with mefloquine 0.05 mg/kg (Group*Time, $F_{4,64}=2.95$, $p=0.026$; post-hoc: AMI10+MEF0.05>VEH, at 2 h $p=0.032$, at 7 h $p=0.040$ post-hoc) (**Figure 13E**); and a better and sustained effect with mefloquine 0.1 mg/kg (**Figure 13F**, left), for which the relief of mechanical hypersensitivity was stably maintained for at least 7h (Group*Time, $F_{4,80}=6.84$, $p=8.10^{-5}$; post-hoc: AMI10+MEF0.1>VEH, at 2 h $p=0.006$, at 4 h $p=0.014$, at 7 h $p=0.001$). We also observed that THN101 at this dose combination had no effect *per se* on the contralateral paw withdrawal thresholds (**Figure 13F**, left) (Group*Time, $F_{4,80}=0.357$, $p=0.84$). The benefit of the THN101 combination compared to individual treatments is also highlighted by the areas under the curve for dose responses representation (**Figure 13G**) (Group effect, $F_{4,51}=6.02$, $p=4.79.10^{-4}$; post-hoc: THN101>PBO, MEF0.1 and AMI10-treated groups at $p<0.0396$). All the following experiments were thus conducted using amitriptyline 10 mg/kg / mefloquine 0.1 mg/kg as THN101 combination.

We showed in the above dose response experiments that a single administration of THN101 allowed maintaining a relief of mechanical hypersensitivity over at least 7 h (**Figure 13**). We then tested how long this effect might last by giving the treatment in the evening and testing the animals the following day (**Figure 14A**). This experiment allowed showing that the action of a single THN101 administration partially lasted at least 16 h and was no more present after 20 h (Group*Time, $F_{6,82}=9.07$, $p<10^{-6}$; post-hoc: THN101>all others groups at 12 h $p<7.10^{-5}$, and at 16h $p<4.10^{-4}$). Repeating the evening injection procedure in a separate set of mice allowed showing that a relief of mechanical hypersensitivity can be repeatedly observed over 5 days 12 h after each THN101 administration (Group*Time, $F_{1,14}=15.55$; $p=0.0015$; post-hoc: THN101>PBO at day 1 $p=0.0011$, day 2 $p=4.10^{-4}$, day 3 $p=0.011$, day 4 $p=0.028$ and day 5 $p=0.029$) (**Figure 14B**).

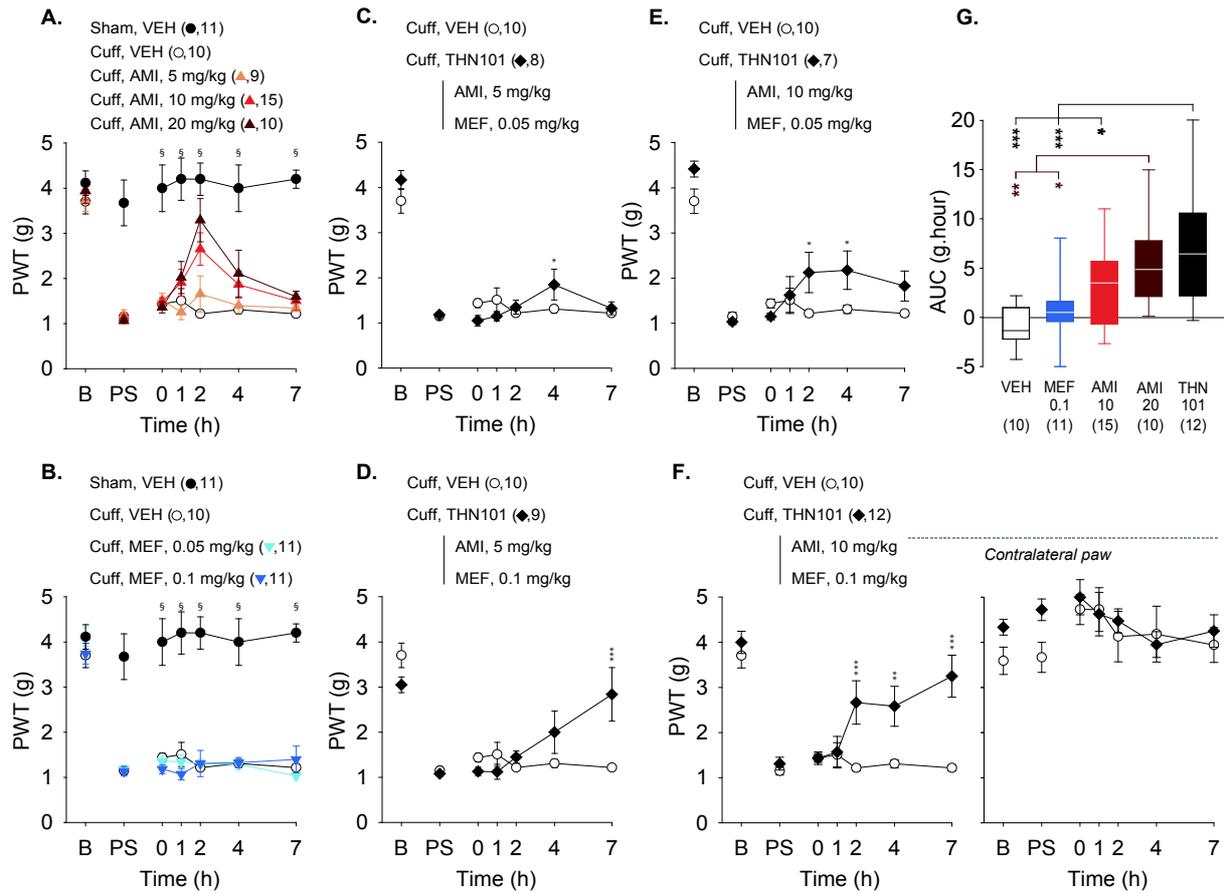


Figure 13. Effect of amitriptyline and mefloquine combination on mechanical hypersensitivity in mice with neuropathic pain.

The mechanical right hindpaw withdrawal threshold (PWT) was assessed with von Frey filaments before surgery (B: baseline), the mean of post-surgical values before treatment is displayed as PS (post-surgery baseline), and the oral drug treatment was done two to three weeks after surgery. On the drug treatment day, sham (n=11) and cuff (n=8-15 per group) mice were tested before and from 1 to 7 h after drug administration. Mice PWT was assessed after amitriptyline (A) or mefloquine (B) treatment at different doses, and after a treatment with amitriptyline and mefloquine combination (C to F). Comparison of areas under the curve (AUC) between cuff VEH, mefloquine, amitriptyline and THN101-treated groups are shown with whisker boxes (G). Vehicle solution (NaCl 0.9%, DMSO 0.02% 10 ml/kg p.o., once after time 0 test) was used as negative control (A to G). Results are expressed as mean \pm SEM.

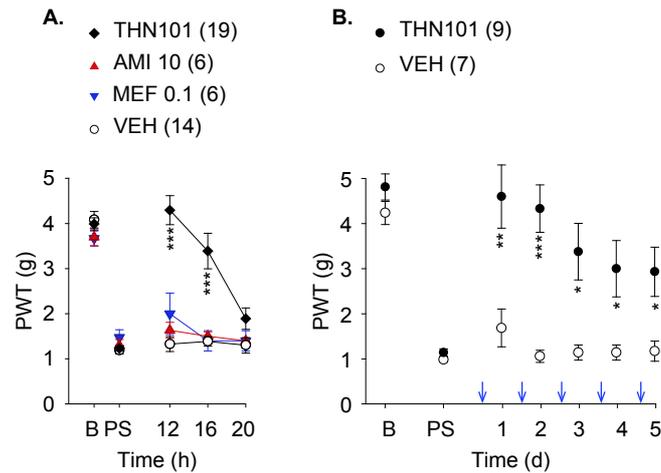


Figure 14. THN101 action on mechanical hypersensitivity.

Experiments were conducted in Cuff mice. The mechanical right hindpaw withdrawal threshold (PWT) was assessed with von Frey filaments before surgery (B: baseline), the mean of post-surgical values before treatment is displayed as PS (post-surgery baseline), and the drug treatment was done or started two to three weeks after surgery. Treatments were given orally in the evening, and mice tested on the following day. In a first experiment, time-course of THN101 action was compared to control, amitriptyline and mefloquine treatments (A). In a second experiment, THN101 was orally given each evening over 5 consecutive days, and mice tested each time 12 h post-administration (B). Results are expressed as mean \pm SEM.

2.4.2 Drug concentrations

We then tested whether mefloquine may impact the antidepressant pharmacokinetic and biodisponibility properties. Blood levels of mefloquine, of amitriptyline and of its metabolite nortriptyline were monitored 1, 2, 4 and 7 h after administration of amitriptyline alone or of THN101, as well as amitriptyline, nortriptyline and mefloquine levels in plasma, brain and spinal cord 7 h after administration.

Unlike amitriptyline and nortriptyline (see below), blood levels of mefloquine were found to gradually increase up to 7 h after oral administration (**Figure 15A**) (Time effect, $F_{3,42}=21.52$, $p<10^{-6}$), reaching 292.1 ± 18.9 μM in the blood. At 7 h post-administration, plasma levels were at 92.6 ± 8.4 μM (**Figure 15B**) and central concentrations were of 44.2 ± 9.1 pmol/mg of protein in the spinal cord (**Figure 15C**) and 1.0 ± 0.1 pmol/mg of protein in the brain (**Figure 15D**).

On the other hand, blood amitriptyline and nortriptyline concentrations (**Figure 15A**) were highest 1 h after oral drug delivery, and decreased similarly in the amitriptyline and THN101-treated groups (Group*Time, amitriptyline: $F_{3,42}=0.55$, $p=0.65$, nortriptyline: $F_{1,14}=4.13$, $p=0.061$) (**Figure 15A**). Similarly, no significant difference was found between amitriptyline alone and THN101 concerning the plasma (**Figure 15B**), spinal cord (**Figure 15C**) and brain (**Figure 15D**) levels of amitriptyline ($p=0.41$, 0.24 and 0.30 respectively) and nortriptyline ($p=0.32$, 0.67 and

0.11 respectively), suggesting that the co-presence of mefloquine affected neither the pharmacokinetic nor the biodisponibility of the antidepressant. It should be noted that one of the mice displayed much higher plasma amitriptyline concentrations than the others, however statistical conclusions remained the same whether this animal was included (see above) or no (plasma: $p=0.83$; spinal cord: $p=0.37$; brain: $p=0.66$).

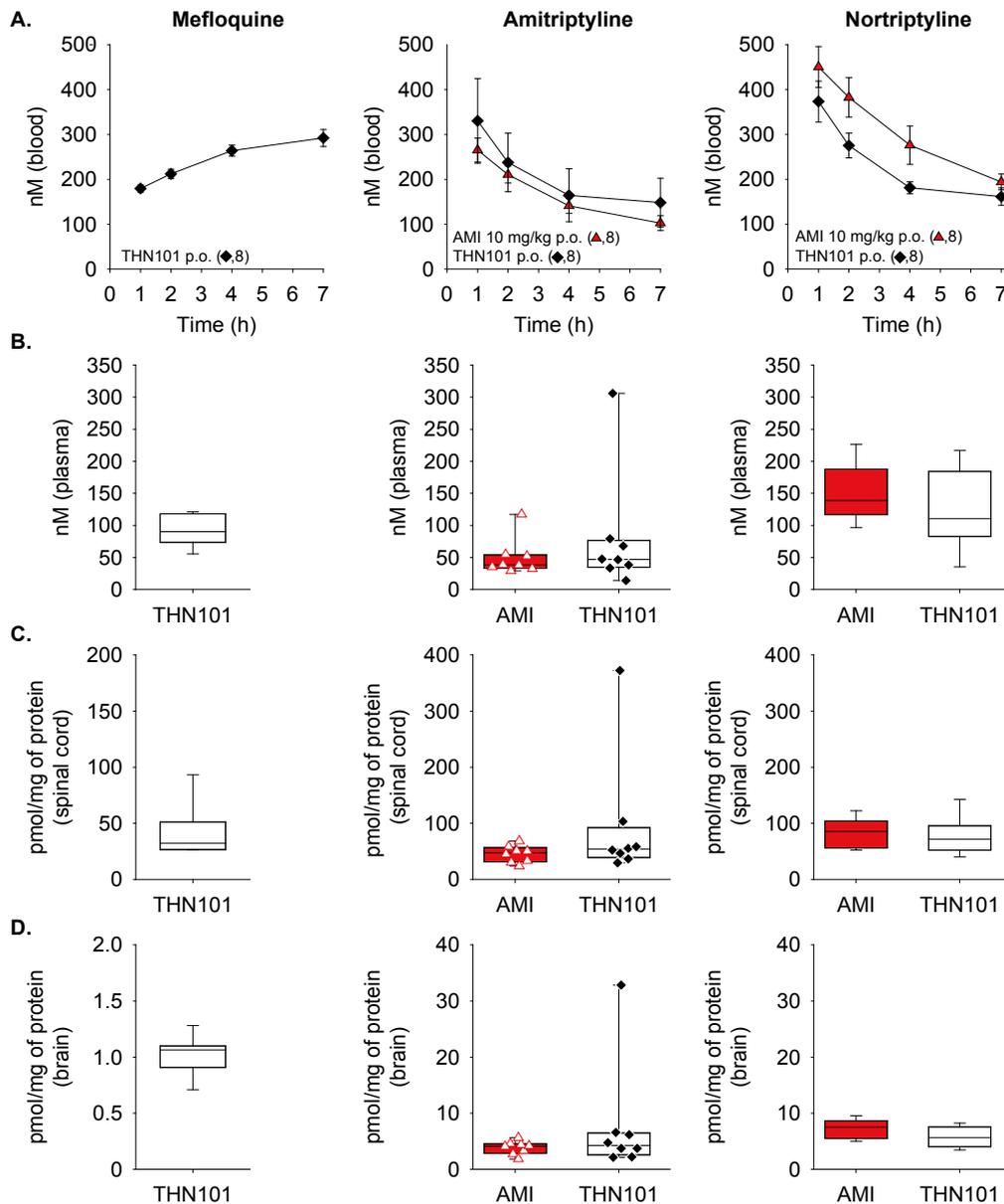


Figure 15. Evaluation of mefloquine, amitriptyline and nortriptyline concentrations by mass spectrometry after amitriptyline or THN101 treatment.

Measures were done in Cuff mice. Mefloquine, amitriptyline and nortriptyline concentrations (nM) were measured in blood from 1 to 7 hours after amitriptyline or THN101 *per os* treatment. Results are expressed as mean \pm SEM (A). Mefloquine, amitriptyline and nortriptyline plasma concentrations (nM) (B), and spinal cord (C) and brain (D) concentrations (pmol/mg of protein), were also assessed 7 hours after amitriptyline or THN101 *per os* treatment (whisker boxes).

2.4.3 Contribution of descending controls of pain in THN101 and mefloquine action

We next explored the mechanism of THN101 potentiation of amitriptyline action by studying the role aminergic pathways, primary targets of amitriptyline. We more specifically addressed the respective role of descending and of peripheral pathways (Kremer et al., 2018). To verify the involvement of descending controls of pain, we performed i.t. injections of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the thoracic area to destroy passing noradrenergic fibers two weeks before the cuff surgery. In these mice, we first observed that the administration of an oral VEH solution did not affect the time-course of the paw withdrawal thresholds (Group*Time effect, $F_{4,56}=1.22$, $p=0.315$) (Figure 16A, left). A week later, we tested THN101 and observed that its action was significantly stronger in the non-lesioned mice (saline i.t.) than in the lesioned ones (6-OHDA i.t.) from 4 to 7 h after administration (Group*Time effect, $F_{4,56}=4.69$, $p=0.0024$; post-hoc: Saline>6-OHDA at 4 h $p=0.050$ and at 7 h $p=0.0001$) (Figure 16A, right).

To test the involvement of the sympathetic system, we injected guanethidine i.p. for five days beforehand, which does not cross the blood-brain barrier and destroys sympathetic sprouting (Bohren et al., 2013). This peripheral lesion did not impact on the THN101 sustained relief of mechanical hypersensitivity, as tested 12 h after oral administration (Treatment effect, $F_{1,16}=36.73$, $p<2.10^{-5}$; Lesion*Treatment effect, $F_{1,16}=0.002$, $p=0.96$; post-hoc: THN101 action similar between both groups at $p=0.80$) (Figure 16B).

The above data were supportive of a critical role of descending noradrenergic pathways in the action of THN101.

We then tested whether mefloquine alone at a higher dose may have an effect on mechanical sensitivity and, if so, whether descending pain control pathways contributed or not. We thus administered 0.4 mg/kg mefloquine *per os* to cuff animals whose descending pathways were or not lesioned, and observed that mefloquine relief of hypersensitivity was lost after lesion (Lesion*Treatment*Time effect, $F_{4,92}=17.53$, $p<1.10^{-6}$, post-hoc: Saline/MEF>6-OHDA/MEF, at 1 h $p=0.010$, at 2 h $p<1.10^{-5}$) (Figure 16C). This finding suggested that mefloquine component of action may be spinal.

To support a potential spinal action of mefloquine in THN101 combination, we administered mefloquine i.t. after an oral administration of 10 mg/kg amitriptyline. Two hours after this procedure, the combination provided a significant improvement in paw withdrawal thresholds compared to mice which received one only of the treatments (Group*Time, $F_{6,62}=3.26$, $p=0.007$; post-hoc: MEF/AMI > all other groups at 2 h $p<0.002$) (Figure 16D).

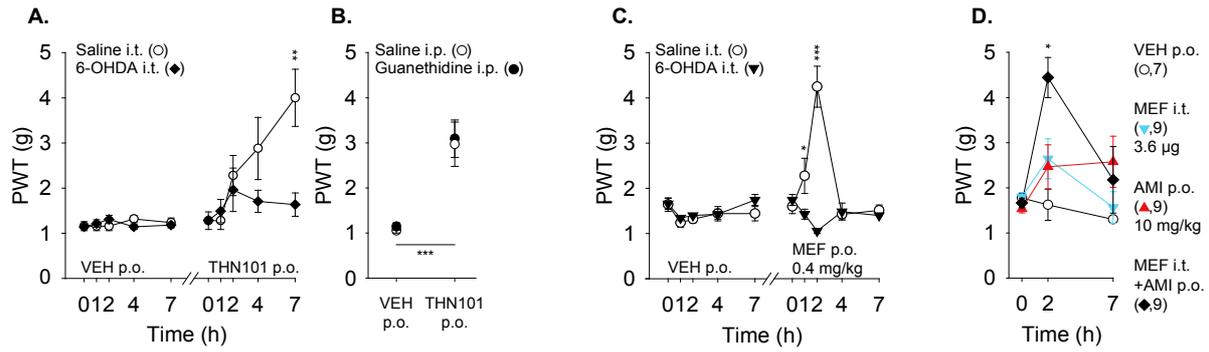


Figure 16. Central descending controls of pain are necessary to the action of THN101 and of mefloquine

All experiments were conducted in Cuff mice. The mechanical hind paw withdrawal thresholds (PWT) were assessed using von Frey filaments in mice 2-3 weeks after cuff surgery. Central (A) and peripheral (B) lesions were performed before surgery, and vehicle and THN101 *per os* treatments tested over 7 h. Similarly, vehicle and mefloquine (0.4 mg/kg) treatments were also tested (C). Central (i.t.) administration of mefloquine (i.t.) combined or not to oral administration of amitriptyline (10 mg/kg) was tested (D). Results are expressed as mean \pm SEM.

2.4.4 Adrenergic mechanism of action of THN101 combination

The efficacy of amitriptyline in neuropathic pain has been shown to be mediated by the action of noradrenaline on either α or β adrenergic receptors, depending on the considered mechanism (Kremer et al., 2018). To precise the mechanism recruited by THN101, we tested the respective contribution of these receptors.

Propranolol or yohimbine were delivered via drinking water, which had no effect *per se* on mechanical sensitivity thresholds (PS *vs.* PA on **Figure 17A**), as previously reported (Kremer et al., 2018). We thus tested THN101 action and observed that its lasting action on mechanical hypersensitivity remained present under propranolol treatment but was suppressed under yohimbine treatment (**Figure 17A**) (Group*Time effect, $F_{10,90}=4.88$, $p<1.10^{-5}$; post-hoc: THN101>all others groups at 12 h $p<0.05$, THN101>all others groups except PRO-THN101 at 16 h $p<0.05$). This finding was further illustrated by the area under the curve (calculated for each mouse above its pre-administration (PA) threshold) (**Figure 17A**, right) (Group effect, $F_{3,35}=8.31$, $p=2.10^{-4}$; post-hoc: THN101>YOH-THN101 and VEH at $p<5.10^{-4}$ and PRO-THN101>YOH-THN101 and VEH at $p<0.02$). This experiment highlighted a preferential role of α_2 -adrenergic receptors in THN101 action. As tests were conducted on the day following THN101 administration while adrenergic receptor blockade was continuous, we then tested whether α_2 -adrenergic receptors were more specifically involved in the induction and/or the expression of

THN101 action. To test this mechanistic aspect, yohimbine was delivered i.p. either at the same time as THN101 administration (induction) or 30 min before testing time (expression). When yohimbine was given at the same the time as THN101, THN101 action was no longer found 12 h later (**Figure 17B**, left), while its effect was still present when providing yohimbine 30 min before the final test (**Figure 17B**, right) (Group*Time effect, $F_{6,52}=6.18$, $p<7.10^{-5}$; post-hoc: THN101>YOH0-THN101 at 12 h and 16 h $p<0.05$). These data supported a preferential role of α_2 -adrenergic receptors in the induction of THN101 lasting action.

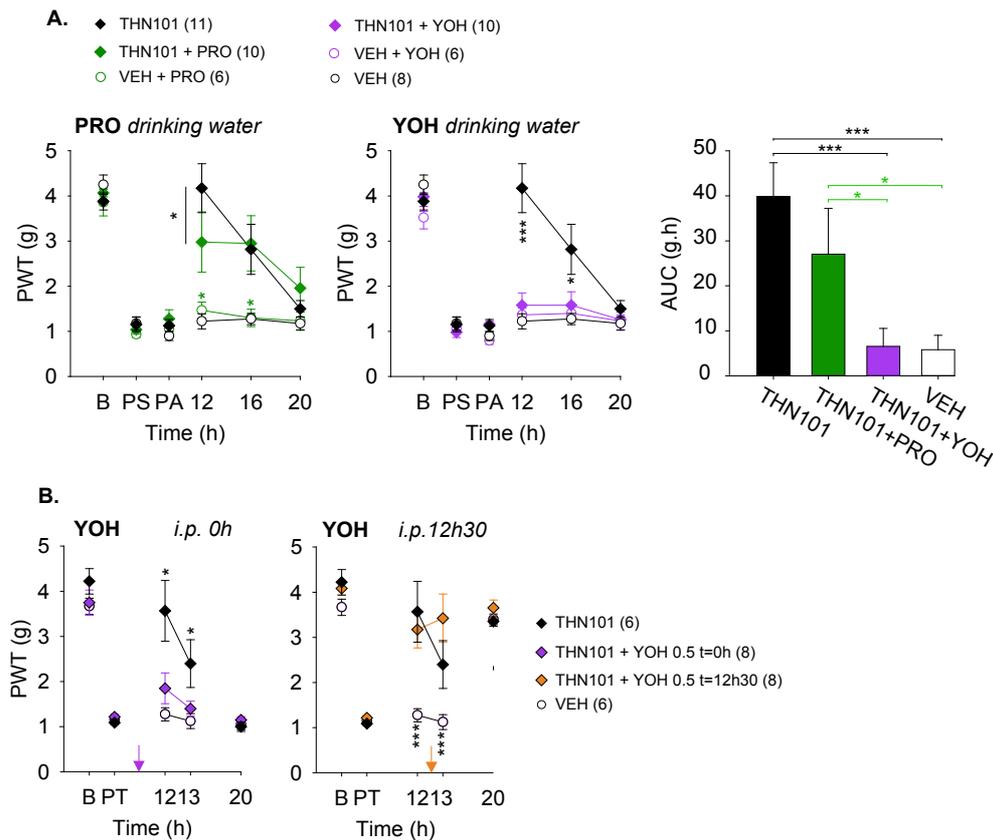


Figure 17. THN101 anti-allodynic action is mediated by α_2 -adrenoceptors in mice.

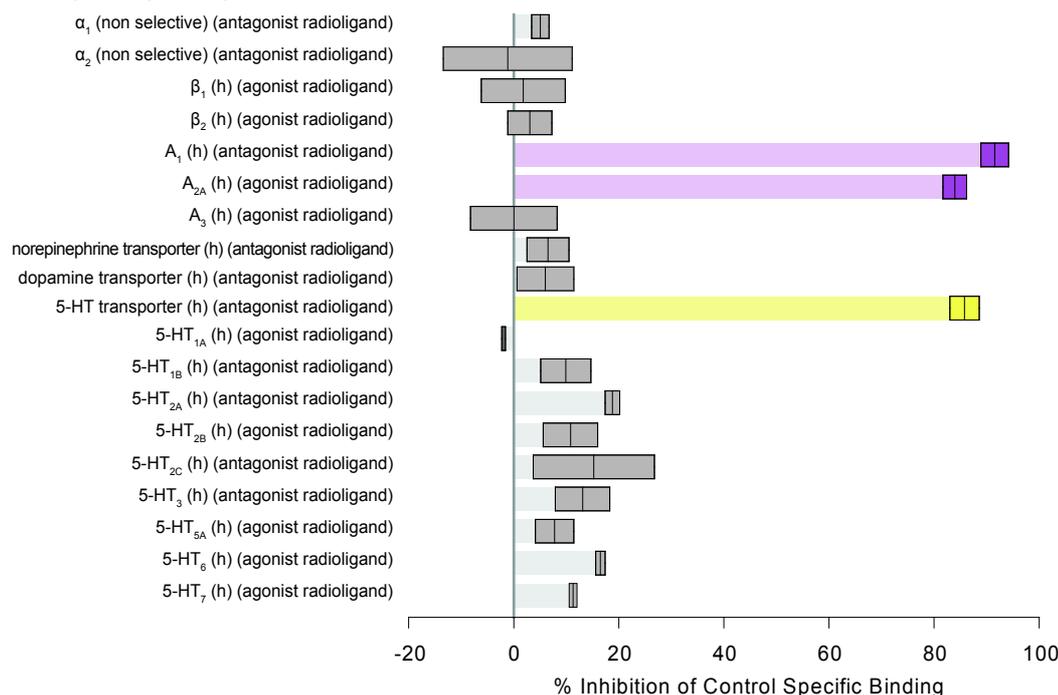
All experiments were conducted in Cuff mice. The mechanical right hindpaw withdrawal threshold (PWT) was assessed with von Frey filaments before surgery (B: baseline), the mean of post-surgical values before antagonist oral delivery in drinking water is displayed as PS (post-surgery baseline) and the value before oral THN101 administration as PA (pre-administration), for i.p. delivery of yohimbine the mean of post-surgical values before THN101 treatment is displayed as PT (pre-treatment). In a first experiment, the β_2 (propranolol, PRO) and α_2 (yohimbine, YOH) adrenergic receptor antagonists time-course of THN101 action were delivered through the drinking water (A). In a second experiment, yohimbine was injected i.p. either at the same time as THN101 (left graph) or 30 min before final test (right graph) (B). Results are expressed as mean \pm SEM.

2.4.5 Contribution of mefloquine in the mechanisms of action of THN101

The previous experiments allowed to determine the mechanism related to the amitriptyline components of THN101, i.e. a spinal recruitment of noradrenergic descending leading to a recruitment of α_2 adrenergic receptors. We then explored further the mefloquine component of THN101 action, first through the analysis of potential relevant targets besides its known action on gap junctions (Cruikshank et al., 2004) that has already been shown to be relevant in a few hundred nM range (Jeanson et al., 2016). The *in vitro* binding essays showed that 1 μ M mefloquine does not directly target noradrenaline and dopamine uptake sites or α and β adrenergic receptors (**Figure 18A**), even though yohimbine was able to antagonize the action of a mefloquine alone at high dose (Group*Time, $F_{4,40}=11.16$, $p<5.10^{-6}$; post-hoc: MEF/saccharine>MEF/yohimbine at 2 h $p<2.10^{-5}$, 4 h $p<2.10^{-4}$ and 7 h $p=0.019$) (**Figure 19A**). The analyses also reported a lack of direct binding to a wide range of other tested targets (**Figure 18A** and **Supplemental Figure 1**). This analysis however showed a potential action (*i.e.* at least 50% binding displacement at 1 μ M) for: i) the adenosine receptors A_1 and A_{2A} , on which mefloquine displayed an antagonistic action (**Figure 18A, B**), and ii) the serotonin transporter pathway, also with an antagonistic action (**Figure 18A, B**).

To evaluate the possible contribution of these targets to the mefloquine component of THN101, we tested *in vivo* whether they selective manipulation may also amplify amitriptyline action. Neither the serotonin uptake inhibitor fluoxetine (Group*Time effect, $F_{8,72}=6.18$, $p=0.52$) (**Figure 19B**), nor the adenosine A_1 antagonist DPCPX (Time*Group ANOVA, $F_{8,60}=1.32$, $p=0.24$) (**Figure 19C**) or A_{2A} antagonist SCH58261 (Time*Group ANOVA, $F_{16,52}=0.59$, $p=0.88$) (**Figure 19D**) did amplify amitriptyline action. However, the concomitant i.t. blockade of gap junctions by carbenoxolone led to potentiate the action of oral amitriptyline (Group*Time, $F_{6,40}=5.65$, $p=2.52.10^{-4}$; post-hoc: AMI+CBX>all the other groups at 2 h $p>0.0048$) (**Figure 19E**). These data suggested that mefloquine may preferentially improve amitriptyline effect through its targeting of gap junctions.

A. Mefloquine 1 μ M - duplicates



B.

Binding assay	Radioligand	IC50	Ki	nh
A ₁ (h) (antagonist radioligand)	[³ H]DPCPX	2.0E-07 M	1.3E-07 M	1.1
A _{2A} (h) (agonist radioligand)	[³ H]CGS21680	1.1E-07 M	9.0E-08 M	0.9
5-HT transporter (h) (antagonist radioligand)	[³ H]imipramine	1.9E-07 M	8.6E-08 M	1.1

Functionnal assay	Referent	EC50	IC50	KB
A1(h) (agonist effect)	CPA	n.c.		
A2A(h) (agonist effect)	NECA	n.c.		
A1 (h) (antagonist effect)	DPCPX		1.8E-09 M	4.5E-10 M
A2A(h) (antagonist effect)	ZM 241385		3.2E-10 M	3.4E-11 M
5-HT uptake	imipramine		3.0E-08 M	

Figure 18. Evaluation of mefloquine pharmacological potential targets *in vitro*.

In vitro determination of pharmacological targets of mefloquine at 1 μ M (A). Binding and functional properties of mefloquine on relevant adenosine and serotonin targets (B). Abbreviations: α_1 : alpha 1 adrenergic receptor; α_2 : alpha 2 adrenergic receptor; β_1 : beta 1 adrenergic receptor; β_2 : beta 2 adrenergic receptor; A₁: adenosine receptor A₁; A_{2A}: adenosine receptor A_{2A}; A₃: adenosine receptor A₃. DPCPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; CPA: N6-Cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine.

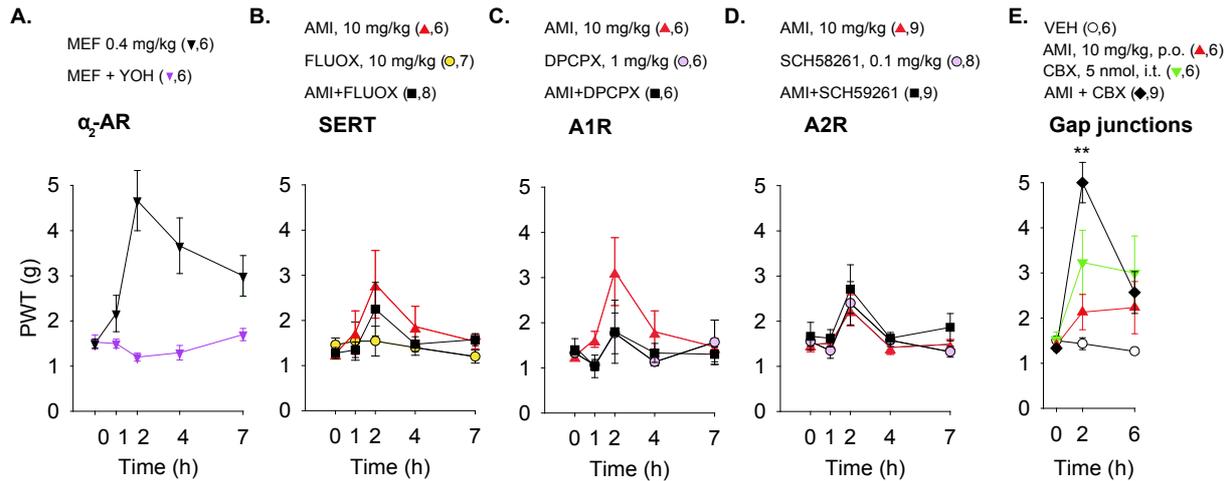


Figure 19. Evaluation of mefloquine pharmacological potential targets *in vivo*.

All experiments were conducted in Cuff mice. The mechanical right hindpaw withdrawal threshold (PWT) was assessed with von Frey filaments. We tested the role of α_2 adrenergic receptors in THN action with yohimbine (YOH) (A), and we tested whether the serotonin uptake (SERT) inhibitor fluoxetine (B), the adenosine A1 receptor antagonist DPCPX (C), the adenosine receptor A2 antagonist SCH59261 (D) and the gap junction blocker carboxolone (CBX) (E) may potentiate oral amitriptyline action. Results are expressed as mean \pm SEM.

2.5 Discussion

In the present study, we showed that mefloquine can prolong the effect of the tricyclic antidepressant amitriptyline on mechanical hypersensitivity in a mouse model of neuropathic pain. Dosage and pharmacological approaches allowed us to highlight some mechanistic features of this potentiation, pointing toward a role of descending noradrenergic pathways, α_2 adrenergic receptors and gap junctions.

A single THN101 (amitriptyline/mefloquine combination) administration led to a long-lasting (around 16 h) effect on the mechanical hypersensitivity of mice with sciatic nerve compression. A first potential mechanism to test was the possibility that mefloquine may interfere with *in vivo* amitriptyline pharmacokinetics or bioavailability. Using mass spectrometry, we thus evaluated blood, plasma, spinal and brain levels of amitriptyline, of its active metabolite nortriptyline, and of mefloquine, after THN101 administration. If the potentiation role played by mefloquine was metabolism-mediated, one would expect to find an increase in nortriptyline levels in the treated THN101 group, which was not the case. Mefloquine did not alter amitriptyline or nortriptyline levels in these tissues. Indeed, amitriptyline is metabolized by the cytochrome P450 system, mainly by the CYP2C19 enzyme, which allows the formation of its active metabolite, nortriptyline, by demethylation (Norkus et al., 2015). Mefloquine, on the other hand,

is metabolized by the same system, in particular by the enzyme CYP3A4 which allows the formation of a major non-active metabolite in malaria, carboxymefloquine, and to a lesser extent hydroxymefloquine (Fontaine et al., 2000). Although amitriptyline can be metabolized by other P450 complex enzymes depending on the doses administered (Linden et al., 2008), the role of the CYP3A4 enzyme appears to be minor (Venkatakrisnan et al., 2001).

To explore the mechanism of THN101, we then analyzed the target mechanism of its drug components. We thus tested the two mechanisms that have been identified for antidepressant-mediated relief of mechanical hypersensitivity (Kremer et al., 2016; Kremer et al., 2018). The peripheral component of antidepressant drugs relies on the recruitment of noradrenergic fibers in the dorsal root ganglia associated to the lesioned nerve, the downstream action being mediated by β_2 -adrenergic receptors on non-neuronal cells and leading to a relief of the neuroimmune phenomena induced by the nerve lesion (Bohren et al., 2013; Kremer et al., 2018). The guanethidine experiment, leading to a sympathectomy, and the use of the β -adrenergic receptor antagonist propranolol converged to show that this peripheral component was not critical to THN101 prolonged action. On the other hand, a central mechanism for antidepressant drug action on neuropathic also exists (Ardid et al., 1995 ; Kremer et al., 2018), relying on the recruitment of descending inhibitory controls of pain (Millan, 2002) and on spinal α_2 -adrenergic receptors. The intrathecal 6-OHDA experiment together with the use of the α_2 -adrenergic receptor antagonist yohimbine highlighted that THN101 potentiating action relied on this spinal mechanism. Interestingly, beyond amitriptyline, this central component appeared to be also critical to mefloquine itself at high dose, which supports a convergence of anatomical targets between the two drug components of THN101.

Mefloquine has been known to inhibit gap junctions (Cruikshank et al., 2004), but this drug could also act on other targets. The screening of 80 putative targets indeed suggested that mefloquine may act below μM range on serotonin reuptake as well as on adenosine receptors A_1 and A_{2A} , in each case with blocker/antagonist properties. We thus tested the potential implication of these targets by using selective drugs in combination to amitriptyline. The potential influence of mefloquine on serotonin reuptake is unlikely relevant as the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine did not improve amitriptyline action. This observation is in line with the fact that fluoxetine is ineffective in relieving neuropathic pain, both clinically (Dharmshaktu et al., 2012) and in the cuff model that we used (Benbouzid et al., 2008; Barthas et al., 2017; Salvat et al., 2017). The manipulation of adenosine receptors is known to significantly modulate nociceptive symptoms (Sawynok, 2016). However, blocking adenosine A_1 and A_{2A} receptors did not improve amitriptyline action, which suggested that these targets may also not be critical in

THN101 action. On the other hand, the intrathecal delivery of another gap junction blocker, carbenoxolone, amplified amitriptyline effect on mechanical hypersensitivity, which was supportive of gap junctions as a relevant target in potentiating antidepressant drug action on neuropathic pain.

Our data indicate that amitriptyline action can be potentiated by the anti-malaria drug mefloquine. While studies have reported that in its present clinical use mefloquine can have psychiatric adverse effects (Caillon et al., 1992; Keiser et al., 2014; Petersen et al., 2006), the doses used in the indication of malaria are in a much higher range than those necessary to improve amitriptyline action. The present data thus support the interest of a clinical assessment of the THN101 drug combination in neuropathic pain patients.

