



HAL
open science

Implication du récepteur purinergique P2X4 microglial et neuronal dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires

Alexia Duveau

► **To cite this version:**

Alexia Duveau. Implication du récepteur purinergique P2X4 microglial et neuronal dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0095 . tel-03662230

HAL Id: tel-03662230

<https://theses.hal.science/tel-03662230v1>

Submitted on 9 May 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

Par Alexia DUVEAU

**IMPLICATION DU RÉCEPTEUR PURINERGIQUE P2X4
MICROGLIAL ET NEURONAL DANS LES DOULEURS
CHRONIQUES NEUROPATHIQUES ET INFLAMMATOIRES**

Sous la direction du Dr. Éric BOUÉ-GRABOT

Soutenue le 31 Mars 2022

Membres du jury :

Dr. Sandrine BERTRAND
Dr. Lauriane ULMANN
Dr. Éric LINGUEGLIA
Dr. Agnès NADJAR
Dr. David BLUM
Dr. Éric BOUE-GRABOT

Directrice Recherche CNRS, Bordeaux
Maître de conférence universitaire, Montpellier
Directeur de Recherche Inserm, Valbonne
Professeure Universitaire, Bordeaux
Directeur de Recherche Inserm, Lille
Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux

Présidente
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les Dr **Sandrine Bertrand**, **Agnès Nadjar**, **Lauriane Ulmann**, **Éric Lingueglia** et **David Blum** de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et ainsi d'évaluer mon travail.

Je tiens aussi à remercier **Erwan Bezard** et **Thomas Boraud** de m'avoir accueillie au sein de leur institut.

Je remercie également **Éric** pour m'avoir offert l'opportunité d'intégrer son équipe. Je te suis reconnaissante d'avoir pu mener ce projet avec toi. Cette expérience a été très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Cela a été un plaisir de travailler au sein d'une équipe aussi bienveillante, solidaire et toujours de bonne humeur.

En parlant d'équipe, je remercie également **Marc**, merci pour ce barbecue, même si je ne fais plus partie de l'équipe je suis toujours disponible pour les prochains ; **Karine**, toujours en manque de chocolat et **Monsieur Callas**.

Marie, l'une des dernières arrivées dans l'équipe. Je te remercie de m'avoir autant aidée dans cette dernière ligne droite. Tu es toujours de bonne humeur, très à cheval sur l'horaire du repas et pas très douée au blind test, mais t'es sympa quand même.

Thibault, ça fait 1 an maintenant que tu es arrivé dans l'équipe et ton arrivée a fait beaucoup de bien. Toi aussi tu m'as beaucoup aidée pendant cette fin de thèse (et oui ces super planches d'immunos viennent de lui !!). Gredin, tu ne dis jamais de gros mots, choqué à chacune de mes blagues, préfères manger du gratin que de boire un verre avec nous. Dommage que tu n'aies écrit que 99% du script par contre... Pas très doué.

Coline, ma 1ère stagiaire, tu as juste été parfaite. Même si au début tu étais un peu apeurée de me parler avant mon café, on a réussi à créer un lien particulier. Fais attention à ne pas croire tout ce qu'on te dit. Tu as néanmoins les salutations de Louison en direct de son monastère au Tibet.

Je remercie également tous les nouveaux venus dans l'équipe **Sandra**, **Sarah**, **Mehdi** et **Sara**. Je n'oublie pas non plus les anciens membres de l'équipe **Éléonore** et **Audrey**, ancienne maman de l'équipe qui nous manque beaucoup.

Sophie, la « Reine mère » de l'open space. Tu étais là bien avant moi et resteras longtemps après. C'est vrai qu'on était dans le même master mais j'ai vraiment appris à te découvrir pendant la thèse. Ton portrait restera veiller sur l'open space à jamais.

La Team Benazzouz ! et tout particulièrement Rabia et Pascal. Vous avez été d'excellents formateurs respectivement pour les chirurgies et l'électrophy. **Rabia**, en dehors du travail tu as su m'écouter et surtout me nourrir de basbousa, houmous et tajine et pour ça un grand merci. **Pascal**, je garderai en souvenir la peur dans tes yeux à chaque fois que je venais dans ton bureau pour te parler de l'électrophy et ta joie à chaque fois que je te disais avoir enregistré un neurone et cela m'encourageait de jour en jour. Je n'oublie pas **Hamid** et **François** qui ont été d'un réel soutien et d'une grande d'aide tout au long de cette écriture de thèse.

Franck, nos discussions interminables, nos brainstormings, nos balades nocturnes, tes danses sur Beyoncé ont été pour moi une bouffée d'air frais. A partir du moment où tu es monté d'un étage tu as été l'un de mes piliers et pour ça je te remercie 1000 fois. Même si tu as voulu me tuer plein de fois avec tes dosages de ti punch, heureusement que **Keri** était là pour rattraper le coup.

Louison, anciennement Landry, tu m'as lâchement abandonné ! Ton arrivée dans l'équipe m'a redonné un coup de boost. Même si on se connaissait avant, je pense qu'on a réappris à se découvrir dans un contexte différent. C'est vrai que fabriquer des paillasse à 22h ça soude !

Une autre team qui a été très importante pour moi c'est la Team Gériatrie. Même si vous n'êtes pas une équipe officielle de l'IMN je pense que vous êtes un réel atout pour cet institut. En particulier **Evelyne**, la pro des perfusions et de l'immuno et **Madame Thiolat**. Toujours de bonne humeur, vous avez su m'écouter et me redonner le sourire à de nombreuses reprises.

Margaux T, même si tu n'as accepté que très récemment de boire une bière avec moi à l'extérieur du labo tu as été d'un énorme soutien. Je pense que tu es l'une des premières personnes vers qui je me tourne pour me plaindre et même si c'est rare te dire quand ça ne va pas. Je n'abandonne pas l'espoir qu'un jour tu m'invites à Biarritz (coucou Marie !) et la colloc' au States.

Une grincheuse est suivie par une autre, même si tu ne m'as pas remerciée dans ta thèse je souhaite te remercier avec l'ensemble du laboratoire... Blague à part, **ML**, je sais que je pouvais venir te voir que ça soit pour des manips ou pour grincer avec toi. Même si certains en doute tu es quelqu'un de très gentille et juste.

A tous les autres que je n'ai pas encore citer, **Jeremy, Léa, Margaux L, Anaëlle, Morgui, Zoé** et toute la Team PIV, en particulier **Guillaume, Méline, Romain** et **Matthieu**.

J'aimerais également remercier tous ceux de l'autre côté de la passerelle, les Magendiens ! Il est vrai que je ne suis pas restée longtemps à Magendie mais l'expérience fut très agréable et très enrichissante. Je remercie les équipes Marsicano et Cota qui m'ont accueilli pour mes stages de M1 et M2. Tout particulièrement j'aimerais remercier **Zhe**, la **Marj**, merci pour les dislocations, **Ashley**, la meilleure thésarde qu'on puisse rêver en master (le serpent qui mange l'éléphant je n'oublie pas), **Omar**, l'autre moitié de cette super team mexicaine et **Vincent**, Mr Simon, et oui la reine des stagiaires a évolué en reine des docteurs (merci pour les anticorps !).

A tous mes amis rencontrés à Bordeaux qui m'ont soutenu pendant ces 3 ans et demi. **Noémie**, merci pour ton mec, tes banana breads et pour m'avoir nourri pendant cette écriture. **Valentine**, la plus merveilleuse des correctrices, toujours disponible pour boire une bière. **Claire**, t'inquiètes bientôt on ouvre notre parc immobilier et un karaoké. **Léo**, merci pour cette journée à la cité du vin incroyable et vive Versailles ! **Tom**, mon coach love préférer, **Pierre M** et **Pierre F**.

A vous, on se connaît depuis presque que 20 ans pour certaines. **Margaux**, tu me connais comme si tu m'avais faite. Tu es le K de mon G. **Yoy**, la pro de la miche et des soirées zouk bébé ! **Majo**, la plus tarée des boliviennes. **Alice**, Céline t'embrasse. **Natosh**, bientôt une star de la chanson si ce n'est déjà le cas (allez tous écouter Resilience de Taos !!!). **Juju**, on se refait un 18ème bar bientôt. Et pour finir **Jérémie**, chouquette, on embrasse tous Greg.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille qui m'a toujours soutenue, tirée vers le haut et appris à toujours donner le meilleur de moi-même. Et oui maintenant vous avez 2 docteurs à la maison !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES FIGURES.....	8
RÉSUMÉ	12
ABSTRACT	14
PUBLICATIONS ET POSTERS.....	16
ABBREVIATIONS.....	18
INTRODUCTION.....	23
I. LE SYSTEME PURINERGIQUE	24
A. Généralités	25
B. Les récepteurs P2X.....	26
1) <i>Structure</i>	27
2) <i>Ouverture du pore et désensibilisation des récepteurs</i>	30
3) <i>Pharmacologie des récepteurs P2X</i>	32
4) <i>Formation homomérique et hétéromérique</i>	35
5) <i>Localisation et trafic</i>	36
6) <i>Expression et fonction</i>	37
C. P2X4.....	41
1) <i>Trafic et localisation subcellulaire</i>	41
2) <i>Expression et rôle</i>	43
3) <i>Pharmacologie</i>	46
4) <i>Pathologies du SNC associées à P2X4</i>	47
II. LE SYSTÈME SENSORIEL.....	59
A. La nociception	59
B. Détection de l'information nociceptive	59
C. Transmission de l'information par les fibres afférentes primaires	61

D.	Projection centrale de l'information.....	64
1)	<i>Organisation anatomique et laminaire de la moelle épinière</i>	64
2)	<i>Les neurones de projection</i>	66
3)	<i>Les interneurones</i>	67
E.	Transmission supra-spinale.....	70
F.	Douleur aigüe ou douleur physiologique.....	71
G.	La douleur chronique	75
1)	<i>La douleur inflammatoire</i>	78
2)	<i>La douleur neuropathique</i>	79
III.	DOULEUR ET P2X4	81
A.	P2X4 et douleur neuropathique	81
1)	<i>Première découverte et rôle clé de la microglie</i>	81
2)	<i>Mécanismes</i>	82
3)	<i>Implication de P2X4 dans la périphérie</i>	90
4)	<i>Dimorphisme sexuel</i>	91
B.	P2X4 et douleur inflammatoire.....	95
1)	<i>Rôle dans la sensibilisation périphérique</i>	96
2)	<i>Rôle dans la sensibilisation centrale</i>	97
3)	<i>Dimorphisme sexuel</i>	99
	<u>OBJECTIFS DE LA THÈSE</u>	101
	<u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	103
	ÉTHIQUE	105
	ANIMAUX.....	105
	P2X4mCherryIN Flox.....	106
	P2X4 KI	108
	Cd11b-Cre P2X4 KI	109
	Synapsin-Cre P2X4 KI	110
	P2X4 KO	111
	CX3CR1-Cre P2X4 KO	111