Conflict of interest statement

This work was co-funded by a collaboration between the Theranexus Company and the Centre National de la Recherche Scientifique. BL, FM, MD and MC are employees of Theranexus.

Acknowledgments

This work was supported by Theranexus, Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (Convention Industrielle de Formation par la Recherche 2016/0621), Centre National de la Recherche Scientifique (UPR3212 and UMR5293), Université de Strasbourg, Agence Nationale de la Recherche (Euridol ANR-17-EURE-0022).

3 Travaux complémentaires

3.1 Analyse de l'impact du THN101 dans la moelle épinière

3.1.1 Contexte

Cette expérience s'inscrit dans l'analyse des effets du THN101 dans le système nerveux. L'objectif était de déterminer un élément moléculaire impacté par le THN101 par immunomarquage. Nous avons voulu cibler la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), car cette protéine est notamment un biomarqueur de l'activation astrocytaire. Dans des modèles de douleurs, une augmentation de l'expression protéique de GFAP est souvent retrouvée après l'induction d'une douleur, notamment au sein de la corne dorsale de la moelle épinière (cf. section 4, [Letellier et al., en préparation](#)). De plus, l'action antinociceptive de certains traitements s'accompagne d'une diminution de l'expression de la GFAP.

Dans cette expérience, nous avons voulu déterminer si dans notre modèle une telle modulation avait lieu au sein de la moelle épinière au niveau lombaire, directement relié au nerf sciatique, et si un traitement au THN101 permettait de rétablir ou non les modifications potentiellement induites par l'induction d'une neuropathie.

3.1.2 Matériel et méthodes

Concernant les animaux, leur hébergement et les traitements administrés, nous nous sommes mis dans les mêmes conditions que dans les travaux décrits précédemment (cf. section 2). Dans cette expérience, trois groupes d'animaux ont été répartis selon ce qui suit : un groupe de 9 souris sham traitées au placebo, un groupe de 9 souris « cuff » traitées au placebo et un groupe de 9 souris « cuff » traitées au THN101 (amitriptyline 10 mg/kg et méfloquine 0,1 mg/kg, administrées par gavage oral). Avant le traitement, la sensibilité mécanique statique des pattes arrière des souris a été évaluée avant et après chirurgie. Deux semaines après la chirurgie, la solution placebo ou le THN101 ont été administrés aux animaux, 7 heures après les souris ont été perfusées afin de récolter les segments lombaires de leur moelle épinière. Les échantillons de moelle épinière ont par la suite été post-fixés avant d'être cryo-protégés, inclus et stockés.

Nous avons ensuite réalisé des sections de moelle épinière de 12 μm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat. Les coupes ont été déposées sur lames, incubées avec l'anticorps primaire de lapin anti-GFAP (US Biological,) dilué au 1/1000, puis avec l'anticorps secondaire d'âne anti-CY3 (Jackson Laboratories) à 1/1000 avec des rinçages successifs entre chaque étape. Les images ont

été recueillies et analysées à l'aide de l'appareillage et du logiciel associés au scanner de lames Nanozoomer[®]. Nous avons calculé la densité du marquage GFAP dans la corne dorsale de la moelle épinière ipsilatérale, que nous avons normalisée par rapport à la densité mesurée dans la partie controlatérale correspondante.

3.1.3 Résultats

Le ratio entre la densité de marquage GFAP dans la corne dorsale de la moelle épinière ipsilatérale et celui de la patte controlatérale est en moyenne de **1,44** ± 35,1 dans le groupe sham traité au placebo, **26,42** ± 42,7 dans le groupe « cuff » traité au placebo et **11,15** ± 37,9 dans le groupe « cuff » traité au THN101. L'analyse globale des résultats ne montre donc pas de différence significative entre les groupes (Chi², p=0.71653). En particulier, elle ne montre pas de présence/persistance d'une induction significative de GFAP chez les animaux « cuff » à 2 semaines après la chirurgie et mise en place du *cuff* autour du nerf sciatique.

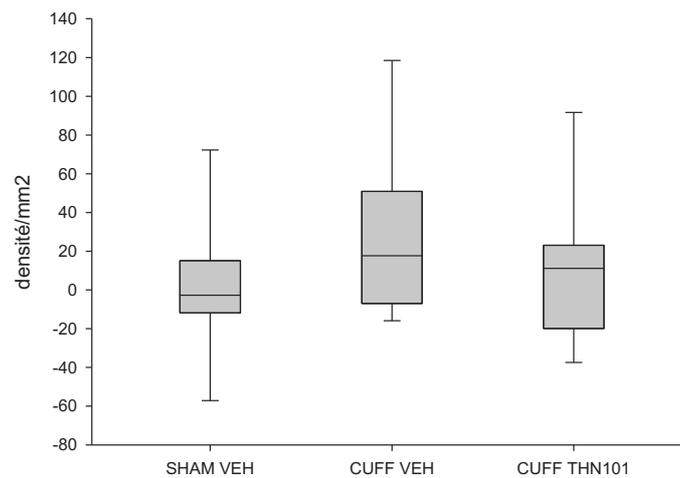


Figure 20. Densité du marquage GFAP dans la corne dorsale de la moelle épinière

3.2 Traitements chroniques : évaluation de l'impact de la connexine 43 dans l'action du THN101 dans la douleur neuropathique

En parallèle des travaux de l'article, nous avons essayé de trouver d'autres approches pour déterminer le mécanisme d'action chronique du traitement THN101 chez nos animaux, dont la synthèse et l'analyse vous sont brièvement présentées ci-après.

3.2.1 Mise en place d'une autre approche chronique

Pour tenter de diminuer la variabilité de réponse des souris aux différents traitements d'amitriptyline administrés, nous nous sommes rapprochés d'une entreprise américaine (Innovative Research of America) qui fabrique des pastilles à diffusion sous-cutanée lente et progressive de médicaments à destination de la recherche animale. Notre objectif était de standardiser la procédure de traitement chronique d'amitriptyline et d'obtenir une absorption continue et mieux contrôlée du produit. De plus, cette méthode présentait l'avantage de ne nécessiter qu'une seule intervention chez l'animal pour toute la durée du traitement, assurant un gain de temps et de reproductibilité. Néanmoins, nous avons constaté le décès de nos animaux après la mise en place des pastilles à cause d'une surdose d'amitriptyline. Après prélèvements, nous avons retrouvé des taux plasmatiques d'amitriptyline et de nortriptyline bien supérieurs à ceux attendus dans le cas d'une diffusion lente et progressive (12-17 μM et 3-7 μM respectivement).

3.2.2 Analyse moléculaire des cibles de l'amitriptyline

En parallèle des travaux de l'article et dans l'espoir de trouver une approche permettant d'observer un effet de l'amitriptyline et du THN101 par traitement chronique chez nos animaux, nous avons lancé un protocole pour étudier les cibles moléculaires mises en jeu. Pour cela, nous avons d'abord voulu étudier le traitement chronique à l'amitriptyline seul, pour pouvoir l'appliquer par après au THN101. Nous avons donc suivi la sensibilité mécanique des souris avant et après chirurgie et avons administré dans un des groupes de l'amitriptyline à une concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par voie orale (eau de boisson) pendant trois semaines. A l'issue de ces traitements, nous avons prélevé le cerveau, la moelle épinière et les ganglions rachidiens dorsaux afin d'en extraire les ARN qui auraient pu être analysés avec le système microfluidique de puces Fluidigm. Nous avons extrait et dosé ces ARN, cependant les résultats comportementaux acquis pendant cette période nous ont redirigés vers une approche aiguë, écartant de fait une analyse mécanistique plus globale à partir de traitements chroniques. Ces échantillons sont sauvegardés au laboratoire et pourront profiter à une étude des cibles de l'amitriptyline dans le traitement de la douleur neuropathique.

3.2.3 Mise en place d'une lignée transgénique

Pour étudier spécifiquement l'effet d'une suppression de la connexine 43 astrocytaire, nous sommes entrés en contact avec une équipe du Collège de France qui dispose d'une lignée dont le

gène de la connexine 43 peut être supprimé spécifiquement dans les astrocytes. En aout 2017, nous avons pu bénéficier par courtoisie d'un mâle (GFAP-Cre^{0/+} : Cx43^{fl/fl}) et d'une femelle (GFAP-Cre^{0/0} : Cx43^{fl/fl}) qui nous ont permis de mettre en place cette lignée dans l'animalerie du Chronobiotron. Malheureusement, la femelle, âgée, est morte de dystocie peu après. Nous avons donc dû faire accoupler le mâle restant avec deux femelles C57BL/6J afin de générer la lignée. Le temps nécessaire à la mise en place de cette lignée, le faible succès de reproduction des générations et les résultats erratiques obtenus sur les quelques souris issues de cette reproduction ne nous ont pas permis de générer des résultats exploitables. La lignée a été terminée ce début 2020.

4 Discussion générale

Le but de ces travaux de thèse a été en premier lieu de valider une procédure expérimentale qui démontre une supériorité d'action antinociceptive du THN101, combinaison d'amitriptyline et de méfloquine, dans le modèle du *cuff* chez la souris, en comparaison à l'amitriptyline qui constitue un traitement de référence. Après des mois de mise au point, nous avons pu établir un protocole qui permet de mesurer un tel effet après une administration aiguë orale et ainsi en déterminer la pharmacocinétique et le mécanisme d'action.

L'évaluation des effets de la combinaison TH101 chez la souris a été réalisée en mesurant l'évolution de la sensibilité mécanique des pattes arrière des animaux par des tests de von Frey, après l'induction d'une neuropathie périphérique par la chirurgie du *cuff* (*cf.* **Figure 13** et **Figure 14**). Pour que cette évaluation soit la plus complète possible, nous avons comparé les effets de l'amitriptyline et de la méfloquine séparément à différentes doses, pour déterminer finalement les doses du THN101 à utiliser chez la souris pour les expériences suivantes. En nous basant sur l'action antinociceptive aiguë de l'amitriptyline ([Kremer et al., 2018](#)), nous avons démontré que la méfloquine permettait une prolongation de l'effet antinociceptif de l'amitriptyline jusqu'à huit fois plus longtemps que l'amitriptyline seule aux mêmes doses.

Par une étude de pharmacocinétique par spectrométrie de masse (*cf.* **Figure 15**), nous avons pu déterminer l'évolution des concentrations d'amitriptyline, de nortriptyline (un de ses métabolites actif), et de méfloquine dans le sang, le plasma, la moelle épinière et le cerveau dans la période où nous avons retrouvé un effet antinociceptif de la combinaison THN101. Cette étude nous a permis de montrer que la méfloquine n'affecte ni la biodisponibilité ni le catabolisme de l'amitriptyline ou de la nortriptyline chez la souris.

Une fois ces observations faites, nous avons voulu comprendre quel mécanisme d'action était à l'origine de cette potentialisation. Par une approche lésionnelle (*cf.* **Figure 16**), nous avons montré que les contrôles descendants inhibiteurs de la douleur étaient essentiels à la manifestation de l'effet antinociceptif du THN101, alors que la composante périphérique de l'amitriptyline ne semblait pas impliquée. Ces résultats sont en concordance avec les données de la littérature, qui montrent que l'amitriptyline met en jeu de façon aiguë les contrôles inhibiteurs noradrénergiques de la douleur ([Hiroki et al., 2017](#) ; [Kremer et al., 2016](#)). En outre, il nous a fallu déterminer les cibles pharmacologiques mises en jeu par la combinaison THN101, en évaluant la contribution respective des cibles directes et/ou indirectes de l'amitriptyline et des cibles directes

de la méfloquine. Nous avons montré que la mise en jeu des récepteurs α_2 -adrénergiques, indirectement ciblés par l'amitriptyline (Di Cesare Mannelli et al., 2016 ; Kremer et al., 2018), était requise dans la mise en place de l'effet du THN101 mais pas nécessairement dans son expression (cf. **Figure 17**). De plus, les récepteurs β -adrénergiques, mis en jeu par les antidépresseurs lors d'un traitement chronique (Bohren et al., 2013 ; Choucair-Jaafar et al., 2009), ne semblent pas être des acteurs majeurs dans l'effet aigu de la combinaison. Enfin, nous avons étudié les cibles pharmacologiques potentielles de la méfloquine en confrontant *in vivo* des cibles candidates issues d'une étude *in vitro*, soulignant une interaction possible de la méfloquine avec les récepteurs purinergiques A_1 et A_{2A} , ainsi que le transporteur de sérotonine (cf. **Figure 18 et Figure 19**). L'hypothèse d'une action de ces cibles a été écartée au profit d'une action principale sur les jonctions communicantes.

Dans cette discussion générale, nous discuterons de la mise en œuvre des travaux présentés précédemment et nous mettrons en perspective nos résultats en essayant de répondre aux hypothèses mécanistiques impliquées dans les effets du THN101.

4.1 De la mise au point à l'étude mécanistique : validité des approches

Au départ, nous avons rencontré des difficultés à observer chez nos animaux une réponse à l'amitriptyline qui soit à la fois dose-dépendante et reproductible, rentrant parfois en contradiction avec des résultats précédents de l'équipe. Le choix de donner le traitement aux animaux par voie orale a été fait pour se rapprocher au maximum des conditions cliniques. Afin de pouvoir contrôler au mieux la dose de traitements à laquelle les animaux seraient exposés, nous avons opté pour une administration des traitements par gavage. Cependant, nous n'arrivions pas à mesurer d'effet antinociceptif chronique avec l'amitriptyline. Lors de ces expériences, nous ne traitons les animaux qu'une fois par jour avec un test effectué le lendemain, alors que toutes les études de l'équipe portant sur l'effet analgésique de certains antidépresseurs ont utilisé des protocoles d'administration chronique d'amitriptyline par voie systémique (i.p.), avec deux administrations journalières (Benbouzid et al., 2008). Il semblerait donc, que la voie d'administration soit i.p. ou orale, qu'une seule administration par jour d'amitriptyline soit insuffisante pour obtenir un soulagement de l'hypersensibilité mécanique toujours présent le lendemain.

Les premiers protocoles d'administration de l'amitriptyline *via* l'eau de boisson, qui permet d'étendre l'exposition sur toute la durée de prise hydrique des animaux, ont permis d'observer un soulagement de l'hypersensibilité mécanique des souris entre 10 et 15 jours après le

début du traitement à 100 µg/mL. Cela est plus tardif qu'avec la dose habituelle de 200 µg/mL que l'équipe a utilisé précédemment pour étudier les mécanismes des antidépresseurs (Kremer et al., 2018). Nous souhaitons en effet nous positionner à une dose intermédiaire, rendant possible une éventuelle potentialisation par la méfloquine (notre hypothèse étant que cette dernière allait permettre d'observer un effet plus précoce). En l'occurrence, à la dose choisie, nous avons observé un effet antialloodyne net de la combinaison avec la méfloquine à 0,3 et 0,9 mg/kg, administrée par voie intrapéritonéale. Cependant, nous avons noté qu'il aurait été nécessaire d'avoir dans ces expériences des groupes contrôle traités à la méfloquine seule, en raison d'une augmentation de variabilité ou d'effet propre de la méfloquine à ces doses. Au final, avec les différentes doses d'amitriptyline que nous avons utilisées, la méfloquine n'a pas permis pas une diminution plus rapide ou plus important de l'hypersensibilité mécanique ipsilatérale des souris. Dès lors, nous nous sommes interrogés quant aux paramètres à modifier afin de poursuivre l'étude sur la base d'un protocole fiable nous permettant d'analyser plus en détail le mécanisme d'action du THN101. Indépendamment de ce qui a été fait jusqu'alors, l'équipe a aussi subi une période, traversée par le début de cette thèse, au cours de laquelle nous avons fait face à des difficultés transitoires dans les expériences comportementales. En effet, l'ensemble des travaux de l'équipe a pendant près d'un an, voire deux, constaté une variabilité importante dans les données comportementales du modèle du *cuff* et dans l'effet des traitements, sans qu'une cause précise ait pu être identifiée. Nous n'avons ainsi pas pu déterminer si ces problèmes provenaient des fournisseurs des animaux, de leur élevage, de leur génétique, de leur nourriture ou s'ils étaient liés aux installations de l'animalerie, à un changement dans la composition de la nourriture, etc. Bien que transitoires, ces difficultés peuvent avoir contribué au manque de reproductibilité des premières expériences avec le THN101.

Après avoir comparé nos méthodes avec celles des autres travaux de l'équipe, nous avons conclu qu'il serait intéressant d'évaluer la faisabilité d'une étude du THN101 sur la base de traitements aigus, pour laquelle une action antinociceptive de l'amitriptyline avait été récemment mise en évidence (Kremer et al., 2018), et qui pourraient apporter l'assurance d'une meilleure fiabilité des résultats. Nous avons aussi relevé que la souche de souris que nous avons utilisée jusqu'alors était sensiblement différente de celle utilisée habituellement au laboratoire. En effet, nous avons travaillé pendant cette période initiale avec des souris issues d'une lignée C57BL/6J_{OlaHsd} (Envigo) dont nous avons ensuite relevé qu'elle présentait une délétion génétique au niveau du locus correspondant à l' α -synucléine (Specht et Schoepfer, 2004). Cette protéine est normalement présente dans le système nerveux, mais son accumulation dans les corps de Lewy est impliquée dans la physiopathologie la maladie de Parkinson. Le rôle de cette

protéine dans la maladie est encore mal connu, et des corrélats entre la perte d'expression de cette protéine et les fonctions sensorielles ou la douleur n'ont à notre connaissance pas été reportés dans la littérature. Même s'il existe une comorbidité importante entre la maladie de Parkinson et des douleurs chroniques (Faivre et al., 2019), la plupart des modèles animaux de la maladie en lien avec l' α -synucléine la surexpriment. De plus, les souris déficientes en α -synucléine ont un taux de recapture de dopamine plus bas que chez des souris non déficientes (Chadchankar et al., 2011). Il n'est donc pas impossible que l'absence d' α -synucléine soit susceptible de jouer un rôle dans la réponse au THN101, composé d'un antidépresseur à composante aminergique. Réflexion faite, nous avons décidé de reprendre une souche qui ne présente pas cette modification génétique, nous avons donc opté pour des souris C57BL/6J (Charles River) « classiques » dans les travaux ultérieurs.

D'autre part, une autre difficulté à laquelle nous avons fait face est le fait que l'efficacité du THN101 est médiée par deux composés qui ont une pharmacodynamie différente. On observe cette différence dans le modèle avec lequel nous avons travaillé où le pic de concentration d'amitriptyline dans le sang est obtenu au maximum une heure après administration, alors que pour la méfloquine il se situe au minimum à 7 heures (cf. **Figure 15**). Nos travaux d'analyse de la composante adrénergique du THN101 ont soulevé l'importance des récepteurs α_2 -adrénergiques dans l'induction de l'effet du THN101, mais pas dans sa persistance (cf. **Figure 17**). De ce fait, tout laisse à penser que la potentialisation de l'effet antinociceptif de l'amitriptyline (cf. **Figure 13**) est dû à la rémanence de la méfloquine dans l'organisme, l'effet comportemental observé étant présent jusqu'à 16 heures après administration (cf. **Figure 14**, gauche). Par ailleurs, les obstacles rencontrés lors de nos protocoles de traitements chroniques peuvent aussi avoir été dus pour partie à cette différence de pharmacodynamie. En effet, injecter de manière quotidienne de la méfloquine, dont l'effet pharmacologique toujours mesuré 16 heures après administration suggère qu'elle est toujours présente dans le sang, favoriserait *de facto* une accumulation du produit dans l'organisme, et l'augmentation de sa concentration dans le sang pourrait diriger *in fine* son spectre d'action vers d'autres cibles biologiques. Néanmoins, nous avons voulu répondre à la question soulevée par ce raisonnement en répétant pendant 5 jours une administration du THN101 aux doses déterminées (cf. **Figure 14**, droite). Cette expérience a montré que l'effet bénéfique du THN101 était conservé. Pour aller plus loin, il serait intéressant de renouveler l'expérience en la menant sur un temps plus long, avec un contrôle à période régulière des taux d'amitriptyline et de méfloquine dans le sang, afin de déterminer les seuils d'exposition de méfloquine à atteindre pour que l'effet du THN101 soit présent.

4.2 Analyse mécanistique du THN101

4.2.1 Contrôles descendants de la douleur et action spinale

D'après les données issues des travaux de l'équipe, les différentes classes d'antidépresseurs utilisés dans le traitement des douleurs neuropathiques agissent sur l'hypersensibilité mécanique au travers de deux mécanismes en partie indépendants (Kremer et al., 2018). D'une part, les antidépresseurs présentent une action rapide en agissant sur les contrôles descendants inhibiteurs de la douleur, favorisant un soulagement de l'hypersensibilité mécanique médié par l'activation des récepteurs adrénergiques α_{2A} spinaux, elle-même provoquée par la libération de noradrénaline. Par ailleurs, ce mécanisme nécessite la coprésence des récepteurs opioïdes μ et δ . D'autre part, les antidépresseurs présentent un mécanisme différé lors de traitements chroniques, qui repose sur les fibres sympathiques ayant bourgeonné dans les ganglions dorsaux suite à la lésion nerveuse périphérique (McLachlan et al., 1993 ; Ramer et Bisby, 1998). Ce mécanisme périphérique des antidépresseurs repose sur une action de la noradrénaline de ces fibres sur les récepteurs adrénergiques β_2 , porté par les cellules satellites au niveau des ganglions rachidiens dorsaux, et va plus spécifiquement jouer sur la neuroinflammation qui accompagne l'atteinte nerveuse. Nos données montrent que la combinaison THN101 amplifie préférentiellement le premier de ces deux mécanismes, jouant sur les contrôles descendants de la douleur.

Les contrôles descendants de la douleur sont les voies neuro-anatomiques impliquées dans la modulation bulbo-spinale des informations nociceptives, qui cheminent le long des faisceaux ventro- ou dorsolatéral pour contacter les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Millan, 2002). Comme certains antidépresseurs utilisés dans le traitement de la douleur neuropathique (Tanabe et al., 2008), l'action du THN101 nécessite que ces contrôles descendants soient fonctionnels. Par exemple, l'action analgésique d'une administration aiguë de clomipramine ou d'amitriptyline peut être supprimée suite à la section de ces voies (Ardid et al., 1995 ; Kremer et al., 2018). Ces voies prennent leur origine au sein du tronc cérébral, dans des régions à composante peptidergique (ocytocine, vasopressine, enképhalines) ou aminergique (dopamine, sérotonine, noradrénaline). Selon les peptides ou les monoamines impliquées, et selon le type de récepteur engagé, les contrôles descendants mis en jeu peuvent avoir une action pronociceptive ou antinociceptive. Une des régions impliquées dans la modulation descendante inhibitrice de la douleur est le locus cœruleus, qui forme des projections noradrénergiques à destination de la moelle épinière (Llorca-Torralba et al., 2016 ; Pertovaara, 2013) et exerce essentiellement son action sur l'information nociceptive à travers les récepteurs adrénergiques α spinaux. L'activation plus particulière des récepteurs adrénergiques α_2 , par exemple par la clonidine ou la xylazine, est

ainsi connue pour être analgésique, comme il l'a été montré chez l'animal ou chez l'Homme (Baidya et al., 2014). Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'action aiguë de l'amitriptyline était supprimée chez souris chez lesquelles les récepteurs adrénergiques α_2 avaient été supprimés par voie transgénique (Özdoğan et al., 2004). De plus, les données de l'équipe ont montré que l'action antinociceptive aiguë d'un autre antidépresseur, la duloxétine, était supprimée par le blocage spécifique des récepteurs adrénergiques α_{2A} par interférence ARN (Kremer et al., 2018). L'ensemble de ces données soulignent l'importance des récepteurs adrénergiques α_2 , et a priori plus précisément des α_{2A} , dans l'action antinociceptive aiguë des antidépresseurs.

Ces récepteurs, préférentiellement exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière, seraient situés sur les fibres afférentes primaires et pas sur les fibres noradrénergiques descendantes (Seibt, 2015). Dans la moelle épinière, l'action antinociceptive de la noradrénaline s'explique par une diminution la transmission glutaminergique des fibres afférentes primaires, par l'activation de récepteurs adrénergiques α_2 présynaptiques, ainsi que par une diminution de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, par une action sur des récepteurs adrénergiques α_2 post-synaptiques (Kawasaki et al., 2003 ; Sonohata et al., 2004), et par l'augmentation de la transmission GABAergique et glycinergique dans la corne dorsale de la moelle épinière, médiée par l'activation de récepteurs adrénergiques portés par les astrocytes des couches plus profondes de la moelle épinière (Seibt, 2015 ; Seibt et Schlichter, 2015).

Des expériences complémentaires, à l'image de celles réalisées suite à un traitement de duloxétine ciblant spécifiquement le récepteur α_{2A} dans le modèle que nous avons utilisé, permettraient d'étudier plus en détail les mécanismes noradrénergiques antinociceptifs mis en jeu par la combinaison THN101. De la même manière, les effets du THN101 sur l'interaction neurones-glie pourraient être davantage étudiés grâce à des modèles de co-culture (Koulakoff et al., 2008) afin de détailler le mécanisme d'action antinociceptif du traitement au sein de la moelle épinière.

Même si à notre connaissance, la méfloquine ne cible pas directement les éléments de la neurotransmission noradrénergique, raison pour laquelle nous avons approfondi la recherche d'autres intervenants dans l'action du THN101, les contrôles descendant inhibiteurs noradrénergiques semblent être indispensables à la potentialisation des effets antinociceptifs démontrés dans nos travaux. De plus, l'action de la méfloquine elle-même semble avoir des interactions avec ces contrôles descendants de la douleur. En effet, la méfloquine à forte dose a un effet antinociceptif propre, qui est bloqué par une lésion de ces contrôles et qui est dépendant des récepteurs adrénergiques α_2 . La convergence de ces données par rapport à l'action aiguë de

l'amitriptyline souligne l'importance de la stimulation des contrôles descendants inhibiteurs de la douleur dans l'action de potentialisation montrée par la combinaison THN101.

4.2.2 Cibles pharmacologiques de la combinaison

L'hypothèse de travail à l'origine de ces travaux de thèse est que l'avantage thérapeutique du THN101 par rapport à l'amitriptyline serait médié par une inhibition de la connexine 43 dans les modèles précliniques utilisés. Le profil pharmacologique de la méfloquine, en partie sélectif, n'est pas uniquement spécifique des jonctions communicantes ou *gap junctions*. Des études ont montré que la méfloquine a une action d'inhibition de la connexine 43 dans sa composante de jonctions communicante mais également dans sa composante hémicanale à 500 nM (Jeanson et al., 2016).

d) Aspects pharmacocinétiques

Dans nos travaux, les dosages de méfloquine que nous avons réalisés nous confirment que nous nous situons à des doses de méfloquine compatibles avec une action sur les jonctions communicantes, en particulier sur les connexines 43. En effet, 7 heures après administration du THN101, les doses de méfloquine ont atteint environ 300 nM. A ce point temporel de prolongation de l'effet antinociceptif, les concentrations sont donc dans la gamme de celles de celles inhibant la connexine 43.

Dans ce cadre, il serait intéressant de déterminer les doses de méfloquine dans le sang et les tissus nerveux lorsque le prolongement d'effet comportemental se poursuit, à savoir à 12, 16 et 20 heures, ce qui permettrait de savoir si l'extinction de l'amplification liée au THN101 est expliquée par une diminution du taux de méfloquine ou non. D'ailleurs, si tel était le cas, il serait intéressant de porter une attention ultérieure sur les terminologies employées pour décrire si, dans le mécanisme du THN101 apparent, la méfloquine amplifie l'effet antinociceptif de l'amitriptyline ou si l'amitriptyline permet d'initier un effet antinociceptif de la méfloquine. A ce stade, nous n'avons malheureusement pas pu déployer d'outils pour répondre complètement à cette question.

Comme indiqué dans la section 3 (travaux complémentaires), nous n'avons pas pu utiliser les données issues de travaux menées sur des souris déficientes en connexine 43 astrocytaire, tant les comportements observés et mesurés étaient sans lien avec le génotype. Par contre, nous avons mis en place des approches pharmacologiques, en partie imparfaites car elles ont été basées sur le principe d'essayer de mimer l'effet de la méfloquine, en co-administration avec l'amitriptyline, avec des molécules agissant sur l'une ou l'autre des cibles proposées par l'étude *in vitro* (cf. **Figure**

18). Parmi ces cibles, l'interaction de la méfloquine avec le transporteur de sérotonine (SERT), avec les récepteurs à l'adénosine A_1 et A_{2A} , ou avec les jonctions communicantes ont été testées *in vivo* dans le modèle du *cuff*.

e) SERT

Concernant le transporteur de la sérotonine (SERT), nous avons utilisé dans notre expérience la fluoxétine en co-administration orale avec l'amitriptyline. Ici, la fluoxétine n'a pas potentialisé l'effet antinociceptif aigu de l'amitriptyline. Ce résultat rejoint les données de la littérature disant que la composante sérotonergique n'est pas essentielle sur les douleurs neuropathiques, que ce soit chez l'Homme (Dharmshaktu, Tayal, et Kalra, 2012) ou chez l'animal (Salvat et al., 2017). Par ailleurs, dans des modèles de douleurs neuropathiques, il a été mis en évidence que celles-ci s'accompagnent d'une perte de fonctionnalité des récepteurs sérotonergiques de sous-type 5-HT_{2A} (Wattiez et al., 2017), induisant par cette occasion une perte d'efficacité de la sérotonine.

f) Adénosine

Il existe trois types de récepteurs à l'adénosine (A_1 , $A_{2(2A, 2B)}$ et A_3). Ces récepteurs, couplés aux protéines G, peuvent être impliqués dans une signalisation pro- ou antinociceptive, selon le type de récepteur engagé (Sawynok, 2016). Ces récepteurs sont exprimés par les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Choca, Green, et Proudfit, 1988 ; Guntz et al., 2008) mais également par les cellules gliales (Fredholm et al., 2011).

Dans nos travaux, nous avons utilisé deux antagonistes, le DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) à 1 mg/kg (Weiss et al., 2003) pour les récepteurs A_1 ; et le SCH58261 (2-(Furan-2-yl)-7-phenethyl-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine), utilisé comme antagoniste des récepteurs A_{2A} à une dose pertinente de 0,1 mg/kg (Kopf et al., 1999 ; Paterniti et al., 2011). Ces deux approches n'ont pas montré d'amplification semblables à l'effet du THN101 en co-administrant ces molécules avec l'amitriptyline, suggérant une absence d'implication de cette voie dans l'action du THN101.

g) Jonctions communicantes et hémicanaux

Face à l'échec auquel nous avons fait face pour étudier l'effet de la perte de la connexine 43 sur la réponse à un traitement d'amitriptyline sur une lignée de souris transgéniques, nous avons utilisé une approche pharmacologique en utilisant la carbenoxolone pour cibler les jonctions communicantes dans notre étude. Cette molécule, qui a notamment été utilisée en clinique pour

le traitement des ulcères de l'estomac (Turpie et Thomson, 1965), est un bloqueur non sélectif de ces jonctions (de 20 à 150 μM selon les modèles) (Giaume et Theis, 2010). Dans nos travaux, nous avons réalisé une expérience comprenant une injection intrathécale de carbenoxolone, avec ou sans administration orale d'amitriptyline, révélant une réponse à la combinaison de traitements plus forte qu'avec les traitements individuels, sachant que de telles administrations ont par ailleurs été individuellement montrées comme pouvant soulager la douleur à plus fortes doses (*cf. Connexins and pannexins in pain models and treatment, Letellier et al., en préparation*). Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de nous positionner à une dose aussi faible que possible, qui nous a permis de n'observer qu'une tendance en administration seule, et un effet de potentialisation marqué lorsque la carbenoxolone a été appliquée avec l'amitriptyline. Si une amplification est présente, nous n'avons toutefois pas observé de prolongement de l'effet antinociceptif, contrairement au THN101 administré par voie orale. Néanmoins, il est à noter que l'administration intrathécale du composé favorise une diffusion plus rapide de la molécule, diminuant ainsi la probabilité d'action de la molécule sur ses cibles ; alors qu'une administration systémique permet une augmentation certes plus lente du taux des molécules administrées, mais qui se maintiennent dans l'organisme à plus long terme.

Nous avons réalisé un état de l'art couvrant, chez des modèles précliniques de douleur, les modifications ou modulations de certaines protéines transmembranaires impliquées dans la formation de jonctions communicantes ou de canaux s'en approchant de manière fonctionnelle et structurelle, en l'occurrence les connexines et les pannexines. Cette revue avait pour but principal de mettre en perspective l'hypothèse principale de ces travaux, selon laquelle l'inhibition de la Cx43 par la méfloquine est à l'origine du mécanisme de potentialisation du THN101. La majorité des études montrent une augmentation de l'expression et/ou de la fonction de la Cx43 et de Panx1 dans certains modèles de douleur. L'utilisation de bloqueurs de jonctions communicantes peu sélectifs, comme la carbenoxolone, de bloqueurs plus sélectifs comme la méfloquine, ou de bloqueurs très sélectifs comme des peptides Cx43 ou Panx1-mimétiques ou des ARN interférents, induisent par ailleurs une diminution des symptômes douloureux, accompagnée par une diminution de l'expression ou de la fonction de la Cx43 et/ou de Panx1. Certaines études ayant relevé la possible interaction de la carbenoxolone ou de la méfloquine avec les Panx1, à plus faible dose que celles utilisées pour le blocage des jonctions communicantes (Dahl, Qiu, et Wang, 2013 ; Giaume et Theis, 2010 ; Iglesias, Spray, et Scemes, 2010), il serait intéressant de compléter notre étude par une analyse de l'effet possible ou non des Panx1 dans l'efficacité apparente du THN101 dans le modèle du *cuff*, en utilisant des modulateurs spécifiques

tels que des peptides ou des ARN interférents, administrés de manière intrathécale en co-administration avec l'amitriptyline.

5 Conclusion

La recherche de nouveaux traitements contre les douleurs neuropathique est un enjeu important, d'autant qu'aucun nouveau médicament n'est arrivé sur le marché dans cette indication récemment et que les traitements actuels ne parviennent pas à satisfaire totalement le besoin thérapeutique. Il semble indispensable d'améliorer le portefeuille des traitements actuels qui présentent un seuil de tolérance parfois trop faible, en raison des effets indésirables qu'ils induisent et de leur manque d'efficacité, dépendamment dans le cas des douleurs neuropathiques.

En cela, le THN101, constitué de deux molécules génériques, présente un intérêt majeur car il permettrait d'apporter aux patients une amélioration de l'efficacité du soulagement de la douleur par la potentialisation des effets de l'amitriptyline.

Enfin, dans la continuité de ces travaux, une étude clinique chez des patients souffrant de douleurs neuropathiques sera menée dans plusieurs sites d'investigation en Europe après une évaluation clinique de sécurité, de tolérance et de pharmacocinétique du THN101, en comparaison avec l'amitriptyline.

Bibliographie

Aasen T., Leithe E., Graham S. V., Kameritsch P., Mayán M. D., Mesnil M., Pogoda K., Taberner A. « Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic ». *Oncogene* [En ligne]. juin 2019. Vol. 38, n°23, p. 4429-4451. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0741-6> >

Alles S. R. A., Smith P. A. « Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain ». *Pharmacol Rev* [En ligne]. avril 2018. Vol. 70, n°2, p. 315-347. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1124/pr.117.014399> >

Antuñano F. J. L., Wernsdorfer W. H. « In vitro response of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum to mefloquine ». *Bull World Health Organ*. 1979. Vol. 57, n°4, p. 663-665.

Ardid D., Jourdan D., Mestre C., Villanueva L., Bars D. L., Eschalier A. « Involvement of bulbospinal pathways in the antinociceptive effect of clomipramine in the rat ». *Brain Research* [En ligne]. octobre 1995. Vol. 695, n°2, p. 253-256. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00826-C](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00826-C) >

Attal N. « Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations ». *Revue Neurologique* [En ligne]. 1 janvier 2019. Vol. 175, n°1, p. 46-50. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.005> >

Attal N., Bouhassira D. « Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms? ». *Pain* [En ligne]. avril 2015. Vol. 156, n°4, p. S104–S114. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460358.01998.15> >

Attal N., Cruccu G., Baron R., Haanpää M., Hansson P., Jensen T. S., Nurmikko T. « EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision: Treatment of neuropathic pain ». *European Journal of Neurology* [En ligne]. septembre 2010. Vol. 17, n°9, p. 1113-e88. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x> >

Baidya D., Kumar A., Maitra S., Khanna P. « Clonidine for management of chronic pain: A brief review of the current evidences ». *Saudi J Anaesth* [En ligne]. 2014. Vol. 8, n°1, p. 92. Disponible sur : < <https://doi.org/10.4103/1658-354X.125955> >

Bannister K., Lockwood S., Goncalves L., Patel R., Dickenson A. H. « An investigation into the inhibitory function of serotonin in diffuse noxious inhibitory controls in the neuropathic rat ». *Eur J Pain* [En ligne]. 2017. Vol. 21, n°4, p. 750-760. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ejp.979> >

Baranova A., Ivanov D., Petrash N., Pestova A., Skoblov M., Kelmanson I., Shagin D., Nazarenko S., Geraymovych E., Litvin O., Tiunova A., Born T. L., Usman N., Staroverov D.,

- Lukyanov S., Panchin Y. « The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins ». *Genomics* [En ligne]. avril 2004. Vol. 83, n°4, p. 706-716. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025> >
- Barr T. P., Albrecht P. J., Hou Q., Mongin A. A., Strichartz G. R., Rice F. L. « Air-Stimulated ATP Release from Keratinocytes Occurs through Connexin Hemichannels ». *PLoS ONE* [En ligne]. 15 février 2013. Vol. 8, n°2, p. e56744. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056744> >
- Barrot M. « Tests and models of nociception and pain in rodents ». *Neuroscience* [En ligne]. juin 2012. Vol. 211, p. 39-50. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041> >
- Beheshti D. « Adverse health effects of abuse-deterrent opioids: Evidence from the reformulation of OxyContin ». *Health Economics* [En ligne]. 2019. Vol. 28, n°12, p. 1449-1461. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/hec.3944> >
- Benbouzid M., Choucair-Jaafar N., Yalcin I., Waltisperger E., Muller A., Freund-Mercier M. J., Barrot M. « Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice ». *European Journal of Pain* [En ligne]. novembre 2008. Vol. 12, n°8, p. 1008-1017. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.01.010> >
- Benbouzid M., Gavériaux-Ruff C., Yalcin I., Waltisperger E., Tessier L.-H., Muller A., Kieffer B. L., Freund-Mercier M. J., Barrot M. « Delta-Opioid Receptors Are Critical for Tricyclic Antidepressant Treatment of Neuropathic Allodynia ». *Biological Psychiatry* [En ligne]. mars 2008. Vol. 63, n°6, p. 633-636. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.06.016> >
- Benbouzid M., Pallage V., Rajalu M., Waltisperger E., Doridot S., Poisbeau P., Freund-Mercier M. J., Barrot M. « Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain ». *European Journal of Pain* [En ligne]. juillet 2008. Vol. 12, n°5, p. 591-599. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.10.002> >
- Benitz K.-F., Hall L. M. « Local Morphological Response Following a Single Subcutaneous Injection of Carrageenin in the Rat ». *Experimental Biology and Medicine* [En ligne]. 1 novembre 1959. Vol. 102, n°2, p. 442-445. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3181/00379727-102-25278> >
- Bennett G. J., Xie Y.-K. « A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man ». *Pain* [En ligne]. avril 1988. Vol. 33, n°1, p. 87-107.

Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6) >

Berrocoso E., Mico J.-A., Vitton O., Ladure P., Newman-Tancredi A., Depoortère R., Bardin L. « Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain ». *European Journal of Pharmacology* [En ligne]. mars 2011. Vol. 655, n°1-3, p. 46-51. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.022> >

Bhave S., Gade A., Kang M., Hauser K. F., Dewey W. L., Akbarali H. I. « Connexin–purinergic signaling in enteric glia mediates the prolonged effect of morphine on constipation ». *The FASEB Journal* [En ligne]. juin 2017. Vol. 31, n°6, p. 2649-2660. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1096/fj.201601068R> >

Bialas P., Maier C., Klose P., Häuser W. « Efficacy and harms of long-term opioid therapy in chronic non-cancer pain: Systematic review and meta-analysis of open-label extension trials with a study duration ≥ 26 weeks ». *European Journal of Pain* [En ligne]. 2019. Vol. n/a, n°n/a. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ejp.1496> > (consulté le 14 novembre 2019)

Bohren Y., Tessier L.-H., Megat S., Petitjean H., Hugel S., Daniel D., Kremer M., Fournel S., Hein L., Schlichter R., Freund-Mercier M.-J., Yalcin I., Barrot M. « Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral $\beta 2$ -adrenoceptor mediated anti-TNF α mechanism ». *Neurobiology of Disease* [En ligne]. décembre 2013. Vol. 60, p. 39-50. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.08.012> >

Borelli E., Crepaldi D., Porro C. A., Cacciari C. « The psycholinguistic and affective structure of words conveying pain ». *PLoS One* [En ligne]. 29 juin 2018. Vol. 13, n°6. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199658> > (consulté le 8 janvier 2020)

Bouhassira D., Lantéri-Minet M., Attal N., Laurent B., Touboul C. « Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population ». *Pain* [En ligne]. juin 2008. Vol. 136, n°3, p. 380-387. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013> >

Boyce A. K. J., Kim M. S., Wicki-Stordeur L. E., Swayne L. A. « ATP stimulates pannexin 1 internalization to endosomal compartments ». *Biochemical Journal* [En ligne]. 15 septembre 2015. Vol. 470, n°3, p. 319-330. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1042/BJ20141551> >

Bravo D., Ibarra P., Retamal J., Pelissier T., Laurido C., Hernandez A., Constandil L. « Pannexin 1: A novel participant in neuropathic pain signaling in the rat spinal cord ». *Pain* [En ligne]. octobre 2014. Vol. 155, n°10, p. 2108-2115. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.07.024> >

Bravo D., Maturana C. J., Pelissier T., Hernández A., Constandil L. « Interactions of pannexin

- 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain ». *Pharmacological Research* [En ligne]. novembre 2015. Vol. 101, p. 86-93. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.016> >
- Breivik H., Collett B., Ventafridda V., Cohen R., Gallacher D. « Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment ». *Eur J Pain* [En ligne]. mai 2006. Vol. 10, n°4, p. 287-333. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009> >
- Breivik H., Eisenberg E., O'Brien T. « The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care ». *BMC Public Health* [En ligne]. 24 décembre 2013. Vol. 13, n°1, p. 1229. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229> >
- Brown I. A. M., McClain J. L., Watson R. E., Patel B. A., Gulbransen B. D. « Enteric Glia Mediate Neuron Death in Colitis Through Purinergic Pathways That Require Connexin-43 and Nitric Oxide ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [En ligne]. janvier 2016. Vol. 2, n°1, p. 77-91. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.08.007> >
- Bruzzone R., Hormuzdi S. G., Barbe M. T., Herb A., Monyer H. « Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain ». *Proc Natl Acad Sci U S A* [En ligne]. 11 novembre 2003. Vol. 100, n°23, p. 13644-13649. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100> >
- Burke B. M. « Mefloquine ». *The Lancet* [En ligne]. juin 1993. Vol. 341, n°8860, p. 1605-1606. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90751-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90751-2) >
- Burma Nicole E, Bonin R. P., Leduc-Pessah H., Baimel C., Cairncross Z. F., Mousseau M., Shankara J. V., Stemkowski P. L., Baimoukhametova D., Bains J. S., Antle M. C., Zamponi G. W., Cahill C. M., Borgland S. L., De Koninck Y., Trang T. « Blocking microglial pannexin-1 channels alleviates morphine withdrawal in rodents ». *Nat Med* [En ligne]. mars 2017. Vol. 23, n°3, p. 355-360. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nm.4281> >
- Burma Nicole E., Leduc-Pessah H., Fan C. Y., Trang T. « Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation ». *Journal of Neuroscience Research* [En ligne]. 2017. Vol. 95, n°6, p. 1242-1256. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/jnr.23768> >
- Caillon E., Schmitt L., Moron P. « Acute depressive symptoms after mefloquine treatment ». *Am J Psychiatry* [En ligne]. mai 1992. Vol. 149, n°5, p. 712. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1176/ajp.149.5.712a> >

- Casale R., Symeonidou Z., Bartolo M. « Topical Treatments for Localized Neuropathic Pain ». *Curr Pain Headache Rep* [En ligne]. mars 2017. Vol. 21, n°3, p. 15. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0615-y> >
- Chadchankar H., Ihalainen J., Tanila H., Yavich L. « Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein ». *Brain Research* [En ligne]. mars 2011. Vol. 1382, p. 37-44. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.064> >
- Charvériat M., Naus C. C., Leybaert L., Sáez J. C., Giaume C. « Connexin-Dependent Neuroglial Networking as a New Therapeutic Target ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 26 juin 2017. Vol. 11, p. 174. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00174> >
- Chen G., Luo X., Qadri M. Y., Berta T., Ji R.-R. « Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain: Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes ». *Neurosci. Bull.* [En ligne]. février 2018. Vol. 34, n°1, p. 98-108. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0145-y> >
- Chen G., Park C.-K., Xie R.-G., Berta T., Nedergaard M., Ji R.-R. « Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice ». *Brain* [En ligne]. août 2014. Vol. 137, n°8, p. 2193-2209. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/brain/awu140> >
- Chen M. J., Kress B., Han X., Moll K., Peng W., Ji R.-R., Nedergaard M. « Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury ». *Glia* [En ligne]. novembre 2012. Vol. 60, n°11, p. 1660-1670. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/glia.22384> >
- Chen S.-P., Qin T., Seidel J. L., Zheng Y., Eikermann M., Ferrari M. D., Van den Maagdenberg A. M. J. M., Moskowitz M. A., Ayata C., Eikermann-Haerter K. « Inhibition of the P2X7–PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation ». *Brain* [En ligne]. 1 juin 2017. Vol. 140, n°6, p. 1643-1656. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/brain/awx085> >
- Chen Z.-Y., Shen F.-Y., Jiang L., Zhao X., Shen X.-L., Zhong W., Liu S., Wang Z.-R., Wang Y.-W. « Attenuation of Neuropathic Pain by Inhibiting Electrical Synapses in the Anterior Cingulate Cortex ». *Anesthesiology* [En ligne]. janvier 2016a. Vol. 124, n°1, p. 169-183. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000942> >
- Chen Z.-Y., Shen F.-Y., Jiang L., Zhao X., Shen X.-L., Zhong W., Liu S., Wang Z.-R., Wang Y.-W. « Attenuation of Neuropathic Pain by Inhibiting Electrical Synapses in the Anterior Cingulate Cortex ». *Anesthesiology* [En ligne]. janvier 2016b. Vol. 124, n°1, p. 169-183.

Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000942> >

Chen Z.-Y., Shen X., Huang L., Wu H., Zhang M. « Membrane potential synchrony of neurons in anterior cingulate cortex plays a pivotal role in generation of neuropathic pain ». *Sci Rep* [En ligne]. décembre 2018. Vol. 8, n°1, p.1691. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20080-2> >

Chiu Y.-H., Jin X., Medina C. B., Leonhardt S. A., Kiessling V., Bennett B. C., Shu S., Tamm L. K., Yeager M., Ravichandran K. S., Bayliss D. A. « A quantized mechanism for activation of pannexin channels ». *Nat Commun* [En ligne]. avril 2017. Vol. 8, n°1, p. 14324. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/ncomms14324> >

Choca J. I., Green R. D., Proudfit H. K. « Adenosine A1 and A2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. » *J Pharmacol Exp Ther*. 1 novembre 1988. Vol. 247, n°2, p. 757-764.

Choi H.-S., Roh D.-H., Yoon S.-Y., Choi S.-R., Kwon S.-G., Kang S.-Y., Moon J.-Y., Han H.-J., Beitz A. J., Lee J.-H. « Differential involvement of ipsilateral and contralateral spinal cord astrocyte D-serine in carrageenan-induced mirror-image pain: role of σ_1 receptors and astrocyte gap junctions: Involvement of D-serine in mirror-image pain ». *British Journal of Pharmacology* [En ligne]. février 2018. Vol. 175, n°3, p. 558-572. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/bph.14109> >

Choi H.-S., Roh D.-H., Yoon S.-Y., Kwon S.-G., Choi S.-R., Kang S.-Y., Moon J.-Y., Han H.-J., Kim H.-W., Beitz A. J., Lee J.-H. « The role of spinal interleukin-1 β and astrocyte connexin 43 in the development of mirror-image pain in an inflammatory pain model ». *Experimental Neurology* [En ligne]. janvier 2017. Vol. 287, p. 1-13. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.10.012> >

Choi S.-R., Roh D.-H., Yoon S.-Y., Kwon S.-G., Choi H.-S., Han H.-J., Beitz A. J., Lee J.-H. « Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice ». *Neuropharmacology* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 111, p. 34-46. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.027> >

Choucair-Jaafar N., Yalcin I., Rodeau J.-L., Waltisperger E., Freund-Mercier M.-J., Barrot M. « β_2 -Adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment: β -agonists in neuropathic allodynia ». *British Journal of Pharmacology* [En ligne]. décembre 2009. Vol. 158, n°7, p. 1683-1694. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00510.x> >

- Clasadonte J., Scemes E., Wang Z., Boison D., Haydon P. G. « Connexin 43-mediated astroglial metabolic networks contribute to the regulation of the sleep-wake cycle ». *Neuron* [En ligne]. 13 septembre 2017. Vol. 95, n°6, p. 1365-1380.e5. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.022> >
- Cohen L. J., De Vane C. L. « Clinical implications of antidepressant pharmacokinetics and pharmacogenetics ». *Ann Pharmacother* [En ligne]. décembre 1996. Vol. 30, n°12, p. 1471-1480. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/106002809603001216> >
- Cordero-Erausquin M., Inquimbert P., Schlichter R., Hugel S. « Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord ». *Neuroscience* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 338, p. 230-247. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.048> >
- Cruikshank S. J., Hopperstad M., Younger M., Connors B. W., Spray D. C., Srinivas M. « Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* [En ligne]. 17 août 2004. Vol. 101, n°33, p. 12364-12369. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0402044101> >
- Dahl G., Qiu F., Wang J. « The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1 ». *Neuropharmacology* [En ligne]. décembre 2013. Vol. 75, p. 583-593. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.019> >
- Dale R., Stacey B. « Multimodal Treatment of Chronic Pain ». *Medical Clinics of North America* [En ligne]. 1 janvier 2016. Vol. 100, n°1, p. 55-64. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.08.012> >
- Decosterd I., Woolf C. J. « Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain ». *Pain* [En ligne]. août 2000. Vol. 87, n°2, p. 149-158. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00276-1) >
- Decrock E., Vinken M., Bol M., D'Herde K., Rogiers V., Vandenabeele P., Krysko D. V., Bultynck G., Leybaert L. « Calcium and connexin-based intercellular communication, a deadly catch? ». *Cell Calcium* [En ligne]. septembre 2011. Vol. 50, n°3, p. 310-321. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.007> >
- Delvalle N. M., Dharshika C., Morales-Soto W., Fried D. E., Gaudette L., Gulbransen B. D. « Communication Between Enteric Neurons, Glia, and Nociceptors Underlies the Effects of Tachykinins on Neuroinflammation ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [En ligne]. 2018. Vol. 6, n°3, p. 321-344. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.05.009> >

- Dere E., Zlomuzica A. « The role of gap junctions in the brain in health and disease ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [En ligne]. 1 janvier 2012. Vol. 36, n°1, p. 206-217. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.05.015> >
- Derry S., Bell R. F., Straube S., Wiffen P. J., Aldington D., Moore R. A. « Pregabalin for neuropathic pain in adults ». *Cochrane Database of Systematic Reviews* [En ligne]. 2019. n°1,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007076.pub3> > (consulté le 5 décembre 2019)
- Dharmshaktu P., Tayal V., Kalra B. S. « Efficacy of Antidepressants as Analgesics: A Review ». *The Journal of Clinical Pharmacology* [En ligne]. janvier 2012. Vol. 52, n°1, p. 6-17. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/0091270010394852> >
- Di Cesare Mannelli L., Marcoli M., Micheli L., Zanardelli M., Maura G., Ghelardini C., Cervetto C. « Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin 1 ». *Neuropharmacology* [En ligne]. octobre 2015. Vol. 97, p. 133-141. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.037> >
- Di Cesare Mannelli L., Micheli L., Crocetti L., Giovannoni M., Vergelli C., Ghelardini C. « $\alpha 2$ Adrenoceptor: a Target for Neuropathic Pain Treatment ». *MRMC* [En ligne]. 29 novembre 2016. Vol. 17, n°2, p. 95-107. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609065535> >
- Dietz A., Frölich L. « Mefloquine-induced Paranoid Psychosis and Subsequent Major Depression in a 25-year-old Student ». *Pharmacopsychiatry* [En ligne]. septembre 2002. Vol. 35, n°5, p. 200-202. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1055/s-2002-34114> >
- Duchêne A., Perier M., Zhao Y., Liu X., Thomasson J., Chauveau F., Piérard C., Lagarde D., Picoli C., Jeanson T., Mouthon F., Dauvilliers Y., Giaume C., Lin J.-S., Charvériat M. « Impact of Astroglial Connexins on Modafinil Pharmacological Properties ». *Sleep* [En ligne]. 1 juin 2016. Vol. 39, n°6, p. 1283-1292. Disponible sur : < <https://doi.org/10.5665/sleep.5854> >
- Eccleston C., Wells C., Morlion B. *European Pain Management*. [s.l.] : Oxford University Press, 2018. 305 p. ISBN : 978-0-19-878575-0.
- Eldufani J., Blaise G. « The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications ». *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* [En ligne]. 2019. Vol. 5, p. 175-183. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.03.004> >

Eto K., Kim S. K., Takeda I., Nabekura J. « The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies ». *Neuroscience Research* [En ligne]. 1 janvier 2018. Vol. 126, p. 3-8. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.08.009> >

Eyding D., Lelgemann M., Grouven U., Härter M., Kromp M., Kaiser T., Kerekes M. F., Gerken M., Wieseler B. « Reboxetine for acute treatment of major depression: systematic review and meta-analysis of published and unpublished placebo and selective serotonin reuptake inhibitor controlled trials ». *BMJ* [En ligne]. 12 octobre 2010. Vol. 341, p. c4737. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1136/bmj.c4737> >

Fagan T., Warden P. G. *Historical Encyclopedia of School Psychology*. [s.l.] : Greenwood Publishing Group, 1996. 464 p. ISBN : 978-0-313-29015-2.

Faivre F., Joshi A., Bezard E., Barrot M. « The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 96, p. 335-352. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.10.004> >

Falk S. « Carbenoxolone as a novel therapy for attenuation of cancer-induced bone pain ». *Pain* [En ligne]. juin 2018. Vol. 159, n°6, p. 1127-1136. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001197> >

Finnerup N. B., Attal N., Haroutounian S., McNicol E., Baron R., Dworkin R. H., Gilron I., Haanpää M., Hansson P., Jensen T. S., Kamerman P. R., Lund K., Moore A., Raja S. N., Rice A. S. C., Rowbotham M., Sena E., Siddall P., Smith B. H., Wallace M. « Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis ». *The Lancet Neurology* [En ligne]. février 2015. Vol. 14, n°2, p. 162-173. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0) >

Finnerup N. B., Sindrup S. H., Jensen T. S. « Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* [En ligne]. avril 2007. Vol. 21, n°2, p. 129-136. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00474.x> >

Fischer M. H. « THE TOXIC EFFECTS OF FORMALDEHYDE AND FORMALIN ». *J. Exp. Med.* [En ligne]. 1 février 1905. Vol. 6, n°4-6, p. 487-518. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1084/jem.6.4-6.487> >

Foley M., Tilley L. « Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance ». *International Journal for Parasitology* [En ligne]. 1 février 1997. Vol. 27, n°2, p. 231-240. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00152-X) >

Fontaine F., De Sousa G., Burcham P. C., Duchêne P., Rahmani R. « Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes ». *Life Sci.* [En ligne]. 21 avril 2000. Vol. 66, n°22, p. 2193-2212. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00546-4](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00546-4) >

Fourny M. « Stromae : ce médicament qui a failli le pousser au suicide ». In : *Le Point* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2017. Disponible sur : < https://www.lepoint.fr/musique/stromae-ce-medicament-qui-a-failli-le-pousser-au-suicide-13-11-2017-2171995_38.php > (consulté le 6 décembre 2019)

Franssen G., Rouveix B., Lebras J., Bauchet J., Verdier F., Michon C., Bricaire F. « Divided-dose kinetics of mefloquine in man. » *British Journal of Clinical Pharmacology* [En ligne]. août 1989. Vol. 28, n°2, p. 179-184. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1989.tb05413.x> >

Fredholm B. B., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Linden J., Müller C. E. « International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update ». *Pharmacol Rev* [En ligne]. mars 2011. Vol. 63, n°1, p. 1-34. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285> >

Garre J. M., Yang G., Bukauskas F. F., Bennett M. V. L. « FGF-1 Triggers Pannexin-1 Hemichannel Opening in Spinal Astrocytes of Rodents and Promotes Inflammatory Responses in Acute Spinal Cord Slices ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 27 avril 2016. Vol. 36, n°17, p. 4785-4801. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4195-15.2016> >

Garrett F. G., Durham P. L. « Differential expression of connexins in trigeminal ganglion neurons and satellite glial cells in response to chronic or acute joint inflammation ». *Neuron Glia Biol.* [En ligne]. novembre 2008. Vol. 4, n°4, p. 295-306. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1017/S1740925X09990093> >

Garry J. W., Leonard T. J. « Trial of Amitriptyline in Chronic Depression ». *Br J Psychiatry* [En ligne]. janvier 1963. Vol. 109, n°458, p. 54-55. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1192/bjp.109.458.54> >

Gaskin D. J., Richard P. « The Economic Costs of Pain in the United States ». *The Journal of Pain* [En ligne]. 1 août 2012. Vol. 13, n°8, p. 715-724. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.03.009> >

Gerner P., Kao G., Srinivasa V., Narang S., Wang G. « Topical amitriptyline in healthy volunteers ». *Regional Anesthesia and Pain Medicine* [En ligne]. août 2003. Vol. 28, n°4,

- p. 289-293. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1098-7339\(03\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S1098-7339(03)00209-8) >
- Ghelardini C., Galeotti N., Bartolini A. « Antinociception induced by amitriptyline and imipramine is mediated by alpha2A-adrenoceptors ». *Jpn. J. Pharmacol.* [En ligne]. février 2000. Vol. 82, n°2, p. 130-137. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1254/jjp.82.130> >
- Giaume C., Theis M. « Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system ». *Brain Research Reviews* [En ligne]. mai 2010. Vol. 63, n°1-2, p. 160-176. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.005> >
- Giboda M., Denis M. B. « Response of Kampuchean strains of Plasmodium falciparum to antimalarials: in-vivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro ». *J Trop Med Hyg.* août 1988. Vol. 91, n°4, p. 205-211.
- Gillman P. K. « Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated ». *British Journal of Pharmacology* [En ligne]. juillet 2007. Vol. 151, n°6, p. 737-748. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707253> >
- González R., Pons-Duran C., Piqueras M., Aponte J. J., Ter Kuile F. O., Menéndez C. « Mefloquine for preventing malaria in pregnant women ». *Cochrane Database of Systematic Reviews* [En ligne]. 14 novembre 2018. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011444.pub3> > (consulté le 10 décembre 2019)
- Goodenough D. A. « BULK ISOLATION OF MOUSE HEPATOCYTE GAP JUNCTIONS ». *J Cell Biol.* 1 mai 1974. Vol. 61, n°2, p. 557-563.
- Gribble F. M., Davis T. M. E., Higham C. E., Clark A., Ashcroft F. M. « The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels ». *Br J Pharmacol* [En ligne]. octobre 2000. Vol. 131, n°4, p. 756-760. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703638> >
- Gringras M. « A clinical trial of Tofranil in rheumatic pain in general practice ». *J. Int. Med. Res.* 1976. Vol. 4, n°2 Suppl, p. 41-49.
- Guntz E., Dumont H., Pastijn E., De Kerchove d'Exaerde A., Azdad K., Sosnowski M., Schiffmann S. N., Gall D. « Expression of Adenosine A2A Receptors in the Rat Lumbar Spinal Cord and Implications in the Modulation of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Currents ». *Anesthesia & Analgesia* [En ligne]. juin 2008. Vol. 106, n°6, p. 1882-1889. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318173251f> >
- Guo W., Wang H., Watanabe M., Shimizu K., Zou S., LaGraize S. C., Wei F., Dubner R., Ren K. « Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 30 mai 2007. Vol. 27, n°22, p. 6006-6018.

Disponible sur : < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0176-07.2007> >

Gustavsson A., Bjorkman J., Ljungerantz C., Rhodin A., Rivano-Fischer M., Sjolund K.-F., Mannheimer C. « Socio-economic burden of patients with a diagnosis related to chronic pain-register data of 840,000 Swedish patients ». *Eur J Pain* [En ligne]. février 2012. Vol. 16, n°2, p. 289-299. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2011.07.006> >

Haderer A., Gerner P., Kao G., Srinivasa V., Wang G. « Cutaneous Analgesia After Transdermal Application of Amitriptyline Versus Lidocaine in Rats ». *Anesthesia & Analgesia* [En ligne]. juin 2003. Vol. 96, n°6, p. 1707-1710. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000060456.91215.90> >

Hamaguchi M., Suzuki K., Fujita H., Uzuka T., Matsuda H., Shishido-Hara Y., Arai S., Nakamura T., Kikuchi S., Nakamichi K., Saijo M., Hirata K. « Successful treatment of non-HIV progressive multifocal leukoencephalopathy: case report and literature review ». *J Neurol* [En ligne]. 14 novembre 2019. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09629-x> > (consulté le 10 décembre 2019)

Hang L.-H., Li S.-N., Luo H., Shu W.-W., Mao Z.-M., Chen Y.-F., Shi L.-L., Shao D.-H. « Connexin 43 Mediates CXCL12 Production from Spinal Dorsal Horn to Maintain Bone Cancer Pain in Rats ». *Neurochem Res* [En ligne]. mai 2016. Vol. 41, n°5, p. 1200-1208. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1815-7> >

Hansson E., Skiöldebrand E. « Coupled cell networks are target cells of inflammation, which can spread between different body organs and develop into systemic chronic inflammation ». *J Inflamm* [En ligne]. décembre 2015. Vol. 12, n°1, p. 44. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0091-2> >

Hanstein R., Hanani M., Scemes E., Spray D. C. « Glial pannexin1 contributes to tactile hypersensitivity in a mouse model of orofacial pain ». *Sci Rep* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 6, n°1, p. 38266. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/srep38266> >

Haroutounian S., Ford A. L., Frey K., Nikolajsen L., Finnerup N. B., Neiner A., Kharasch E. D., Karlsson P., Bottros M. M. « How central is central poststroke pain? The role of afferent input in poststroke neuropathic pain: a prospective, open-label pilot study ». *PAIN* [En ligne]. juillet 2018. Vol. 159, n°7, p. 1317-1324. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001213> >

Hervé J.-C., Derangeon M. « Gap-junction-mediated cell-to-cell communication ». *Cell Tissue Res* [En ligne]. 1 avril 2013. Vol. 352, n°1, p. 21-31. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1485-6> >

- Hervé J.-C., Derangeon M., Sarrouilhe D., Giepmans B. N. G., Bourmeyster N. « Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [En ligne]. 1 août 2012. Vol. 1818, n°8, p. 1844-1865. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.009> >
- Heshmati M., Golden S. A., Pfau M. L., Christoffel D. J., Seeley E. L., Cahill M. E., Khibnik L. A., Russo S. J. « Mefloquine in the nucleus accumbens promotes social avoidance and anxiety-like behavior in mice ». *Neuropharmacology* [En ligne]. février 2016. Vol. 101, p. 351-357. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.013> >
- Hiroki T., Suto T., Saito S., Obata H. « Repeated Administration of Amitriptyline in Neuropathic Pain: Modulation of the Noradrenergic Descending Inhibitory System ». *Anesthesia & Analgesia* [En ligne]. octobre 2017. Vol. 125, n°4, p. 1281-1288. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002352> >
- Hisaoka-Nakashima K., Miyano K., Matsumoto C., Kajitani N., Abe H., Okada-Tsuchioka M., Yokoyama A., Uezono Y., Morioka N., Nakata Y., Takebayashi M. « Tricyclic Antidepressant Amitriptyline-induced Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Production Involves Pertussis Toxin-sensitive $G\alpha_{i/o}$ Activation in Astroglial Cells ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 29 mai 2015. Vol. 290, n°22, p. 13678-13691. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622415> >
- Hoebe C., De Munter J., Thijs C. « Adverse effects and compliance with mefloquine or proguanil antimalarial chemoprophylaxis ». *European Journal of Clinical Pharmacology* [En ligne]. 27 juin 1997. Vol. 52, n°4, p. 269-275. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s002280050288> >
- Iglesias R., Dahl G., Qiu F., Spray D. C., Scemes E. « Pannexin 1: The Molecular Substrate of Astrocyte “Hemichannels” ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 27 mai 2009. Vol. 29, n°21, p. 7092-7097. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009> >
- Iglesias R., Spray D. C., Scemes E. « Mefloquine Blockade of Pannexin1 Currents: Resolution of a Conflict ». *Cell Communication & Adhesion* [En ligne]. janvier 2010. Vol. 16, n°5-6, p. 131-137. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3109/15419061003642618> >
- Inoue K., Tsuda M. « Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. mars 2018. Vol. 19, n°3, p. 138-152. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.2> >
- Inquimbert P., Bartels K., Babaniyi O. B., Barrett L. B., Tegeder I., Scholz J. « Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in

the dorsal horn of the spinal cord ». *Pain* [En ligne]. décembre 2012. Vol. 153, n°12, p. 2422-2431. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.08.011> >

IsHak W. W., Wen R. Y., Naghdechi L., Vanle B., Dang J., Knosp M., Dascal J., Marcia L., Gohar Y., Eskander L., Yadegar J., Hanna S., Sadek A., Aguilar-Hernandez L., Danovitch I., Louy C. « Pain and Depression: A Systematic Review ». *Harvard Review of Psychiatry* [En ligne]. 2018. Vol. 26, n°6, p. 352-363. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/HRP.000000000000198> >

Ishikawa M., Iwamoto T., Nakamura T., Doyle A., Fukumoto S., Yamada Y. « Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation ». *The Journal of Cell Biology* [En ligne]. 27 juin 2011. Vol. 193, n°7, p. 1257-1274. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1083/jcb.201101050> >

Jaeger A., Sauder P., Kopferschmitt J., Flesch F. « Clinical Features and Management of Poisoning due to Antimalarial Drugs ». *Medical Toxicology* [En ligne]. août 1987. Vol. 2, n°4, p. 242-273. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF03259868> >

Jasmin L., Vit J.-P., Bhargava A., Ohara P. T. « Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? ». *Neuron Glia Biol.* [En ligne]. février 2010. Vol. 6, n°1, p. 63-71. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1017/S1740925X10000098> >

Jeanson T., Charveriat M., Mouthon F. *Use of amitriptyline for blocking brain hemichannels and method for potentiating its effect in vivo* [En ligne]. US20180207147A1. 26 juillet 2018. Disponible sur : < <https://patents.google.com/patent/US20180207147A1/en> > (consulté le 1 janvier 2020)

Jeanson T., Duchêne A., Richard D., Bourgoïn S., Picoli C., Ezan P., Mouthon F., Giaume C., Hamon M., Charvériat M. « Potentiation of Amitriptyline Anti-Hyperalgesic-Like Action By Astroglial Connexin 43 Inhibition in Neuropathic Rats ». *Sci Rep* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 6, n°1, p. 38766. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/srep38766> >

Jeanson T., Pondaven A., Ezan P., Mouthon F., Charvériat M., Giaume C. « Antidepressants Impact Connexin 43 Channel Functions in Astrocytes ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 7 janvier 2016. Vol. 9,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00495> > (consulté le 1 août 2019)

Jennings L. « Antidepressants ». In : Grossberg GT, Kinsella LJ (éd.). *Clinical Psychopharmacology for Neurologists: A Practical Guide* [En ligne]. Cham : Springer International Publishing, 2018. p. 45-71. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-319-74604-3_4 > (consulté le 6 décembre 2019) ISBN : 978-3-319-74604-3.

- Jensen T. S. « Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence ». *European Journal of Pain* [En ligne]. janvier 2002. Vol. 6, n°SA, p. 61-68. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0324> >
- Ji R.-R., Donnelly C. R., Nedergaard M. « Astrocytes in chronic pain and itch ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. 19 septembre 2019. p. 1-19. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0218-1> >
- Johnstone S. R., Billaud M., Lohman A. W., Taddeo E. P., Isakson B. E. « Posttranslational Modifications in Connexins and Pannexins ». *J Membrane Biol* [En ligne]. juin 2012. Vol. 245, n°5-6, p. 319-332. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9453-3> >
- Julius D. « TRP Channels and Pain ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [En ligne]. 2013. Vol. 29, n°1, p. 355-384. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833> >
- Kaji K., Shinoda M., Honda K., Unno S., Shimizu N., Iwata K. « Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury ». *Mol Pain* [En ligne]. janvier 2016. Vol. 12, p. 174480691663370. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/1744806916633704> >
- Kajitani N., Hisaoka-Nakashima K., Morioka N., Okada-Tsuchioka M., Kaneko M., Kasai M., Shibasaki C., Nakata Y., Takebayashi M. « Antidepressant Acts on Astrocytes Leading to an Increase in the Expression of Neurotrophic/Growth Factors: Differential Regulation of FGF-2 by Noradrenaline ». *PLoS One* [En ligne]. 5 décembre 2012. Vol. 7, n°12,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051197> > (consulté le 8 décembre 2019)
- Karbwang J., White N. J. « Clinical Pharmacokinetics of Mefloquine ». *Clin Pharmacokinet* [En ligne]. 1 octobre 1990. Vol. 19, n°4, p. 264-279. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2165/00003088-199019040-00002> >
- Kawasaki Y., Kumamoto E., Furue H., Yoshimura M. « α_2 Adrenoceptor-mediated Presynaptic Inhibition of Primary Afferent Glutamatergic Transmission in Rat Substantia Gelatinosa Neurons ». *Anesthesiology* [En ligne]. mars 2003. Vol. 98, n°3, p. 682-689. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/00000542-200303000-00016> >
- Keiser J., Silué K. D., Adiossan L. K., N'Guessan N. A., Monsan N., Utzinger J., N'Goran E. K. « Praziquantel, Mefloquine-Praziquantel, and Mefloquine-Artesunate-Praziquantel against *Schistosoma haematobium*: A Randomized, Exploratory, Open-Label Trial ». *PLoS Negl Trop Dis* [En ligne]. 17 juillet 2014. Vol. 8, n°7, p. e2975. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002975> >

Kiani J., Ahmad Nasrollahi S., Esna-Ashari F., Fallah P., Sajedi F. « Amitriptyline 2% cream vs. capsaicin 0.75% cream in the treatment of painful diabetic neuropathy (Double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety) ». *Iran J Pharm Res.* 2015. Vol. 14, n°4, p. 1263-1268.

Kim S. H., Chung J. M. « An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat ». *Pain* [En ligne]. septembre 1992. Vol. 50, n°3, p. 355-363. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90041-9](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90041-9) >

Kim Y., Griffin J. M., Harris P. W. R., Chan S. H. C., Nicholson L. F. B., Brimble M. A., O'Carroll S. J., Green C. R. « Characterizing the mode of action of extracellular Connexin43 channel blocking mimetic peptides in an in vitro ischemia injury model ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [En ligne]. février 2017. Vol. 1861, n°2, p. 68-78. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.001> >

Kjell J., Olson L. « Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies ». *Dis Model Mech* [En ligne]. 1 octobre 2016. Vol. 9, n°10, p. 1125-1137. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1242/dmm.025833> >

Komiya H., Shimizu K., Ishii K., Kudo H., Okamura T., Kanno K., Shinoda M., Ogiso B., Iwata K. « Connexin 43 expression in satellite glial cells contributes to ectopic tooth-pulp pain ». *Journal of Oral Science* [En ligne]. 2018. Vol. 60, n°4, p. 493-499. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2334/josnusd.17-0452> >

Koo J., Choe H. K., Kim H.-D., Chun S. K., Son G. H., Kim K. « Effect of Mefloquine, a Gap Junction Blocker, on Circadian Period2 Gene Oscillation in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus *Ex Vivo* ». *Endocrinol Metab* [En ligne]. 2015. Vol. 30, n°3, p. 361. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.3.361> >

Kopf S. R., Melani A., Pedata F., Pepeu G. « Adenosine and memory storage ». *Psychopharmacology* [En ligne]. 24 septembre 1999. Vol. 146, n°2, p. 214-219. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s002130051109> >

Koulakoff A., Ezan P., Giaume C. « Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes ». *Glia* [En ligne]. septembre 2008. Vol. 56, n°12, p. 1299-1311. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/glia.20698> >

Kremer M., Salvat E., Muller A., Yalcin I., Barrot M. « Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights ». *Neuroscience* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 338, p. 183-206. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.057> >

Kremer M., Yalcin I., Goumon Y., Wurtz X., Nexon L., Daniel D., Megat S., Ceredig R. A.,

- Ernst C., Turecki G., Chavant V., Thérroux J.-F., Lacaud A., Joganah L.-E., Lelievre V., Massotte D., Lutz P.-E., Gilsbach R., Salvat E., Barrot M. « A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 14 novembre 2018. Vol. 38, n°46, p. 9934-9954. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1004-18.2018> >
- Kremer M., Yalcin I., Nexon L., Wurtz X., Ceredig R. A., Daniel D., Hawkes R. A., Salvat E., Barrot M. « The antiallodynic action of pregabalin in neuropathic pain is independent from the opioid system ». *Mol Pain* [En ligne]. janvier 2016. Vol. 12, p. 174480691663347. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/1744806916633477> >
- Lacour M., Péliissier R., Guidoum Y. « Note préliminaire sur l'action antalgique de l'Amitriptyline. Application au traitement de la sciatique. » *Gazette médicale de France.* 10 octobre 1965. Vol. 79, n°19, p. 3296-9.
- Laird D. W., Lampe P. D. « Therapeutic strategies targeting connexins ». *Nat Rev Drug Discov* [En ligne]. décembre 2018. Vol. 17, n°12, p. 905-921. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.138> >
- Lambiase P. D., Tinker A. « Connexins in the heart ». *Cell Tissue Res.* [En ligne]. juin 2015. Vol. 360, n°3, p. 675-684. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2020-8> >
- Lapato A. S., Tiwari-Woodruff S. K. « Connexins and pannexins: At the junction of neuroglial homeostasis & disease ». *J Neuro Res* [En ligne]. janvier 2018. Vol. 96, n°1, p. 31-44. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/jnr.24088> >
- Latimer M., Finley G. A., Rudderham S., Inglis S., Francis J., Young S., Hutt-MacLeod D. « Expression of pain among Mi'kmaq children in one Atlantic Canadian community: a qualitative study ». *CMAJ Open* [En ligne]. 29 juillet 2014. Vol. 2, n°3, p. E133-E138. Disponible sur : < <https://doi.org/10.9778/cmajo.20130086> >
- Lee-Kubli C. A., Ingves M., Henry K. W., Shiao R., Collyer E., Tuszynski M. H., Campana W. M. « Analysis of the behavioral, cellular and molecular characteristics of pain in severe rodent spinal cord injury ». *Experimental Neurology* [En ligne]. avril 2016. Vol. 278, p. 91-104. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.009> >
- Li X., Jiang S., Yang H., Liao Q., Cao S., Yan X., Huang D. « Breakthrough Cancer Pain Is Associated with Spinal Gap Junction Activation via Regulation of Connexin 43 in a Mouse Model ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 17 juillet 2017. Vol. 11, p. 207. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00207> >
- Lin S.-H., Lu C.-Y., Muhammad R., Chou W. Y., Lin F.-C., Wu P.-C., Lin C.-R., Yang L.-C.