TESTS COMPORTEMENTAUX.....	112
Test de von Frey	112
Test plantaire	113
NEUROPATHIE PAR LÉSION PARTIELLE DU NERF SCIATIQUE	114
INFLAMMATION CHRONIQUE PAR INJECTION DE CFA.....	116
PHARMACOLOGIE	117
ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES <i>IN VIVO</i>	118
RÉCUPÉRATION ET PRÉPARATION DES TISSUS.....	120
IMMUNOHISTOCHIMIE (IHC)	121
Marquage et quantification microgliale.....	121
Co-marquage Iba1 et P2X4.....	121
Co-marquage P2X3 et P2X4.....	122
ANALYSES STATISTIQUES.....	123
<u>RÉSULTATS.....</u>	125
PARTIE 1 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION BASALE.....	127
PARTIE 2 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA DOULEUR NEUROPATHIQUE	137
PARTIE 3 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 NEURONAL ET GLIAL DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION BASALE	157
PARTIE 4 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 NEURONAL ET GLIAL DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION NEUROPATHIQUE	165
PARTIE 5 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE	173
<u>DISCUSSION</u>	187
I. L' AUGMENTATION DE P2X4 A LA SURFACE DES MICROGLIES ET/OU DES MACROPHAGES INDUIT UNE HYPERSENSIBILITE MECANIQUE ET THERMIQUE, EN CONDITION BASALE.....	189

II. P2X4 A LA SURFACE DES MICROGLIES ET/OU DES MACROPHAGES EST NECESSAIRE POUR INDUIRE UNE HYPERALGESIE EN CONDITION NEUROPATHIQUE	191
III. L'HYPEREXCITABILITE DES NEURONES WDR EST MODULEE DE MANIERE P2X4- DEPENDANTE, EN CONDITION BASALE.....	192
IV. LA NEUROPATHIE INDUIT UNE HYPEREXCITABILITE P2X4-DEPENDANTE DES NEURONES WDR, UNIQUEMENT CHEZ LES MALES.....	195
V. P2X4 EST NECESSAIRE ET SUFFISANT AU DEVELOPPEMENT DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE 196	
<u>ARTICLES ASSOCIÉS</u>	200
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	202

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Les différents récepteurs purinergiques.....	25
Figure 2: Structure des récepteurs P2X.....	28
Figure 3: Cinétique d'activation et de désensibilisation des récepteurs P2X.....	31
Figure 4: Localisation et fonction des récepteurs P2X.....	40
Figure 5: Internalisation constitutive de P2X4	42
Figure 6: Différences d'expression de P2X4 dans le SNC en condition physiologique et pathologique	48
Figure 7: Implication de P2X4 dans différentes pathologies	57
Figure 8: Détection du stimulus sensoriel.....	60
Figure 9: Caractérisation des fibres afférentes primaires.....	62
Figure 10: Représentation schématique d'une coupe transversale de moelle épinière.....	65
Figure 11: Projections centrales des fibres afférentes primaires	66
Figure 12: Les voies supra-spinales ascendantes nociceptives.....	71
Figure 13: Sensibilisation inflammatoire périphérique.....	73
Figure 14: La théorie du portillon.....	75
Figure 15: Caractérisation de la douleur	77
Figure 16: Libération P2X4-dépendante de BDNF par la microglie en condition neuropathique	83
Figure 17: Implication du récepteur P2X4 microglial en condition normale et neuropathique	85
Figure 18: Facteurs régulant la transcription et le trafic en surface de P2X4 en condition neuropathique.....	86
Figure 19: Douleur neuropathique et dimorphisme sexuel.....	94
Figure 20: Implication du récepteur P2X4 au niveau des macrophages dans la douleur inflammatoire.....	96
Figure 21: Représentation schématique de la modification génétique chez les souris P2X4mCherryIN Flox (P2X4 WT).....	106
Figure 22: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris P2X4 KI. ..	108

Figure 23: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI.....	109
Figure 24: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI.....	110
Figure 25: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris P2X4 KO..	111
Figure 26: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO.....	111
Figure 27: Test de von Frey.....	113
Figure 28: Test plantaire.....	113
Figure 29: Établissement du modèle neuropathique.....	115
Figure 30: Établissement du modèle inflammatoire.....	116
Figure 31: Protocole d'enregistrements extracellulaires in vivo des neurones WDR.....	119
Figure 32: Diminution des seuils mécaniques et thermiques chez les souris P2X4 KI mâles et femelles.....	128
Figure 33: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre mâles et femelles..	129
Figure 34: Effet analgésique du 5-BDBD chez les souris P2X4 KI.....	130
Figure 35: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris P2X4 KI.....	133
Figure 36: Pas de modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones WDR entre les mâles et les femelles.....	135
Figure 37: Suppression de la diminution des seuils mécaniques et thermiques en condition neuropathique chez les souris P2X4 KO.....	139
Figure 38: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre mâles et femelles en condition neuropathique.....	140
Figure 39: Effet analgésique du 5BDBD chez les souris P2X4 KI SNI.....	141
Figure 40: : Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR uniquement chez les mâles en condition neuropathique.....	144
Figure 41: Diminution de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris P2X4 KI mâles en condition neuropathique.....	147
Figure 42: Augmentation de l'excitabilité et de la sensibilisation des neurones WDR chez les souris femelles P2X4 KI.....	148
Figure 43: La neuropathie induit une activation et une prolifération microgliale.....	151

Figure 44: P2X4 exprimé dans les microglies de la CDME chez les souris P2X4 WT mâles et femelles.	154
Figure 45: Diminution des seuils mécaniques et thermiques chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI mâles et femelles.	158
Figure 46: Seuils mécanique et thermique identiques chez les souris mâles et les femelles Cd11b-Cre et Synapsin-Cre P2X4 KI.	159
Figure 47: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles.....	161
Figure 48: Pas de différences d'excitabilité et de sensibilisation neuronale entre les mâles et les femelles.....	163
Figure 49: Hyperalgésie mécanique et thermique chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI et Syn-Cre P2X4 KI en condition neuropathique.....	166
Figure 50: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition neuropathique.....	167
Figure 51: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles neuropathique.	169
Figure 52: Pas de différence d'excitabilité et de sensibilisation neuronale entre les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles et femelles neuropathiques.....	171
Figure 53: Table récapitulative des précédents résultats.....	172
Figure 54: Suppression de la diminution des seuils mécaniques et thermiques en condition inflammatoire chez les souris P2X4 KO.....	175
Figure 55: Pas de différences de sensibilités mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition inflammatoire.....	176
Figure 56: Hyperalgésie mécanique et thermique chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI et Syn-Cre P2X4 KI en condition inflammatoire.	177
Figure 57: Pas de différences de sensibilités mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition inflammatoire.....	178
Figure 58: L'inflammation chronique n'induit pas d'activation et de prolifération microgliale.	180
Figure 59: L'inflammation n'augmente pas l'expression de P2X4 dans les microglies.	183
Figure 60: L'Inflammation augmente l'expression de P2X4 dans les DRG.	185

RÉSUMÉ

Les récepteurs P2X sont des récepteurs canaux cationiques non sélectifs ATP-dépendants hautement perméables au calcium et fortement exprimés dans de nombreux tissus. Dans le système nerveux central, P2X4 est le récepteur P2X le plus répandu et est impliqué dans divers états pathologiques, tels que la sclérose latérale amyotrophique, l'ischémie ou la douleur chronique. En conditions physiologiques, il a la particularité d'être constitutivement internalisé et de ce fait, se retrouve majoritairement dans des compartiments intracellulaires assurant sa faible expression à la surface des cellules. D'autre part, en conditions pathologiques, P2X4 est surexprimé à la surface cellulaire, soit dans les neurones et/ou les cellules gliales. Cela suggère que les récepteurs P2X4 neuronaux et gliaux peuvent contribuer à des mécanismes distincts des différentes pathologies dans lesquelles il est impliqué. P2X4 joue un rôle clé dans la transduction sensorielle physiologique et pathologique. Il a été démontré que des altérations de la signalisation purinergique sont impliquées dans les syndromes de douleur chronique avec un rôle central pour les récepteurs P2X4 microgliaux dans les modèles de douleur neuropathique. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de P2X4 dans la microglie de la corne dorsale de la moelle épinière. De plus, les souris neuropathiques déplétées en P2X4 (P2X4 KO) ne présentent pas d'augmentation de leur sensibilité mécanique par rapport aux souris neuropathiques contrôles. Néanmoins, lors de douleurs inflammatoires chroniques, les récepteurs P2X4 microgliaux ne semblent pas être impliqué dans la transduction de la douleur. L'expression de P2X4 a également été rapportée dans les neurones sensoriels et les cellules gliales satellites des ganglions de la racine dorsale (DRG) au cours de conditions d'inflammation chronique et de neuropathie, qui pourraient donc contribuer à ces deux types de douleur. Par conséquent, l'implication neuronale vs gliale de P2X4 dans les douleurs neuropathique et inflammatoire reste à être élucidée ainsi que les différences observées entre mâles et femelles dans plusieurs modèles de douleur. Dans ce contexte, nous avons développé et utilisé un nouveau modèle de souris transgénique dans lequel P2X4 est augmenté au niveau de la surface cellulaire soit dans toutes les cellules exprimant nativement P2X4 (P2X4 KI) soit dans des populations cellulaires spécifiques : dans les neurones (Synapsin-Cre P2X4 KI) ou dans les cellules myéloïdes (CD11b-Cre P2X4 KI). Tout d'abord, nous avons montré qu'une augmentation de P2X4 à la surface des cellules myéloïdes, chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI est suffisante pour augmenter les sensibilités mécaniques

et thermiques à l'état basal, à la fois chez le mâle et la femelle. Cette hyperalgésie est également en adéquation avec une hausse de la transmission nociceptive enregistrée *in vivo* dans les neurones de projection de la corne dorsale de la moelle épinière des lignées de souris transgéniques correspondantes. Nous avons ensuite montré que le récepteur P2X4 microglial était nécessaire au développement et au maintien de la douleur neuropathique chronique après une lésion nerveuse partielle du nerf sciatique (SNI). Concernant la douleur inflammatoire induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA) dans la patte arrière chez les différentes souris transgéniques, nos résultats ont indiqué que le P2X4 présent à la surface des macrophages mais pas des neurones et des microglies contribue à son développement mais n'a aucun effet dans le maintien de la douleur inflammatoire.

En conclusion, le développement de ces nouveaux modèles de souris transgéniques spécifiques à certaines cellules et la combinaison d'approches comportementales, électrophysiologiques et histologiques nous ont permis de mieux comprendre le rôle des récepteurs P2X4 dans la douleur neuropathique et inflammatoire, tant chez les mâles que chez les femelles.