« Induction of connexin 37 expression in a rat model of neuropathic pain ». *Molecular Brain Research* [En ligne]. mars 2002. Vol. 99, n°2, p. 134-140. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00112-2) >

Linden R., Antunes M. V., Ziulkoski A. L., Wingert M., Tonello P., Tzvetkov M., Souto A. A. « Determination of amitriptyline and its main metabolites in human plasma samples using HPLC-DAD: application to the determination of metabolic ratios after single oral dose of amitriptyline ». *J. Braz. Chem. Soc.* [En ligne]. 2008. Vol. 19, n°1, p. 35-41. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000100007> >

Liu Z., Song Z., Guo S., He J., Wang S., Zhu J., Yang H., Liu J. « CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain via central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model ». *CNS Neurosci Ther* [En ligne]. 7 avril 2019. p. cns.13128. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/cns.13128> >

Llorca-Torralba M., Borges G., Neto F., Mico J. A., Berrocoso E. « Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation ». *Neuroscience* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 338, p. 93-113. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.057> >

Ma W., Compan V., Zheng W., Martin E., North R. A., Verkhratsky A., Surprenant A. « Pannexin 1 forms an anion-selective channel ». *Pflugers Arch.* [En ligne]. avril 2012. Vol. 463, n°4, p. 585-592. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1077-z> >

Mao M. Y., Tonkin M. R. S., Nguyen T., O'Carroll D. S. J., Nicholson L. F., Green C. R., Moalem-Taylor D. G., Gorrie D. C. A. « Systemic administration of Connexin43 mimetic peptide improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in adult rats ». *Journal of Neurotrauma* [En ligne]. 2016. p. 48. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4625> >

Mao Y., Nguyen T., Tonkin R. S., Lees J. G., Warren C., O'Carroll S. J., Nicholson L. F. B., Green C. R., Moalem-Taylor G., Gorrie C. A. « Characterisation of Peptide5 systemic administration for treating traumatic spinal cord injured rats ». *Exp Brain Res* [En ligne]. octobre 2017. Vol. 235, n°10, p. 3033-3048. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5023-3> >

Mapplebeck J. C. S., Lorenzo L.-E., Lee K. Y., Gauthier C., Muley M. M., De Koninck Y., Prescott S. A., Salter M. W. « Chloride Dysregulation through Downregulation of KCC2 Mediates Neuropathic Pain in Both Sexes ». *Cell Reports* [En ligne]. juillet 2019. Vol. 28, n°3, p. 590-596.e4. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.059> >

Martinez V., Attal N., Bouhassira D., Lantéri-Minet M. « Les douleurs neuropathiques

chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d'étude et de traitement de la douleur ». *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement* [En ligne]. février 2010. Vol. 11, n°1, p. 3-21. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.douler.2009.12.009> >

Martini L., Hoffmann F. « Comorbidity of chronic back pain and depression in Germany: Results from the GEDA study, 2009 and 2010 ». *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* [En ligne]. novembre 2018. Vol. 137-138, p. 62-68. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.zefq.2018.10.003> >

Max M. B., Culnane M., Schafer S. C., Gracely R. H., Walther D. J., Smoller B., Dubner R. « Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood ». *Neurology* [En ligne]. avril 1987. Vol. 37, n°4, p. 589-596. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1212/wnl.37.4.589> >

McArdle J. J., Sellin L. C., Coakley K. M., Potian J. G., Hognason K. « Mefloquine selectively increases asynchronous acetylcholine release from motor nerve terminals ». *Neuropharmacology* [En ligne]. mars 2006. Vol. 50, n°3, p. 345-353. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.09.011> >

McDermott A. M., Toelle T. R., Rowbotham D. J., Schaefer C. P., Dukes E. M. « The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey ». *European Journal of Pain* [En ligne]. février 2006. Vol. 10, n°2, p. 127-127. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.01.014> >

McLachlan E. M., Jänig W., Devor M., Michaelis M. « Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia ». *Nature* [En ligne]. juin 1993. Vol. 363, n°6429, p. 543-546. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/363543a0> >

Meacham K., Shepherd A., Mohapatra D. P., Haroutounian S. « Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms ». *Curr Pain Headache Rep* [En ligne]. juin 2017. Vol. 21, n°6, p. 28. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0629-5> >

Medicaments.gouv.fr. « Notice patient - LARIAM 250 mg, comprimé sécable - Base de données publique des médicaments ». [s.l.] : [s.n.], [s.d.]. Disponible sur : < <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=65999556&typedoc=N> > (consulté le 10 décembre 2019)

Mick G., Perrot S., Poulain P., Serrie A., Eschalier A., Langley P., Pomerantz D., Ganry H. « Impact sociétal de la douleur en France : résultats de l'enquête épidémiologique National Health and Wellness Survey auprès de plus de 15 000 personnes adultes ». *Douleurs :*

Evaluation - Diagnostic - Traitement [En ligne]. 1 avril 2013. Vol. 14, n°2, p. 57-66. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.douler.2012.12.014> >

Mico J., Ardid D., Berrocoso E., Eschalier A. « Antidepressants and pain ». *Trends in Pharmacological Sciences* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 27, n°7, p. 348-354. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.05.004> >

Milatovic D., Jenkins J. W., Hood J. E., Yu Y., Rongzhu L., Aschner M. « Mefloquine neurotoxicity is mediated by non-receptor tyrosine kinase ». *NeuroToxicology* [En ligne]. octobre 2011. Vol. 32, n°5, p. 578-585. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.01.001> >

Millan M. J. « Descending control of pain ». *Progress in Neurobiology* [En ligne]. avril 2002. Vol. 66, n°6, p. 355-474. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6) >

Mimica I., Fry W., Eckert G., Schwartz D. E. « Multiple-Dose Kinetic Study of Mefloquine in Healthy Male Volunteers ». *Chemotherapy* [En ligne]. 1983. Vol. 29, n°3, p. 184-187. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1159/000238195> >

Moore R. A., Derry S., Aldington D., Cole P., Wiffen P. J. « Amitriptyline for neuropathic pain in adults ». *Cochrane Database of Systematic Reviews* [En ligne]. 6 juillet 2015. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008242.pub3> > (consulté le 5 décembre 2019)

Morioka N., Fujii S., Kondo S., Zhang F. F., Miyauchi K., Nakamura Y., Hisaoka-Nakashima K., Nakata Y. « Downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 and mechanical hypersensitivity in mice ». *Glia* [En ligne]. février 2018. Vol. 66, n°2, p. 428-444. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/glia.23255> >

Morioka N., Suekama K., Zhang F. F., Kajitani N., Hisaoka-Nakashima K., Takebayashi M., Nakata Y. « Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway: Effect of amitriptyline on connexin43 expression ». *Br J Pharmacol* [En ligne]. juin 2014. Vol. 171, n°11, p. 2854-2867. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/bph.12614> >

Morioka N., Zhang F. F., Nakamura Y., Kitamura T., Hisaoka-Nakashima K., Nakata Y. « Tumor necrosis factor-mediated downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to increased glutamatergic neurotransmission and neuropathic pain in mice ». *Brain, Behavior, and Immunity* [En ligne]. octobre 2015. Vol. 49, p. 293-310. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.015> >

- Mosconi T., Kruger L. « Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations »: *Pain* [En ligne]. janvier 1996. Vol. 64, n°1, p. 37-57. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00077-1) >
- Nakamura Y., Morioka N., Zhang F. F., Hisaoka-Nakashima K., Nakata Y. « Downregulation of connexin36 in mouse spinal dorsal horn neurons leads to mechanical allodynia: Diminished Connexin36 Causes Allodynia (38/40) ». *Journal of Neuroscience Research* [En ligne]. avril 2015. Vol. 93, n°4, p. 584-591. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/jnr.23515> >
- Neumann E., Hermanns H., Barthel F., Werdehausen R., Brandenburger T. « Expression Changes of MicroRNA-1 and its Targets Connexin 43 and Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Peripheral Nervous System of Chronic Neuropathic Rats ». *Mol Pain* [En ligne]. 28 août 2015. Vol. 11, p. s12990-015-0045. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0045-y> >
- Nevin R. L. « Mefloquine blockade of connexin 43 (Cx43) and risk of pregnancy loss ». *Placenta* [En ligne]. septembre 2011. Vol. 32, n°9, p. 712. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.016> >
- Nicholas M., Vlaeyen J. W. S., Rief W., Barke A., Aziz Q., Benoliel R., Cohen M., Evers S., Giamberardino M. A., Goebel A., Korwisi B., Perrot S., Svensson P., Wang S.-J., Treede R.-D. « The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain ». *PAIN* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 160, n°1, p. 28-37. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001390> >
- Nielsen B. S., Toft-Bertelsen T. L., Lolansen S. D., Anderson C., Nielsen M. S., Thompson R. J., MacAulay N. « Pannexin 1 activation and inhibition is permeant-selective ». *J. Physiol. (Lond.)* [En ligne]. 7 novembre 2019. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1113/JP278759> >
- Nielsen C. S. « Chronic pain is strongly associated with work disability ». *Scand J Pain* [En ligne]. 1 octobre 2013. Vol. 4, n°4, p. 180-181. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2013.08.002> >
- Norkus C., Rankin D., KuKanich B. « Pharmacokinetics of intravenous and oral amitriptyline and its active metabolite nortriptyline in Greyhound dogs ». *Vet Anaesth Analg* [En ligne]. novembre 2015. Vol. 42, n°6, p. 580-589. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/vaa.12248> >
- North R. Y., Lazaro T. T., Dougherty P. M. « Ectopic Spontaneous Afferent Activity and Neuropathic Pain ». *Neurosurgery* [En ligne]. 1 septembre 2018. Vol. 65, n°CN_suppl_1,

p. 49-54. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy119> >

Ohara P. T., Vit J.-P., Bhargava A., Jasmin L. « Evidence for a Role of Connexin 43 in Trigeminal Pain Using RNA Interference In Vivo ». *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. décembre 2008. Vol. 100, n°6, p. 3064-3073. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1152/jn.90722.2008> >

Ohta M., Okajima S., Hirakawa H., Tokunaga D., Fujiwara H., Oda R., Kobashi H., Hirata M., Kubo T. « Expression of tight and gap junctional proteins in the perineurial window model of the rat sciatic nerve ». *International Journal of Neuroscience* [En ligne]. janvier 2005. Vol. 115, n°10, p. 1469-1481. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/00207450591001871> >

Okamura Y., Nishino A., Murata Y., Nakajo K., Iwasaki H., Ohtsuka Y., Tanaka-Kunishima M., Takahashi N., Hara Y., Yoshida T., Nishida M., Okado H., Watari H., Meinertzhagen I. A., Satoh N., Takahashi K., Satou Y., Okada Y., Mori Y. « Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes ». *Physiological Genomics* [En ligne]. 11 août 2005. Vol. 22, n°3, p. 269-282. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00229.2004> >

Okinami T., Imamura M., Nishikawa N., Negoro H., Sugino Y., Yoshimura K., Kanematsu A., Hashitani H., Ogawa O. « Altered Detrusor Gap Junction Communications Induce Storage Symptoms in Bladder Inflammation: A Mouse Cyclophosphamide-Induced Model of Cystitis ». *PLoS ONE* [En ligne]. 6 août 2014. Vol. 9, n°8, p. e104216. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104216> >

Olausson H., Wessberg J., Morrison I., McGlone F., Vallbo Å. « The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [En ligne]. 1 février 2010. Vol. 34, n°2, p. 185-191. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.09.011> >

Olesen O. V., Linnet K. « Metabolism of the Tricyclic Antidepressant Amitriptyline by cDNA-Expressed Human Cytochrome P450 Enzymes ». *Pharmacology* [En ligne]. 1997. Vol. 55, n°5, p. 235-243. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1159/000139533> >

OMS. *World Malaria Report 2015*. [s.l.] : Organisation Mondiale de la Santé, 2016. 283 p. ISBN : 978-92-4-156515-8.

Ongghena P., Van Houdenhove B. « Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain: a meta-analysis of 39 placebo-controlled studies ». *Pain* [En ligne]. mai 1992. Vol. 49, n°2, p. 205-219. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90144-z](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90144-z) >

- Ossipov M. H., Morimura K., Porreca F. « Descending pain modulation and chronification of pain ». *Curr Opin Support Palliat Care* [En ligne]. juin 2014. Vol. 8, n°2, p. 143-151. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000055> >
- Ouachikh O., Hafidi A., Boucher Y., Dieb W. « Electrical Synapses are Involved in Orofacial Neuropathic Pain ». *Neuroscience* [En ligne]. juillet 2018a. Vol. 382, p. 69-79. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.041> >
- Ouachikh O., Hafidi A., Boucher Y., Dieb W. « Electrical Synapses are Involved in Orofacial Neuropathic Pain ». *Neuroscience* [En ligne]. juillet 2018b. Vol. 382, p. 69-79. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.041> >
- Owens M. J., Morgan W. N., Plott S. J., Nemeroff C. B. « Neurotransmitter Receptor and Transporter Binding Profile of Antidepressants and Their Metabolites ». *J Pharmacol Exp Ther*. 1 décembre 1997. Vol. 283, n°3, p. 1305-1322.
- Özdoğan Ü. K., Lähdesmäki J., Mansikka H., Scheinin M. « Loss of amitriptyline analgesia in α 2A-adrenoceptor deficient mice ». *European Journal of Pharmacology* [En ligne]. février 2004. Vol. 485, n°1-3, p. 193-196. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.047> >
- Paoli F., Darcourt G., Cossa P. « Note préliminaire sur l'action de l'imipramine dans les états douloureux ». *Rev. Neurol. (Paris)*. mai 1960. Vol. 102, p. 503-504.
- Paterniti I., Melani A., Cipriani S., Corti F., Mello T., Mazzon E., Esposito E., Bramanti P., Cuzzocrea S., Pedata F. « Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects ». *J Neuroinflammation* [En ligne]. 2011. Vol. 8, n°1, p. 31. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-31> >
- Pérez Armendariz E. M., Norcini M., Hernández-Tellez B., Castell-Rodríguez A., Coronel-Cruz C., Alquicira R. G., Sideris A., Recio-Pinto E. « Neurons and satellite glial cells in adult rat lumbar dorsal root ganglia express connexin 36 ». *Acta Histochemica* [En ligne]. avril 2018. Vol. 120, n°3, p. 168-178. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.11.005> >
- Pertovaara A. « The noradrenergic pain regulation system: A potential target for pain therapy ». *European Journal of Pharmacology* [En ligne]. septembre 2013. Vol. 716, n°1-3, p. 2-7. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.067> >
- Petersen E., Rønne T., Rønn A., Bygbjerg I., Larsen S. O. « Reported Side Effects to Chloroquine, Chloroquine plus Proguanil, and Mefloquine as Chemoprophylaxis against Malaria in Danish Travelers ». *Journal of Travel Medicine* [En ligne]. 1 mars 2000. Vol. 7,

- n°2, p. 79-84. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2310/7060.2000.00026> >
- Phelan P., Starich T. A. « Innexins get into the gap ». *BioEssays* [En ligne]. 2001. Vol. 23, n°5, p. 388-396. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/bies.1057> >
- Picoli C., Soleilhac E., Journet A., Barette C., Comte M., Giaume C., Mouthon F., Fauvarque M.-O., Charvériat M. « High-Content Screening Identifies New Inhibitors of Connexin 43 Gap Junctions ». *ASSAY and Drug Development Technologies* [En ligne]. juillet 2019. Vol. 17, n°5, p. 240-248. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1089/adt.2019.927> >
- Pinheiro A. R., Paramos-de-Carvalho D., Certal M., Costa M. A., Costa C., Magalhães-Cardoso M. T., Ferreirinha F., Sévigny J., Correia-de-Sá P. « Histamine Induces ATP Release from Human Subcutaneous Fibroblasts, via Pannexin-1 Hemichannels, Leading to Ca²⁺ Mobilization and Cell Proliferation ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 20 septembre 2013. Vol. 288, n°38, p. 27571-27583. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460865> >
- Qin M., Wang J.-J., Cao R., Zhang H., Duan L., Gao B., Xiong Y.-F., Chen L.-W., Rao Z.-R. « The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat ». *Neuroscience Research* [En ligne]. août 2006. Vol. 55, n°4, p. 442-450. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.04.017> >
- Raftery M. N., Ryan P., Normand C., Murphy A. W., De la Harpe D., McGuire B. E. « The economic cost of chronic noncancer pain in Ireland: results from the PRIME study, part 2 ». *J Pain* [En ligne]. février 2012. Vol. 13, n°2, p. 139-145. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.10.004> >
- Ramer M. S., Bisby M. A. « Normal and injury-induced sympathetic innervation of rat dorsal root ganglia increases with age ». *J. Comp. Neurol.* 27 avril 1998. Vol. 394, n°1, p. 38-47.
- Raslan A., Hainz N., Beckmann A., Tschernig T., Meier C. « Pannexin-1 expression in developing mouse nervous system: new evidence for expression in sensory ganglia ». *Cell Tissue Res* [En ligne]. avril 2016. Vol. 364, n°1, p. 29-41. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2294-5> >
- Rey R. *Histoire de la douleur*. Paris : La Découverte, 1993. 420 p.(Histoire des Sciences). ISBN : 2-7071-2255-6.
- Roberts G., Kent B., Prys D., Lewis R. « Describing chronic pain: towards bilingual practice ». *International Journal of Nursing Studies* [En ligne]. 1 novembre 2003. Vol. 40, n°8, p. 889-902. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0020-7489\(03\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7489(03)00055-5) >
- Ruhé H. G., Mason N. S., Schene A. H. « Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion

- studies ». *Mol Psychiatry* [En ligne]. avril 2007. Vol. 12, n°4, p. 331-359. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001949> >
- Saarto T., Wiffen P. J. « Antidepressants for neuropathic pain ». *Cochrane Database of Systematic Reviews* [En ligne]. 17 octobre 2007. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005454.pub2> > (consulté le 6 décembre 2019)
- Sáez J. C., Retamal M. A., Basilio D., Bukauskas F. F., Bennett M. V. L. « Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms ». *Biochim Biophys Acta* [En ligne]. 10 juin 2005. Vol. 1711, n°2, p. 215-224. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.014> >
- Salvat E., Yalcin I., Muller A., Barrot M. « A comparison of early and late treatments on allodynia and its chronification in experimental neuropathic pain ». *Mol Pain* [En ligne]. 6 décembre 2017. Vol. 14,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/1744806917749683> > (consulté le 6 novembre 2019)
- Sasakura Y., Shoguchi E., Takatori N., Wada S., Meinertzhagen I. A., Satou Y., Satoh N. « A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: X. Genes for cell junctions and extracellular matrix ». *Dev Genes Evol* [En ligne]. juin 2003. Vol. 213, n°5-6, p. 303-313. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00427-003-0320-1> >
- Sauvet F., Erblang M., Gomez-Merino D., Rabat A., Guillard M., Dubourdieu D., Lefloch H., Drogou C., Van Beers P., Bougard C., Bourrillhon C., Arnal P., Rein W., Mouthon F., Brunner-Ferber F., Leger D., Dauvilliers Y., Chennaoui M., Charvériat M. « Efficacy of THN102 (a combination of modafinil and flecainide) on vigilance and cognition during 40-hour total sleep deprivation in healthy subjects: Glial connexins as a therapeutic target ». *Br J Clin Pharmacol* [En ligne]. novembre 2019. Vol. 85, n°11, p. 2623-2633. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/bcp.14098> >
- Sawynok J. « Adenosine receptor targets for pain ». *Neuroscience* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 338, p. 1-18. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.031> >
- Scholz J., Finnerup N., Attal N., Aziz Q., Baron R., Bennett M., Benoliel R., Cohen M., Cruccu G., Davis K., Evers S., First M., Giamberardino M., Hansson P., Kaasa S., Korwisi B., Kosek E., Lavand'homme P., Nicholas M., Nurmikko T., Perrot S., Raja S., Rice A., Rowbotham M., Schug S., Simpson D., Smith B., Svensson P., Vlaeyen J., Wang S.-J., Barke A., Rief W., Treede R.-D. « The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain ». *Pain* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 160, n°1, p. 53-59. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365> >

Bibliographie

- Scholz J., Finnerup N. B., Attal N., Aziz Q., Baron R., Bennett M. I., Benoliel R., Cohen M., Cruccu G., Davis K. D., Evers S., First M., Giamberardino M. A., Hansson P., Kaasa S., Korwisi B., Kosek E., Lavand'homme P., Nicholas M., Nurmikko T., Perrot S., Raja S. N., Rice A. S. C., Rowbotham M. C., Schug S., Simpson D. M., Smith B. H., Svensson P., Vlaeyen J. W. S., Wang S.-J., Barke A., Rief W., Treede R.-D. « The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain ». *PAIN* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 160, n°1, p. 53-59. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365> >
- Schwartz D. E., Eckert G., Hartmann D., Weber B., Richard-Lenoble D., Ekue J. M. K., Gentilini M. « Single Dose Kinetics of Mefloquine in Man ». *Chemotherapy* [En ligne]. 1982. Vol. 28, n°1, p. 70-84. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1159/000238062> >
- Schwartz D. E., Weber W., Richard-Lenoble D., Gentilini M. « Kinetic studies of mefloquine and of one of its metabolites, Ro 21-5104, in the dog and in man ». *Acta Trop.* septembre 1980. Vol. 37, n°3, p. 238-242.
- Seibt F. *Effets de la noradrénaline sur les transmissions synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat.* [s.l.] : Université de Strasbourg, 2015. 161 p.
- Seibt F., Schlichter R. « Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications ». *Eur J Neurosci* [En ligne]. novembre 2015. Vol. 42, n°9, p. 2654-2665. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/ejn.13077> >
- Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. « A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury ». *Pain.* novembre 1990. Vol. 43, n°2, p. 205-218.
- Shields S. D., Eckert W. A., Basbaum A. I. « Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis ». *The Journal of Pain* [En ligne]. octobre 2003. Vol. 4, n°8, p. 465-470. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1067/S1526-5900\(03\)00781-8](https://doi.org/10.1067/S1526-5900(03)00781-8) >
- Sindrup S. H., Otto M., Finnerup N. B., Jensen T. S. « Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain ». *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [En ligne]. 2005. Vol. 96, n°6, p. 399-409. Disponible sur : < https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_96696601.x >
- Sneider W. *Drug Discovery: A History.* [s.l.] : John Wiley & Sons, 2005. 483 p. ISBN : 978-0-470-01552-0.
- Sonohata M., Furue H., Katafuchi T., Yasaka T., Doi A., Kumamoto E., Yoshimura M.

« Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by *in vivo* patch recording: Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones ». *The Journal of Physiology* [En ligne]. 1 mars 2004. Vol. 555, n°2, p. 515-526. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.054932> >

Sosinsky G. E., Boassa D., Dermietzel R., Duffy H. S., Laird D. W., MacVicar B., Naus C. C., Penuela S., Scemes E., Spray D. C., Thompson R. J., Zhao H.-B., Dahl G. « Pannexin channels are not gap junction hemichannels ». *Channels (Austin)* [En ligne]. juin 2011. Vol. 5, n°3, p. 193-197. Disponible sur : < <https://doi.org/10.4161/chan.5.3.15765> >

Sowunmi A., Salako L. A., Walker O., Ogundahunsi O. A. « Clinical efficacy of mefloquine in children suffering from chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Nigeria ». *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* [En ligne]. décembre 1990. Vol. 84, n°6, p. 761-764. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90067-o](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90067-o) >

Specht C. G., Schoepfer R. « Deletion of multimerin-1 in α -synuclein-deficient mice ». *Genomics* [En ligne]. juin 2004. Vol. 83, n°6, p. 1176-1178. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.014> >

Spray D. C., Iglesias R., Shraer N., Suadicani S. O., Belzer V., Hanstein R., Hanani M. « Gap junction mediated signaling between satellite glia and neurons in trigeminal ganglia ». *2019* [En ligne]. mai 2019. Vol. 67, n°5, p. 791-801. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/glia.23554> >

Starobova H., Vetter I. « Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy ». *Front Mol Neurosci* [En ligne]. 31 mai 2017. Vol. 10,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00174> > (consulté le 17 octobre 2019)

Stein C., Kopf A. « Pain therapy – Are there new options on the horizon? ». *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* [En ligne]. 1 juin 2019. Vol. 33, n°3, p. 101420. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.06.002> >

Stenager E., Christiansen E., Handberg G., Jensen B. « Suicide attempts in chronic pain patients. A register-based study ». *Scandinavian Journal of Pain* [En ligne]. 1 janvier 2014. Vol. 5, n°1, p. 4-7. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2013.09.001> >

Tanabe M., Takasu K., Takeuchi Y., Ono H. « Pain relief by gabapentin and pregabalin via supraspinal mechanisms after peripheral nerve injury ». *J. Neurosci. Res.* [En ligne]. 15 novembre 2008. Vol. 86, n°15, p. 3258-3264. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/jnr.21786> >

Tang W., Ahmad S., Shestopalov V. I., Lin X. « Pannexins are new molecular candidates for

assembling gap junctions in the cochlea »: *NeuroReport* [En ligne]. août 2008. Vol. 19, n°13, p. 1253-1257. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32830891f5> >

Tatsumi M., Groshan K., Blakely R. D., Richelson E. « Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters ». *European Journal of Pharmacology* [En ligne]. décembre 1997. Vol. 340, n°2-3, p. 249-258. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01393-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01393-9) >

Tickell-Painter M., Maayan N., Saunders R., Pace C., Sinclair D. « Mefloquine for preventing malaria during travel to endemic areas ». *Cochrane Database Syst Rev* [En ligne]. 30 2017. Vol. 10, p. CD006491. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006491.pub4> >

Todd A. J. « Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor ». *Exp. Physiol.* mars 2002. Vol. 87, n°2, p. 245-249.

Tonkin R. S., Bowles C., Perera C. J., Keating B. A., Makker P. G. S., Duffy S. S., Lees J. G., Tran C., Don A. S., Fath T., Liu L., O'Carroll S. J., Nicholson L. F. B., Green C. R., Gorrie C., Moalem-Taylor G. « Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice ». *Experimental Neurology* [En ligne]. février 2018. Vol. 300, p. 1-12. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.016> >

Treede R.-D., Rief W., Barke A., Aziz Q., Bennett M. I., Benoliel R., Cohen M., Evers S., Finnerup N. B., First M. B., Giamberardino M. A., Kaasa S., Korwisi B., Kosek E., Lavand'homme P., Nicholas M., Perrot S., Scholz J., Schug S., Smith B. H., Svensson P., Vlaeyen J. W. S., Wang S.-J. « Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11) ». *PAIN* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 160, n°1, p. 19-27. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384> >

Turpie A. G., Thomson T. J. « Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference to side-effects. » *Gut* [En ligne]. 1 décembre 1965. Vol. 6, n°6, p. 591-594. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1136/gut.6.6.591> >

Upward J. W., Edwards J. G., Goldie A., Waller D. G. « Comparative effects of fluoxetine and amitriptyline on cardiac function ». *Br J Clin Pharmacol* [En ligne]. octobre 1988. Vol. 26, n°4, p. 399-402. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1988.tb03397.x> >

Valentin G. H., Pilegaard M. S., Vaegter H. B., Rosendal M., Ørtenblad L., Væggemose U.,

- Christensen R. « Prognostic factors for disability and sick leave in patients with subacute non-malignant pain: a systematic review of cohort studies ». *BMJ Open* [En ligne]. 6 janvier 2016. Vol. 6, n°1, p. e007616. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-007616> >
- Vazzana M., Andreani T., Fangueiro J., Faggio C., Silva C., Santini A., Garcia M. L., Silva A. M., Souto E. B. « Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* [En ligne]. 1 mars 2015. Vol. 70, p. 234-238. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.022> >
- Venkatakrishnan Karthik, Schmider J., Harmatz J. S., Ehrenberg B. L., Von Moltke L. L., Graf J. A., Mertzanis P., Corbett K. E., Rodriguez M. C., Shader R. I., Greenblatt D. J. « Relative Contribution of CYP3A to Amitriptyline Clearance in Humans: In Vitro and In Vivo Studies ». *The Journal of Clinical Pharmacology* [En ligne]. octobre 2001. Vol. 41, n°10, p. 1043-1054. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/00912700122012634> >
- Venkatakrishnan K., Schmider J., Harmatz J. S., Ehrenberg B. L., Von Moltke L. L., Graf J. A., Mertzanis P., Corbett K. E., Rodriguez M. C., Shader R. I., Greenblatt D. J. « Relative contribution of CYP3A to amitriptyline clearance in humans: in vitro and in vivo studies ». *J Clin Pharmacol* [En ligne]. octobre 2001. Vol. 41, n°10, p. 1043-1054. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/00912700122012634> >
- Vit J.-P., Jasmin L., Bhargava A., Ohara P. T. « Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain ». *Neuron Glia Biol.* [En ligne]. novembre 2006. Vol. 2, n°4, p. 247-257. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1017/S1740925X07000427> >
- Vos B. P., Strassman A. M., Maciewicz R. J. « Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 mai 1994. Vol. 14, n°5, p. 2708-2723. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02708.1994> >
- Walker E. A., Roy-Byrne P. P., Katon W. J., Jemelka R. « An open trial of nortriptyline in women with chronic pelvic pain ». *Int J Psychiatry Med* [En ligne]. 1991. Vol. 21, n°3, p. 245-252. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2190/EXRP-J206-CBWT-UTFK> >
- Wang H., Sun X. « Carbon Monoxide-Releasing Molecule-2 Inhibits Connexin 43-Hemichannel Activity in Spinal Cord Astrocytes to Attenuate Neuropathic Pain ». *J Mol Neurosci* [En ligne]. septembre 2017. Vol. 63, n°1, p. 58-69. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0957-2> >

- Wang N., De Bock M., Decrock E., Bol M., Gadicherla A., Vinken M., Rogiers V., Bukauskas F. F., Bultynck G., Leybaert L. « Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [En ligne]. janvier 2013. Vol. 1828, n°1, p. 35-50. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.002> >
- Wattiez A.-S., Dupuis A., Privat A.-M., Chalus M., Chapuy E., Aissouni Y., Eschalier A., Courteix C. « Disruption of 5-HT 2A -PDZ protein interaction differently affects the analgesic efficacy of SSRI, SNRI and TCA in the treatment of traumatic neuropathic pain in rats ». *Neuropharmacology* [En ligne]. octobre 2017. Vol. 125, p. 308-318. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.034> >
- Weiss S. M., Benwell K., Cliffe I. A., Gillespie R. J., Knight A. R., Lerpiniere J., Misra A., Pratt R. M., Revell D., Upton R., Dourish C. T. « Discovery of nonxanthine adenosine A2A receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease ». *Neurology* [En ligne]. 9 décembre 2003. Vol. 61, n°Issue 11, Supplement 6, p. S101-S106. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000095581.20961.7D> >
- Wenger T. L., Cohn J. B., Bustrack J. « Comparison of the effects of bupropion and amitriptyline on cardiac conduction in depressed patients ». *J Clin Psychiatry*. mai 1983. Vol. 44, n°5 Pt 2, p. 174-175.
- Willebrords J., Maes M., Crespo Yanguas S., Vinken M. « Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics ». *Pharmacology & Therapeutics* [En ligne]. décembre 2017. Vol. 180, p. 144-160. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.001> >
- Woolf C. J. « Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain »: *Pain* [En ligne]. mars 2011. Vol. 152, n°Supplement, p. S2-S15. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030> >
- Wooltorton E. « Mefloquine: contraindicated in patients with mood, psychotic or seizure disorders ». *CMAJ*. 12 novembre 2002. Vol. 167, n°10, p. 1147.
- Wu J.-I., Wang L.-H. « Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application ». *J Biomed Sci* [En ligne]. 14 janvier 2019. Vol. 26,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0497-x> > (consulté le 18 novembre 2019)
- Wu X.-F., Liu W.-T., Liu Y.-P., Huang Z.-J., Zhang Y.-K., Song X.-J. « Reopening of ATP-sensitive potassium channels reduces neuropathic pain and regulates astroglial gap junctions

in the rat spinal cord »: *Pain* [En ligne]. novembre 2011. Vol. 152, n°11, p. 2605-2615. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.08.003> >

Xing L., Yang T., Cui S., Chen G. « Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders ». *Front. Mol. Neurosci.* [En ligne]. 6 février 2019. Vol. 12, p. 23. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00023> >

Xu Q., Cheong Y.-K., He S.-Q., Tiwari V., Liu J., Wang Y., Raja S. N., Li J., Guan Y., Li W. « Suppression of spinal connexin 43 expression attenuates mechanical hypersensitivity in rats after an L5 spinal nerve injury ». *Neuroscience Letters* [En ligne]. avril 2014. Vol. 566, p. 194-199. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.004> >

Yalcin I., Barrot M. « The anxiodepressive comorbidity in chronic pain ». *Curr Opin Anaesthesiol* [En ligne]. octobre 2014. Vol. 27, n°5, p. 520-527. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000116> >

Yalcin I., Choucair-Jaafar N., Benbouzid M., Tessier L.-H., Muller A., Hein L., Freund-Mercier M.-J., Barrot M. « β 2-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain ». *Ann Neurol.* [En ligne]. février 2009. Vol. 65, n°2, p. 218-225. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ana.21542> >

Yalcin I., Megat S., Barthas F., Waltisperger E., Kremer M., Salvat E., Barrot M. « The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice ». *Journal of Visualized Experiments* [En ligne]. 16 juillet 2014. n°89,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3791/51608> > (consulté le 29 mai 2016)

Yalcin I., Tessier L.-H., Petit-Demoulière N., Doridot S., Hein L., Freund-Mercier M.-J., Barrot M. « β 2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain ». *Neurobiology of Disease* [En ligne]. 1 mars 2009. Vol. 33, n°3, p. 386-394. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.003> >

Yang H., Yan H., Li X., Liu J., Cao S., Huang B., Huang D., Wu L. « Inhibition of Connexin 43 and Phosphorylated NR2B in Spinal Astrocytes Attenuates Bone Cancer Pain in Mice ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 8 mai 2018. Vol. 12, p. 129. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00129> >

Yoon S.-Y., Robinson C. R., Zhang H., Dougherty P. M. « Spinal Astrocyte Gap Junctions Contribute to Oxaliplatin-Induced Mechanical Hypersensitivity ». *The Journal of Pain* [En ligne]. février 2013. Vol. 14, n°2, p. 205-214. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.11.002> >

Yorek M. A. « Alternatives to the Streptozotocin-Diabetic Rodent ». In : *International Review*

of Neurobiology [En ligne]. [s.l.] : Elsevier, 2016. p. 89-112. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.002> > (consulté le 8 janvier 2020) ISBN : 978-0-12-803915-1.

Zhang F. F., Morioka N., Kitamura T., Fujii S., Miyauchi K., Nakamura Y., Hisaoka-Nakashima K., Nakata Y. « Lycopene ameliorates neuropathic pain by upregulating spinal astrocytic connexin 43 expression ». *Life Sciences* [En ligne]. juin 2016. Vol. 155, p. 116-122. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.021> >

Zhang Y., Laumet G., Chen S.-R., Hittelman W. N., Pan H.-L. « Pannexin-1 Up-regulation in the Dorsal Root Ganglion Contributes to Neuropathic Pain Development ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 5 juin 2015. Vol. 290, n°23, p. 14647-14655. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650218> >

Zhou C. « Mefloquine Enhances Nigral -Aminobutyric Acid Release via Inhibition of Cholinesterase ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [En ligne]. 2 mars 2006. Vol. 317, n°3, p. 1155-1160. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101923> >

Zhou J., Chen H., Yang C., Zhong J., He W., Xiong Q. « Reversal of TRESK Downregulation Alleviates Neuropathic Pain by Inhibiting Activation of Gliocytes in the Spinal Cord ». *Neurochem Res* [En ligne]. mai 2017. Vol. 42, n°5, p. 1288-1298. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2170-z> >

Zhuo M. « Contribution of synaptic plasticity in the insular cortex to chronic pain ». *Neuroscience* [En ligne]. décembre 2016. Vol. 338, p. 220-229. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.014> >

Annexes

Annexe 1. Partie supplémentaire de l'article de thèse

Binding screening for mefloquine targets

According to the CRO (Eurofins CEREP) recommendations, results showing an inhibition (or a stimulation for assays run in basal conditions) higher than 50% were considered to represent significant effects of THN101. This cut-off value was thus considered for further investigation, such as determination of IC₅₀ or EC₅₀ values from concentration-response curves (see below). Results showing an inhibition (or stimulation) between 25% and 50% were considered as indicative of weak to moderate effects. Results showing an inhibition (or stimulation) lower than 25% were not considered significant, being mostly attributable to the variability of the signal around control levels.

Binding assays

Results were expressed as a percent of control specific binding:

$$\frac{\text{measured specific binding}}{\text{control specific binding}} \times 100$$

and as a percent inhibition of control specific binding:

$$100 - \left(\frac{\text{measured specific binding}}{\text{control specific binding}} \times 100 \right)$$

obtained in the presence of THN01.

The IC₅₀ values (concentration causing a half-maximal inhibition of control specific binding) and Hill coefficients (nH) were determined by non-linear regression analysis of the competition curves generated with mean replicate values using Hill equation curve fitting:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + \left(\frac{C}{C_{50}} \right)^{nH}} \right]$$

where Y = specific binding, A = left asymptote of the curve, D = right asymptote of the curve, C = compound concentration, C₅₀ = IC₅₀, and nH = slope factor. This analysis was performed using software developed at CEREP (Hill software) and validated by comparison with data generated by the commercial software SigmaPlot[®] 4.0 for Windows[®] (© 1997 by SPSS Inc.). The inhibition constants (K_i) were calculated using the Cheng Prusoff equation:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{L}{K_D} \right)}$$

where L = concentration of radioligand in the assay, and K_D = affinity of the radioligand for the receptor. A scatchard plot is used to determine the K_D .

Receptor Functional Assays

The results are expressed as a percent of control agonist response or inverse agonist response:

$$\frac{\text{measured response}}{\text{control response}} \times 100$$

and as a percent inhibition of control agonist response:

$$100 - \left(\frac{\text{measured response}}{\text{control response}} \times 100 \right)$$

obtained in the presence of THN01.

The EC_{50} values (concentration producing a half-maximal response) and IC_{50} values (concentration causing a half-maximal inhibition of the control agonist response) were determined by non-linear regression analysis of the concentration-response curves generated with mean replicate values using Hill equation curve fitting:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + \left(\frac{C}{C_{50}} \right)^{nH}} \right]$$

where Y = response, A = left asymptote of the curve, D = right asymptote of the curve, C = compound concentration, and C_{50} = EC_{50} or IC_{50} , and nH = slope factor.

This analysis was performed using software developed at CEREP (Hill software) and validated by comparison with data generated by the commercial software SigmaPlot® 4.0 for Windows® (© 1997 by SPSS Inc.).

For the antagonists, the apparent dissociation constants (K_B) were calculated using the modified Cheng Prusoff equation:

$$K_B = \frac{IC_{50}}{\left(1 + A/EC_{50A} \right)}$$

where A = concentration of reference agonist in the assay, and EC_{50A} = EC_{50} value of the reference agonist.

Uptake Assays

The results are expressed as a percent of control specific activity:

$$\frac{\text{measured specific activity}}{\text{control specific activity}} \times 100$$

And as a percent inhibition of control specific activity:

$$100 - \left(\frac{\text{measured specific activity}}{\text{control specific activity}} \times 100 \right)$$

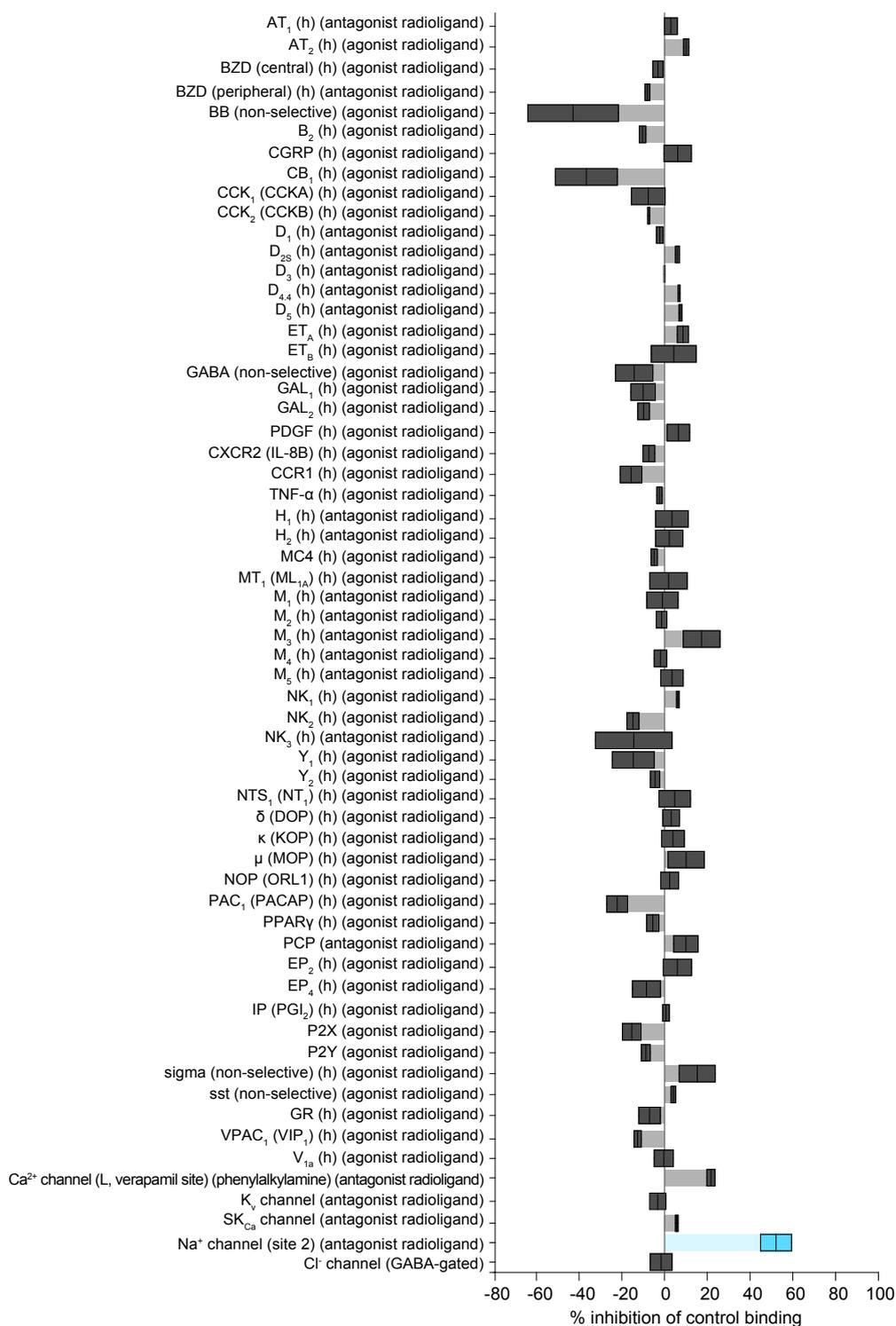
obtained in the presence of THN01.

The IC₅₀ values (concentration causing a half-maximal inhibition of control specific activity), EC₅₀ values (concentration producing a half-maximal increase in control basal activity), and Hill coefficients (nH) were determined by non-linear regression analysis of the inhibition/concentration-response curves generated with mean replicate values using Hill equation curve fitting:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + \left(\frac{C}{C_{50}} \right)^{nH}} \right]$$

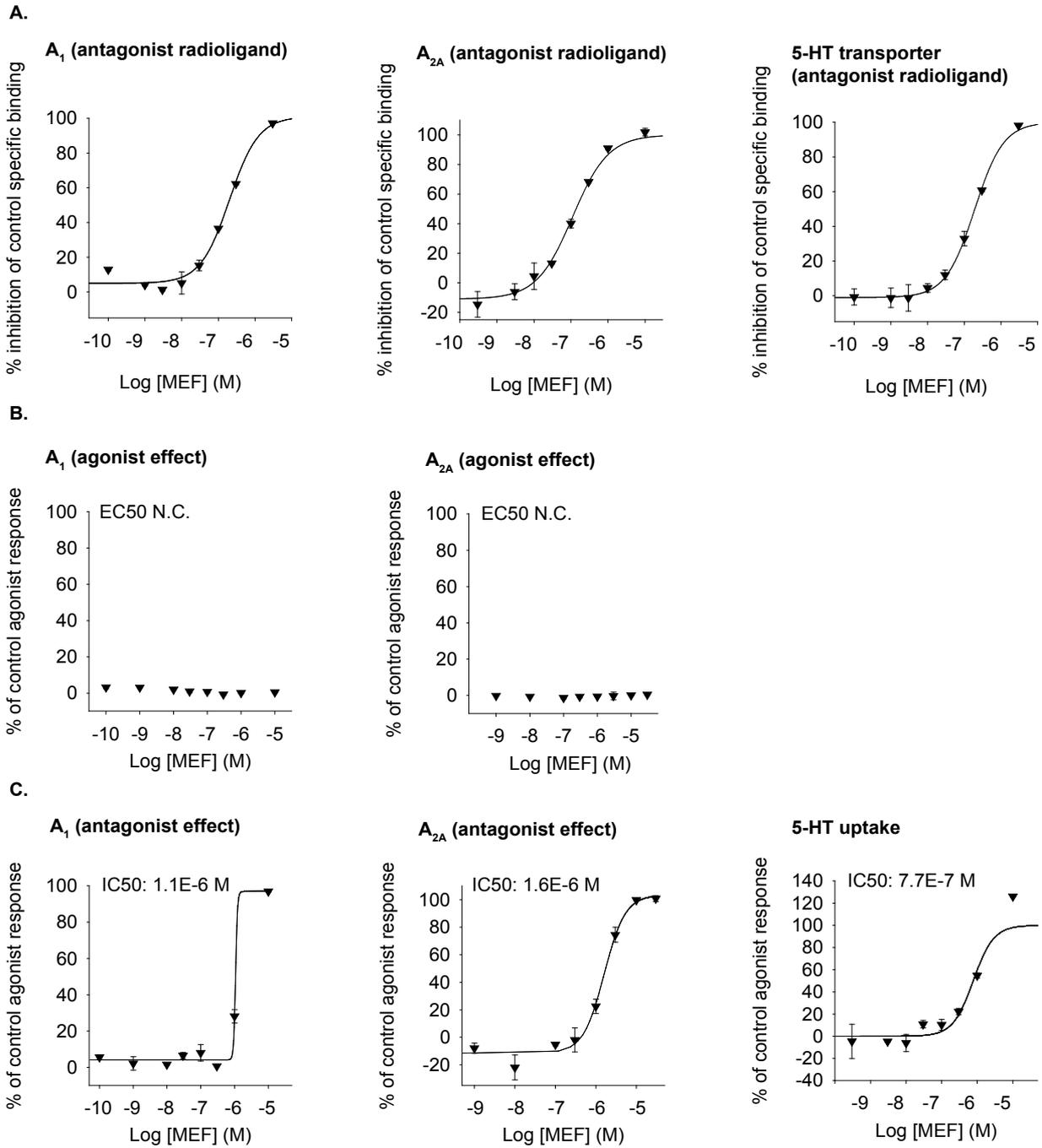
where Y = specific activity, A = left asymptote of the curve, D = right asymptote of the curve, C = compound concentration, C₅₀ = IC₅₀ or EC₅₀, and nH = slope factor.

This analysis was performed using software developed at CEREP (Hill software) and validated by comparison with data generated by the commercial software SigmaPlot® 4.0 for Windows® (© 1997 by SPSS Inc.).



Supplemental figure 1. In vitro evaluation of mefloquine potential targets.

Mefloquine was used at 1 μ M, binding radioligands are detailed in the Supplemental figure 3.



Supplemental figure 2. Binding and functional *in vitro* assays.

Binding radioligands (A), and control agonists for functional assays (B, C), are detailed in the Supplemental figure 3.

Annexes

Assay	Source	Ligand	Conc.	Kd	Non Specific	Incubation	Detection Method
Receptors							
A1 (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]DPCPX	1 nM	1.7 nM	DPCPX (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
A2A (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]CGS 21680	6 nM	27 nM	NECA (10 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
A3 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I]AB-MECA	0.15 nM	0.22 nM	IB-MECA (1 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
α1 (non- selective) (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]prazosin	0.25 nM	0.09 nM	prazosin (0.5 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
α2 (non- selective) (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]RX 821002	0.5 nM	0.38 nM	(-)-epinephrine (100 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
β1 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H](-)CGP 12177	0.3 nM	0.39 nM	alprenolol (50 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
β2 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H](-)CGP 12177	0.3 nM	0.15 nM	alprenolol (50 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
AT1 (<i>h</i>) (antagonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I][Sar1,Ile8]-AT-II	0.05 nM	0.05 nM	angiotensin-II (10 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
AT2 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I]CGP 42112A	0.01 nM	0.01 nM	angiotensin-II (1 μ M)	4 hr 37°C	Scintillation counting
BZD (peripheral) (antagonist radioligand)	rat heart	[3H]PK 11195	0.2 nM	1.8 nM	PK 11195 (10 μ M)	15 min RT	Scintillation counting
BB (non-selective) (agonist radioligand)	rat cerebral cortex	[125I][Tyr4]bombesin	0.01 nM	0.71 nM	bombesin (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
B2 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]bradykinin	0.3 nM	0.32 nM	bradykinin (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
CGRP (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]hCGRP α	0.03 nM	0.06 nM	hCGRP α (1 μ M)	90 min RT	Scintillation counting
CB1 (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]CP 55940	0.5 nM	3.5 nM	WIN 55212-2 (10 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
CCK1 (CCKA) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]CCK-8s	0.08 nM	0.24 nM	CCK-8s (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
CCK2 (CCKB) (<i>h</i>) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]CCK-8s	0.08 nM	0.054 nM	CCK-8s (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting

Annexes

D1 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]SCH 23390	0.3 nM	0.2 nM	SCH 23390 (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
D2S (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]methylspiperone	0.3 nM	0.15 nM	(+)butaclamol (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
D3 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]methylspiperone	0.3 nM	0.085 nM	(+)butaclamol (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
D4.4 (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]methylspiperone	0.3 nM	0.19 nM	(+)butaclamol (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
D5 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (GH4 cells)	[3H]SCH 23390	0.3 nM	0.25 nM	SCH 23390 (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
ETA (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]endothelin-1	0.03 nM	0.03 nM	endothelin-1 (100 nM)	120 min 37°C	Scintillation counting
ETB (h)	human recombinant (CHO cells)	[125I]endothelin-1	0.03 nM	0.04 nM	endothelin-1 (0.1 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
GABA (non-selective) (agonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]GABA	10 nM	15 nM	GABA (100 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
GAL1 (h) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I]galanin	0.1 nM	0.1 nM	galanin (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
GAL2 (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]galanin	0.05 nM	0.63 nM	galanin (1 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
PDGF (agonist radioligand)	Balb/c 3T3 cells	[125I]PDGF BB	0.03 nM	0.15 nM	PDGF BB (10 nM)	180 min 4°C	Scintillation counting
CXCR2 (IL-8B) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I]IL-8	0.025 nM	0.022 nM	IL-8 (30 nM)	60 min RT	Scintillation counting
CCR1 (h) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[125I]MIP-1 α	0.01 nM	0.02 nM	MIP-1 α (100 nM)	120 min RT	Scintillation counting
TNF-α (h) (agonist radioligand)	U-937 cells	[125I]TNF- α	0.1 nM	0.05 nM	TNF- α (10 nM)	120 min 4°C	Scintillation counting
H1 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]pyrilamine	1 nM	1.7 nM	pyrilamine (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
H2 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]APT	0.075 nM	2.9 nM	tiotidine (100 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
MC4 (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]NDP- α -MSH	0.05 nM	0.54 nM	NDP- α -MSH (1 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting

Annexes

MT1 (ML1A) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]2-iodomelatonin	0.01 nM	0.04 nM	melatonin (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
M1 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]pirenzepine	2 nM	13 nM	atropine (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
M2 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]AF-DX 384	2 nM	4.6 nM	atropine (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
M3 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]4-DAMP	0.2 nM	0.5 nM	atropine (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
M4 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]4-DAMP	0.2 nM	0.32 nM	atropine (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
M5 (h) (antagonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]4-DAMP	0.3 nM	0.3 nM	atropine (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
NK1 (h) (agonist radioligand)	U373MG uppsala	[125I]-Substance P LYS3	0.05 nM	0.04 nM	[Sar9, Met(O2)11]-SP (1 µM)	30 min RT	Scintillation counting
NK2 (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]NKA	0.1 nM	0.12 nM	[Nleu10]-NKA (4-10) (300 nM)	60 min RT	Scintillation counting
NK3 (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]SR 142801	0.4 nM	0.47 nM	SB 222200 (10 µM)	120 min RT	Scintillation counting
Y1 (h) (agonist radioligand)	SK-N-MC cells (endogenous)	[125I]peptideYY	0.025 nM	0.06 nM	NPY (1 µM)	120 min 37°C	Scintillation counting
Y2 (h) (agonist radioligand)	KAN-TS cells	[125I]peptideYY	0.015 nM	0.01 nM	NPY (1 µM)	60 min 37°C	Scintillation counting
NTS1 (NT1) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]Tyr3-neurotensin	0.05 nM	0.22 nM	neurotensin (1 µM)	60 min 4°C	Scintillation counting
δ (DOP) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]DADLE	0.5 nM	0.73 nM	naltrexone (10 µM)	120 min RT	Scintillation counting
κ (KOP) (agonist radioligand)	rat recombinant (CHO cells)	[3H]U 69593	1 nM	2 nM	naloxone (10 µM)	60 min RT	Scintillation counting
µ (MOP) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]DAMGO	0.5 nM	0.35 nM	naloxone (10 µM)	120 min RT	Scintillation counting
NOP (ORL1) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]nociceptin	0.2 nM	0.4 nM	nociceptin (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
PAC1 (PACAP) (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[125I]PACAP1-27	0.015 nM	0.092 nM	PACAP1-27 (100 nM)	120 min RT	Scintillation counting

Annexes

PPARγ (agonist radioligand)	(h)	human recombinant (E. coli)	[3H]rosiglitazone	5 nM	5.7 nM	rosiglitazone (10 μ M)	120 min 4°C	Scintillation counting
EP2 (h) (agonist radioligand)		human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]PGE2	3 nM	3 nM	PGE2 (10 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
EP4 (h) (agonist radioligand)		human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]PGE2	0.5 nM	0.3 nM	PGE2 (10 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
IP (PGI2) (agonist radioligand)	(h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]iloprost	6 nM	8 nM	iloprost (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
P2Y (agonist radioligand)		rat cerebral cortex	[35S]dATP α S	10 nM	10 nM	dATP α S	60 min RT	Scintillation counting
5-HT1A (agonist radioligand)	(h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]8-OH-DPAT	0.3 nM	0.5 nM	8-OH-DPAT (10 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
5-HT1B (antagonist radioligand)		rat cerebral cortex	[125I]CYP (+ 30 μ M isoproterenol)	0.1 nM	0.16 nM	serotonin (10 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
5-HT2A (antagonist radioligand)	(h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]ketanserin	0.5 nM	0.6 nM	ketanserin (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
5-HT2B (agonist radioligand)	(h)	human recombinant (CHO cells)	[125I](\pm)DOI	0.2 nM	0.2 nM	(\pm)DOI (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting
5-HT2C (antagonist radioligand)	(h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]mesulergine	1 nM	0.5 nM	RS 102221 (10 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
5-HT5a (agonist radioligand)	(h)	human recombinant (HEK-293 cells)	[3H]LSD	1.5 nM	1.5 nM	serotonin (100 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
5-HT6 (h) (agonist radioligand)		human recombinant (CHO cells)	[3H]LSD	2 nM	1.8 nM	serotonin (100 μ M)	120 min 37°C	Scintillation counting
5-HT7 (h) (agonist radioligand)		human recombinant	[3H]LSD	4 nM	2.3 nM	serotonin (10 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
sigma (non-selective) (agonist radioligand)	(non-h)	Jurkat cells (endogenous)	[3H]DTG	10 nM	41 nM	Haloperidol (10 μ M)	120 min RT	Scintillation counting
sst (non-selective) (agonist radioligand)		AtT-20 cells	[125I]Tyr11-somatostatin-14	0.05 nM	0.08 nM	somatostatin-14 (300 nM)	60 min 37°C	Scintillation counting
GR (h) (agonist radioligand)		IM-9 cells (cytosol)	[3H]dexamethasone	1.5 nM	1.5 nM	triamcinolone (10 μ M)	6 hr 4°C	Scintillation counting
VPAC1 (VIP1) (h) (agonist radioligand)		human recombinant (CHO cells)	[125I]VIP	0.04 nM	0.05 nM	VIP (1 μ M)	60 min RT	Scintillation counting

Annexes

V1 a (h) (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[3H]AVP	0.3 nM	0.5 nM	AVP (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting
Ion channels							
BZD (agonist radioligand) (central)	rat cerebral cortex	[3H]flunitrazepam	0.4 nM	2.1 nM	diazepam (3 µM)	60 min 4°C	Scintillation counting
PCP (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]TCP	10 nM	13 nM	MK 801 (10 µM)	120 min 37°C	Scintillation counting
P2X (agonist radioligand)	rat urinary bladder	[3H]α,β-MeATP	3 nM	2.6 nM	α,β-MeATP (10 µM)	120 min 4°C	Scintillation counting
5-HT3 (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]BRL 43694	0.5 nM	1.15 nM	MDL 72222 (10 µM)	120 min RT	Scintillation counting
Ca2+ channel (L, verapamil site) (phenylalkylamine) (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]D888	3 nM	3 nM	D 600 (10 µM)	120 min RT	Scintillation counting
KV channel (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[125I]α-dendrotoxin	0.01 nM	0.04 nM	α-dendrotoxin (50 nM)	60 min RT	Scintillation counting
SKCa channel (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[125I]apamin	0.007 nM	0.007 nM	apamin (100 nM)	60 min 4°C	Scintillation counting
Na+ channel (site 2) (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[3H]batrachotoxinin	10 nM	91 nM	veratridine (300 µM)	60 min 37°C	Scintillation counting
Cl- channel (GABA-gated) (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[35S]TBPS	3 nM	14.6 nM	picrotoxinin (20 µM)	120 min RT	Scintillation counting
Transporters							
norepinephrine transporter (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]nisoxetine	1 nM	2.9 nM	desipramine (1 µM)	120 min 4°C	Scintillation counting
dopamine transporter (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]BTCP	4 nM	4.5 nM	BTCP (10 µM)	120 min 4°C	Scintillation counting
5-HT transporter (antagonist radioligand) (h)	human recombinant (CHO cells)	[3H]imipramine	2 nM	1.7 nM	imipramine (10 µM)	60 min RT	Scintillation counting

Supplemental figure 3. Control compounds for the in vitro pharmacology assays of mefloquine.

Annexe 2. Participation à d'autres travaux

Contexte

Au cours de mon doctorat j'ai eu l'opportunité de collaborer à une étude menée par une équipe de chimistes et de biologistes. A ce titre, je fais partie des auteurs de l'article intitulé *Phenylpyridine-2-ylguanidines and rigid mimetics as novel inhibitors of TNF α overproduction: beneficial action in models of neuropathic pain and of acute lung inflammation*, pour lequel ma participation s'est inscrite dans le criblage pharmaco-comportemental (tests de von Frey avec les souris) de composés synthétisés par les chimistes.

Résumé de l'article

La surproduction de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) ou de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 beta (IL-1 β) est un des marqueurs biologiques des maladies inflammatoires ou des douleurs neuropathiques. Le but de cette étude a été d'étudier un composé issu d'un criblage haut débit à partir d'une lignée de cellules monocytaires sanguines humaines stimulées avec du lipopolysaccharide, ce qui favorise la production de TNF- α et d'IL-1 β . Ce composé, le 4-phenylpyridin-2-yl-guanidine, ainsi que ces homologues, a été montré comme inhibiteur de ces voies. Les recherches montrées dans cet article portent sur l'évaluation cytotoxique de ces composés *in silico* et *in vivo* dans un modèle d'inflammation pulmonaire ou de douleur neuropathique.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Review article

Phenylpyridine-2-ylguanidines and rigid mimetics as novel inhibitors of TNF α overproduction: Beneficial action in models of neuropathic pain and of acute lung inflammation



Maud Bollenbach^{a,e}, Eric Salvat^{b,c}, François Daubeuf^{a,d,e}, Patrick Wagner^{a,e}, Ipek Yalcin^b, Muris Humo^b, Baptiste Letellier^b, Léa J. Becker^b, Frédéric Bihel^{a,e}, Jean-Jacques Bourguignon^{a,e}, Pascal Villa^{d,e}, Adeline Obrecht^{d,e}, Nelly Frossard^{a,e}, Michel Barrot^b, Martine Schmitt^{a,e,*}

^a CNRS, Université de Strasbourg, UMR7200 Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, 67401 Illkirch, France

^b CNRS, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000 Strasbourg, France

^c Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Centre d'Évaluation et de Traitement de la Douleur, 67000 Strasbourg, France

^d CNRS, Université de Strasbourg, UMS3286 PCBIS Plateforme de chimie biologique intégrative, 67400 Illkirch, France

^e Labex MEDALIS, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2017

Received in revised form

13 January 2018

Accepted 16 January 2018

Available online 31 January 2018

Keywords:

Pyridine-2-yl guanidine

TNF α inhibitor

Phenotypic screening

Inflammation

Neuropathic pain

ABSTRACT

4-phenylpyridin-2-yl-guanidine (**5b**): a new inhibitor of the overproduction of pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL1 β) was identified from a high-throughput screening of a chemical library on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after LPS stimulation. Derivatives, homologues and rigid mimetics of **5b** were designed and synthesized, and their cytotoxicity and ability to inhibit TNF α overproduction were evaluated. Among them, compound **5b** and its mimetic **12** (2-aminodihydroquinazoline) showed similar inhibitory activities, and were evaluated *in vivo* in models of lung inflammation and neuropathic pain in mice. In particular, compound **12** proved to be active (5 mg/kg, ip) in both models.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Tumor necrosis factor- α (TNF α) is a cytokine that is overproduced in inflammatory disease states, mimicked in animal models by LPS (lipopolysaccharide) administration, for instance in the airways [1–3]. The clinical efficacy and FDA (Food and Drug Administration) approval of anti-TNF α biologics such as etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol and golimumab confirm its critical role in inflammatory diseases [4–8].

Proof of concept with anti-TNF α biologics was also obtained in animal models for the treatment of neuropathic pain [9–12], which arises from a lesion or disease affecting the somatosensory system. The contribution of cytokines originating from immune and/or glial

cells, including TNF α , to the pathophysiology of neuropathic pain is supported by experimental and clinical evidence [9,12–19]. Some of the first line treatments of neuropathic pain, namely antidepressant drugs targeting aminergic uptake sites (such as nortriptyline and venlafaxine) and gabapentinoids targeting calcium channels (such as pregabalin), suppress the TNF α overexpression observed in experimental neuropathic pain [12,20]. While existing immunotherapies could be an option to block TNF α in these diseases, their potent action in blocking TNF α is associated with major adverse effects. This limitation might be overcome by the development of new chemicals exerting a milder action on TNF α .

Small molecules inhibiting TNF α production would be expected to be effective disease-modifying treatments for inflammation that recruits this cytokine. For example, thalidomide (and its derivatives), xanthine derivatives (such as pentoxifylline), the antidepressant bupropion and the natural compound curcumin have been shown to induce the inhibition of TNF α expression [21–24].

* Corresponding author. CNRS, Université de Strasbourg, UMR7200 Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, 67401 Illkirch, France.
E-mail address: mschmitt@unistra.fr (M. Schmitt).

During the last decade our laboratory has built a chemical library comprising about 10,000 compounds with large chemical diversity. This library is constituted of new chemical entities (NCE) resulting from specific organic chemistry methodologies and various medicinal chemistry programs, including mainly heterocyclic derivatives, but also short peptides (1–3 aminoacid residues) and natural compounds from plants. The main characteristic they share in common is their drug-like character. Known pharmacological agents were added as reference compounds and served to evaluate the predictivity of the screening assay. In particular, we introduced rolipram and other type 4 phosphodiesterase inhibitors developed in recent years [25–28], which are known TNF α production inhibitors [29] but are limited to topical administration due to adverse effects.

The screening assay used a cell-based approach rather than target-based molecular approaches. We used human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) from healthy volunteers (Centre de transfusion sanguine de Strasbourg, France), originating from pooled blood pockets in order to minimize the standard deviation between two experiments. The PCBIS (Plateforme de chimie biologique Intégrative de Strasbourg) performed the screening using fully automated robotic workstations into 96-well microplates. hPBMCs were stimulated with LPS inducing TNF α and IL1 β production. Cells were incubated in the presence of the screening compounds at 10 μ M during 24 h, then TNF α and IL1 β productions were measured. At the same time cell survival was evaluated in order to check toxicity of the compounds. Hits were selected on the basis of their capacity to inhibit TNF α overproduction ($\geq 50\%$ at 10 μ M concentration) and to be non-cytotoxic ($>70\%$ of cell survival at 10 μ M). We obtained a hit rate close to 2%. Active molecules were then validated for reproducibility by determining the dose-reponse effect. After removal of the control hits (PDE4 inhibitors), about 20 molecules were selected based on their structural properties (low molecular weight with relatively few decorations, pharmacophore specificity). Finally, a 1-(4-phenylpyridin-2-yl)guanidine derivative (compound **5b**, Ar = 4-Ph) was chosen as a valuable hit for further structural optimization (Chart 1).

Careful analysis of literature describing aryl and heteroaryl guanidines as specific chemotypes highlighted several pharmacological agents listed in Chart 2 [30–35]. Specific target proteins were selected based on keywords associated with pain/hyperalgesia, inflammation and cytokines/TNF α . Several serotonergic drugs acting on specific receptor subtypes (5HT $_5$, 5HT $_7$ and 5HT $_3$ [31,36,37]) have shown anti-hyperalgesic effects. Pyridinyl 2-guanidines have been designed as α_2 -adrenoreceptor antagonists [38,39]. Small arginine-containing peptides can act as antagonists of the GPCR NPPF-R [32] and NPY-R [33]. More recently,

peptidomimetic heterocyclic compounds (quinolin or quinazolin guanidines) that retained the critical moiety (cation and set of H bond acceptor-donor system surrounded by an aromatic ring) were also shown to display NPPF-R antagonist properties [32]. More interestingly, NPPF-R antagonists were shown to be anti-hyperalgesic in chronic pain situations [40], which might be related to their regulation of the NF- κ B pathway and TNF α production [41,42]. Other systems including purinergic (P2X $_4$, P2X $_7$) [34] and glutamatergic [35,43] antagonists may also be relevant. Other target proteins have also been selected in Chart 2, as potentially involved in pain and inflammation. The tissue-type and urokinase-type plasminogen activators (tPA and uPA) are induced in dorsal root ganglia (DRG) neurons and tPA plays a role in inducing neuropathic pain [30,44].

Based on this literature, our first objective was to perform a preliminary study with the starting hit **5b**. First, we performed a survey of the potential beneficial effect of a phenyl ring at positions 3 to 6 along the pyridine nucleus. Secondly, further substitution effects on ortho, meta or para position by means of prototypical substituents (OMe, Cl, CF $_3$) were considered to potentially improve the potency accounting for geometric, electronic or lipophilic parameters. Homologues and isosteres of **5b** have also been prepared and tested. Finally, the second part of this work was dedicated to the replacement of the pyridine nucleus by a bicyclic scaffold as a valuable rigid frame able to mimic a highly favored internal H bond interaction within the structure of **5** (see the favored internal H bond interaction in the structure of **I** and their rigid mimetics **II** in Table 2). Different homologues were considered, and derivatives of amino-dihydroquinazolines (**12**, **17**, **24**), benzimidazoles **28**, and dihydro 1,3-benzodiazepines **34** were synthesized for this purpose.

2. Chemistry

Chemical methodologies used are described in Schemes 1–8. The synthesis of HCl or TFA salts of the target 2-guanidinopyridines **5a–w** was based on two different pathways (Scheme 1). The first one (Method 1) involved a Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with the corresponding halogeno-aminopyridines **1** followed by a guanylation reaction with SMe-isothiourea in presence of HgCl $_2$. Finally a deprotection of the Boc group allowed the formation of the HCl or TFA salts of target products **5a–w**. Two optimized conditions (a or b) were developed for the Suzuki-Miyaura cross coupling reaction. In particular, amino pyridines **1c** and **1d** were coupled under standard methods using Pd(PPh $_3$) $_4$ in a mixture of toluene:ethanol:water (5:1:1). However, starting from the relatively more basic halogeno-aminopyridines **1a** and **1b**, no reaction was observed under these conditions.

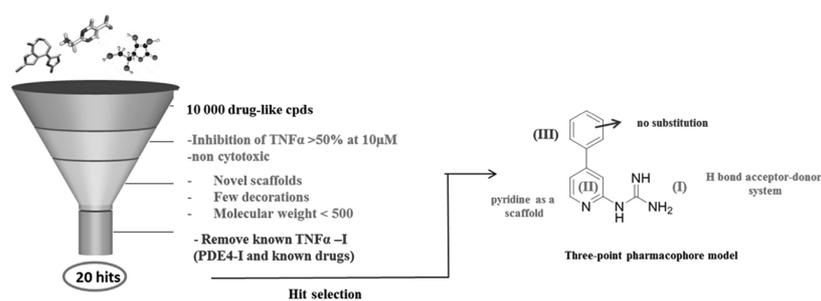


Chart 1. Workflow from cell-based assay using hPBMCs to identification of 1-(4-phenyl-pyridin-2-yl)guanidine as an inhibitor of TNF α overproduction.

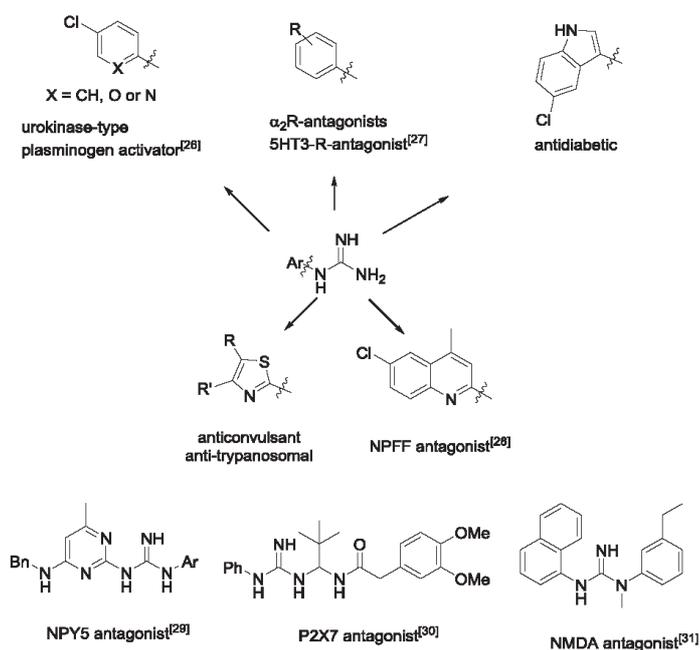
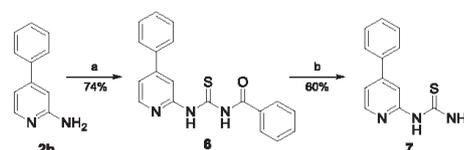
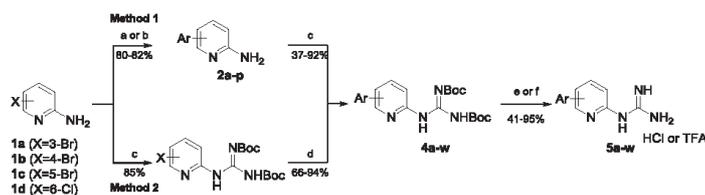


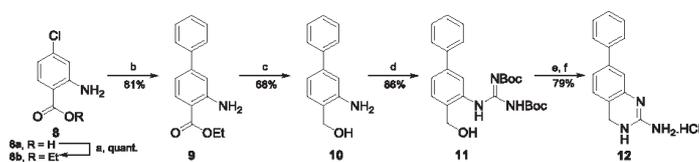
Chart 2. Aryl and heteroaryl guanidines as known pharmacological agents.

Instead, the use of *S*-Phos in the presence of Pd(OAc)₂ [45] proceeded with good yields. As an example, the reaction starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** and 4-methoxyphenylboronic acid afforded **2d** in 72% yield after purification. Unfortunately, under the same conditions, the reaction using 4-chlorophenylboronic acid was unsuccessful (data not shown). So, we developed a second method (Method 2), in which we reversed the reaction order (guanylation followed by a Suzuki-Miyaura reaction). In that case, the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction was performed on the corresponding *N*-diBoc pyridyl guanidine derivatives **3** in the presence of Pd(OAc)₂ and X-Phos at 50 °C [46]. These mild conditions avoided the removal of the Boc protecting groups during the cross-coupling reaction.

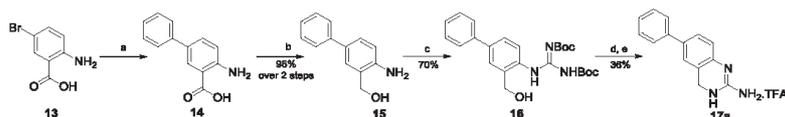
The reaction of the 2-amino-4-phenylpyridine **2b** with benzoyl isothiocyanate afforded the corresponding *N*-heteroaryl-*N*-benzoylthiourea **6**, which was hydrolyzed under basic conditions to give **7** with moderate yield (Scheme 2). Schemes 3–6 outline the

different synthetic routes for the preparation of the 2-aminodihydroquinazolines **12**, **17a**, **17b** and **24**. Different methodologies leading to 2-aminodihydroquinazolines derivatives are described in the literature, but among them, there is no generalized method for their construction. So, our synthetic strategies were based on i)

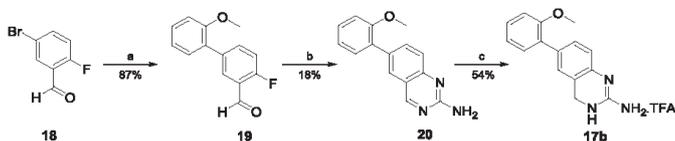
Scheme 2. Synthesis of 2-thioureapyridine **7**. (a) Benzoyl isothiocyanate, THF, 70 °C, 14 h; (b) NaOH, EtOH:H₂O (1:1), 80 °C, 1.5 h.Scheme 1. General synthesis of 2-guanidinopyridines **5**. (a) ArB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, Tol:EtOH:H₂O (5:1:1), 120 °C, 2–16 h; (b) ArB(OH)₂, Pd(OAc)₂, *S*-Phos, K₂CO₃, MeCN:H₂O (2:1), 105 °C, 3 h; (c) *N,N'*-diBoc-*S*-methylisothiourea, HgCl₂, NEt₃, DCM, rt, 16 h; (d) ArB(OH)₂, Pd(OAc)₂, X-Phos, Cs₂CO₃, *n*BuOH:H₂O (4:1), 50 °C, 16 h; (e) TFA:DCM (1:1), rt, 1 h; (f) HCl, Diethyl ether, rt, 5 h; *Yields over 2 steps.



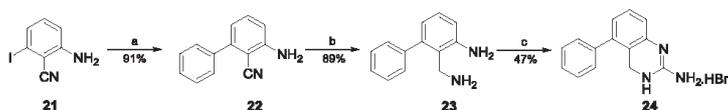
Scheme 3. Synthesis of 2-amino-7-phenyldihydroquinazoline **12**. (a) H_2SO_4 , EtOH, 90 °C, 4 h; (b) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, X-Phos, Cs_2CO_3 , $n\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1), 50 °C, 16 h; (c) LiBH_4 , THF, 70 °C, 5 h; (d) *N,N'*-diBoc-*S*-methylisothiourea, HgCl_2 , NEt_3 , DCM, rt, 16 h; (e) SOCl_2 , DCM, 50 °C, 2.5 h; (f) HCl in dioxane, rt, 12 h.



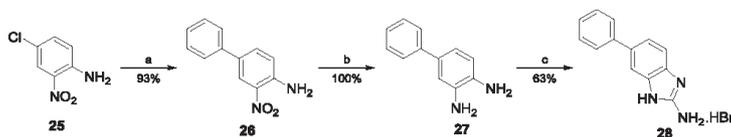
Scheme 4. Synthesis of 2-amino-6-phenyldihydroquinazoline **17**. (a) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Na_2CO_3 , H_2O , 95 °C, 16 h; (b) LAH, THF, rt, 12 h; (c) *N,N'*-diBoc-*S*-methylisothiourea, HgCl_2 , NEt_3 , DCM, rt, 16 h; (d) SOCl_2 , DCM, 50 °C, 2.5 h; (e) TFA:DCM (1:1), rt, 1 h.