Mots clés : douleur, purinergique, neuropathie, inflammation, microglie, macrophages

ABSTRACT

P2X receptors are ATP-gated non-selective cation channels highly permeable to calcium and highly expressed in many tissues. In the central nervous system (CNS), P2X4 is the most widespread P2X receptor and is involved in various pathological states, such as amyotrophic lateral sclerosis, ischemia or chronic pain. It has the particularity to be constitutively internalized and as a result, are found predominantly in intracellular compartments ensuring its low surface expression, in physiological conditions. On the other hand, in pathological condition, P2X4 is overexpressed at the cell-surface, either in neurons and/or glial cells. This is suggesting that neuronal and glial P2X4 receptors may contribute to distinct mechanisms of pathogenesis. P2X4 is playing a key role in the physiological and pathological sensory transduction. Alterations of the purinergic signaling have been shown to be involved in chronic pain syndromes with a pivotal role for microglial P2X4 receptors in neuropathic pain models. Indeed, P2X4 was observed to be increased in the microglia of the dorsal horn of the spinal cord. On the other hand, neuropathic P2X4-depleted mice (P2X4 KO) do not present an increase of their mechanical sensitivity as compared to neuropathic control mice. Unlikely, during inflammatory chronic pain, microglial P2X4 does not seem to be implicated in the pain transduction instead of neuronal P2X4. P2X4 expression was also reported in dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons during neuropathic and chronic inflammatory conditions as well as in satellite glial cells that may contribute to both types of pain. Therefore, the neuronal vs. glial implication of P2X4 in neuropathic and inflammatory pain still needs to be unraveled and especially its role at the cell-surface level, as well as sexual dimorphism. In this context, we developed and used novel transgenic mice model in which P2X4 is increased at the cell surface level either in all cells expressing natively P2X4 (P2X4 KI) or in specific cell populations: in neurons (Synapsin-Cre P2X4 KI) or in myeloid cells (CD11b-Cre P2X4 KI mice). First, we showed that higher surface of myeloid P2X4, in Cd11b-Cre P2X4 KI mice, is sufficient to increase mechanical and thermal sensitivities in basal state, in both male and female. This hyperalgesia is also in adequation with a functional increase of the nociceptive transmission recorded *in vivo* in the dorsal horn projection neurons of the spinal cord of the corresponding transgenic mouse lines. We then showed that microglial P2X4 was necessary for the development and the maintenance of the chronic neuropathic pain after spared nerve injury (SNI). Regarding inflammatory pain induced by Complete Freund Adjuvant (CFA) in the hind

paw in the different transgenic mice, our results indicated that macrophages P2X4 but not neuronal and microglial P2X4 contribute to its development but have no effect in the maintenance of the inflammatory pain.

In conclusion, the development of these novel cell-specific transgenic mouse models and the combination of behavioral, electrophysiological and histological approaches allowed us to unravel the complex implication of P2X4 in neuropathic and inflammatory pain, in both male and female.

Keywords : pain, purinergic, neuropathy, inflammation, microglia, macrophages

PUBLICATIONS ET POSTERS

Articles publiés :

Duveau, A., Bertin, E., & Boue-Grabot, E. Implication of Neuronal Versus Microglial P2X4 Receptors in Central Nervous System Disorders. *Neurosci Bull.* (2020) doi:10.1007/s12264-020-00570-y

Abboud C., **Duveau A.**, Bouali-Benazzouz R., Massé K., Mattar J., Brochoire L., Fossat P., Boué-Grabot E., Hleihel W., Landry M. Animal models of pain: diversity and benefits. *Journal of Neuroscience methods* (2021) doi: 0.1016/j.jneumeth.2020.108997

Posters :

Unravelling cell-specific role of P2X4 in neuropathic pain using P2X4 internalization-defective knock-in mice. **Duveau, A.**, Martinez, A., Riffault C., Landry M., Fossat P., Boué-Grabot E., Neurofrance 2021, Virtual meeting, May 2021.

Unravelling cell-specific role of P2X4 in neuropathic pain using P2X4 internalization-defective knock-in mice. **Duveau, A.**, Martinez, A., Riffault C., Landry M., Fossat P., Boué-Grabot E., Neurocampus Day 2021, Bordeaux, September 2021.

ABBREVIATIONS

5-BDBD	5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzofuro[3,2- <i>e</i>]-1,4-diazepin-2-one
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP2	Protéine adaptatrice 2
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASIC	Récepteur canal sensible à l'acide
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
C-term	Partie C-terminale d'une sous-unité des récepteurs P2X
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CD	Corne dorsale
CGRP	Peptide lié au gène de la calcitonine
CIDN	Contrôle inhibiteur diffus
CPSE	Courant post-synaptique excitateur
CSF1	Colony stimulating factor 1
CSF1R	Récepteur du colony stimulating factor 1
CWU	Coefficient de wind up
DRG	Ganglion de la racine dorsale
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
E_{anion}	Potentiel d'inversion des anions
GAD65	Acide glutamique décarboxylase 65
GAT	Transporteur du GABA
GDNF	Facteur neurotrophique dérivé des cellules
GlyRα3	Récepteur glycinergique α 3
IASP	Association internationale pour l'étude de la douleur
IHC	Immunohistochimie
IR	Intensité-réponse
IRF5	interferon regulatory factor 5
IRF8	interferon regulatory factor 8

IVM	Ivermectine
KCC2	Co-transporteur potassique et chlorure
KI	Knock-in
KO	Knock-out
LNP	Lésion de nerf périphérique
LTMR	Mécanorécepteur à bas seuil
MA	Maladie d'Alzheimer
MAFB	V-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue B
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
ME	Moelle épinière
MN	Motoneurones
MP	Maladie de Parkinson
N-term	Partie N-terminale d'une sous-unité des récepteurs P2X
NGF	Facteur de croissance nerveuse
NGS	Sérum naturel de chèvre
NK1	Récepteur de la neurokinine 1
NTG	Nitroglycérine
PA	Potentiel d'action
PAG	Substance grise périaqueducule
PCT	Plasticité à court terme
PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	Prostaglandine E2
PIEZO	Piezo-type mechanosensitive ion channel
PIPn	Phosphoinositides
PIV	Pôle <i>in vivo</i>
PLT	Potentialisation à long terme
PNI	Lésion de nerf périphérique
SB	Substance blanche
SG	Substance grise
SGC	Cellules gliales satellites
SEP	Sclérose en plaque
SLA	Sclérose latérale amyotrophique

SNC	Système nerveux central
SNL	Ligature de nerf sciatique
SNP	Système nerveux périphérique
SOPF	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques et opportunistes
TM1	Sous-unité transmembranaire 1 d'une sous-unité des récepteurs P2X
TM2	Sous-unité transmembranaire 2 d'une sous-unité des récepteurs P2X
TNC	Noyau caudé trigéminal
TrkA	Récepteur tyrosine kinase A
TrkB	Récepteur tropomyosine kinase B
TrkB-Fc	Agent séquestrant de BDNF
TRP	Récepteur canal à potentiel transitoire
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
VNUT	Transporteurs vésiculaires de nucléotides
VPL	Noyau ventro-postéro-latéral du thalamus
VPM	Noyau ventro-postéro-médian du thalamus
WDR	Wide dynamic range
zP2X4	Récepteur P2X4 de poisson zèbre

INTRODUCTION

I. LE SYSTEME PURINERGIQUE

A. Généralités

Initialement découverte en 1929 comme étant la principale source d'énergie des cellules (Fiske and Subbarow, 1929; Radford et al., 1997), l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est maintenant reconnue comme étant une molécule importante dans la communication et la signalisation entre différentes cellules dans tout l'organisme, et en particulier dans le système nerveux périphérique (SNP), et le système nerveux central (SNC) (North, 2016). La première évidence remonte à la fin des années 50, où il a été montré pour la première fois que des nerfs sensoriels étaient capable de libérer de l'ATP (Holton, 1959). Mais ce n'est qu'en 1972 que Geoffrey Burnstock, grâce à son travail sur la transmission non adrénergique et non cholinergique, proposera le concept de neurotransmission purinergique, attribuant alors à l'ATP un rôle de neurotransmetteur rapide (Burnstock, 1972). Cette hypothèse sera validée par la suite en démontrant que l'ATP pouvait être colibérée avec d'autres neurotransmetteurs tels que le GABA (Jo and Schlichter, 1999) ou le glutamate (Mori et al., 2001) et ce dans le SNP et le SNC. Quelques années plus tard, Burnstock proposera l'existence de 2 principales familles de récepteurs pouvant être activés soit par des métabolites de dégradation de l'ATP tels que l'adénosine (récepteur P1), soit par l'ATP en elle-même (récepteur P2) (Burnstock, 1978) (Figure 1).

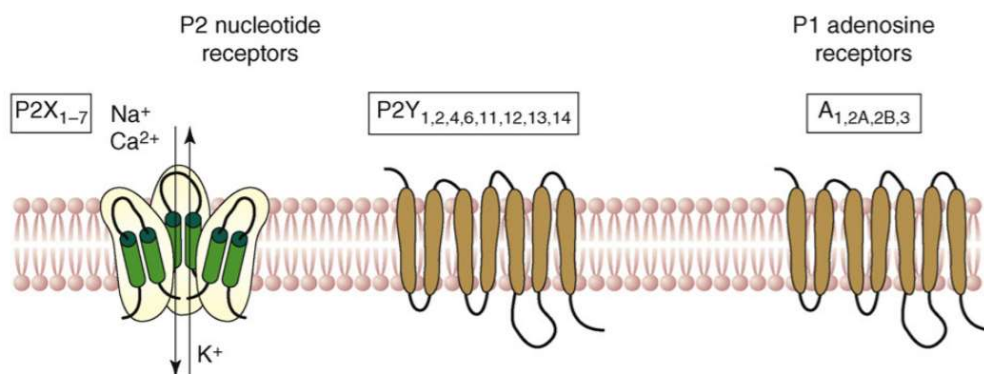


Figure 1: Les différents récepteurs purinergiques

Les récepteurs P1 sont des récepteurs métabotropiques activés par l'adénosine. Les récepteurs P2 sont activés par l'ATP et se divisent en deux familles : les récepteurs P2Y qui sont des récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs P2X qui sont des canaux ioniques (d'après Abbracchio et al. 2009).

Les récepteurs P1, également nommés récepteurs adénosine par la suite (van Calker et al., 1979), se divisent en 4 sous-types : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃. Parmi eux, les A₁ et A_{2A} sont les sous-types les plus abondants du SNC (Fredholm et al., 2005) et sont exprimés à la fois par les neurones et les cellules gliales. Ce sont des récepteurs métabotropiques à 7 domaines transmembranaires, couplés à des protéines G, respectivement G_i (inhibitrice) et G_s (activatrice) et sont localisés principalement au niveau des synapses, aussi bien en pré- qu'en post-synaptique. Ils sont présents dans les neurones glutamatergiques mais aussi GABAergiques, cholinergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques (Cunha, 2016). Ils participent notamment à la régulation de la transmission synaptique excitatrice (Dunwiddie and Masino, 2001) et à la communication neurone/glie (Dare et al., 2007; Fellin et al., 2006). Ils sont également impliqués dans de nombreuses pathologies telles que l'ischémie, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, la dépression ou encore l'épilepsie (Liu et al., 2019).

Les récepteurs P2 qui sont activés par l'ATP ont eux aussi révélé pouvoir avoir des effets cellulaires différents (Shuba and Vladimirova, 1980; Su, 1981), ce qui a mené à leur subdivision en 2 classes : les récepteurs P2Y et P2X (Burnstock and Kennedy, 1985).

Les P2Y sont des récepteurs métabotropiques, à 7 domaines transmembranaires, couplés à une protéine G et sont largement exprimés dans le SNC aussi bien au niveau des neurones que dans les cellules gliales. Ils sont composés de 8 sous-types : P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2003). Ces sous-types sont couplés à différentes protéines G, telles qu'une G_q pour les P2Y_{1, 2, 4, 6}, et une G_i pour P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄. P2Y₁₁ est quant à lui capable de se coupler à une protéine G_q mais aussi G_s (Ralevic, 2021). Cette hétérogénéité lui confère de nombreux rôles au sein du SNC et notamment dans la neurotransmission, la neurogénèse ou encore la communication intercellulaire (Fields and Burnstock, 2006; Gerevich and Illes, 2004; Zimmermann, 2006). Différentes études ont également révélé leur implication dans différentes pathologies comme l'ischémie, la maladie d'Alzheimer, les troubles du sommeil ou la douleur neuropathique (Guzman and Gerevich, 2016).