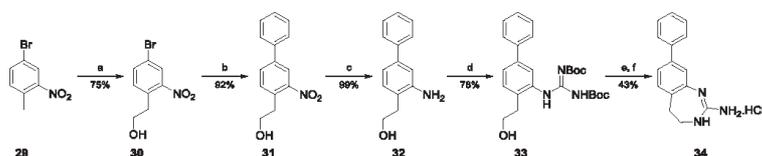
Scheme 5. Synthesis of 2-amino-6-(2-methoxyphenyl)dihydroquinazoline **21**. (a) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, *S*-Phos, K_2CO_3 , $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1), 105 °C, 3 h; (b) guanidine carbonate, DIEA, NMM, 150 °C, 16 h; (c) Et_3SiH , TFA, DCM, rt, 15 h.



Scheme 6. Synthesis of 2-amino-5-phenyldihydroquinazoline **25**. (a) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{ToI}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (5:1:1), 120 °C, 2 h; (b) $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$, THF, 75 °C, 2 h; (c) BrCN, Toluene, 110 °C, 4 h.



Scheme 7. Synthesis of 2-amino-5-phenylbenzimidazole **29**. (a) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, *S*-Phos, K_2CO_3 , $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1), 105 °C, 3 h; (b) Sn, HCl, EtOH, 0–80 °C, 1 h; (c) BrCN, Toluene, 110 °C, 4 h.



Scheme 8. Synthesis of 2-amino-8-phenylidrohbenzodiazepine **34**. (a) $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n\text{H}$, Triton B, DMSO, 90 °C, 16 h; (b) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, TBAB, K_2CO_3 , H_2O , 70 °C, 3 h; (c) Pd/C, H_2 (60 psi), MeOH, rt, 3 days; (d) *N,N'*-diBoc-*S*-methylisothiourea, HgCl_2 , NEt_3 , DCM, rt, 16 h; (e) DIAD (2.0 equiv.), PPh_3 (2.0 equiv.), THF, rt, 1.5 h; (f) HCl in dioxane, rt, 12 h.

the nature and position of the substituent on the aromatic ring; and ii) the availability of the starting materials.

2-Amino-4-chlorobenzoic acid **8a** served as a suitable starting material for the preparation of the 7-phenyl dihydroquinazoline **12** (Scheme 3). After an esterification step under acidic conditions, a Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction was performed on the ester **8b** using Pd(OAc)₂ and X-Phos as the catalytic system. The reduction of the ester group by means of LiBH₄, followed by a guanylation reaction resulted in the key alcohol intermediate **11**. Finally an intramolecular cyclization was achieved using SOCl₂ followed by deprotection of the remaining Boc residue with HCl to yield the target derivative **12**. The 2-amino-6-phenyl-dihydroquinazoline **17a** was synthesized using a similar strategy starting from the 4-bromoanthranilic acid **13** (Scheme 4). A ligand-free Suzuki-Miyaura reaction was performed directly on **13** in presence of Pd(OAc)₂ in water [47]. Reduction of the carboxylic acid using LiAlH₄, followed by a guanylation reaction, intramolecular cyclization of the intermediate **16**, and finally an acidic treatment, yielded the desired compound **17a**. Unfortunately, due to the steric hindrance, the Suzuki-Miyaura reaction was unsuccessful, when using 2-methoxyphenylboronic acid. An alternative strategy was developed starting from 2-fluoro-5-bromobenzaldehyde **18** (Scheme 5).

The key steps of the sequence involved first the Suzuki-Miyaura reaction in presence of Pd(PPh₃)₄ and the formation of the quinazoline derivative **20** with the help of guanidine carbonate via a nucleophilic aromatic substitution [48]. Finally, a partial

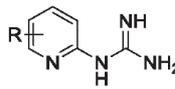
hydrogenation step using Et₃SiH in presence of TFA allowed the formation of the expected dihydroquinazoline **17b** [49].

The 2-amino-5-phenyldihydroquinazoline **24** [50] was synthesized in a three-step sequence starting from 2-amino-6-iodobenzonitrile **21** via a Suzuki-Miyaura reaction (Scheme 6). Reduction of the nitrile group by means of BH₃.SMe₂ yielded the corresponding diamino intermediate **23** [51]. A final cyclization using cyanogen bromide [52] allowed the formation of the target compound **24**.

The lower homologue 2-aminobenzimidazole **28** was synthesized starting from 4-chloro-2-nitroaniline **25** through a Suzuki-Miyaura/reduction/cyanogen bromide sequence (Scheme 7). Reduction of the resulting 2-nitroaniline **26** to the corresponding 4-phenylbenzene-1,2-diamine **27** was accomplished using tin in presence of HCl.

Finally, the superior homologue of **17a**, the 2-amino-dihydrobenzodiazepine **34** was obtained in 6 steps starting from 4-bromo-2-nitrotoluene **29** (Scheme 8). Hydroxymethylation of the methyl group of **29** was carried out with paraformaldehyde in the presence of triton B. Introduction of the C-8 phenyl via a Suzuki Miyaura reaction in water in the presence of a phase transfer catalyst (TBAB) yielded the intermediate **31** [53]. After a catalytic hydrogenation of the nitro group, a guanylation reaction was performed in presence of HgCl₂ to form the key intermediate **33**. An intramolecular cyclization using a Mitsunobu reaction followed by acidic treatment gave the expected dihydrobenzodiazepine **34**.

Table 1
Inhibition of cytokine production by pyridyl-2-guanidines.^{a,b}



Entry	Cmpd	R	TNF α		IL1 β		Cell viability % at 10 μ M
			%inh at 10 μ M ^a	IC ₅₀ (μ M)	%inh at 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)	
1	5a	3-Ph	11	nd	1	nd	108
2	5b	4-Ph	67	1.2 \pm 0.1	91	5.8 \pm 0.4	72
3	5c	4-(2-ClPh)	65	nd	23	nd	42
4	5d	4-(2-OMePh)	10	nd	-1	nd	99
5	5e	4-(3-ClPh)	64	nd	53	nd	38
6	5f	4-(3-OMePh)	56	nd	29	nd	66
7	5g	4-(4-ClPh)	69	nd	97	nd	24
8	5h	4-(4-OMePh)	69	nd	86	nd	34
9	5i	4-(4-CF ₃ Ph)	71	nd	98	nd	24
10	5j	5-Ph	-9	nd	-1	nd	97
11	5k	5-(2-ClPh)	82	nd	96	nd	55
12	5l	5-(2-OMePh)	56	7.7 \pm 0.9	4	>30	78
13	5m	5-(3-ClPh)	52	5.5 \pm 0.7	8	17.5 \pm 0.6	94
14	5n	5-(3-OMePh)	25	nd	4	nd	116
15	5o	5-(4-ClPh)	72	nd	97	nd	23
16	5p	5-(4-OMePh)	58	nd	48	nd	34
17	5q	6-Ph	18	18.6 \pm 0.9	3	>30	100
18	5r	6-(2-ClPh)	47	19.2 \pm 1.9	9	>30	74
19	5s	6-(2-OMePh)	7	nd	1	nd	106
20	5t	6-(3-ClPh)	74	nd	80	nd	40
21	5u	6-(3-OMePh)	7	nd	2	nd	104
22	5v	6-(4-ClPh)	72	nd	77	nd	35
23	5w	6-(4-OMePh)	27	nd	-6	nd	94
24	7		4	nd	1	nd	86

^a Rolipram as positive control, TNF α : (inhibition at 10 μ M: 79%, IC₅₀ = 0.13 \pm 0.03 μ M, standard deviation (n = 2)), IL1 β : nd; cell viability at 10 μ M: 104%; nd = not determined (low potency or cytotoxicity).

^b Standard deviation (n = 2).

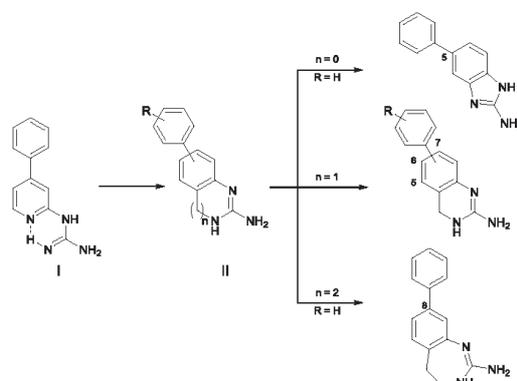
3. Results and discussion

A first evaluation of the cell viability in the presence of the tested compounds eliminated strongly cytotoxic compounds (% viability less than 70% at 10 μM). The TNF α /IL1 β inhibitory effects of derivatives of the firstly identified hit **5b**, its congeners (**5a-w**) and their structural analogues (compounds **12**, **17**, **24**, **28** and **34**) were evaluated in parallel. All the results are summarized in Tables 1 and 2. Shifting the phenyl ring to the position 3 (**5a**), or 5 (**5j**), or 6 (**5q**) yielded inactive compounds (compare entries 2 with 1, 10 and 17 in Table 1). A set of substituted 4-aryl 2-pyridylguanidines **5c-5i** were tested, but were found to be inactive or cytotoxic. A similar set of 5-aryl (**5j-5p**) and 6-aryl (**5q-5w**) pyridyl-2-guanidines were tested, but again were found to be inactive or cytotoxic. However, some activity could be recovered in the 5-substituted pyridine sub-series through beneficial effects of aromatic substitution (in ortho position) with a methoxy group (**5l**, entry 12) and a chlorine in meta position (compound **5m**, entry 13). Finally, replacement of the guanidine moiety in **5b** by its isosteric thiourea **7** yielded an inactive compound. The results clearly emphasized the critical role played by a phenyl ring specifically at position 4 (para position of the pyridine nitrogen).

The different aryl bicyclic structural analogues of **5** ($n=0, 1$ or 2 in structure II) are listed in Table 2. This series appeared less cytotoxic. Among them, the 7-phenyl 2-amino dihydropyrimidine **12** was particularly interesting, as it confirmed our working medicinal chemistry hypothesis. Compound **12** appeared as an efficient mimetic of **5b** (with the same localization of the phenyl ring in both structures). Finally, we selected a monocyclic (**5b**) and a bicyclic (**12**) compound for further pharmacological studies (Fig. 1), first for *in vivo* evaluation.

Table 2

Rigid 2-pyridylguanidines as TNF α /IL1 β inhibitors.^{a,b}



Entry	Compd	n	Position	R	TNF α		IL1 β		Cell viability
					%inhib at 10 μM	IC ₅₀ (μM) ^a	%inhib at 10 μM	IC ₅₀ (μM) ^a	% at 10 μM
1	28	0	5	/	15	nd	3	nd	114
2	24	1	5	H	7	nd	0	nd	111
3	17a	1	6	H	22	nd	nd	nd	90
4	17b	1	6	2-OMe	13	nd	1	nd	126
5	12	1	7	H	76	1.0 \pm 0.1	93	3.7 \pm 0.2	81
6	34	2	8	/	-7	nd	-4	nd	100

^a Rolipram as positive control, TNF α : (inhibition at 10 μM : 79%, IC₅₀ = 0.13 \pm 0.03 μM , standard deviation (n=2)), IL1 β : nd; cell viability at 10 μM : 104%; nd = not determined (low potency or cytotoxicity).

^b Standard deviation (n=2).

3.1. *In vivo* experiments in an acute lung inflammation model

Evaluation of the anti-inflammatory effect of compounds *in vivo* was performed in an acute lung inflammation model in C57BL/6 mice, in response to intranasal LPS. We compared the effect of compounds **5b** and **12** at a dose of 5 mg/kg (i.p., *BID*). Analysis of airway inflammation in BAL fluid (BALF) shows that compounds **5b** and **12** have no effect on the number of inflammatory cells recovered in BAL fluid as compared to solvent. LPS challenge increases the total number of cells recovered in BAL fluid. This effect is related to a significant influx of neutrophils and lymphocytes (###, $p < 0.001$ vs control; Fig. 2). Compounds **5b** and **12** (5 mg/kg, i.p.) induced a statistically reliable inhibition of the recruitment of neutrophils (39% and 62%, respectively) and lymphocytes (52% and 63%, respectively) in the airways.

The release of TNF α in BALF was significantly increased by LPS challenge (#, $p < 0.05$ vs control). Compound **12** induced a statistically reliable decrease in TNF α release in BALF (49%).

3.2. *In vivo* experiments in a neuropathic pain model

Neuropathic pain was induced in mice by inserting a standardized polyethylene cuff around the main branch of the right sciatic nerve [54,55]. In this model, heat hyperalgesia only lasts 2–3 weeks [54,55] while mechanical allodynia, which is clinically more relevant [56], remains stable over 2 months [54,55]. Moreover, the mechanical allodynia in this model is sensitive to clinical treatments of neuropathic pain, such as tricyclic antidepressants and gabapentinoids [20,54,55,57], and its consistency allows reducing the number of animals per group.

Implantation of the cuff around the sciatic nerve induced a long

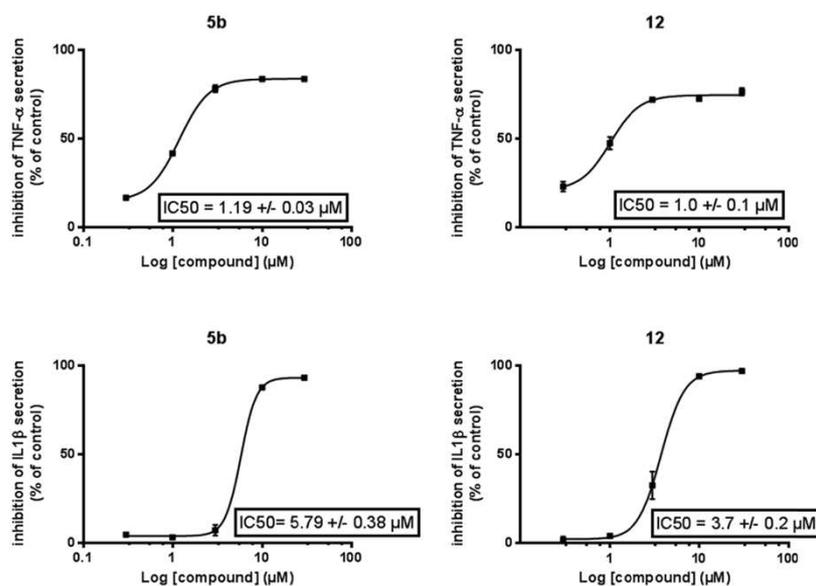


Fig. 1. IC₅₀ curves of inhibition of TNF α and IL1 β of compounds 5b and 12.

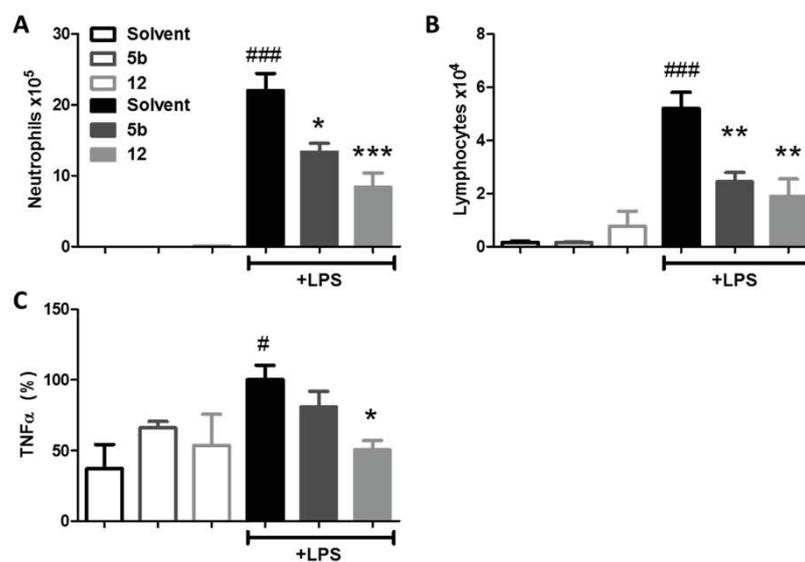


Fig. 2. Anti-inflammatory activity of compounds 5b and 12 in an acute lung inflammation model in C57BL/6 mice. Compounds 5b and 12 were administered by IP injection (5 mg/kg) 1 h before and 10 h after LPS or saline challenge. Absolute numbers of neutrophils (A) lymphocytes (B) in BAL are shown. TNF α levels in BAL fluid (C) quantified by ELISA with R&d systems kit are expressed as % of the LPS group. Blocks are means and bars are SEM values (n = 3 to 9 per group). #*p* < 0.05, ****p* < 0.001, vs control group and **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs LPS group.

lasting ipsilateral mechanical allodynia, while sham surgery did not affect the paw withdrawal thresholds (Fig. 3a; surgery \times paw \times time interaction, $F_{8,64} = 2.24$, $p = 0.035$, post hoc: "Cuff postsurgery,

right paw" < "Sham", "Cuff, baseline right paw" and "Cuff, left paw" at $p < 0.001$ on pretreatment and treatment days 4–17). Two to three weeks after cuff insertion, treatments started with saline,

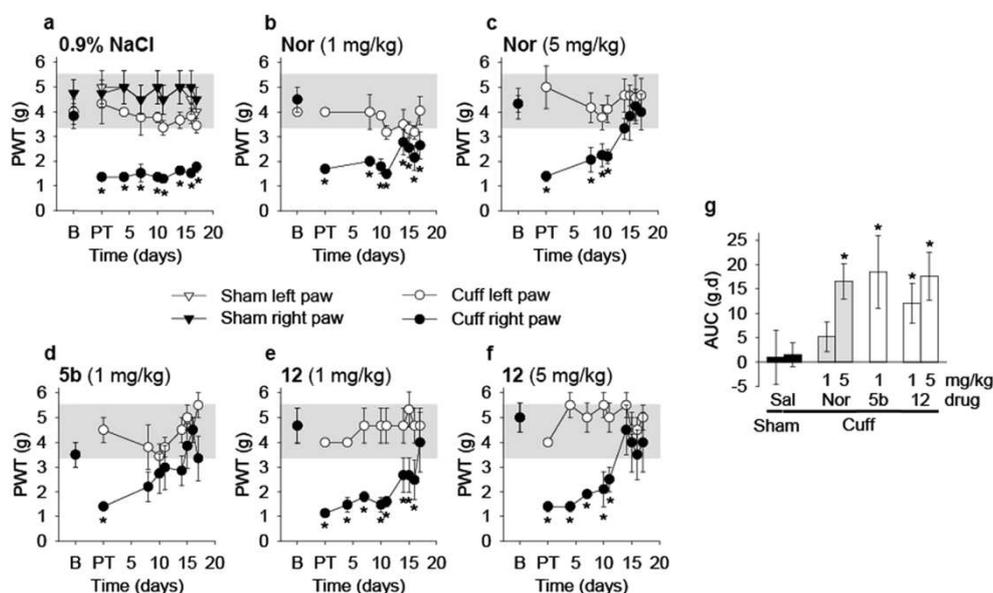


Fig. 3. Chronic treatments with **5b** and **12** alleviated mechanical allodynia in mice. Two to three weeks after sham surgery ($n = 4$) or unilateral cuff implantation on the right sciatic nerve ($n = 3-6$ per group), treatments started and were continued for 17 days. The mechanical hindpaw withdrawal threshold (PWT) was evaluated using von Frey filaments before surgery (B: baseline), before starting treatments (PT: pre-treatment) and on given days during the chronic treatment. Nortriptyline (Nor, 1 and 5 mg/kg, i.p., twice a day) was used as positive control (b,c). **5b** treatment (1 mg/kg, i.p., twice a day) (d) and **12** treatments (1 and 5 mg/kg, i.p., twice a day) (e,f) reversed the mechanical allodynia in mice ($*p < 0.05$ compared to the baseline right paw). The shaded area represents the mean \pm std of the 31 mice at baseline, thus providing a visual reference on the graphs for the absence of mechanical allodynia. The area under the curve (AUC) above pre-treatment values is calculated for the whole treatment period and is displayed in graph g. It shows that nortriptyline 5 mg/kg, **5b** 1 mg/kg and **12** 1 and 5 mg/kg have an antiallodynic action that significantly differs from saline treatment ($*p < 0.05$ compared to Cuff/saline data).

with the tricyclic antidepressant nortriptyline as a positive control, or with the compounds **5b** and **12**, at doses of 1 and 5 mg/kg. Area under the curve (AUC) analysis for allodynia relief is presented in Fig. 3g, and time-courses in Fig. 3a and f. Saline treatment had no impact *per se* (Fig. 3a). Nortriptyline at a dose of 1 mg/kg was only partially effective and did not lead to full recovery of baseline values (Fig. 3b, paw \times time interaction, $F_{8,25} = 3.75$, $p = 0.005$; post hoc: "Right paw" $<$ "Baseline right paw" at $p < 0.05$ on treatment days 0–17), while (as previously reported) [12,57] chronic nortriptyline alleviated neuropathic allodynia at a dose of 5 mg/kg (Fig. 3c, paw \times time interaction, $F_{8,48} = 2.45$, $p = 0.025$; post hoc: "Right paw" $<$ "Baseline right paw" at $p < 0.02$ on treatment days 0–11). **5b** at a dose of 5 mg/kg was the only condition that led to a 5% decrease in body weight, with an important induration at injection sites that developed after a few injections; behavioral data at this dose were thus not considered. **5b** at a dose of 1 mg/kg was not accompanied by these adverse effects, and it alleviated the cuff-induced allodynia (Fig. 3d, paw \times time interaction, $F_{8,24} = 1.96$, $p = 0.09$; post hoc: "Right paw" $<$ "Baseline right paw" at $p < 0.02$ on pretreatment day). **12** at doses of 1 and 5 mg/kg alleviated the cuff-induced allodynia after 16 and 11 days, respectively (Figure 3e, 1 mg/kg, paw \times time interaction, $F_{9,18} = 3.14$, $p = 0.018$; post hoc: "Right paw" $<$ "Baseline right paw" at $p < 0.01$ on treatment days 0–16) (Figure 3f, 5 mg/kg, paw \times time interaction, $F_{9,27} = 7.96$, $p = 0.000012$; post hoc: "Right paw" $<$ "Baseline right paw" at $p < 0.05$ on treatment days 0–11). The AUC analysis confirmed the lack of effect of saline treatment, the mild but non-significant improvement with nortriptyline 1 mg/kg ($p = 0.3$ vs. Cuff/saline), and the significant antiallodynic action of chronic treatments with

nortriptyline at 5 mg/kg ($p = 0.005$), **5b** at 1 mg/kg ($p = 0.034$), **12** at 1 mg/kg ($p = 0.046$) and **12** at 5 mg/kg ($p = 0.010$).

This work evaluates the pharmacologic activity of **5b**, a hit recently discovered as an inhibitor of TNF α overproduction by human PBMCs upon exposure to LPS. This non-cytotoxic hit was selected with an IC_{50} value in the μ M range. However various derivatives (24 compounds) and structural analogues (6 compounds) of **5b** showed few active compounds with similar *in vitro* potencies (**5f**, **5i**, **5m**). Interestingly, the novel bicyclic sub-series based on a **5b** mimetic highlighted the dihydroquinazoline **12** as a particularly interesting molecule (TNF α inhibition: $IC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \mu$ M). Pharmacophoric critical substitutions of **5b**, in particular the presence and location of the phenyl ring in position 4, was referred to the newly formed covalent bond of II replacing the internal H bond interaction in I (I \rightarrow II, Table 2). The optimal homologue ($n = 1$) was the rigidified compound of **5b**, whereas other homologues ($n = 0$ and $n = 2$) were found inactive. The active conformer with the phenyl ring is correctly located at position 7 is strongly active. As observed with the inactive phenyl pyridyl guanidine isomers (**5a**, **5j**, **5q**), to be compared with the active **5b**, a SAR analysis of the location of the phenyl group was similar (inactive phenyl isomers of aminodihydroquinazolines **24** and **17a**, to be compared with the active compound **12**). Among the novel series of aminodihydroquinazolines, we focused on compound **12**, which presented TNF α inhibiting properties with a 1μ M IC_{50} value. The selected TNF α inhibitors **5b** and **12** were analyzed in *in vivo* experiments (acute lung inflammation and neuropathic pain), which confirmed their efficacies in both selected animal models. Indeed, the 2-amino dihydroquinazoline **12** was found effective in a

neuropathic pain model in mice at 1 and 5 mg/kg *i.p.* (Fig. 3). However the compound **5b** presented some *in vivo* toxicity with repeated treatment at dose 5 mg/kg twice a day. This adverse effect was absent at a dose of 1 mg/kg, which was effective in relieving neuropathic allodynia. We used the tricyclic antidepressant nortriptyline as reference control for these experiments. Tricyclic antidepressants are among the first line treatments of neuropathic pain [58,59], and we previously showed that nortriptyline inhibits TNF α overproduction through the noradrenergic recruitment of β_2 -adrenoceptors in the dorsal root ganglia of a mouse model of neuropathic pain [12]. Validation of our strategy using a human PBMCs screening assay highlighted valuable hits to be tested *in vivo*. The novel 2-aminodihydroquinazoline (2-ADHQ, **12** as representative) compared to 2-ADHQ derivatives presented similar *in vitro* and *in vivo* pharmacological properties (Chart 2) [37,60,61], as shown in Chart 2. A particularly interesting set of pharmacological agents containing 2-ADHQ derivatives were very similar to mimetic pharmacological compounds in Chart 2 (5HT-R subtypes, α_2 -R subtypes). Interestingly, a similar working hypothesis of the use of a specific bicyclic scaffold able to mimic an internal H bond interaction [62] (I to II in Table 2) was already applied with success by Rozas et al. for the design of novel noradrenergic ligands [38].

Based on our *in vivo* data, we confirm the rationale of the working hypothesis, i.e. the anti-inflammatory potential of our compounds evaluated in a LPS-induced pulmonary inflammation, releasing TNF α as previously reported [1–3]. Compound **12** was found to be efficient in the neuropathic pain model in mice at doses of 1 and 5 mg/kg, *i.p.*, with no apparent sign of behavioral toxicity. This result is in line with previous data showing that the two first-line clinical treatments of neuropathic pain, antidepressants and gabapentinoids, indirectly lead to decrease in the nerve injury-induced TNF α overproduction in the dorsal root ganglia of a model of neuropathic pain [12,20], and with data showing an efficacy of anti-TNF α biotherapies in animal models of neuropathic pain [9–12]. Moreover, other pharmacological agents known to inhibit the production of TNF α , such as type 4 phosphodiesterase (PDE4) inhibitors or less selective PDE/PDE4 inhibitors, such as rolipram, theophylline at high dose, or pentoxifylline, have been found active in *in vivo* neuropathic pain models (unpublished data and [63–66]), which fully supported our working hypothesis of an interest for small molecules to oppose the overproduction of TNF α observed in specific diseases, including neuropathic pain. The major concern for the discovery of novel hits from a phenotypic screening is the lack of knowledge of the target protein(s) accounting for both the cellular and the *in vivo* effects of a given molecule. The compound **12** may be potent enough ($IC_{50} \approx 1 \mu M$ in PBMCs) to be a valuable tool for target fishing (affinity column chromatography), or for target identification by means of chemoproteomics and chemoinformatic approaches. So far in the literature, 5HT $_3$ [67], α_2 receptors [68], P $_{2X7}$ purinergic receptors [69,70] ligands have been associated with neuropathic pain treatments for both aryl/heteroaryl guanidines and 2-ADHQ (represented in Chart 1 and Chart 3).

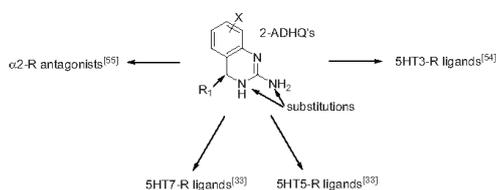


Chart 3. Pharmacological properties of selected 2-ADHQ's.

4. Conclusion

LPS-stimulated hPBMCs-based assay and primary screen of about 10,000 drug-like compounds led to the selection of an initial hit, the 1-(4-phenylpyridin-2-yl) guanidine (**5b**) as a TNF α overproduction inhibitor ($IC_{50} \sim 1 \mu M$). SAR analysis highlighted the beneficial effect of a phenyl ring at position 4 (**5b**). Design of a mimetic drug leading to a novel scaffold (2-amino dihydroquinazoline **12**) showed a similar μM IC_{50} value. Both compounds were found active in mice models of acute lung inflammation and neuropathic pain. This shows a successful proof of concept for the search of small molecules as inhibitors of TNF α production for use as novel treatments of neuropathic pain and acute inflammation. An optimization program for the further development of a valuable successor of **12** (with a gain of magnitude from 1 μM \rightarrow 0.1 μM) is now in progress, which will allow the study of its precise mechanism of action.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

General Methods for Chemistry. All reactions were carried out under usual atmosphere unless otherwise stated. Chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich and were used without further purification. Analytical TLC was performed using silica gel plates Merck 60F254 and plates were visualized by exposure to ultraviolet light. Compounds were purified on silica gel Merck 60 (particle size 0.040–0.063 mm) or using Armen spot flash chromatography (normal phase column: Interchim 30 SHIP 25 g; reverse phase column: AIT 50 g C18). Microwave irradiation was performed with a Biotage Initiator EXP (external sensor type). Yields refer to isolated compounds, estimated to be >95% pure as determined by ¹H NMR or HPLC. ¹H, ¹⁹F and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance Spectrometer operating at 400 or 500 MHz, 376 MHz and 100 or 125 MHz, respectively. All chemical shift values δ and coupling constants J are quoted in ppm and in Hz, respectively, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad). Melting points were realized using a Büchi Melting point B-540. Analytical RP-HPLC-MS was performed using a LC-MSD 1200SL Agilent with a Thermo Hypersilgold[®] column (C18, 30 mm \times 1 mm; 1.9 μm) using the following parameters: 1) The solvent system: A (acetonitrile) and B (0.05% TFA in H₂O); 2) A linear gradient: t = 0 min, 98%B; t = 5 min, 5%B; t = 6 min, 5%B; t = 7 min, 98%B; t = 9 min, 98%B; 3) Flow rate of 0.3 mL/min; 4) Column temperature: 50 °C; 5) The ratio of products was determined by integration of spectra recorded at 210 nm or 254 nm; 6) Ionization mode: MM-ES+APCI. HPLC were performed using a Dionex UltiMate 300 using the following parameters: Flow rate of 0.5 mL/min, column temperature: 30 °C, solvent system: A (MeOH) and B (0.05% of THA in H₂O), t = 0 min–1 min: 50–60% of B then t = 1 min to t = 10 min: 60–100% of B and t = 10 min to t = 15 min: 100% of B.

Pd-Catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling using Pd(PPh₃)₄: General method A. A microwave vial under argon was charged with the corresponding halogeno derivatives (1.0 equiv.), the corresponding phenylboronic acid (1.2 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol %), Na₂CO₃ (3.0 equiv.) and a mixture toluene:ethanol:water (5:1:1). The vial was capped properly, flushed with argon and heated to 120 °C until complete conversion of the starting material. After cooling, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was diluted in water. The organic phase was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography, eluting with the

appropriate *n*heptane:EtOAc mixture.

Pd-Catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling using Pd(OAc)₂ and S-Phos: General method B. A microvial under argon was charged with the corresponding halogeno derivatives (1.0 equiv.), the corresponding phenylboronic acid (1.2 equiv.), Pd(OAc)₂ (2–10 mol%), S-Phos (4–20 mol%), Na₂CO₃ (3.0 equiv.) and a mixture CH₃CN:H₂O (1:1). The vial was capped properly, flushed with argon and heated to 100 °C until complete conversion of the starting material. After cooling, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was diluted in water. The organic phase was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography, eluting with the appropriate *n*heptane:EtOAc mixture.

Pd-Catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling using Pd(OAc)₂ and X-Phos: General method C. A microvial under argon was charged with the corresponding halogeno derivatives (1.0 equiv.), the corresponding phenylboronic acid (1.2 equiv.), Pd(OAc)₂ (6 mol%), S-Phos (7 mol%), Cs₂CO₃ (2.5 equiv.) and a mixture *n*BuOH:H₂O (4:1). The vial was capped properly, flushed with argon and heated to 50 °C until complete conversion of the starting material. After cooling, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was diluted in water. The organic phase was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography, eluting with the appropriate *n*heptane:EtOAc mixture.

Preparation of Boc-Protected guanidines derivatives: General method D. A solution of starting amine (1.0 equiv.), *N,N'*-bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (0.95 equiv.), triethylamine (4.4 equiv.) and mercuric chloride (1.1 equiv.) in CH₂Cl₂ were stirred at rt overnight. After completion of the reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite® and washed with CH₂Cl₂. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography, eluting with the appropriate *n*heptane:EtOAc mixture.

Formation of guanidine hydrochloride salts: General method E. The protected guanidine (1.0 equiv.) was dissolved in ether. The reaction mixture was cooled at 0 °C and a solution of HCl 37% (18 equiv.) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 6 h. The solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography, eluting with the appropriate MeOH/H₂O+0.05% HCl mixture.

Formation of guanidine trifluoroacetate salts: General method F. The protected guanidine (1 equiv.) was dissolved in a mixture of TFA:DCM (1:1). The solution was stirred at room temperature for 2 h. The solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography, eluting with the appropriate MeOH/H₂O+0.05% TFA mixture.

3-Phenylpyridin-2-amine (2a). Following general method B and starting from 2-amino-3-bromopyridine **1a** (200 mg, 1.16 mmol) and phenylboronic acid (169 mg, 1.39 mmol), **2a** was obtained as a white solid (160 mg, 0.95 mmol, 82%). Data are consistent with literature values [71] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.54 (s, 2H), 6.67 (dd, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 7.4 Hz), 7.28 (dd, 2H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.37–7.39 (m, 4H), 8.00 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 5.0 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 114.5, 121.9, 127.8, 128.7, 129.1, 137.8, 138.1, 147.2, 155.9.

4-Phenylpyridin-2-amine (2b). Following general method B and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** (700 mg, 4.05 mmol) and phenylboronic acid (592 mg, 4.86 mmol), **2b** was obtained as a yellow solid (552 mg, 3.24 mmol, 80%). Data are consistent with literature values [72]. mp = 164–165 °C ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.52 (br s, 2H), 6.71 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz), 6.89 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 5.4 Hz), 7.38–7.47 (m, 3H), 7.58 (dd, 2H,

J = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz), 8.12 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 106.4, 112.9, 127.0, 128.9, 129.0, 138.8, 148.5, 150.5, 159.0.

4-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2c). Following general method B and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** (100 mg, 0.58 mmol) and 2-methoxyphenylboronic acid (105 mg, 0.69 mmol), **2c** was obtained as a yellow oil (75 mg, 0.37 mmol, 65%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.75 (s, 3H), 4.41 (s, 2H), 6.60 (s, 1H), 6.75 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 3.9 Hz), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.95 (td, 1H, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.22 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.28 (td, 1H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 7.5 Hz), 8.00 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.6, 109.0, 111.4, 115.4, 120.9, 128.4, 129.8, 130.3, 147.5, 148.2, 156.5, 158.4.

4-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2d). Following general method B and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** (200 mg, 1.16 mmol) and 3-methoxyphenylboronic acid (211 mg, 1.39 mmol), **2d** was obtained as a white solid (168 mg, 0.84 mmol, 72%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.79 (s, 3H), 4.48 (s, 2H), 6.62 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 5.4 Hz), 6.88 (dd, 1H, *J* = 2.6 Hz, *J* = 8.0 Hz), 7.02 (t, *J* = 2.5 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.4, 106.5, 112.7, 112.8, 114.2, 119.4, 129.9, 140.2, 148.1, 150.5, 158.8, 160.0.

4-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2e). Following general method B and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** (150 mg, 0.87 mmol) and 4-methoxyphenylboronic acid (158 mg, 1.04 mmol), **2e** was obtained as a white solid (125 mg, 0.62 mmol, 72%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.80 (s, 3H), 5.90 (br s, 2H), 6.66 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 6.74 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 5.4 Hz), 7.03 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.92 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm 55.7, 104.8, 110.2, 114.9, 128.1, 131.0, 148.1, 148.8, 160.3, 160.9.

4-(4-Trifluoromethylphenyl)pyridin-2-amine (2f). Following general method B and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1b** (200 mg, 1.16 mmol) and 4-trifluoromethylphenylboronic acid (264 mg, 1.39 mmol), **2f** was obtained as a white solid (186 mg, 0.78 mmol, 67%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.52 (s, 2H), 6.62 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 5.4 Hz), 7.59–7.65 (m, 4H), 8.00 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 106.4, 112.7, 125.9 (q, *J* = 4.4 Hz), 127.3, 130.9, 142.4, 148.8, 148.9, 159.0.

5-Phenylpyridin-2-amine (2g). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (100 mg, 0.58 mmol) and phenylboronic acid (85 mg, 0.69 mmol), **2g** was obtained as a white solid (89 mg, 0.52 mmol, 91%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.78 (br s, 2H), 6.59 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.33 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.40–7.45 (m, 2H), 7.51 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.69 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.40 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 109.1, 126.3, 127.0, 127.3, 129.0, 136.9, 138.1, 145.5, 157.4.

5-(2-Chlorophenyl)pyridin-2-amine (2h). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (200 mg, 1.16 mmol) and 2-chlorophenylboronic acid (217 mg, 1.39 mmol), **2h** was obtained as a white solid (177 mg, 0.87 mmol, 75%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.51 (s, 2H), 6.48 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.16–7.125 (m, 3H), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.51 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.4 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 107.6, 125.6, 127.0, 128.5, 130.0, 131.1, 132.8, 137.5, 138.9, 148.3, 157.6.

5-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2i). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (200 mg, 1.16 mmol) and 2-methoxyphenylboronic acid (211 mg, 1.39 mmol), **2i** was obtained as a colorless oil (232 mg, 1.16 mmol, 100%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.81 (s, 3H), 4.53 (s, 2H), 6.54 (dd, 1H, *J* = 1.1 Hz, *J* = 8.5 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.01 (td, 1H, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.27–7.31 (m, 2H), 7.66 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.5 Hz), 8.24 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.5, 107.8, 111.3, 121.0, 124.6, 127.6, 128.5, 130.2, 139.0, 148.1, 156.6, 157.1.

5-(3-Chlorophenyl)pyridin-2-amine (2j). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (200 mg, 1.16 mmol) and 3-chlorophenylboronic acid (217 mg, 1.39 mmol), **2j** was obtained as a white solid (180 mg, 0.88 mmol, 76%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.57 (s, 2H), 6.49 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.20 (dt, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 7.26 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.30 (dt, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 7.40 (t, 1H, $J = 1.9$ Hz), 7.55 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 8.22 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 108.6, 124.3, 125.9, 126.3, 126.9, 130.1, 134.8, 136.5, 140.2, 146.3, 158.0.

5-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2k). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (200 mg, 1.16 mmol) and 3-methoxyphenylboronic acid (211 mg, 1.39 mmol), **2k** was obtained as a colorless oil (168 mg, 0.84 mmol, 73%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.85 (s, 3H), 4.58 (s, 2H), 6.56 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 6.86 (ddd, 1H, $J = 0.6$ Hz, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 7.03 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz), 7.09 (dq, 1H, $J = 0.6$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 7.33 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.66 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 8.32 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 55.3, 108.5, 112.1, 112.2, 118.8, 127.2, 129.9, 136.6, 139.8, 146.4, 157.8, 160.1.

5-(4-Chlorophenyl)pyridin-2-amine (2l). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (100 mg, 0.58 mmol) and 4-chlorophenylboronic acid (109 mg, 0.69 mmol), **2l** was obtained as a white solid (81 mg, 0.40 mmol, 69%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.65 (br s, 2H), 6.57 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.29 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 108.7, 126.2, 127.5, 129.1, 133.0, 136.5, 136.7, 146.0, 157.7.

5-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2m). Following general method A and starting from 2-amino-5-bromopyridine **1c** (100 mg, 0.58 mmol) and 4-methoxyphenylboronic acid (105 mg, 0.69 mmol), **2m** was obtained as a yellow solid (90 mg, 0.45 mmol, 77%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.76 (s, 3H), 5.96 (s, 2H), 6.50 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.47 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.17 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ ppm 55.6, 108.4, 114.8, 124.3, 127.0, 131.1, 135.5, 145.6, 158.5, 159.2.

6-Phenylpyridin-2-amine (2n). Following general method A and starting from 2-amino-6-chloropyridine **1d** (200 mg, 1.56 mmol) and phenylboronic acid (228 mg, 1.87 mmol), **2n** was obtained as a yellow oil (242 mg, 1.42 mmol, 92%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.54 (s, 2H), 6.45 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.10 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.38 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.44 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.50 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.94 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 107.1, 111.0, 126.8, 128.5, 128.6, 138.4, 139.7, 156.2, 158.3.

6-(2-Chlorophenyl)pyridin-2-amine (2o). Following general method A and starting from 2-amino-6-chloropyridine **1d** (300 mg, 2.33 mmol) and 2-chlorophenylboronic acid (438 mg, 2.80 mmol), **2o** was obtained as a white solid (283 mg, 1.38 mmol, 59%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.59 (s, 2H), 6.50 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.94 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.31 (td, 2H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.44 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.48–7.53 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 107.5, 115.0, 126.8, 129.2, 130.0, 131.2, 137.7, 139.4, 155.3, 158.1.

6-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-amine (2p). Following general method A and starting from 2-amino-6-chloropyridine **1d** (150 mg, 1.17 mmol) and 2-methoxyphenylboronic acid (213 mg, 1.40 mmol), **2p** was obtained as a yellow solid (201 mg, 1.01 mmol, 86%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.76 (s, 3H), 4.40 (s, 2H), 6.36 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 6.89 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 6.97 (td, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.06 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.25 (ddd, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 7.39 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.61 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 7.9$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 55.7, 106.7, 111.5, 115.5, 120.9, 129.4, 129.5, 130.9, 137.5, 154.6, 157.0, 158.1.

4-Bromo-1-[2,3-di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]pyridine (3a). Following general method D and starting from 2-amino-4-bromopyridine **1d** (100 mg, 0.58 mmol), **3a** was obtained as a white solid (193 mg, 0.47 mmol, 85%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.56 (s, 18H), 7.20 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 8.13 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 8.64 (br s, 1H), 10.99 (br s, 1H), 11.52 (br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.0, 28.1, 119.0, 123.2, 134.1, 148.5, 151.4, 152.8.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-chloropyridine (3b). Following general method D and starting from 2-amino-6-chloropyridine **1d** (1.00 g, 7.78 mmol), **3b** was obtained as a white solid (2.36 g, 6.37 mmol, 86%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.53 (s, 18H), 7.03 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.65 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.36 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 10.85 (s, 1H), 11.50 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.0, 28.1, 80.2, 84.2, 114.2, 119.8, 140.6, 153.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-3-phenylpyridine (4a). Following general method D and starting from **2a** (143 mg, 0.84 mmol), **4a** was obtained as a colorless oil (95 mg, 0.23 mmol, 37%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.38 (s, 18H), 7.07 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.28–7.40 (m, 5H), 7.60 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.28 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 11.99 (s, 1H).

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-phenylpyridine (4b). Following general method D and starting from **2b** (350 mg, 2.06 mmol), **4b** was obtained as a white solid (597 mg, 1.45 mmol, 74%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.54 (s, 18H), 7.26 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 7.40–7.50 (m, 3H), 7.71 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz), 8.33 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.72 (br s, 1H), 10.93 (br s, 1H), 11.48 (br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.1, 117.9, 127.2, 128.9, 129.0, 150.4.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(2-chlorophenyl)pyridine (4c). Following general method C and starting from **3a** (200 mg, 0.48 mmol) and 2-chlorophenylboronic acid (90 mg, 0.58 mmol), **4c** was obtained and used directly in the next step without further purification.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(2-methoxyphenyl)pyridine (4d). Following general method D and starting from **2c** (66 mg, 0.33 mmol), **4d** was obtained as a yellow solid (91 mg, 0.21 mmol, 62%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.41 (s, 18H), 3.81 (s, 3H), 4.41 (s, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.93–7.00 (m, 2H), 6.75 (dd, 1H, $J = 5.3$ Hz, 1.4 Hz), 7.29–7.36 (m, 2H), 8.23 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 10.86 (s, 1H), 11.45 (s, 1H).

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(3-chlorophenyl)pyridine (4e). Following general method C and starting from **3a** (200 mg, 0.48 mmol) and 3-chlorophenylboronic acid (90 mg, 0.58 mmol), **4e** was obtained and used directly in the next step without further purification.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(3-methoxyphenyl)pyridine (4f). Following general method D and starting from **2d** (156 mg, 0.78 mmol), **4f** was obtained as a white solid (265 mg, 0.60 mmol, 77%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.46 (s, 18H), 3.81 (s, 3H), 6.90 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 7.17–7.22 (m, 3H), 7.31 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.25 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.55 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 11.40 (s, 1H).

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(4-chlorophenyl)pyridine (4g). Following general method C and starting from **3a** (50 mg, 0.12 mmol) and 4-chlorophenylboronic acid (23 mg, 0.14 mmol), **4g** was obtained as a white solid (35 mg, 0.08 mmol, 66%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.54 (s, 9H), 7.21 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 7.44 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.64 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 6.33 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.71 (br s, 1H), 10.93 (br s, 1H), 11.47 (br s, 1H).

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(4-methoxyphenyl)pyridine (4h). Following general method D and starting from **2e** (110 mg, 0.55 mmol), **4h** was obtained as a white solid (184 mg, 0.41 mmol, 76%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.54 (s, 18H), 3.86 (s, 3H), 6.99 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.22 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 7.66 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 8.29 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.64 (br s,

1H), 10.92 (br s, 1H), 11.44 (br s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 55.4, 114.3, 117.3, 128.3, 149.8, 160.5.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-(4-trifluoromethylphenyl)pyridine (4i). Following general method D and starting from **2f** (1/5 mg, 0.73 mmol), **4i** was obtained as a white solid (232 mg, 0.48 mmol, 66%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.47 (s, 18H), 7.18 (s, 1H), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.31 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz), 8.67 (s, 1H), 10.93 (s, 1H), 11.40 (s, 1H).

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-phenylpyridine (4j). Following general method D and starting from **2g** (73 mg, 0.43 mmol), **4j** was obtained as a white solid (111 mg, 0.27 mmol, 66%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.35 (s, 18H), 7.18 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.26 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz), 7.36 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 7.72 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.27 (br s, 1H), 8.33 (s, 1H), 10.76 (br s, 1H), 11.35 (br s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 28.2, 115.9, 126.8, 127.7, 129.0, 132.9, 136.6, 137.6, 146.2, 149.8, 153.1.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(2-chlorophenyl)pyridine (4k). Following general method D and starting from **2h** (90 mg, 0.44 mmol), **4k** was obtained as a colorless oil (147 mg, 0.33 mmol, 78%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.54 (s, 9H), 1.55 (s, 9H), 7.34 (dt, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.7 Hz), 7.38 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.43 (dt, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.7 Hz), 7.53 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H, *J* = 2.5 Hz, *J* = 8.7 Hz), 8.48 (s, 1H), 8.50 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 10.97 (s, 1H), 11.55 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.0, 28.2, 60.4, 80.1, 84.1, 115.9, 125.0, 126.9, 127.7, 130.3, 131.5, 135.0, 136.5, 139.4, 146.2, 150.3, 153.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(2-methoxyphenyl)pyridine (4l). Following general method D and starting from **2i** (132 mg, 0.66 mmol), **4l** was obtained as a colorless oil (194 mg, 0.44 mmol, 70%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.47 (s, 18H), 3.74 (s, 3H), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.97 (td, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.23 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.27 (td, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.83 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 8.5 Hz), 8.33 (s, 1H), 8.39 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 10.86 (s, 1H), 11.49 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 28.2, 55.5, 111.4, 115.2, 121.0, 126.9, 129.2, 130.4, 139.1, 148.3, 149.1, 153.1, 156.7, 163.3.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(3-chlorophenyl)pyridine (4m). Following general method D and starting from **2j** (90 mg, 0.44 mmol), **4m** was obtained as a white solid (143 mg, 0.32 mmol, 77%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.54 (s, 9H), 1.55 (s, 9H), 7.30–7.34 (m, 3H), 7.48 (dt, 1H, *J* = 2.3 Hz, *J* = 8.5 Hz), 7.83 (dd, 1H, *J* = 2.3 Hz, *J* = 8.5 Hz), 8.38 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.45 (br s, 1H), 10.98 (s, 1H), 11.56 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.0, 28.2, 80.0, 84.0, 115.2, 127.1, 129.1, 130.2, 131.2, 132.9, 136.8, 139.1, 148.2, 149.8, 153.1, 163.2.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(3-methoxyphenyl)pyridine (4n). Following general method D and starting from **2k** (79 mg, 0.40 mmol), **4n** was obtained as a white solid (114 mg, 0.26 mmol, 69%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.54 (s, 18H), 3.87 (s, 3H), 6.92 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.0 Hz), 7.08 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.14 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.37 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz), 8.45 (br s, 1H), 8.52 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 10.96 (s, 1H), 11.55 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 28.2, 55.3, 80.0, 84.0, 112.7, 113.0, 115.8, 119.3, 130.1, 132.7, 136.6, 139.0, 146.2, 149.9, 153.1, 160.1, 163.2.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(4-chlorophenyl)pyridine (4o). Following general method D and starting from **2l** (100 mg, 0.49 mmol), **4o** was obtained as a white solid (160 mg, 0.36 mmol, 77%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.47 (s, 18H), 7.19 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.41 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.81 (dd, 1H, *J* = 2.8 Hz, *J* = 8.4 Hz), 8.40 (br s, 1H), 8.42 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 10.91 (br s, 1H), 11.47 (br s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 31.3, 128.0, 129.2, 133.9, 136.0, 136.4.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-(4-

methoxyphenyl)pyridine (4p). Following general method D and starting from **2m** (80 mg, 0.40 mmol), **4p** was obtained as a white solid (125 mg, 0.28 mmol, 75%) and used directly for the Boc deprotection step without further purification.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-phenylpyridine (4q). Following general method D and starting from **2n** (496 mg, 2.91 mmol), **4q** was obtained as a white solid (944 mg, 2.29 mmol, 83%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.55 (s, 9H), 1.56 (s, 9H), 7.39–7.48 (m, 4H), 7.77 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 8.01 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 8.26 (br s, 1H), 10.87 (s, 1H), 11.58 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.0, 28.2, 116.3, 126.8, 128.7, 129.1, 138.5, 129.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(2-chlorophenyl)pyridine (4r). Following general method D and starting from **2o** (174 mg, 0.85 mmol), **4r** was obtained as a yellow solid (332 mg, 0.74 mmol, 92%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.53 (s, 18H), 7.30–7.36 (m, 3H), 7.45 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 7.2 Hz), 7.57 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 7.2 Hz), 7.77 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 8.35 (br s, 1H), 10.82 (s, 1H), 11.56 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 126.9, 129.5, 130.1, 131.6, 138.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(2-methoxyphenyl)pyridine (4s). Following general method D and starting from **2p** (184 mg, 0.92 mmol), **4s** was obtained as a white solid (310 mg, 0.70 mmol, 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.53 (s, 18H), 3.85 (s, 3H), 6.99 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.06 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.35 (td, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.4 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.72 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.83 (br s, 1H), 8.28 (br s, 1H), 10.80 (s, 1H), 11.57 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.2, 55.6, 111.5, 121.0, 130.0, 131.2, 137.8, 157.2.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(3-chlorophenyl)pyridine (4t). Following general method C and starting from **3b** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-chlorophenylboronic acid (25 mg, 0.16 mmol), **4t** was obtained as a white solid (48 mg, 0.11 mmol, 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.55 (s, 18H), 7.36–7.39 (m, 2H), 7.45 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.78 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.88 (br s, 1H), 8.01 (s, 1H), 8.38 (br s, 1H), 10.88 (s, 1H), 11.58 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 116.3, 124.9, 127.0, 129.0, 129.9, 134.7, 139.1, 155.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(3-methoxyphenyl)pyridine (4u). Following general method C and starting from **3b** (150 mg, 0.40 mmol) and 3-methoxyphenylboronic acid (74 mg, 0.49 mmol), **4u** was obtained as a white solid (75 mg, 0.17 mmol, 42%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.55 (s, 18H), 3.89 (s, 3H), 6.95 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 7.9 Hz), 7.36 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.57 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.76 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 8.36 (br s, 1H), 10.87 (s, 1H), 11.59 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.1, 28.2, 55.4, 112.5, 114.6, 116.4, 119.3, 129.6, 138.9, 160.0.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(4-chlorophenyl)pyridine (4v). Following general method C and starting from **3b** (100 mg, 0.27 mmol) and 4-chlorophenylboronic acid (42 mg, 0.27 mmol), **4v** was obtained and used directly for the Boc deprotection step without further purification.

1-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-6-(4-methoxyphenyl)pyridine (4w). Following general method C and starting from **3b** (200 mg, 0.54 mmol) and 4-methoxyphenylboronic acid (98 mg, 0.65 mmol), **4w** was obtained as a white solid (224 mg, 0.51 mmol, 94%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.54 (s, 18H), 3.86 (s, 3H), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 7.41 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.23 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.96 (br s, 2H), 8.29 (br s, 1H), 10.84 (s, 1H), 11.58 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.2, 55.4, 114.1, 115.4, 128.1, 138.9, 160.5.

1-(3-Phenylpyridin-2-yl)guanidine Hydrochloride (5a). Following general method E and starting from **4a** (75 mg, 0.18 mmol), **5a** was obtained as a white solid (35 mg, 0.14 mmol, 77%). Purity ≥98%; mp > 410 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7.34 (dd, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz),

7.52–7.58 (m, 3H), 7.78 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 8.38 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 5.0$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 120.7, 127.5, 129.2, 129.7, 135.4, 141.1, 146.4, 148.6, 156.1; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 213.1118 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{H}^+$ 213.1135).

1-[4-(2-Phenylpyridin-2-yl)guanidine Hydrochloride (5b). Following general method E and starting from **4b** (100 mg, 0.24 mmol), **5b** was obtained as a white solid (46 mg, 0.19 mmol, 76%). Purity $\geq 98\%$; mp = 206–208 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 7.31 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 7.47 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 5.5$ Hz), 7.50–7.56 (m, 3H), 7.74 (dd, 2H, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 8.39 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 110.2, 117.5, 126.6, 129.0, 129.5, 136.9, 147.0, 151.7, 152.6, 155.8.

1-[4-(2-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5c). Following general method E and starting from **4c** (144 mg, 0.32 mmol), **5c** was obtained as a white solid (26 mg, 0.09 mmol, 29% over 2 steps). Purity $\geq 98\%$; mp = 189–191 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 7.16 (s, 1H), 7.30 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 7.44–7.50 (m, 3H), 7.57–7.61 (m, 1H), 8.44 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 113.3, 120.2, 127.3, 130.0, 130.2, 130.6, 131.5, 136.9, 146.4, 150.5, 152.0, 155.8; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0737 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[4-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5d). Following general method F and starting from **4d** (94 mg, 0.21 mmol), **5d** was obtained as a white solid (47 mg, 0.13 mmol, 61%). Purity $\geq 98\%$; mp = 137–138 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.82 (s, 3H), 7.10 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.32 (dd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 7.41 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.6$ Hz), 7.47 (td, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 8.34 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 8.44 (s, 4H), 11.22 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.1, 112.6, 113.7, 120.3, 121.3, 126.4, 130.5, 131.4, 146.8, 149.3, 152.5, 155.8, 156.8; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1238 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OH}^+$ 243.1240).

1-[4-(3-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5e). Following general method E and starting from **4e** (144 mg, 0.32 mmol), **5e** was obtained as a white solid (26 mg, 0.09 mmol, 29% over 2 steps). Purity $\geq 98\%$; mp = 102–105 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 7.33 (s, 1H), 7.48 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.52–7.55 (m, 2H), 7.69 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz), 7.76 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 110.5, 117.6, 125.2, 126.7, 129.4, 130.6, 134.9, 138.9, 147.2, 150.3, 152.6, 155.8; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0742 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[4-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5f). Following general method E and starting from **4f** (238 mg, 0.54 mmol), **5f** was obtained as a white solid (89 mg, 0.32 mmol, 59%). Purity $\geq 98\%$; mp = 107–110 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.73 (s, 3H), 6.82 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 6.94 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.00–7.03 (m, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.22 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.05 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.30 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.4, 111.5, 112.6, 114.7, 117.0, 119.3, 130.2, 138.6, 146.6, 151.1, 153.8, 156.5, 160.0; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1243 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OH}^+$ 243.1240).

1-[4-(4-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5g). Following general method E and starting from **4g** (30 mg, 0.07 mmol), **5g** was obtained as a white solid (13 mg, 0.05 mmol, 68%). Purity $\geq 98\%$; mp = 255–256 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 7.29 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 7.50 (dd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 7.58 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.76 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 8.42 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 110.1, 117.4, 128.3, 129.1, 147.2; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0742 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[4-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5h). Following general method E and starting from **4h** (140 mg, 0.32 mmol), **5h** was obtained as a white solid (55 mg, 0.20 mmol, 63%). Purity $\geq 98\%$; mp = 283–284 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.82 (s, 3H), 7.10 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.26 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.71 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 8.31 (d,

1H, $J = 5.4$ Hz), 8.39 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 55.9, 109.6, 115.3, 117.1, 128.6, 128.9, 147.7, 150.2, 153.1, 155.8, 161.2; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1237 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OH}^+$ 243.1240).

1-[4-(4-Trifluoromethylphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5i). Following general method E and starting from **4i** (220 mg, 0.46 mmol), **5i** was obtained as a white solid (60 mg, 0.19 mmol, 41%). Purity $\geq 98\%$; mp = 255–256 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 7.24 (s, 1H), 7.41 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.72 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 8.33 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ ppm –61.2; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm 111.0, 117.8, 124.5 (q, $J = 272.2$ Hz), 126.6 (q, $J = 3.7$ Hz), 126.3, 130.3 (q, $J = 32.3$ Hz), 141.1, 148.1, 149.2, 160.2, 155.9; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 281.1017 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{H}^+$ 281.1009).

1-(5-Phenylpyridin-2-yl)guanidine Trifluoroacetate (5j). Following general method F and starting from **4j** (180 mg, 0.44 mmol), **5j** was obtained as a white solid (130 mg, 0.40 mmol, 91%). Purity $\geq 98\%$; mp = 189–191 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.17 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.41 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.50 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.70 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 8.20 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.55 (br s, 4H), 8.62 (s, 1H), 11.5 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.8, 127.0, 128.5, 129.6, 131.7, 136.6, 138.1, 144.7, 151.7, 155.7, 160.2 (q, $J = 32.3$ Hz); HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 213.1126 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{H}^+$ 213.1135).

1-[5-(2-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5k). Following general method F and starting from **4k** (105 mg, 0.24 mmol), **5k** was obtained as a white solid (64 mg, 0.18 mmol, 75%). Purity $\geq 98\%$; mp = 170–171 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.18 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.44–7.49 (m, 3H), 7.59–7.63 (m, 1H), 8.00 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 8.39 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.56 (br s, 4H), 11.55 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.1, 128.3, 130.3, 130.4, 132.0, 132.1, 136.1, 140.8, 146.8, 151.9, 155.8, 160.1 (q, $J = 32$ Hz); HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0744 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[5-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5l). Following general method F and starting from **4l** (92 mg, 0.21 mmol), **5l** was obtained as a white solid (70 mg, 0.20 mmol, 95%). Purity $\geq 98\%$; mp = 128–130 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.79 (s, 3H), 7.06 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.4 (t, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.40 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 8.01 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 8.48 (br s, 4H), 11.35 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.1, 112.3, 113.1, 125.9, 129.8, 130.2, 130.6, 140.6, 146.7, 151.1, 155.7, 156.7, 159.7; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1232 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OH}^+$ 243.1240).

1-[5-(3-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5m). Following general method F and starting from **4m** (87 mg, 0.19 mmol), **5m** was obtained as a white solid (59 mg, 0.16 mmol, 84%). Purity $\geq 98\%$; mp = 187–188 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.17 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.47 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.53 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.68 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.79 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.57 (br s, 4H), 8.66 (s, 1H), 11.54 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.8, 125.7, 126.7, 128.2, 130.2, 131.4, 134.4, 138.3, 138.8, 145.1, 152.2, 155.7, 160.2 (q, $J = 32$ Hz); HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0739 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[5-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5n). Following general method F and starting from **4n** (76 mg, 0.16 mmol), **5n** was obtained as a white solid (50 mg, 0.14 mmol, 86%). Purity $\geq 98\%$; mp = 171–172 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.83 (s, 3H), 6.98 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.22–7.26 (m, 2H), 7.41 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.20 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.5$ Hz), 8.56 (br s, 4H), 8.63 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 11.51 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 55.7, 112.5, 113.7, 114.0, 119.2, 130.7, 131.6, 138.1, 138.2, 144.8, 151.8, 155.7, 160.4; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1243 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OH}^+$ 243.1240).

1-[5-(4-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine

Trifluoroacetate (5o). Following general method F and starting from **4o** (134 mg, 0.30 mmol), **5o** was obtained as a white solid (72 mg, 0.20 mmol, 66%). Purity $\geq 98\%$; mp = 216–218 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.16 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.56 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.74 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.21 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8.44 (br s, 3H), 8.64 (s, 1H), 11.29 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.4, 128.3, 129.1, 130.0, 132.9, 135.0, 137.6, 144.3, 151.4, 155.1; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0745 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[5-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5p). Following general method F and starting from **4p** (125 mg, 0.28 mmol), **5p** was obtained as a white solid (66 mg, 0.19 mmol, 65%). Purity $\geq 98\%$; mp = 246–249 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.80 (s, 3H), 7.06 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.13 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.64 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 8.15 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8.41 (br s, 3H), 8.58 (s, 1H), 11.20 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 55.2, 113.4, 114.6, 127.7, 128.4, 131.1, 137.1, 143.7, 150.5, 155.1, 159.3; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1242 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{H}^+$ 243.1240).

1-[6-Phenylpyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5q). Following general method E and starting from **4q** (150 mg, 0.36 mmol), **5q** was obtained as a white solid (73 mg, 0.29 mmol, 80%). Purity $\geq 98\%$; mp = 238–239 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.06 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.48–7.55 (m, 3H), 7.72 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.93–7.99 (m, 3H), 8.42 (br s, 4H), 11.65 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 112.5, 116.6, 127.1, 129.5, 130.1, 138.0, 141.0, 152.4, 154.7, 155.9; HRMS ($\text{M}-\text{H}^+$) 213.1125 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{H}^+$ 213.1135).

1-[6-(2-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5r). Following general method E and starting from **4r** (100 mg, 0.22 mmol), **5r** was obtained as a white solid (46 mg, 0.16 mmol, 73%). Purity $\geq 98\%$; mp = 206–207 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.12 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.48–7.51 (m, 2H), 7.61–7.63 (m, 2H), 8.01 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz), 8.37 (br s, 4H), 11.74 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 112.8, 120.4, 128.2, 130.8, 131.1, 131.5, 131.9, 137.8, 140.6, 151.9, 153.9, 155.8; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0739 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[6-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5s). Following general method F and starting from **4s** (172 mg, 0.39 mmol), **5s** was obtained as a white solid (115 mg, 0.32 mmol, 83%). Purity $\geq 98\%$; mp = 183–184 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.83 (s, 3H), 7.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.09 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.46 (td, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 7.53 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 7.93 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.59 (br s, 4H), 11.34 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.1, 111.8, 112.8, 120.0, 121.4, 127.4, 130.7, 131.2, 140.2, 151.8, 153.6, 155.9, 157.2, 160.0 (q, $J = 32.3$ Hz); HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1239 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{H}^+$ 243.1240).

1-[6-(3-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Hydrochloride (5t). Following general method E and starting from **4t** (28 mg, 0.063 mmol), **5t** was obtained as a white solid (7 mg, 0.026 mmol, 42%). Purity $\geq 98\%$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.09 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.55–7.56 (m, 2H), 7.77 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.90–7.93 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.99 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.53 (br s, 4H), 11.41 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.4, 117.1, 125.8, 126.9, 129.9, 131.4, 134.4, 140.2, 141.2, 152.5, 153.2, 155.7; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0738 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[6-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5u). Following general method F and starting from **4u** (43 mg, 0.10 mmol), **5u** was obtained as a white solid (34 mg, 0.09 mmol, 99%). Purity $\geq 98\%$; mp = 138–139 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.84 (s, 3H), 7.05–7.08 (m, 2H), 7.43–7.52 (m, 3H), 7.73 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.97 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 8.51 (br s, 4H), 11.25 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 55.7, 112.5, 112.8, 115.7, 116.9, 119.4, 130.7, 139.6, 141.0, 152.4, 154.5, 155.8, 159.3 (q, $J = 32.7$ Hz), 160.3; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1234 (calcd for

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{H}^+$ 243.1240).

1-[6-(4-Chlorophenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5v). Following general method F and starting from the crude **4v**, **5v** was obtained as a white solid (32 mg, 0.09 mmol, 33% over 2 steps). Purity $> 98\%$; mp = 253–254 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.07 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.58 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.73 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.95–8.00 (m, 3H), 8.53 (br s, 4H), 11.41 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.0, 116.7, 129.0, 129.5, 134.9, 136.9, 141.1, 152.5, 153.5, 155.8; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 247.0729 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{H}^+$ 247.0745).

1-[6-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl]guanidine Trifluoroacetate (5w). Following general method F and starting from **4w** (100 mg, 0.23 mmol), **5w** was obtained as a white solid (64 mg, 0.18 mmol, 79%). Purity $\geq 98\%$; mp = 198–199 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.82 (s, 3H), 6.98 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.07 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.65 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.89 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.92 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.59 (br s, 4H), 11.39 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 55.8, 111.7, 114.9, 115.8, 128.5, 130.4, 140.9, 152.4, 154.5, 155.9, 161.0; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 243.1232 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{H}^+$ 243.1240).

1-Benzoyl-3-(4-phenylpyridin-2-yl)thiourea (6). **2b** (100 mg, 0.59 mmol, 1 equiv.) and benzoyl isothiocyanate (87 μL , 0.65 mmol, 1.1 equiv.) were dissolved in THF (4.8 mL). The resulting mixture was heated at reflux for 3 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 8:2), yielding to **6** as a yellow solid (144 mg, 0.43 mmol, 74%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.40 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 5.1$ Hz), 7.43–7.57 (m, 5H), 7.66 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.72 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz), 7.92 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 8.48 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz), 9.08 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 13.19 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 114.0, 119.5, 127.2, 127.6, 129.1, 129.2, 129.3, 131.7, 133.8, 138.0, 149.0, 150.3, 151.9, 166.4, 177.1.

(4-Phenylpyridin-2-yl)thiourea (7). **6** (80 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.) was dissolved in ethanol (1.8 mL). NaOH (29 mg, 0.72 mmol, 3 equiv.) was dissolved in water (1.8 mL) and added in the previous solution. The resulting solution was heated at reflux for 1 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude residue was diluted in water. The organic phase was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 4:1), yielding to **7** as a white solid (33 mg, 0.14 mmol, 60%). Purity $> 98\%$; mp = 207–209 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.37 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 5.4$ Hz), 7.47–7.56 (m, 4H), 7.69 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 8.30 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 8.93 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 10.59 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 110.3, 116.3, 127.2, 129.8, 130.0, 137.4, 147.2, 150.2, 154.8, 181.2; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 230.0736 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{SH}^+$ 230.0746).

Ethyl 2-amino-4-chlorobenzoate (8b). The 2-amino-4-chlorobenzoic acid **8a** (150 g, 8.74 mmol, 1 equiv.) was dissolved in ethanol (53.0 mL) and H_2SO_4 was added (8 mL). The reaction media was heated at reflux for 21 h. After it was cooled, the solution was concentrated under vacuum. K_2CO_3 was added in the residue by small portions to reach a pH of 8. The residue was diluted with water and filtered. The aqueous phase was extracted 3 times with AcOEt. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, yielding to **8b** as an orange oil (1.75 g, 8.74 mmol, 100%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.37 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 4.32 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 5.81 (s, 2H), 6.59 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.7$ Hz), 6.65 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.79 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.3, 60.5, 109.6, 115.9, 116.6, 132.6, 139.9, 151.2, 167.6.

Ethyl 2-amino-4-phenylbenzoate (9). Following general method C and starting from **8b** (625 mg, 3.13 mmol) and phenylboronic acid (458 mg, 3.75 mmol), **9** was obtained as a brown solid

(747 mg, 3.10 mmol, 99%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.41 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 4.36 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 5.81 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 6.89 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.2$ Hz), 7.37 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.44 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.58 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.4, 60.3, 110.1, 114.9, 115.6, 127.1, 128.0, 128.7, 131.8, 140.3, 146.7, 150.7, 168.1.

(2-Amino-4-phenylphenyl)methanol (10). In an oven-dried one-neck round-bottom flask, **9** (320 mg, 1.41 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (8.7 mL). LiBH_4 (123 mg, 4 equiv.) was added by small portion at 0 °C. The resulting mixture was heated at reflux for 7 h. The reaction media was cooled at 0 °C and methanol was added dropwise. The solution was concentrated under vacuum and diluted with water. The aqueous phase was extracted 3 times with AcOEt. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 1:1), to yield **10** as an orange solid (224 mg, 1.13 mmol, 80%). ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 4.65 (s, 2H), 6.96 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 7.05 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.32 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.41 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 61.9, 114.3, 116.4, 124.7, 126.4, 126.7, 128.3, 128.9, 141.2, 141.6, 146.2.

[2-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-phenylphenyl]methanol (11). Following general method D and starting from **10** (479 mg, 2.40 mmol), **11** was obtained as a white solid (870 mg, 1.97 mmol, 86%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.45 (s, 9H), 1.56 (s, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.35 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.43 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.48–7.59 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.1, 61.7, 80.1, 84.2, 124.5, 126.2, 127.1, 127.6, 128.8, 132.1, 134.3, 135.6, 140.0, 141.8, 153.2, 155.7, 162.6.

7-Phenyl-3,4-dihydroquinazolin-2-amine Hydrochloride (12). **11** (100 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) was dissolved in DCM (2.9 mL), and SOCl_2 (0.66 mL, 9.06 mmol, 40 equiv.) was added. The resulting mixture was heated at reflux for 6 h. After cooling, the solution was concentrated under vacuum. The residue was diluted in ether (1.0 mL) and HCl 37% was added (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ H_2O +0.05%TFA), yielding to **12** as a white solid (47 mg, 0.18 mmol, 79%). Purity $\geq 98\%$; mp = 200–203 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 4.53 (s, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.36–7.41 (m, 2H), 7.48 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.78 (s, 2H), 8.68 (s, 1H), 11.08 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 41.0, 113.6, 117.6, 122.8, 127.0, 127.4, 128.3, 129.5, 134.2, 139.7, 140.9, 153.3; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 224.1178 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{H}^+$ 224.1182).

2-Amino-5-phenylbenzoic acid (14). A microwave vial under argon was charged with 5-bromoanthranilic acid **13** (500 mg, 2.31 mmol, 1 equiv.), phenylboronic acid (310 mg, 2.55 mmol, 1.1 equiv.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (52 mg, 0.23 mmol, 10 mol%) and Na_2CO_3 (736 mg, 6.94 mmol, 3 equiv.) in water (1.0 mL). The vial was capped properly, flushed with argon and heated to 90 °C for 16 h. After cooling, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite[®], washed with AcOEt and concentrated under vacuum, yielding to **14** which was used for the next step without further purification. The crude material was purified by silica gel chromatography (0–15% EtOAc/Hexanes gradient column) to give an oil. Which was triturated with ether and petroleum ether yielding **14** as a white solid which was collected by filtration (0.485 g, 98%). Data are consistent with literature values [73]. mp = 204–205 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 6.85 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.24 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.35–7.39 (m, 2H), 7.54–7.60 (m, 3H), 7.95 (bs, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 110.3, 117.5, 125.8, 126.6, 126.9, 129.2, 129.3, 132.6, 140.2, 151.4.

(2-Amino-5-phenylphenyl)methanol (15). In a two-neck round-bottom flask (oven-dried and under argon) LAH (220 mg, 5.79 mmol, 2.5 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (10 mL). A

solution of crude **14** in anhydrous THF (5 mL) was added slowly in the previous solution. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Water was slowly added at 0 °C to neutralized the excess of LAH and the aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, yielding to **15** as a yellow solid (440 mg, 2.21 mmol, 95% over 2 steps). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.27 (br s, 2H), 4.77 (s, 2H), 6.80 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.28–7.32 (m, 1H), 7.36–7.49 (m, 5H), 7.55 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 62.4, 108.3, 124.6, 163.7, 127.2, 127.9, 129.8, 130.1, 131.4, 144.8, 148.9.

{2-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-phenylphenyl}methanol (16). Following general method A and starting from **15** (440 mg, 2.21 mmol), **16** was obtained as a white solid (680 mg, 1.54 mmol, 70%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.47 (s, 9H), 1.57 (s, 9H), 4.29 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 7.35–7.70 (m, 8H), 10.21 (s, 1H), 11.63 (s, 1H).

6-Phenyl-3,4-dihydroquinazolin-2-amine Trifluoroacetate (17a). **16** (662 mg, 1.50 mmol, 1 equiv.) was dissolved in DCM (20.0 mL), and SOCl_2 (4.38 mL, 59.97 mmol, 40 equiv.) was added. The resulting mixture was heated at reflux for 3 h. After cooling, the solution was concentrated under vacuum. The residue was diluted in a mixture DCM:TFA (1:1). The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ H_2O +0.05%TFA), yielding to **17** as a white solid (140 mg, 0.54 mmol, 36%). Purity $\geq 98\%$; mp = 249–250 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 4.55 (s, 2H), 7.04 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.33 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz), 7.44 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.51–7.63 (m, 4H), 7.86 (s, 2H), 8.59 (s, 1H), 11.07 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 40.9, 115.6, 118.6, 124.5, 126.2, 126.6, 127.3, 128.9, 132.7, 135.9, 139.2, 152.6; HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$) 224.1187 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{H}^+$ 224.1182).

2-Fluoro-5-(2-methoxyphenyl)benzaldehyde (19). Following general method B and starting from 5-bromo-2-fluorobenzaldehyde **18** (200 mg, 0.99 mmol) and 2-methoxyphenylboronic acid (180 mg, 1.18 mmol), **19** was obtained as a colorless oil (197 mg, 0.86 mmol, 87%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.82 (s, 3H), 6.99 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.04 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.20 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.30 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.36 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.77–7.81 (m, 1H), 8.01 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz) 10.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 55.6, 111.3, 116.0 (d, $J = 20$ Hz), 121.0, 128.3, 129.4, 129.6 (d, $J = 2$ Hz), 130.6, 135.4, 137.5 (d, $J = 9$ Hz), 156.3, 162.5, 165.0, 187.3 (d, $J = 6$ Hz).

6-(2-Methoxyphenyl)quinazolin-2-amine (20). **19** (184 mg, 0.80 mmol, 1 equiv.), DIEA (349.8 μL , 2.00 mmol, 2.5 equiv.) and guanidine carbonate (180 mg, 1.00 mmol, 1.25 equiv.) were dissolved in NMP (3.4 mL). The resulting mixture was heated at 150 °C for 16 h. After cooling at room temperature, the solution was poured in water (15 mL) and brine (1.6 mL) was added. The brown solid was filtered, purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 1:1 to 1:4), yielding to **19** as an orange solid (36 mg, 0.14 mmol, 18%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.79 (s, 3H), 6.84 (s, 2H), 7.05 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.13 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.36 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.43 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.86 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.0, 112.3, 119.8, 119.9, 121.3, 124.3, 128.1, 129.4, 129.5, 130.8, 132.2, 136.2, 151.4, 156.7, 161.4, 162.9.