B. Les récepteurs P2X

La deuxième grande famille de récepteurs purinergiques P2 sont les P2X. Elle est composée de 7 récepteurs-canaux cationiques non sélectifs qui une fois activés par l'ATP vont entraîner un flux entrant de cations calciques et sodiques et un flux sortant de cations potassiques (North, 2002). L'expansion de la technique d'isolation de l'ADN complémentaire (ADNc) des ARN messagers (ARNm) codant les récepteurs-canaux, dans les années 80 a permis d'identifier et de cloner, en 1994, le premier ADNc appartenant à la famille des récepteurs P2X, celui de P2X1 provenant de cellules musculaires lisses (Valera et al., 1994), qui fut rapidement suivi de P2X2 (Brake et al., 1994). Les 5 autres sous-unités de récepteurs P2X ont ensuite été identifiées, par homologie de séquence et PCR, la classification se terminant par la caractérisation de P2X7, à la fin des années 90 (Surprenant et al., 1996).

1) Structure

En alliant des études biophysiques et des études de mutagenèse, la caractérisation des différentes sous-unités P2X a ensuite permis d'émettre les premières hypothèses concernant leur structure générale. Une sous-unité serait alors composée d'une partie extracellulaire, de 2 domaines transmembranaires (TM1 et TM2) et de 2 parties intracellulaires N-terminale et C-terminale. Il a ensuite été proposé que les récepteurs P2X étaient formés de 3 sous-unités formant alors un trimère fonctionnel (Nicke et al., 1998), ce qui a été confirmé quelques années plus tard (Barrera et al., 2005; Mio et al., 2005). Ce n'est qu'en 2009 que l'architecture globale et la stœchiométrie des récepteurs P2X fut confirmée et approfondie. En effet, l'établissement de la structure cristallisée d'un récepteur P2X4 tronqué de poisson zèbre (zP2X4), dans un premier temps dans son état fermé en absence d'ATP (Kawate et al., 2009), puis dans son état ouvert, en présence d'ATP (Hattori and Gouaux, 2012), a permis de préciser l'organisation tridimensionnelle du récepteur, ainsi que la composition et le rôle des différentes sous-unités. La forme générale de chaque sous-unité est souvent comparée à une représentation de dauphin, composée d'un corps, d'une tête, d'une queue, d'un aileron dorsal

et de 2 nageoires. Chaque partie du corps représentant des régions distinctes et structurellement différentes de la sous unité (Figure 2).

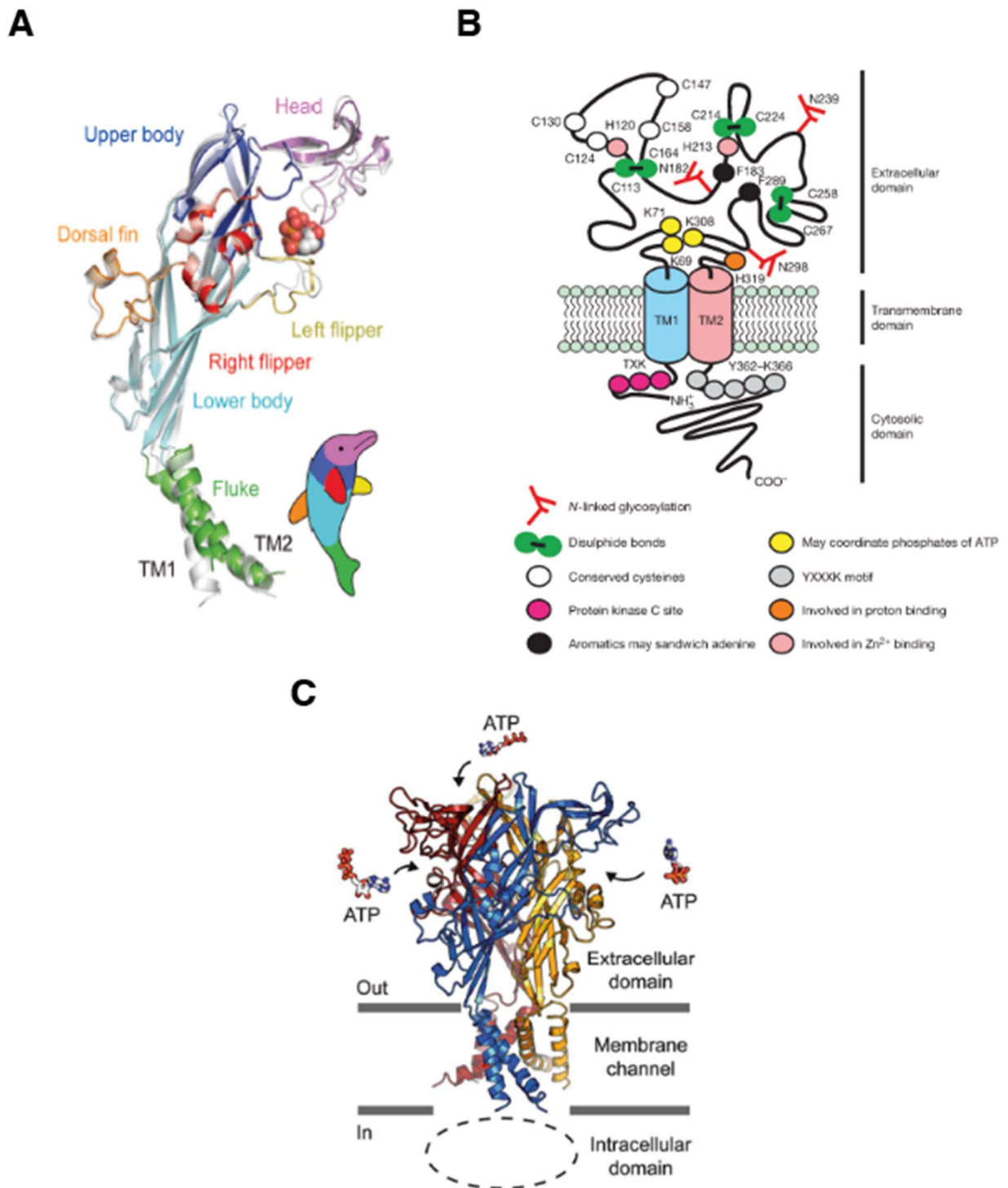


Figure 2: Structure des récepteurs P2X

(A) Structure cristallographique d'une sous-unité du récepteur P2X4 prenant la forme d'un dauphin (Hattori and Gouaux, 2012). (B) Représentation schématique de la topologie d'une sous-unité des récepteurs P2X (Khakh and North, 2006). (C) Représentation imagée de l'architecture trimérique des récepteurs P2X (Kawate, 2017).

i. Partie extracellulaire et site de liaison à l'ATP

La partie extracellulaire, aussi appelée boucle extracellulaire, est fortement glycosylée et est composée de résidus hautement conservés organisés en feuillets beta et stabilisés par 5 ponts disulfures, importants dans le maintien de la conformation du récepteur, sa fonction et son adressage à la membrane (Clyne et al., 2002; Hattori and Gouaux, 2012).

De nombreuses études ont révélé que la boucle extracellulaire contient 8 résidus cruciaux pour la liaison de l'ATP (K70, K72, N96, F188, T189, F297, R298 and K316) (Ennion et al., 2000; Fischer et al., 2007; Jiang et al., 2000; Roberts et al., 2008; Wilkinson et al., 2006). Outre ces 8 résidus la formation du site de liaison requiert l'implication de 2 sous-unités (Marquez-Klaka et al., 2009; Wilkinson *et al.*, 2006) qui vont former une cavité entre la « tête » de la première et « l'aile dorsal » de la deuxième. Cet endroit est communément appelé « la mâchoire de liaison ».

ii. Domaines transmembranaires

Chaque sous-unité des récepteurs P2X possède deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 (Brake *et al.*, 1994; Valera *et al.*, 1994), qui sont composés d'une hélice alpha (Li et al., 2004; Rassendren et al., 1997; Silberberg et al., 2005) et qui sont tous deux couplés structurellement à la partie inférieure de la boucle extracellulaire. Le TM1 est localisé de manière périphérique au TM2 (Samways and Egan, 2007; Samways et al., 2008) ce qui lui donne un rôle mineur dans la conductance des ions (Jiang et al., 2001; Li et al., 2008). Le TM2, de par sa position centrale est lui impliqué directement dans la conductance des ions notamment grâce à la présence d'une région hydrophobe située dans sa partie inférieure. C'est l'association des 3 hélices alpha composant les TM2 de chaque sous-unité qui forme ainsi le canal.

iii. Partie intracellulaire

Les parties intracellulaires N-terminale (N-term) et C-terminale (C-term) (Newbolt et al., 1998) sont les domaines les plus variables d'une sous-unité à l'autre, mais certaines propriétés restent conservées d'une sous-unité à une autre.

La partie N-term est courte (environ 30 acides aminés) et possède un site de phosphorylation par la protéine kinase C, conservée dans les différentes sous-unités P2X, qui participe à des modulations de fonctions des récepteurs qui diffèrent selon la sous-unité étudiée. En effet, une mutation de ce site va par exemple entraîner une altération de la désensibilisation des récepteurs P2X1 et P2X2 (Boue-Grabot et al., 2000; Ennion and Evans, 2002) et une modulation des courants induits par l'ATP du récepteur P2X3 (Stanchev et al., 2006).

La partie C-term est quant à elle de séquence et de longueur variable (d'environ 30 à 240 acides aminés) en fonction de la sous-unité. Néanmoins, toutes les sous-unités P2X possèdent en leur C-term un motif juxta membranaire YXXXX (X représentant un acide aminé variable), situé à la suite du TM2. Par approche mutationnelle, il a été montré que ce motif est indispensable au trafic des récepteurs P2X à la membrane plasmique (Chaumont et al., 2004). D'autres motifs de la partie C-term ont ainsi été identifiés comme un site spécifiquement présent dans la sous-unité P2X4 responsable de l'endocytose constitutive des récepteurs P2X4 (Royle et al., 2002), des motifs impliqués dans le phénomène de dilatation du pore (Eickhorst et al., 2002) ou d'interactions avec d'autres protéines (Kim et al., 2001).

2) Ouverture du pore et désensibilisation des récepteurs

L'utilisation de la microscopie à force atomique a permis d'étudier les changements structuraux des récepteurs P2X lors de leur activation par l'ATP (Shinozaki et al., 2009). Il a alors été montré que, en présence d'ATP, les 3 sous-unités s'éloignent les unes des autres afin d'ouvrir le pore central du récepteur. La structure et la modélisation des différentes sous-unités ont permis de définir 5 étapes clés dans l'ouverture du canal : la fixation de l'ATP, le

resserrement de la « mâchoire de liaison », la flexion des régions inférieures de la boucle extracellulaire, l'expansion des fenêtres latérales et l'ouverture des pores (Du et al., 2012; Kawate et al., 2011; Kowalski et al., 2014; Lorinczi et al., 2012; Roberts et al., 2012; Samways et al., 2014; Stelmashenko et al., 2014).

Le passage d'un état ouvert à un état fermé peut se faire soit par désactivation du récepteur, en absence d'agoniste ou par désensibilisation du récepteur, en présence d'agoniste. Lors d'une exposition prolongée à l'ATP, leurs cinétiques de désensibilisation diffèrent en fonction de la sous-unité P2X étudiée (North, 2002). On distingue alors les récepteurs à désensibilisation rapide, comprenant les P2X1 et les P2X3, et les récepteurs à désensibilisation lente, que sont les P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7 (Figure 3).

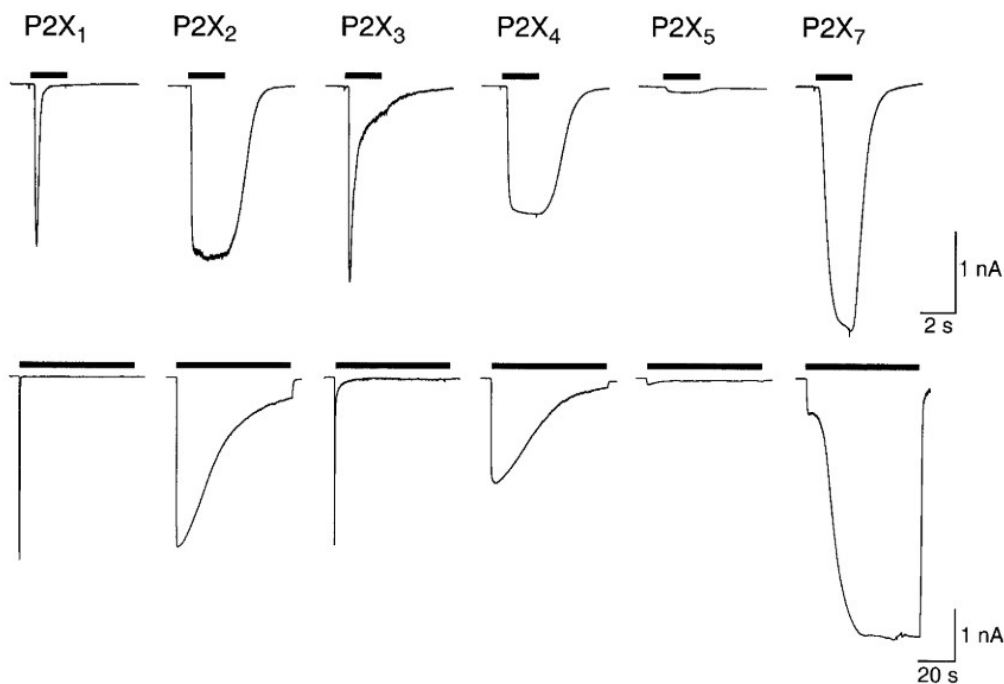


Figure 3: Cinétique d'activation et de désensibilisation des récepteurs P2X

L'application brève (haut) ou prolongée (bas) d'ATP permet de différencier les différents homomères. Les courants sont enregistrés par patch clamp dans des cellules HEK293 (North, 2002).

3) Pharmacologie des récepteurs P2X

i. Les agonistes

L'agoniste naturel de tous les récepteurs P2X est l'ATP. Cependant, la sensibilité des P2X à l'ATP varie en fonction des sous-unités P2X formant le récepteur fonctionnel. Elle est évaluée selon la concentration d'ATP nécessaire pour induire la moitié de la réponse maximale du récepteur (EC_{50}). Cet indice permet de regrouper les différentes sous-unités en différentes catégories. Les récepteurs P2X1 et P2X3 possèdent une forte sensibilité pour l'ATP. Ils ont une EC_{50} de l'ordre du sub-micromolaire. Les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X6 ont une sensibilité moyenne pour l'ATP, ayant une EC_{50} de l'ordre d'une dizaine de micromolaires. Le récepteur ayant la plus faible affinité à l'ATP est le récepteur P2X7 qui possède une EC_{50} supérieure à 100 μ M (Kaczmarek-Hajek et al., 2012).

Outre l'ATP, il existe également d'autres agonistes des récepteurs P2X, pour la plupart dérivés de l'ATP, qui possèdent des affinités différentes pour chaque sous-unité. Par exemple, l'ATP γ S et le 2-meSATP sont des agonistes puissants et stables mais ne sont pas spécifiques des récepteurs P2X car ils possèdent une grande affinité pour les récepteurs P2Y. Aussi d'autres agonistes, comme l' $\alpha\beta$ -meATP ou le Bz-ATP, sont spécifiques des récepteurs P2X mais possèdent respectivement une faible sensibilité pour ces derniers, ou ne reconnaissent pas toutes les sous-unités P2X. Il n'existe pas à ce jour de bons agonistes spécifiques de chaque sous-unité (Khakh and North, 2012).

ii. Les antagonistes

Pendant longtemps, de nombreux antagonistes des récepteurs P2X ont été utilisés, tels que le PPADS, le brillant bleu, les dérivés de suramine ou le TNP-ATP. Cependant, ces antagonistes ne sont pas sélectifs d'une sous-unité en particulier car ils permettent d'activer deux sous-unités, ou plus. Par exemple, le TNP-ATP, utilisé dans de nombreuses études impliquant les récepteurs P2X, possède une très forte affinité P2X1 et P2X3 mais est également un bloqueur efficace d'autres récepteurs comme P2X4. Aussi, certains dérivés salicylamide ont souvent été

utilisés comme des antagonistes spécifiques de P2X1, mais il a été démontré qu'ils avaient également un effet inhibiteur sur les récepteurs P2X4 et P2X7 (Muller and Namasivayam, 2021).

Il existe néanmoins quelques antagonistes spécifiques de certaines sous-unités P2X. En effet, l'existence d'antagoniste spécifique d'un type de récepteur P2X est souvent corrélée avec son potentiel thérapeutique. C'est le cas du récepteur P2X3, où des efforts de développement d'antagoniste sélectif, ont été faits, suite aux travaux montrant son implication dans la douleur, l'inflammation ou la toux chronique (Krajewski, 2020). Ainsi, le Gefaxipant est un antagoniste spécifique de P2X3 qui est entré récemment en phase 3 d'un essai clinique, comme un traitement pour la toux chronique (Morice et al., 2021).

Quelques antagonistes spécifiques du récepteur P2X4 existent également, tels que le 5-BDBD (Abdelrahman et al., 2017), le dérivé de diazépine NP-1815-PX (Matsumura et al., 2016) et le dérivé sulfonamide BAY-1797 (Werner et al., 2019). Cependant ces antagonistes, bien que spécifiques de P2X4, ne sont pas très puissants et pour certains ne passent pas la barrière hémato-encéphalique.

iii. Les modulateurs allostériques

Outre la fixation d'agonistes et d'antagonistes sur les sites de liaison orthostérique à l'ATP, les récepteurs P2X arborent également des sites de liaison dits allostériques qui peuvent entraîner une modulation de l'activité des agonistes. Parmi ces modulateurs, on peut compter des métaux, des protons ou encore des phospholipides. Quelques exemples sont présentés dans la section suivante.

Le zinc est le deuxième métal le plus présent dans l'organisme après le fer et est capable de moduler les fonctions de certains récepteurs P2X. Son rôle diffère en fonction de sa concentration et des sous-unités P2X qu'il module. Par exemple, à de faibles concentrations, le zinc potentialise les courants induits par l'ATP des récepteurs P2X2, P2X3, P2X4 et P2X5, alors qu'à fortes concentrations il inhibe ces mêmes récepteurs (Wildman et al., 2002; Wildman et al., 1998; 1999a; b). Par contre, le zinc n'a qu'un effet inhibiteur sur les courants des récepteurs P2X1 et P2X7 (Liu et al., 2008). Ces effets opposés du zinc sont dus à l'existence

d'au moins 2 sites de liaison au zinc au niveau de la boucle extracellulaire sur les parties inférieures et supérieures de la « mâchoire de liaison » des récepteurs P2X, permettant son maintien en position fermée (Jiang et al., 2012). Le premier site, possédant une forte affinité avec le zinc, est responsable de l'effet de potentialisation. Le deuxième site possède une faible affinité avec le zinc et est à l'origine de l'effet inhibiteur (Coddou et al., 2011).

D'autres métaux sont également capables d'agir en tant que modulateurs allostériques sur les récepteurs P2X tels que le cadmium, le mercure ou encore le cobalt (Coddou et al., 2005)

Le pH défini par la concentration de protons présents dans le milieu est un régulateur important des récepteurs canaux. Sans surprise, les récepteurs P2X sont aussi sujets à des modulations dues aux protons suite à leur fixation au niveau de la boucle extracellulaire. A l'exception de P2X2 qui est potentialisé, tous les autres récepteurs homomériques, P2X1, P2X3, P2X4, P2X5 et P2X7, sont inhibés par l'augmentation de la concentration en protons en pH acide (Clarke et al., 2000; Gerevich et al., 2007).

Les phosphoinositides (PIPn) sont des phospholipides qui peuvent également agir en tant que modulateurs de la fonction des récepteurs P2X. Contrairement au zinc et aux protons, ils n'agissent pas au niveau de la boucle extracellulaire mais au niveau de la partie intracellulaire C-term du récepteur, à proximité de la membrane plasmique et du TM2 (Bernier et al., 2012) (Bernier et al., 2013). Les PIPn vont permettre d'augmenter les courants des récepteurs P2X1, P2X2 et P2X4 (Bernier et al., 2008a; Bernier et al., 2008b). Bien que les PIPn ne possèdent pas ces sites de liaison chez les récepteurs P2X3 et P2X7, ces derniers sont néanmoins modulables, suggérant un mécanisme indirect ou la présence d'autres sites de liaison (Zhao et al., 2007). Le récepteur P2X5 n'est lui pas du tout sensible aux PIPn (Ase et al., 2010). Cette différence d'effet des PIPn sur les différentes sous-unités P2X, est probablement due aux différences de longueur de la partie C-term.

Les récepteurs P2X sont également modulés par l'éthanol qui inhibe l'activité des récepteurs P2X2 et P2X4, tandis qu'il potentialise celle du récepteur P2X3 (Davies et al., 2006). Cette modulation est due à la fixation de l'éthanol sur des résidus présents au niveau de la boucle extracellulaire (Asatryan et al., 2011; Popova et al., 2010; Xiong et al., 2004).

4) Formation homomérique et hétéromérique

Comme détaillé précédemment, les récepteurs P2X sont l'assemblage de 3 sous-unités. Ces 3 sous-unités peuvent être de même nature formant un récepteur homomérique. Comme illustré précédemment, la plupart des sous-unités P2X peuvent former des récepteurs homomériques fonctionnels à l'exception de P2X6 (Barrera *et al.*, 2005) et de P2X5 qui forme un récepteur fonctionnel mais avec de très faibles réponses à l'ATP (Bo *et al.*, 2003).

De nombreuses études ont montré un chevauchement de l'expression de plusieurs sous-unités P2X, dans un même type cellulaire et des réponses pharmacologiques différentes de celles des homomères, suggérant l'existence de récepteurs hétéromériques, formés par l'assemblage de plusieurs sous-unités P2X différentes. La plupart des sous-unités des récepteurs P2X sont capables de s'hétéromériser à l'exception de P2X7 (Torres *et al.*, 1999), qui semble néanmoins interagir avec P2X4 sans pour autant former un récepteur hétéromérique (Boumechache *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2017).