6-(2-Methoxyphenyl)-3,4-dihydroquinazolin-2-amine Trifluoroacetate (17b). **20** (15 mg, 0.06 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a mixture DCM (0.2 mL) and TFA (21.3 μL , 0.29 mmol, 4.96 equiv.). Et_3SiH (22.8 μL , 0.14 mmol, 2.45 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 15 h. The reaction media was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ H_2O +0.05%TFA), to yield **21** as a white solid (11 mg, 0.03 mmol, 54%). Purity $\geq 98\%$;

mp = 124–126 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.75 (s, 3H), 4.52 (s, 2H), 7.01 (t, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.10 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.25 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 7.29 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.31–7.38 (m, 2H), 7.77 (s, 2H), 8.53 (s, 1H), 10.92 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 41.4, 56.0, 112.3, 115.3, 118.1, 121.3, 127.5, 129.3, 129.4, 129.8, 130.6, 132.6, 134.5, 153.1, 156.6; HRMS ($M+H^+$) 254.1294 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{OH}^+$ 254.1288).

2-Amino-6-phenylbenzonitrile (22). Following general method A and starting from 2-amino-6-iodobenzonitrile **21** (300 mg, 1.23 mmol) and phenylboronic acid (180 mg, 1.47 mmol), **22** was obtained as a yellow solid (218 mg, 1.12 mmol, 91%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.53 (s, 2H), 6.73 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 6.79 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.9$ Hz), 7.35 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.40–7.49 (m, 3H), 7.53–7.56 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 113.6, 117.4, 119.0, 128.5, 128.6, 133.4, 138.9, 145.9, 150.6.

2-(Aminomethyl)-3-phenylaniline (23). In a one-neck round-bottom flask under argon, **22** (200 mg, 1.03 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (14.3 mL) and $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ (195.3 μL , 2.06 mmol, 2 equiv.) was added dropwise. The resulting solution was heated at reflux for 2 h. After cooling, HCl 2N was added and the solution was heated at 90 °C for 1 h. The solution was then concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}+0.05\%\text{TFA}$). The desired salt was solubilized in water and a saturated solution of NaHCO_3 was added to reach a pH of 8. The aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, yielding to **23** as a white solid (181 mg, 0.91 mmol, 89%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 2.81 (br s, 4H), 3.71 (s, 2H), 6.57 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.62 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.02 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.17–7.31 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 41.6, 120.1, 123.4, 126.8, 127.5, 128.0, 129.1, 142.0, 142.9, 147.2.

5-Phenyl-3,4-dihydroquinazolin-2-amine Hydrobromide (24). **23** (53 mg, 0.27 mmol, 1 equiv.) was dissolved in toluene (0.7 mL). A solution of BrCN (42 mg, 0.40 mmol, 1.5 equiv.) in toluene (0.4 mL) was added dropwise. The resulting solution was heated at 110 °C for 4 h. After cooling, the solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}+0.05\%\text{HBr}$), yielding to **24** as an orange solid (38 mg, 0.13 mmol, 47%). Purity $\geq 98\%$; mp = 252–253 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 4.37 (s, 2H), 7.05 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.32–7.38 (m, 3H), 7.40–7.50 (m, 3H), 7.58 (s, 2H), 8.12 (s, 1H), 10.65 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 115.2, 116.4, 125.9, 128.3, 128.9, 129.0, 129.1, 134.2, 138.9, 140.1, 153.1; HRMS ($M+H^+$) 224.1171 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{H}^+$ 224.1182).

2-Nitro-4-phenylaniline (26). Following general method B and starting from 4-chloro-2-nitroaniline **25** (250 mg, 1.45 mmol) and phenylboronic acid (212 mg, 1.74 mmol), **26** was obtained as a red solid (288 mg, 1.35 mmol, 93%). Data are consistent with literature values [74]. mp = 124–126 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.12 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.34 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.43 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.65 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.7$ Hz), 8.37 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 119.3, 123.9, 126.3, 127.3, 128.9, 130.4, 134.5, 138.8, 143.7.

4-Phenylbenzene-1,2-diamine (27). In a one-neck round-bottom flask, **26** (200 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) and Sn (708 mg, 3.73 mmol, 2.63 equiv.) were dissolved in ethanol (4.0 mL). The reaction media was cooled at 0 °C and HCl 37% (2.8 mL, 36 equiv.) was added slowly. The resulting solution was heated at reflux for 1 h. After cooling, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite® and washed with ethanol. The filtrate was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in a saturated solution of NaHCO_3 . The aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, yielding to **27** as a white solid (139 mg, 0.75 mmol, 100%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm

5.88 (br s, 4H), 6.73 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.87 (dd, 1H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 7.00 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.23 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.37 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.49 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 114.9, 117.1, 117.9, 126.1, 126.5, 129.2, 131.3, 133.8, 134.0, 141.2.

6-phenyl-1H-benzo[d]imidazol-2-amine hydrobromide (28). **27** (80 mg, 0.43 mmol, 1 equiv.) was dissolved in toluene (1.1 mL). A solution of BrCN (69 mg, 0.65 mmol, 1.5 equiv.) in toluene (0.7 mL) was added dropwise. The resulting solution was heated at 110 °C for 4 h. After cooling, the solution was concentrated under vacuum and purified by reverse chromatography (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}+0.05\%\text{HBr}$), yielding to **28** as a white solid (79 mg, 0.27 mmol, 63%). Purity $\geq 98\%$; mp = 226–227 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm 7.37 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.43–7.52 (m, 4H), 7.58 (s, 1H), 7.63 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 8.50 (s, 2H), 12.47 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 109.9, 112.2, 122.6, 127.3, 127.8, 129.5, 129.7, 130.9, 136.2, 140.5, 151.3.

(4-Bromo-2-nitrophenyl)ethanol (30). Paraformaldehyde (114 mg, 3.80 mmol, 1.0 equiv.), 4-bromo-2-nitrotoluene **29** (2.00 g, 9.26 mmol, 2.44 equiv.) and Triton-B (114 μL , 40% in methanol) were dissolved in DMSO (2.0 mL). The resulting mixture was heated 2 h at 90 °C. After cooling, the reaction mixture was diluted with a saturated solution of NH_4Cl . The aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated and purified by silica gel column chromatography (heptane:EtOAc 1:1 to 1:2), yielding to **30** as a yellow solid (700 mg, 2.84 mmol, 75%). Data are consistent with literature values [75]. m.p. 75–76 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.15 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.96 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.69 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 35.8, 62.4, 120.5, 127.7, 132.8, 134.4, 136.1, 150.2.

(2-Nitro-4-phenylphenyl)ethanol (31). A microwave vial under argon was charged with **30** (246 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.), phenylboronic acid (134 mg, 1.10 mmol, 1.1 equiv.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4 mg, 0.02 mmol, 20 mol%), K_2CO_3 (345 mg, 2.50 mmol, 2.5 equiv.) and TBAB (322 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) in water (1.1 mL). The vial was capped properly, flushed with argon and heated to 70 °C for 3 h. After cooling, the reaction mixture was diluted with water and the aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 2:1), yielding to **31** a colorless oil (197 mg, 0.92 mmol, 92%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.22 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 7.42–7.54 (m, 4H), 7.61 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 7.78 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 8.17 (s, 1H).

(2-Amino-4-phenylphenyl)ethanol (32). In a hydrogenation flask, **31** (197 mg, 0.81 mmol, 1 equiv.) was dissolved in ethanol (10.0 mL) then argon was bubbled in through. Pd/C (25 mg, 10 mol%) was added and the reaction media was stirred at rt for 24 h under a dihydrogen pressure (70 psi). The reaction media was filtered through a pad of Celite® and washed with ethanol. The filtrate was concentrated, yielding to **32** as a white solid (171 mg, 0.80 mmol, 99%). mp = 99–100 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.84 (br s, 1H), 2.87 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.98 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.97 (bs, 2H), 6.97 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.35 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.44 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 145.4, 141.1, 140.8, 131.0, 128.6, 127.1, 126.9, 123.4, 118.1, 114.9, 63.1, 34.5.

[2-[2,3-Di(tert-butoxycarbonyl)guanidino]-4-phenylphenyl] ethanol (33). Following general method A and starting from **32** (171 mg, 0.80 mmol), **33** was obtained as a white solid (285 mg, 0.63 mmol, 78%). mp = 107–109 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.46 (s, 9H), 1.56 (s, 9H), 2.93 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.95 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz), 7.34–7.47 (m, 4H), 7.62 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.88 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 11.65 (s, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.0,

28.2, 34.4, 62.5, 125.2, 125.3, 127.1, 127.3, 128.7, 130.5, 132.5, 135.5, 140.1, 140.4, 154.9.

8-phenyl-4,5-dihydro-1H-benzo[d] [1,3]diazepin-2-amine Hydrochloride (34). **33** (285 mg, 0.63 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (10.0 mL), PPh₃ (328 mg, 1.25 mmol, 2 equiv.) and DIAD (243.0 μ L, 1.25 mmol, 2 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at rt for 3 h. The solution was concentrated under vacuum and purified by silica gel column chromatography (n-heptane:EtOAc 2:1). The intermediate was diluted in a solution of HCl (4.0N) in dioxane. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The solution was concentrated under vacuum, yielding to **34** as a white solid (72 mg, 0.26 mmol, 43%). Purity \geq 98%; mp = 236–237 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3.18 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.09 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.37–7.43 (m, 3H), 7.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.69 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 8.06 (br s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 27.5, 51.4, 113.5, 123.4, 126.5, 127.4, 128.1, 129.4, 133.1, 140.2, 140.6, 141.4, 154.6; HRMS (M+H⁺) 238.1336 (calcd for C₁₅H₁₅N₃H⁺ 238.1339).

5.2. Biological methods

5.2.1. In vitro anti-inflammatory activity

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation and culture PBMCs were prepared from the peripheral blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang) according to Kümmerle et al. [29] with modifications [76]. Briefly PBMCs were isolated using Histopaque gradient (Sigma), washed in Hanks' balanced salt solution (Sigma) and were then cultured in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (PAA), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (PAA). PBMCs were seeded into 24-well plates (5 \times 10⁵ cells/well) and stimulated with 5 μ g/mL LPS (Sigma), into a total volume of 1 mL per well. Compounds were re-suspended in DMSO and tested at different concentrations (Final DMSO concentration was adjusted to 1% maximum for each well). Cells without LPS stimulation were considered as bio-inactive control (basal level of cytokine). Cells incubation was realized at 37 °C (5% CO₂).

5.3. Characterization of cytokine secretion

Quantitative evaluation of TNF α and IL1 β secreted by PBMCs was achieved by ELISA using conditions as previously described [29] or HTRF technology (Cisbio bioassays) according to supplier recommendations as previously described [76].

Briefly, detection of TNF α and IL1 β was done on culture supernatant after 24 h. ELISAs were performed using antibodies from Antibody Solutions (Half Moon Bay, CA, USA); HTRF assays were performed using (Cisbio 62TNFPEC assay for TNF α and 62IL1PEB for IL1 β) according to supplier recommendations. Reading was performed after 2 h and 30 min of incubation with HTRF tools.

5.4. Cell viability assay

Cell viability was measured using the WST-1 (Ozyme) assay according to the manufacturer protocol and Houël et al. [76], after supernatant transfer for cytokine determination, WST-1-containing medium was added to cells and cell viability was determined by measuring absorbance at 450 nm using the Victor³ reader (PerkinElmer) after 2 h incubation at 37 °C.

Each measurement was performed in triplicate with three independent experiments. The results were expressed as means of three independent experiments.

5.4.1. In vivo assay on LPS-induced lung inflammation

Nine-week-old male C57BL/6 mice were purchased from Janvier

Laboratories. Animal experimentation was conducted with the ministerial approval through the Regional Ethics Committee for animal research at the Strasbourg University (APAFIS Authorization number 20150603112018276v2). Mice were treated by intraperitoneal (i.p.) injection (12 mL/kg) of the selected compounds or solvent, 1 h before and 10 h after LPS (lipopolysaccharide E.coli O55:B5, Sigma-Aldrich, L2880) or saline challenge by intranasal route (i.n., 25 μ L). LPS was used at the dose of 1 μ g/mouse. BAL was performed 24 h after LPS challenge as described [77]. Mice were anaesthetized i.p. (ketamine 150 mg/kg – xylazine 10 mg/kg). After semi-excision of the trachea, a plastic cannula was inserted, and airspace washed with 0.5 mL of 0.9% NaCl injected with a 1 mL syringe. This procedure was performed 10 times. The initial concentrated supernatant of the 2 first washes (volume = 2 \times 0.5 mL administered, -0.5 mL recovered) was collected for cytokine measurements. The remaining BAL fluid was centrifuged (300 g for 5 min, 4 °C), and cell pellets pooled. The cell pellet was suspended in 500 μ L of PBS-EDTA 3 mM. BAL cells were counted on a Muse[®] Cell Analyser (Millipore) and differential cell counts were assessed by flow cytometry (LSRII[®] cytometer, BD Bioscience). BAL cells were added with FcBlock (0.5 μ L, 553142, BD Bioscience) in a black microplate, incubated for 20 min at room temperature. Then, marker antibodies were added: CD11c-FITC (557400, BD bioscience), Gr-1-Pe-eFluor610 (61-5931-82, eBioscience), CD11b-APC-Cy7 (557657, BD bioscience), CD45-Alexa-Fluor700 (103128, BioLegend), CD3-BV605 (564009, BD bioscience), CD19-PE-Cy7 (552854, BD bioscience). Antibodies were incubated with BAL cells for 30 min at room temperature before DAPI (5 μ L, BD bioscience) addition, and flow cytometry was performed immediately. Live leukocytes were identified as CD45⁺DAPI⁻ cells then differentiated into T cells (CD11b^{low}CD19⁺CD3⁺), B cells (CD11b^{low}CD19⁺CD3⁻), eosinophils (CD11b⁺CD11c⁻GR1⁻), neutrophils (CD11b⁺CD11c⁺GR1⁺) and macrophages (CD11b⁺GR1⁻CD11c⁺).

5.5. Measurement of cytokines

TNF α ELISA was obtained from R&D systems and performed according to the manufacturer's instructions.

5.5.1. In vivo essay on a neuropathic pain model

Experiments were done using 35C57BL/6J male mice (Charles River, L'Arbresle, France), 8–10 weeks old at surgery time. They were housed 2 to 5 per cage, under a 12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*. The animal facilities (Chronobiotron UMS3415) are registered for animal experimentation (agreement #A67-2018-38) and protocols were approved by the institutional ethical committee (CREMEAS, CEEA35).

Neuropathic pain was induced by placing a cuff around the right sciatic nerve [54,55]. Surgeries were performed under intraperitoneal (i.p.) ketamine (68 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) anesthesia (Centravet, Tadden, France). The main branch of the right sciatic nerve was exposed and a PE-20 polyethylene cuff (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) of standard length (2 mm) was unilaterally inserted around it (Cuff group). The skin was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same procedure without implantation of the cuff (Sham group). Mice were allowed to recover from surgery for at 2–3 weeks before starting treatments.

Mechanical allodynia (hypersensitivity) was assessed using von Frey hairs. Mice were placed in Plexiglas boxes (7 cm \times 9 cm \times 7 cm) on an elevated mesh screen. The von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) were applied to the plantar surface of each hindpaw until they just bent, in a series of ascending forces up to the mechanical threshold. Filaments were tested five times per paw

and the paw withdrawal threshold (PWT) was defined as the lower of two consecutive filaments for which three or more withdrawals out of the five trials were observed [55,78]. Results were expressed in grams.

Treatments began 2–3 weeks after the surgery and lasted for 17 consecutive days. During the treatment, mice received two i.p. injections per day (morning and evening) of either 0.9% NaCl, nortriptyline hydrochloride (Sigma-Aldrich) (1 or 5 mg/kg, 5 mL/kg), **5b** (1 or 5 mg/kg, 5 mL/kg), or **12** (1 or 5 mg/kg, 5 mL/kg). The 4 mice treated with **5b** 5 mg/kg were discarded from the analyses due to adverse effects of the chronic treatment (see results). All drugs were prepared in 0.9% NaCl solution.

Data were expressed as mean \pm SEM, and statistical analyses were performed using STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). ANOVA for multiple comparisons and the Duncan test for posthoc analyses were used for time-course analyses.

Acknowledgements

We thank the Chronobiotron UMS3415 for animal housing and Valentin Bergmann for his assistance in behavioral experiments. This work was supported by SATT Connectus. We also thank CNRS (contract UPR3212) and University of Strasbourg for support. This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis. We are very grateful to Dr Lauren Rajakovich for her careful review and her suggestions for improving our manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.049>.

References

- [1] J. Becker, C. Delayre-Orthez, N. Frossard, F. Pons, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α expression during lung inflammation, *Pulm. Pharmacol. Therapeut.* 21 (2008) 324–330, <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.08.001>.
- [2] C. Delayre-Orthez, J. Becker, I. Guenon, V. Lagente, J. Auwerx, N. Frossard, F. Pons, PPAR α downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse, *Respir. Res.* 6 (2005) 91, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-91>.
- [3] C. Delayre-Orthez, F. De Blay, N. Frossard, F. Pons, Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse, *Clin. Exp. Allergy* 34 (2004) 1789–1795, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02082.x>.
- [4] J. Braun, J. Sieper, Role of novel biological therapies in psoriatic arthritis, *BioDrugs* 17 (2003) 187–199, <https://doi.org/10.2165/00063030-200317030-00005>.
- [5] B. Jarvis, D. Faulds, Etanercept, *Drugs* 57 (1999) 945–966, <https://doi.org/10.2165/00003495-199957060-00014>.
- [6] C. Richard-Miceli, M. Dougados, Tumour necrosis Factor- α blockers in rheumatoid Arthritis, *BioDrugs* 15 (2001) 251–259, <https://doi.org/10.2165/00063030-200115040-00005>.
- [7] H.E. Seymour, A. Worsley, J.M. Smith, S.H.L. Thomas, Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (2001) 201–208, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.00321.x>.
- [8] J. Harris, J. Keane, How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity, *Clin. Exp. Immunol.* 161 (2010) 1–9, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04146.x>.
- [9] C. Sommer, T. Lindenlaub, P. Teuteberg, M. Schäfers, T. Hartung, K.V. Toyka, Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy, *Brain Res.* 913 (2001) 86–89, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02743-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02743-3).
- [10] C. Sommer, M. Schäfers, M. Marziniak, K.V. Toyka, Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy, *J. Peripher. Nerv. Syst.* 6 (2001) 67–72.
- [11] K. Watanabe, S. Yabuki, M. Sekiguchi, S. Kikuchi, S. Konno, Etanercept attenuates pain-related behavior following compression of the dorsal root ganglion in the rat, *Eur. Spine J.* 20 (2011) 1877, <https://doi.org/10.1007/s00586-011-1854-y>.
- [12] Y. Bohren, L.-H. Tessier, S. Megat, H. Petitjean, S. Hugel, D. Daniel, M. Kremer, S. Fournel, L. Hein, R. Schlichter, M.-J. Freund-Mercier, I. Yalcin, M. Barrot, Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral β 2-adrenoceptor mediated anti-TNF α mechanism, *Neurobiol. Dis.* 60 (2013) 39–50, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.08.012>.
- [13] P.J. Austin, G. Moalem-Taylor, The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines, *J. Neuroimmunol.* 229 (2010) 26–50, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.013>.
- [14] N. Uceyler, J.P. Rogausch, K.V. Toyka, C. Sommer, Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies, *Neurology* 69 (2007) 42–49.
- [15] L. Leung, C.M. Cahill, Tnf-alpha and neuropathic pain - a review, *J. Neuroinflammation* 7 (2010).
- [16] M. Empl, S. Renaud, B. Erne, P. Fuhr, A. Straube, N. Schaeren-Wiemers, A.J. Steck, TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies, *Neurology* 56 (2001) 1371–1377, <https://doi.org/10.1212/WNL.56.10.1371>.
- [17] T. Lindenlaub, C. Sommer, Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies, *Acta Neuropathol.* 105 (2003) 593–602, <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0689-y>.
- [18] P. Andrade, G. Hoogland, O.P. Teernstra, J. van Aalst, E. van Maren, M.A. Daemen, V. Visser-Vandewalle, Elevated levels of tumor necrosis factor- α and TNFR1 in recurrent herniated lumbar discs correlate with chronicity of postoperative sciatic pain, *Spine J.* 16 (2016) 243–251, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2015.10.038>.
- [19] J. Xu, X. E. H. Liu, F. Li, Y. Cao, J. Tian, J. Yan, Tumor necrosis factor-alpha is a potential diagnostic biomarker for chronic neuropathic pain after spinal cord injury, *Neurosci. Lett.* 595 (2015) 30–34, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.004>.
- [20] M. Kremer, I. Yalcin, L. Nexon, X. Wurtz, R.A. Ceredig, D. Daniel, R.A. Hawkes, E. Salvat, M. Barrot, The antiallodynic action of pregabalin in neuropathic pain is independent from the opioid system, *Mol. Pain* 12 (2016) 1744806916633477, <https://doi.org/10.1177/1744806916633477>.
- [21] S. Majumder, S. Rama Chaitanya Sreedhara, S. Banerjee, S. Chatterjee, TNF α signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- α signaling under thalidomide, *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2012) 1456–1467, <https://doi.org/10.2174/156802612801784443>.
- [22] D. Brie, A. Sahabkar, P.E. Penson, M. Dinca, S. Ursoniu, M.-C. Serban, A. Zanchetti, G. Howard, A. Ahmed, W.S. Aronow, P. Muntner, G.Y.H. Lip, N.D. Wong, J. Rysz, M. Banach, Effects of pentoxifylline on inflammatory markers and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *J. Hypertens.* 34 (2016) 2318–2329, <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001086>.
- [23] D. Brustolin, R. Ribeiro-dos-Santos, R.E. Kast, E.L. Altschuler, M.B.P. Soares, A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice, *Int. Immunopharm.* 6 (2006) 903–907, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.12.007>.
- [24] B.B. Aggarwal, S.C. Gupta, B. Sung, Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers: curcumin as TNF blocker, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 1672–1692, <https://doi.org/10.1111/bph.12131>.
- [25] M.C. Marivet, J.J. Bourguignon, C. Lugnier, A. Mann, J.C. Stoclet, C.G. Wermuth, Inhibition of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate phosphodiesterase from vascular smooth muscle by rolipram analogs, *J. Med. Chem.* 32 (1989) 1450–1457, <https://doi.org/10.1021/jm00127a009>.
- [26] J.-J. Bourguignon, L. Desaubry, P. Rabaïsson, C.-G. Wermuth, C. Lugnier, 9-benzyladenines: potent and selective cAMP phosphodiesterase inhibitors, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1768–1770, <https://doi.org/10.1021/jm960827x>.
- [27] P. Rabaïsson, C. Lugnier, C. Müller, J.-M. Reimund, D. Schultz, G. Pinna, A. Le Bec, H. Basaran, L. Desaubry, F. Gaudiot, M. Seloum, J.-J. Bourguignon, Design, synthesis and structure-activity relationships of a series of 9-substituted adenine derivatives as selective phosphodiesterase type-4 inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 199–214, [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01446-0](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01446-0).
- [28] F.J. Bihel, H. Justiniano, M. Schmitt, M. Hellal, M.A. Ibrahim, C. Lugnier, J.-J. Bourguignon, New PDE4 inhibitors based on pharmacophoric similarity between papaverine and tofisopam, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 6567–6572, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.036>.
- [29] A.E. Kümmerle, M. Schmitt, S.V.S. Cardozo, C. Lugnier, P. Villa, A.B. Lopes, N.C. Romeiro, H. Justiniano, M.A. Martins, C.A.M. Fraga, J.-J. Bourguignon, E.J. Barreiro, Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation Of N-Acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7525–7545, <https://doi.org/10.1021/jm300514y>.
- [30] C.G. Barber, R.P. Dickinson, V.A. Horne, Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. part 1: 2-Pyridinylguanidines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 181–184, [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00701-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00701-6).
- [31] M. Dukat, A.A. Abdel-Rahman, A.M. Ismaiel, S. Ingher, M. Teitler, L. Gyermek, R.A. Glennon, Structure-activity relationships for the binding of arylpiperazines and arylbiguanides at 5-HT $_3$ serotonin receptors, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 4017–4026, <https://doi.org/10.1021/jm9603936>.
- [32] N. Vyas, C. Mollereau, G. Chevè, C.R. McCurdy, Structure-activity relationships of neuropeptide FF and related peptidic and non-peptidic derivatives, *Peptides* 27 (2006) 990–996, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.024>.
- [33] C.J. Aquino, J.M. Ramanjulu, D. Heyer, A.J. Daniels, F. Palazzo, M. DeZube, Synthesis and structure activity relationship of guanidines as NPY Y5 antagonists, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2691–2708, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.012>.
- [34] P. Honore, D. Donnelly-Roberts, M.T. Namovic, G. Hsieh, C.Z. Zhu, J.P. Mikusa,

- G. Hernandez, C. Zhong, D.M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A.P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J.P. Sullivan, C.R. Faltynek, M.F. Jarvis, A-740003 [N-(1-((Cyanomino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a Novel and Selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 319 (2006) 1376–1385, <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111559>.
- [35] N.L. Reddy, L.-Y. Hu, R.E. Cotter, J.B. Fischer, W.J. Wong, R.N. McBurney, E. Weber, D.L. Holmes, S.T. Wong, Synthesis and structure-activity studies of N,N'-diarylguanidine derivatives. N-(1-naphthyl)-N'-(3-ethylphenyl)-N-methylguanidine: a new, selective noncompetitive NMDA receptor antagonist, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 260–267, <https://doi.org/10.1021/jm00028a009>.
- [36] M. Honda, K. Uchida, M. Tanabe, H. Ono, Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallosteric effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors, *Neuropharmacology* 51 (2006) 866–872, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.05.031>.
- [37] J.-U. Peters, T. Lübbers, A. Alanine, S. Kolczewski, F. Blasco, L. Steward, Cyclic guanidines as dual 5-HT_{5A/5-HT7} receptor ligands: structure–activity relationship elucidation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 256–261, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.080>.
- [38] B. Kelly, M. McMullan, C. Muguruza, J.E. Ortega, J.J. Meana, L.F. Callado, I. Rozas, α_2 -adrenoceptor antagonists: synthesis, pharmacological evaluation, and molecular modeling investigation of pyridinoguanidine, pyridino-2-aminoimidazole and their derivatives, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 963–977, <https://doi.org/10.1021/jm501635e>.
- [39] F. Rodriguez, I. Rozas, J.E. Ortega, A.M. Erdozain, J.J. Meana, L.F. Callado, Guanidine and 2-aminoimidazole aromatic derivatives as α_2 -adrenoceptor antagonists. 2. exploring alkyl linkers for new antidepressants, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 3304–3312, <https://doi.org/10.1021/jm800026x>.
- [40] J. Lameh, F. Bertozzi, N. Kelly, P.M. Jacobi, D. Nguyen, A. Bajpai, G. Gaubert, K. Olsson, L.R. Gardell, Neuropeptide FF receptors have opposing modulatory effects on nociception, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 334 (2010) 244–254, <https://doi.org/10.1124/jpet.109.164384>.
- [41] Y. Sun, X. Zhang, N. He, T. Sun, Y. Zhuang, Q. Fang, K. Wang, R. Wang, Neuro-peptide FF activates ERK and NF kappa B signal pathways in differentiated SH-SY5Y cells, *Peptides* 38 (2012) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.019>.
- [42] Y. Wang, S. Wang, J. Ma, J. Guo, Q. Fang, T. Sun, Y. Zhuang, R. Wang, Neuro-peptide FF receptor antagonist, RF9, attenuates the fever induced by central injection of LPS in mice, *Peptides* 32 (2011) 702–706, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.12.001>.
- [43] B. Kest, J.S. Mogil, W.F. Sternberg, R.N. Pechnick, J.C. Liebeskind, 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG) differentially affects acute and tonic formalin pain: antagonism by rimcazole, *Pharmacol., Biochem. Behav.* 52 (1995) 175–178, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00085-B](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00085-B).
- [44] H. Yamanaka, K. Obata, T. Fukuoka, Y. Dai, K. Kobayashi, A. Tokunaga, K. Noguchi, Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury, *Neuroscience* 132 (2005) 183–191, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.003>.
- [45] K.L. Billingsley, K.W. Anderson, S.L. Buchwald, A highly active catalyst for suzuki–miyaura cross-coupling reactions of heteroaryl compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 3484–3488, <https://doi.org/10.1002/anie.200600493>.
- [46] J. Yang, S. Liu, J.-F. Zheng, J. (Steve) Zhou, Room-Temperature suzuki–miyaura coupling of heteroaryl chlorides and tosylates, *Eur. J. Org. Chem.* 2012 (2012) 6248–6259, <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200918>.
- [47] T. Mairal, J. Nieto, M. Pinto, M.R. Almeida, L. Gales, A. Ballesteros, J. Barluenga, J.J. Pérez, J.T. Vázquez, N.B. Centeno, M.J. Saraiva, A.M. Damas, A. Planas, G. Arsequell, G. Valencia, Iodine atoms: a new molecular feature for the design of potent transthyretin fibrillogenesis inhibitors, *PLoS One* 4 (2009) e4124, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004124>.
- [48] A.L. Smith, K.L. Andrews, H. Beckmann, S.F. Bellon, P.J. Beltran, S. Booker, H. Chen, Y.-A. Chung, N.D. D'Angelo, J. Dao, K.R. Dellamaggiore, P. Jaeckel, R. Kendall, K. Labitzke, A.M. Long, S. Materna-Reichert, P. Mitchell, M.H. Norman, D. Powers, M. Rose, P.L. Shaffer, M.M. Wu, J.R. Lipford, Discovery of 1H-Pyrazol-3(2H)-ones as potent and selective inhibitors of protein kinase r-like endoplasmic reticulum Kinase (PERK), *J. Med. Chem.* 58 (2015) 1426–1441, <https://doi.org/10.1021/jm5017494>.
- [49] S. Baskaran, E. Hanan, D. Byun, W. Shen, A facile reduction of 2-amino-pyrimidines with triethylsilane and trifluoroacetic acid, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 2107–2111, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.056>.
- [50] P.S. Charifson, A.-L. Grillot, T.H. Grossman, J.D. Parsons, M. Badia, S. Bellon, D.D. Deininger, J.E. Drumm, C.H. Gross, A. LeTiran, Y. Liao, N. Mani, D.P. Nicolau, E. Perola, S. Ronkin, D. Shannon, L.L. Swenson, Q. Tang, P.R. Tessier, S.-K. Tian, M. Trudeau, T. Wang, Y. Wei, H. Zhang, D. Stamos, Novel dual-targeting benzimidazole urea inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV possessing potent antibacterial activity: intelligent design and evolution through the judicious use of structure-guided design and structure–activity relationships, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 5243–5263, <https://doi.org/10.1021/jm800318d>.
- [51] T. Hendrickson, K.-K. Ho, M. Saunders, B. Stevens, K. Swierczek, K. Wright, Chemical Compounds. WO2013062945 (A1), 2013, https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20130502&DB=EPODOC&locale=en_EP&CC=WO&NR=2013062945A1&KC=A1&ND=4 (accessed September 21, 2016).
- [52] F. Ishikawa, Y. Watanabe, J. Saegusa, Cyclic guanidines. IX. synthesis of 2-amino-3, 4-dihydroquinazolines as blood platelet aggregation inhibitors, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 28 (1980) 1357–1364.
- [53] J.W. Janetka, Z. Han, S. Hultgren, J. Pinkner, C. Cusumano, Mannoside Compounds and Methods of Use Thereof. WO2012109263 (A1), 2012, https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20120816&DB=EPODOC&locale=en_EP&CC=WO&NR=2012109263A1&KC=A1&ND=4 (accessed September 23, 2016).
- [54] M. Benbouzid, V. Pallage, M. Rajalu, E. Waltisperger, S. Doridot, P. Poisbeau, M.J. Freund-Mercier, M. Barrot, Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain, *Eur. J. Pain* 12 (2008) 591–599, <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.10.002>.
- [55] I. Yalcin, E. Waltisperger, M. Barrot, S. Megat, F. Barthas, M. Kremer, E. Salvat, The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice, *J. Vis. Exp. JoVE* 89 (2014) e51608.
- [56] J.S. Mogil, S.E. Crager, What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112 (2004) 12–15.
- [57] M. Benbouzid, N. Choucair-Jaafar, I. Yalcin, E. Waltisperger, A. Muller, M.J. Freund-Mercier, M. Barrot, Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice, *Eur. J. Pain* 12 (2008) 1008–1017, <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.01.010>.
- [58] M. Kremer, E. Salvat, A. Muller, I. Yalcin, M. Barrot, Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: mechanistic insights, *Neuroscience* 338 (2016) 183–206, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.057>.
- [59] N.B. Finnerup, N. Attal, S. Haroutounian, E. McNicol, R. Baron, R.H. Dworkin, I. Gilron, M. Haanpää, P. Hansson, T.S. Jensen, P.R. Kamerman, K. Lund, A. Moore, S.N. Raja, A.S.C. Rice, M. Rowbotham, E. Sena, P. Siddall, B.H. Smith, M. Wallace, Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol.* 14 (2015) 162–173, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0).
- [60] M. Dukat, K. Alix, J. Worsham, S. Khatri, M.K. Schulte, 2-Amino-6-chloro-3,4-dihydroquinazoline: a novel 5-HT₃ receptor antagonist with antidepressant character, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5945–5948, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.072>.
- [61] M. McMullan, A. García-Bea, P. Miranda-Azpiuz, L.F. Callado, I. Rozas, Substituted conformationally restricted guanidine derivatives: probing the α_2 -adrenoceptors' binding pocket, *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 48–57, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.011>.
- [62] B. Kelly, D.H. O'Donovan, J. O'Brien, T. McCabe, F. Blanco, I. Rozas, Pyridin-2-yl guanidine derivatives: conformational control induced by intramolecular hydrogen-bonding interactions, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 9216–9227, <https://doi.org/10.1021/jo200954c>.
- [63] H.K. Kim, J.Y. Kwon, C. Yoo, S. Abdi, The analgesic effect of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, on chemotherapy-induced neuropathic pain in rats, *Anesth. Analg.* 121 (2015) 822–828, <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000853>.
- [64] J. Liu, X. Feng, M. Yu, W. Xie, X. Zhao, W. Li, R. Guan, J. Xu, Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain, *Neurosci. Lett.* 412 (2007) 268–272, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.022>.
- [65] J. Mika, M. Osikowicz, W. Makuch, B. Przewlocka, Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.* 560 (2007) 142–149, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.013>.
- [66] H.K. Kim, S.-H. Hwang, S.-O. Lee, S.H. Kim, S. Abdi, Pentoxifylline ameliorates mechanical hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced neuropathic pain, *Pain Physician* 19 (2016) E589–E600.
- [67] N. Maleki-Dizaji, T. Eteraf-Oskouei, A. Fakhri, S.H. Maljaie, A. Garjani, The effects of 5HT₃ receptor antagonist granisetron on inflammatory parameters and angiogenesis in the air-pouch model of inflammation, *Int. Immunopharm.* 10 (2010) 1010–1016, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.05.013>.
- [68] A. Goonan, A. Kahvedžić, F. Rodriguez, P.S. Nagle, T. McCabe, I. Rozas, A.M. Erdozain, J. Javier Meana, L.F. Callado, Novel synthesis and pharmacological evaluation as α_2 -adrenoceptor ligands of O-phenylisouronium salts, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8210–8217, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.033>.
- [69] D. Donnelly-Roberts, S. McGaraughty, C.-C. Shieh, P. Honore, M.F. Jarvis, Painful purinergic receptors, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 324 (2008) 409–415, <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105890>.
- [70] W.A. Carroll, D. Donnelly-Roberts, M.F. Jarvis, Selective P2X7 receptor antagonists for chronic inflammation and pain, *Purinergic Signal* 5 (2009) 63, <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9110-6>.
- [71] J. Maes, T.R.M. Rauws, B.U.W. Maes, Synthesis of C8 N9 annulated purines by iron-catalyzed C H amination, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 9137–9141, <https://doi.org/10.1002/chem.201301248>.
- [72] J. Cook, F.C. Zusi, I.M. McDonald, D. King, M.D. Hill, C. Iwuagwu, R.A. Mate, H. Fang, R. Zhao, B. Wang, J. Cutrone, B. Ma, Q. Gao, R.J. Knox, M. Matchett, L. Gallagher, M. Ferrante, D. Post-Munson, T. Molski, A. Easton, R. Miller, K. Jones, S. Digavalli, F. Healy, K. Lentz, Y. Benitex, W. Clarke, J. Natale, J.A. Siuciak, N. Lodge, R. Zaczek, R. Denton, D. Morgan, L.J. Bristow, J.E. Macor, R.E. Olson, Design and synthesis of a new series of 4-heteroarylmino-1'-azaspiro[oxazole-5,3'-bicyclo[2.2.2]octanes as α_7 nicotinic receptor agonists. 1. development of pharmacophore and early structure–activity relationship,

- J. Med. Chem. 59 (2016) 11171–11181, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01506>.
- [73] A.-L. Gérard, V. Lisowski, S. Rault, Direct synthesis of new arylanthranilic acids via a Suzuki cross-coupling reaction from iodoisatins, *Tetrahedron* 61 (2005) 6082–6087, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.04.022>.
- [74] T. Jiang, S.-Y. Chen, G.-Y. Zhang, R.-S. Zeng, J.-P. Zou, CoPc-catalyzed selective radical arylation of anilines with arylhydrazines for synthesis of 2-amino-biaryls, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 6922, <https://doi.org/10.1039/C4OB00798K>.
- [75] X.-G. Song, Y.-Y. Ren, S.-F. Zhu, Q.-L. Zhou, Enantioselective copper-catalyzed intramolecular N–H bond insertion: synthesis of chiral 2-carboxytetrahydroquinolines, *Adv. Synth. Catal.* 358 (2016) 2366–2370, <https://doi.org/10.1002/adsc.201600390>.
- [76] E. Houël, M. Fleury, G. Odonne, F. Nardella, G. Bourdy, C. Vonthron-Sénécheau, P. Villa, A. Obrecht, V. Eparvier, E. Deharo, D. Stien, Antiplasmodial and anti-inflammatory effects of an antimalarial remedy from the Wayana amerindians, French Guiana: Takamalimè (psidium acutangulum Mart. ex DC., Myrtaceae), *J. Ethnopharmacol.* 166 (2015) 279–285, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.015>.
- [77] F. Daubeuf, N. Frossard, Performing bronchoalveolar lavage in the mouse, *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2 (2012) 167–175.
- [78] M. Barrot, Tests and models of nociception and pain in rodents, *Neuroscience* 211 (2012) 39–50, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>.