Le premier hétéromère mis en évidence est le récepteur P2X2/3 (Lewis *et al.*, 1995; Radford *et al.*, 1997), présent au niveau des corps cellulaires et des terminaisons synaptiques des neurones sensoriels des DRG. Cet hétéromère présente un profil de désensibilisation lente caractéristique des P2X2 mais une activation pharmacologique caractéristique des P2X3. Il est notamment impliqué au niveau du système sensoriel dans la transmission douloureuse (Cockayne *et al.*, 2005). Il est également impliqué dans la signalisation des neurones sensoriels gustatifs vers le cortex gustatif (Huang *et al.*, 2011) lui conférant un rôle clé dans la perception et la sensibilité au goût (Bo *et al.*, 1999; Finger *et al.*, 2005).

La quasi non-fonctionnalité de P2X5 sous forme homomérique a permis de révéler l'existence de 2 hétéromères impliquant la sous-unité P2X5. Le premier est l'hétéromère P2X1/5 (Le *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 1998). Il est exprimé dans les astrocytes du cortex et participe à la modulation de l'excitabilité neuronale (Lalo *et al.*, 2008; Palygin *et al.*, 2010). Le deuxième est l'hétéromère P2X2/5 qui est présent au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Son rôle précis reste néanmoins à être étudié (Compan *et al.*, 2012).

Tout comme P2X2/5, d'autres hétéromères ont été découverts mais la détermination de leur rôle nécessite de plus amples investigations. Parmi ces hétéromères, on retrouve les hétéromères P2X1/2, P2X1/4, P2X2/4 et P2X2/6.

Plus récemment, un hétéromère formé de sous-unités appartenant à 3 sous-types de récepteurs P2X différents a été identifié, le P2X2/4/6 (Antonio et al., 2014). Cependant, son rôle reste difficile à établir à cause du manque d'outils permettant de confirmer sa présence et sa fonctionnalité *in vivo*.

5) Localisation et trafic

Une fois assemblés en trimère au sein du réticulum endoplasmique, les récepteurs P2X sont adressés à la surface de la membrane plasmique, à l'exception de P2X6 qui réside dans le réticulum endoplasmique (Ormond et al., 2006). La plupart des récepteurs P2X sont maintenus à la surface des cellules à l'exception de P2X4 qui est constitutivement internalisé dans les lysosomes (Qureshi et al., 2007). La cinétique du trafic à la membrane plasmique dépend des sous-unités P2X et détermine la distribution des récepteurs à la membrane plasmique.

A la membrane plasmique, les P2X peuvent également être mobiles et diffusent à la surface des cellules. La liaison de leur agoniste peut moduler cette mobilité et ainsi jouer un rôle dans la régulation de la force synaptique dépendante du calcium. Par exemple, la liaison de l'ATP sur les récepteurs P2X2 et P2X4 augmente leur mobilité et déclenche des afflux locaux de calcium, respectivement au niveau des dendrites des neurones de la moelle épinière et des microglies (Richler et al., 2011; Toulme and Khakh, 2012).

6) Expression et fonction

La localisation subcellulaire des différents récepteurs P2X leur donne alors des rôles distincts. Aussi, leur localisation très répandue au sein de nombreux systèmes tels que le système cardiovasculaire, pulmonaire, immunitaire et aussi nerveux, leur confèrent des rôles aussi bien en condition physiologique qu'en condition pathologique (Figure 4).

En périphérie, l'ATP peut être libérée par un grand nombre de types cellulaires, tels que les cellules épithéliales et les kératinocytes en réponse à des stimuli mécaniques, chimiques ou thermiques. Cette libération d'ATP peut ainsi activer les récepteurs P2X présents dans les terminaisons nerveuses périphériques et induire une transmission du message sensoriel. De plus, la co-libération d'ATP avec d'autres neurotransmetteurs tels que le glutamate ou le GABA par les terminaisons nerveuses périphériques peut également activer les récepteurs P2X présents à la surface d'autres types cellulaires, et donc jouer un rôle dans la neurotransmission. Par exemple, la libération d'ATP co-libérée avec la noradrénaline par le système nerveux sympathique peut agir sur les récepteurs P2X1 (Vial and Evans, 2002) présents au niveau des cellules musculaires lisses et contribuer à la contraction musculaire (Kennedy, 2015). Des mutations du gène *p2rx1* peuvent engendrer des réponses contractiles aberrantes, par exemple de la vessie ou du canal déférent, ce qui engendre des problèmes de fertilité (Mulryan et al., 2000). L'activation de P2X1 dans les cellules musculaires lisses des artères peut également agir sur la vasoconstriction artérielle et entraîner des thromboses (Darbousset et al., 2014).

D'autres récepteurs P2X jouent également un rôle en périphérie, à l'image de P2X2 (Cockayne *et al.*, 2005). P2X2 est fortement exprimé dans les différents types cellulaires de la cochlée et de ce fait est un acteur de l'audition (Housley et al., 1998). Il possède un effet protecteur en diminuant les potentiels cochléaires induits par un fort bruit (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2003). Une diminution de P2X2 entraînerait une non-protection de la cochlée résultant en une perte auditive (George et al., 2019; Telang et al., 2010; Yan et al., 2013).

Outre son rôle dans le système sensoriel, P2X2 joue également un rôle dans le système nerveux central. Son expression au niveau des neurones de l'hypothalamus et de l'hypophyse l'implique dans la libération d'hormones telles que la vasopressine (Custer et al., 2012) et

l'hormone lutéinisante (Zemkova et al., 2006). Il est également impliqué dans la régulation de la prise alimentaire qui est en partie contrôlée par l'hypothalamus (Collden et al., 2010).

Le récepteur P2X3 a une distribution limitée et est essentiellement exprimé dans les neurones sensoriels au niveau des corps cellulaires et des terminaisons synaptiques périphériques et centrales, où il joue un rôle dans la transmission sensorielle, la perception du goût, la distension de la vessie et les réflexes liés aux chémorécepteurs (Fabbretti, 2019).

Le clonage de P2X3 provenant des neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (DRG) (Chen et al., 1995) a permis bon nombre d'études sur son rôle dans la transmission douloureuse. Son expression au niveau des fibres nociceptives de type C, dans les tissus périphériques, mais aussi au niveau du système nerveux central (Bernier et al., 2018) indique sa contribution dans la transmission sensorielle liée à la douleur aiguë et chronique.

P2X3 est aussi exprimé au niveau des neurones sensoriels gustatifs et est responsable de la transmission de l'information au cortex gustatif (Vandenbeuch et al., 2015).

Outre son expression au niveau des neurones sensoriels, P2X3 est également exprimé dans les corps cellulaires des neurones carotidiens qui régulent la réponse sympathique excitatrice, contrôlant alors la pression artérielle, lui donnant un rôle dans l'hypertension (Pijacka et al., 2016).

Au niveau clinique, P2X3 est surtout étudié en tant que cible thérapeutique contre la toux chronique à cause de sa présence au niveau des neurones afférents vagues des voies respiratoires. Aussi, des études ont remarqué les effets antitussifs des antagonistes des récepteurs P2X3 (Abdulqawi et al., 2015).

Le récepteur P2X4 est très largement distribué au sein du SNC et en périphérie. En effet, P2X4 est exprimé en périphérie par les cellules endothéliales, les kératinocytes et dans les cellules immunitaires telles que les macrophages. Il est également distribué au sein du système sensoriel périphérique, dans la cochlée, ou encore dans les ganglions trigéminaux et DRG. Dans le SNC, P2X4 est exprimé dans les neurones et les cellules gliales dans de très nombreuses régions du cerveau et de la moelle épinière. Cette grande diversité d'expression lui confère de nombreux rôles physiologiques comme dans la neuromodulation et pathologiques comme dans la douleur chronique, la sclérose latérale amyotrophique ou encore l'épilepsie (Suurvali et al., 2017).

Bien que peu fonctionnel sous forme homomérique, le récepteur P2X5 est exprimé dans les ostéoclastes et jouerait un rôle dans la réponse inflammatoire osseuse. Il serait nécessaire à la libération de facteurs pro-inflammatoires tels que IL1 β , IL6, IL17a ou encore TNF-sf11 (Kim et al., 2018; Kim et al., 2017).

Il est le plus souvent retrouvé sous forme hétéromérique P2X1/5 et P2X2/5.

Le récepteur P2X6 n'est pas fonctionnel sous forme homomérique mais est néanmoins exprimé dans le SNC, dans les cellules de Purkinje du cervelet et les cellules pyramidales de l'hippocampe (Burnstock and Knight, 2004; Collo et al., 1996; Rubio and Soto, 2001). Il peut donc s'associer à P2X2 et/ou à P2X4 pour former des récepteurs hétéromériques P2X2/4 et P2X2/6 (Collo *et al.*, 1996; Soto et al., 1996). P2X2/6 serait exprimé au sein des neurones du thalamus et de l'hypothalamus (Collo *et al.*, 1996) et dans les cellules souches neuronales chez les embryons (Schwindt et al., 2011). L'hétéromère P2X4/6 est exprimé dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje du cervelet et dans les neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe (Rubio and Soto, 2001) et joue un rôle dans l'excitabilité neuronale des neurones du CA3 de l'hippocampe (Mori *et al.*, 2001).

Bien que P2X7 soit le récepteur P2X ayant la plus faible affinité pour l'ATP, il est néanmoins impliqué dans beaucoup de mécanismes physiopathologiques (Di Virgilio et al., 2018).

Dans le SNC, P2X7 est exprimé dans les cellules gliales, incluant la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes. La présence de P2X7 dans les neurones est plus débattue (Illes et al., 2017; Jimenez-Mateos et al., 2019). Dans le SNC P2X7 joue un rôle dans la croissance axonale des neurones, dans la modulation des neurotransmetteurs et dans la neuroinflammation (Bartlett et al., 2014). Dans des conditions pathologiques, P2X7 stimule la production par la microglie de médiateurs pro-inflammatoires induisant la mort neuronale. P2X7 serait d'ailleurs impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la sclérose en plaque (McLarnon et al., 2006; Ni et al., 2013; Ryu and McLarnon, 2008). La réponse inflammatoire déclenchée par l'activation de P2X7 est également impliquée dans certaines maladies psychiatriques comme les troubles bipolaires, la dépression et l'anxiété (Bhattacharya and Ceusters, 2020; Czamara et al., 2018; Deussing and Arzt, 2018).

P2X7 est le récepteur P2X le plus étudié en tant que cible thérapeutique potentielle et de nombreuses compagnies ont synthétisé de petites molécules qui sont de puissants antagonistes sélectifs du récepteur (Bhattacharya et al., 2013; Chrovia et al., 2014). De par son rôle important dans la libération de cytokines inflammatoires par la microglie, P2X7 a longtemps été une cible thérapeutique afin de lutter contre la douleur inflammatoire (Ferrari et al., 1997; Ren et al., 2021).

Sous-unite	Expression	Rôles principaux
P2X1	Cellules musculaires lisses, plaquettes sanguines	Contraction musculaire, agrégation plaquettaire
P2X2	Neurones sensoriels (cochlée), hypothalamus, hypophyse	Audition, libération hormonale, prise alimentaire
P2X3	Neurones sensoriels (nociceptifs, gustatifs), neurones carotidien	Transmission douloureuse, transmission de l'information gustative, hypertension
P2X4	Neurones (SNC, SNP), cellules gliales, cellules immunitaires, keratinocytes, cellules endothéliales	Neurotransmission, transmission douloureuse, plasticité synaptique, inflammation
P2X5	Ostéoclastes	Inflammation
P2X6	Neurones (SNC)	Non fonctionnel
P2X7	Cellules gliales	Croissance axonale, neurotransmission, neuro-inflammation

Figure 4: Localisation et fonction des récepteurs P2X

C. P2X4

Parmi les 7 sous-unités P2X, le récepteur P2X4 est le plus largement distribué dans le SNC (North, 2016; Suurvali *et al.*, 2017). Il est exprimé aussi bien dans les neurones que dans les cellules gliales, ce qui lui donne de nombreuses implications physiologiques et pathologiques (Soto *et al.*, 1996).

1) Trafic et localisation subcellulaire

Comme évoqué précédemment, contrairement aux autres récepteurs P2X, le récepteur P2X4 est, en condition physiologique, peu présent à la surface des cellules car il est constitutivement internalisé, principalement dans les compartiments endosomaux/lysosomaux (Robinson and Murrell-Lagnado, 2013) (Figure 5).

L'endocytose constitutive de P2X4 est dépendante d'un complexe clathrine-dynamine. Elle est provoquée par l'interaction du motif YXXGL, du domaine C-term de P2X4 avec la sous-unité $\mu 2$ de la protéine adaptative 2 (AP2) (Bobanovic *et al.*, 2002; Qureshi *et al.*, 2007; Royle *et al.*, 2002) qui est responsable de l'internalisation de P2X4 (Royle *et al.*, 2002). Des études de mutagénèses ont montré que le motif atypique Y₃₇₈XXGL dans l'internalisation de P2X4. Effectivement, des mutations de ce motif augmentent de manière importante le nombre de récepteurs à la surface en bloquant leur internalisation (Bobanovic *et al.*, 2002; Jo *et al.*, 2011; Toulme *et al.*, 2006). Suite à son internalisation, le récepteur est ensuite adressé vers les endosomes et lysosomes (Royle *et al.*, 2005). Un autre motif de leucine L22 et I23 présent dans le domaine N-term intracellulaire de P2X4, est responsable de cet adressage. En effet, la mutation de ce motif de leucine diminue le nombre de récepteurs dans les lysosomes et augmente le nombre de P2X4 recyclés à la membrane plasmique (Qureshi *et al.*, 2007). En condition physiologique, ces deux motifs intracellulaires tyrosine C-term et de leucine N-term sont donc, respectivement responsables de l'internalisation constitutive du récepteur et de sa localisation lysosomale. Suite à des études qui ont permis la fusion d'une protéine fluorescente sensible au pH, la pHluorine, avec le récepteur P2X4, la distribution cellulaire de P2X4 dans les divers compartiments a pu être disséqué. Il est alors décrit que le *pool*

intracellulaire de P2X4 peut soit rester dans les lysosomes soit être recyclé à la surface des cellules afin de réguler le nombre de P2X4 à la surface (Xu et al., 2014).

Malgré le pH acide et les protéases intra lysosomales ($3,5 < \text{pH} < 5$), P2X4 n'est pas dégradé car il est protégé par la présence d'un complexe de 6 oligosaccharides liés à la boucle extracellulaire, qui fait face à la lumière des vésicules lysosomales (Qureshi et al., 2007).

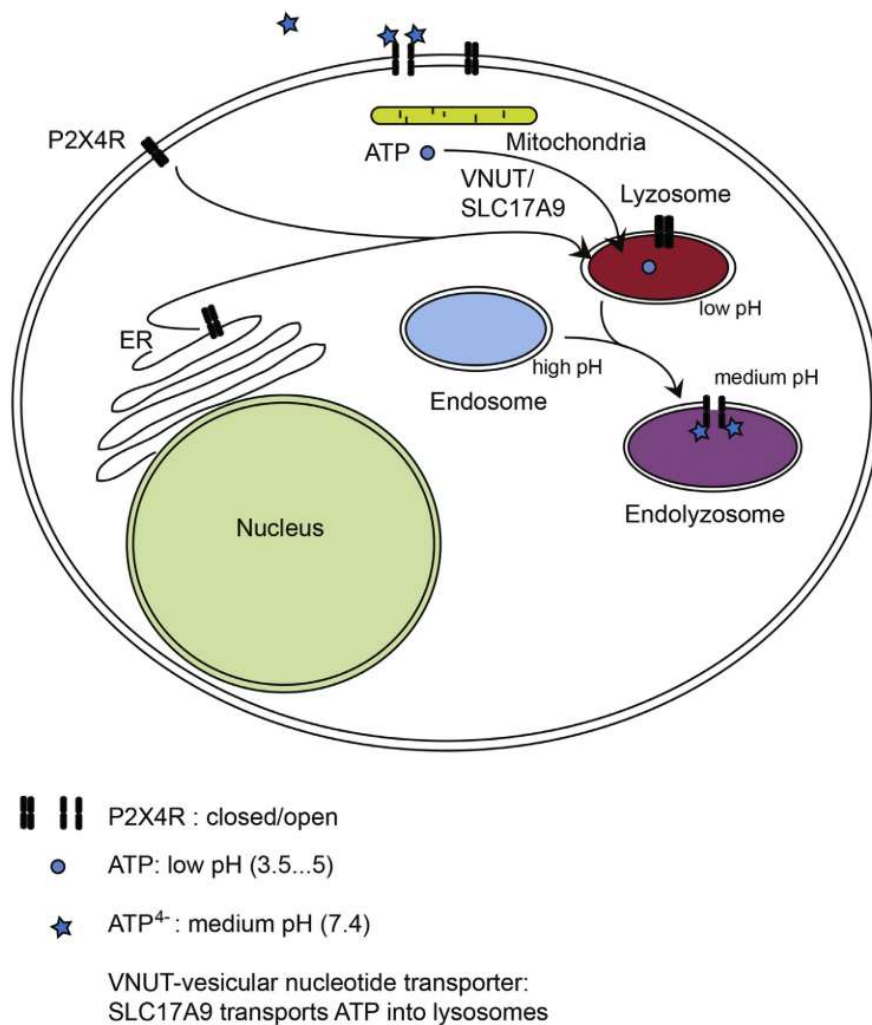


Figure 5: Internalisation constitutive de P2X4

En condition physiologique, P2X4 est constitutivement localisé dans les lysosomes (Suurvali et al., 2017).

De nombreuses évidences ont suggéré que le récepteur P2X4 lysosomal possédait également d'importantes fonctions physiologiques (Murrell-Lagnado and Frick, 2019). Dans les lysosomes, le domaine extracellulaire présentant les sites de liaison à l'ATP fait face au compartiment luminaire qui contient beaucoup d'ATP (Besnard et al., 2016; Zhang et al., 2007b). Cet ATP lysosomal provient du transport d'ATP cytoplasmique via le transporteur de nucléotide vésiculaire VNUT/SLC17A9 présent au niveau de la membrane des lysosomes (Cao et al., 2014).

Bien que le compartiment luminaire soit trop acide pour une activation de P2X4 par l'ATP, une alcalinisation du pH intra-lysosomal peut engendrer une activation de P2X4. L'activation de la calmoduline et son association avec P2X4, à la suite de l'entrée de calcium provoquée par son activation participe ensuite à la fusion et la vacuolisation endolysosomale (Cao et al., 2015; Murrell-Lagnado and Frick, 2019).

2) *Expression et rôle*

i. Au niveau neuronal

Le clonage de P2X4 a permis de montrer pour la première fois, l'expression de P2X4 dans le cerveau et en particulier dans le gyrus denté et les cellules pyramidales de CA1/CA3 de l'hippocampe et au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (Seguela et al., 1996; Soto *et al.*, 1996). D'autres études ont ensuite confirmé la présence de P2X4 dans les interneurons GABAergiques de l'hippocampe, du cervelet et du bulbe olfactif (Le et al., 1998; Rubio and Soto, 2001), dans les neurones épineux du striatum et de la substance noire (Amadio et al., 2007; Le *et al.*, 1998) et au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Stojilkovic, 2009). Il a également été rapporté que P2X4 était également exprimé au niveau des neurones corticaux somatosensoriels (Lalo et al., 2007), des nerfs et des ganglions sensoriels (Ito et al., 2010; Luo et al., 2006; Tan et al., 2009), et de la rétine (Wheeler-Schilling et al., 2001).

Grâce à la microscopie électronique, il a été montré que le récepteur P2X4 était localisé à la fois au niveau des terminaisons pré- et post-synaptiques. Néanmoins, il reste localisé préférentiellement à la périphérie de la densité post-synaptique dans l'espace péri et extra-

synaptique (Rubio and Soto, 2001). Cela est en accord avec l'idée que l'activation par l'ATP colibérée avec d'autres neurotransmetteurs tels que le glutamate ou le GABA des récepteurs P2X post-synaptiques ne contribue pas à la transmission synaptique rapide mais plutôt à la modulation des synapses excitatrices et inhibitrices dans le SNC (Boue-Grabot and Pankratov, 2017).

Au niveau des terminaisons pré-synaptiques, son rôle est encore mal connu, néanmoins il a été montré que l'activation de P2X4 présynaptique permet d'augmenter la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, région majeure permettant la régulation de la prise alimentaire (Xu et al., 2016).

Des travaux ont montré que l'ATP libérée par les cellules gliales pouvait agir sur les récepteurs P2X4 présents au niveau des terminaisons pré- et post-synaptiques et moduler la quantité de neurotransmetteurs libérée ainsi que la plasticité des synapses excitatrices et inhibitrices dans plusieurs régions du cerveau (Lalo et al., 2016; Pougnet et al., 2014).

En effet, des études ont révélé que l'activation des récepteurs P2X4 et/ou P2X2 par l'ATP gliale pouvait provoquer l'internalisation des récepteurs AMPA et une dépression synaptique à long terme dans l'hippocampe. L'influx de calcium via les récepteurs P2X postsynaptiques modulerait la phosphorylation de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA et entraînerait leur internalisation (Pougnet et al., 2016; Pougnet *et al.*, 2014). L'activation de P2X4 par l'ATP libérée au niveau présynaptique peut aussi moduler la potentialisation à long terme (PLT) médiée par les récepteurs NMDA dans les neurones du CA1 de l'hippocampe. En effet, le blocage pharmacologique de P2X4 facilite l'induction de la PLT dépendante des récepteurs NMDA (Pankratov et al., 2009), suggérant que P2X4 pouvait avoir un effet négatif sur la PLT. Cependant, cet effet n'est pas retrouvé chez les souris n'exprimant plus P2X4 (P2X4KO). De plus, il a été observé que la potentialisation de P2X4 par l'ivermectine, modulateur positif de P2X4, augmentait la PLT dans la région du CA1 de l'hippocampe (Sim et al., 2006). Ces résultats suggèrent alors que l'influx de calcium via les récepteurs P2X4 post-synaptiques, en promouvant l'incorporation des récepteurs NMDA post-synaptiques renforce l'activité synaptique pendant la PLT (Baxter et al., 2011). Toutefois, il a récemment été montré *in vitro* que les récepteurs P2X4 pouvaient interagir physiquement avec les récepteurs NMDA et provoquer une inhibition fonctionnelle de ces derniers (Rodriguez et al., 2020). Ceci serait

alors en accord avec les études montrant l'effet négatif des récepteurs P2X4 sur la PLT dépendante des récepteurs NMDA (Pankratov *et al.*, 2009).

Les récepteurs P2X4 sont également capables de moduler les synapses inhibitrices GABAergiques. L'interaction physique entre les récepteurs P2X4 post-synaptiques et les récepteurs GABA_A présents dans le noyau ventro-médial de l'hypothalamus conduit à une inhibition des courants contrôlés par les récepteurs GABA post-synaptiques et ainsi à l'augmentation de l'excitabilité neuronale. De manière intéressante, cet effet est observé uniquement après le blocage de l'internalisation de P2X4 (Jo *et al.*, 2011). Cette inhibition des courants GABAergiques provoquée par l'activation de P2X4, corrélée à une diminution des récepteurs GABA_A, est également retrouvée au niveau des neurones corticaux (Boue-Grabot and Pankratov, 2017; Lalo *et al.*, 2014).

Même si les récepteurs P2X4 sont très exprimés dans les neurones, leurs rôles restent néanmoins mal connus et parfois contradictoires. Cela est certainement dû à la faible expression de P2X4 à la surface des membranes plasmiques, en condition physiologique, ce qui rend son étude complexe.

ii. Au niveau glial

Outre les neurones, les cellules gliales sont des acteurs clés du bon fonctionnement du SNC. Elles participent notamment à la communication neuro-gliale et gliale-gliale grâce à la libération de cytokines inflammatoires, ou encore de facteurs neurotrophiques, mais aussi grâce à la présence de récepteurs purinergiques.

Les récepteurs P2X4 sont présents au niveau des cellules gliales. En effet, il a été montré que P2X4 était présent dans les microglies, les cellules gliales immunitaires du SNC, où son expression *de novo* et/ou l'augmentation de son trafic à la surface joue un rôle clé dans plusieurs pathologies telles que la douleur neuropathique.

Bien que la présence de P2X4 dans les astrocytes reste débattue (Stokes *et al.*, 2017), son expression a été montrée dans les astrocytes au niveau du CA1, du CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe (Bertin *et al.*, 2020; Kukley *et al.*, 2001) et également au niveau du noyau accumbens (Franke *et al.*, 2001). Son rôle reste néanmoins méconnu.

Dans les cellules gliales satellites (SGC) des DRG, on retrouve une augmentation de P2X4 dans des conditions pathologiques de douleur neuropathique (Deng et al., 2018; Teixeira et al., 2019).

Le récepteur P2X4 est également retrouvé dans les cellules précurseurs des oligodendrocytes (Agesti et al., 2005). Mais son implication reste encore inconnue.

Au niveau des cellules de Schwann, P2X4 est principalement localisé, en condition physiologique, dans les lysosomes intracellulaires. Après une lésion de nerf périphérique (LNP), la surexpression de P2X4 et son augmentation à la surface des cellules de Schwann induisent la libération de facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), une récupération des fonctionnalités motrices et sensorielles ainsi qu'une amélioration de la myélinisation des nerfs (Su et al., 2019).

3) Pharmacologie

Bien que le récepteur P2X4 est l'un des récepteurs P2X le plus étudié de ces 10 dernières années, il existe pour l'heure peu d'outils pharmacologiques spécifiques de P2X4, permettant de le potentialiser ou de le bloquer sélectivement.

L'un des outils le plus connu est certainement l'ivermectine (IVM). Utilisée comme un antiparasitaire (Silberberg et al., 2007), elle est également utilisée en tant que modulateur allostérique positif de P2X4. L'IVM possède deux sites de liaison proches des fenêtres latérales au niveau de la partie externe des domaines transmembranaires du récepteur P2X4 (Jelinkova et al., 2008; Norenberg et al., 2012; Silberberg *et al.*, 2007) (Gao et al., 2015). L'un de ses sites de liaison possède une forte affinité pour l'IVM et induit, suite à sa fixation, une diminution de la désensibilisation du canal. Le deuxième site de liaison, lui possède une faible affinité pour l'IVM et va diminuer la désactivation du courant en stabilisant l'état ouvert du récepteur. La potentialisation de P2X4 par l'IVM facilite donc l'ouverture du canal et retarde également sa fermeture (Khakh et al., 1999; Priel and Silberberg, 2004). L'IVM serait également capable d'affecter le trafic et le recyclage de P2X4. La potentialisation observée pourrait donc provenir aussi d'une augmentation du nombre de P2X4 à la surface (Stokes, 2013). Si l'IVM est spécifique de P2X4 au sein de la famille des récepteurs P2X chez les rongeurs, chez l'homme,

l'IVM possède une forte affinité aussi pour les récepteurs P2X7 (Norenberg *et al.*, 2012). De plus, chez les rongeurs, l'IVM est aussi capable de potentialiser l'action des récepteurs $\alpha 7$ -nicotiniques de l'acétylcholine (Krause *et al.*, 1998) et de moduler la fonction des récepteurs GABA_A (Bortolato *et al.*, 2013).

Malgré le manque d'agonistes spécifiques, il existe néanmoins quelques antagonistes spécifiques de P2X4.

Le dérivé des benzodiazépines, le 5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one (5-BDBD) est un antagoniste sélectif de P2X4 (Abdelrahman *et al.*, 2017). Il n'est pas très puissant (IC₅₀ = 0.5 μ M) et possède une faible solubilisation dans l'eau.

Le NP-1815-PX est également un antagoniste allostérique qui est lui plus soluble dans l'eau (Matsumura *et al.*, 2016).

Le PSB-15417 est un antagoniste sélectif de P2X4 puissant et pouvant pénétrer la barrière hémato encéphalique lui conférant alors une action potentielle au niveau du SNC (Teixeira *et al.*, 2019).

4) Pathologies du SNC associées à P2X4

La grande diversité des récepteurs P2X et le manque d'outils pharmacologiques spécifiques de P2X4 ne permettent pas toujours de distinguer l'implication de P2X4 en condition physiologique. Cependant, l'augmentation de son expression et/ou de son trafic à la surface suggère un rôle important dans de nombreuses pathologies (Figure 6 et 7), telles que la douleur chronique neuropathique et inflammatoire, les maladies neurodégénératives ou encore les troubles psychiatriques (Duveau *et al.*, 2020).

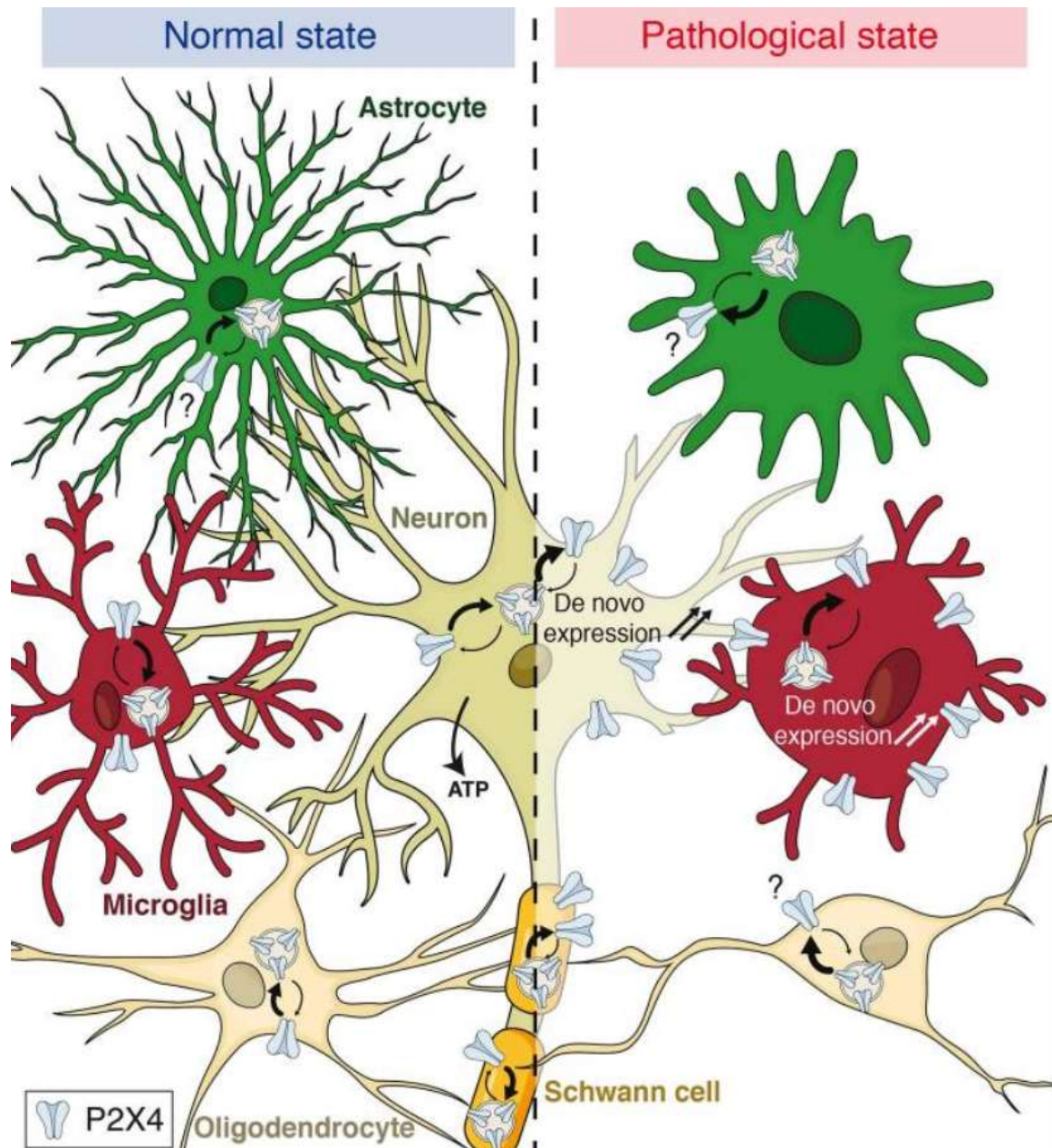


Figure 6: Différences d'expression de P2X4 dans le SNC en condition physiologique et pathologique

En condition physiologique (gauche), P2X4 est majoritairement localisé en intracellulaire. En conditions pathologiques (droite), P2X4 est augmenté à la surface des cellules via une augmentation de son trafic à la surface et/ou une augmentation de son expression de novo (Duveau et al., 2020).

i. Douleur chronique

La dérégulation du système sensoriel nociceptif entraîne des réponses anormales qui, lorsqu'elles persistent, peuvent devenir pathologiques et donner lieu à des douleurs chroniques. Il existe deux types de douleurs chroniques, la douleur inflammatoire (Ciaramella, 2019; Costigan et al., 2009; Yam et al., 2018) résultant d'une lésion tissulaire et la douleur neuropathique ayant lieu après une lésion nerveuse (Bouhassira et al., 2008; Yam *et al.*, 2018). Les récepteurs P2X4 sont impliqués dans ces deux types de douleurs (Tsuda et al., 2003; Tsuda et al., 2009b) (cf. Partie 3).

ii. Ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale est une insuffisance d'apport de sang et d'oxygène causée par une obstruction vasculaire engendrant une lésion cérébrale. Cette ischémie est souvent associée à une inflammation post-ischémique, qui inclue l'activation de cellules gliales et une augmentation d'ATP extracellulaire.

Plusieurs études ont reporté une augmentation de P2X4 dans les microglies activées après une lésion cérébrale ischémique (Cavaliere et al., 2003; Cheng et al., 2014; Vazquez-Villoldo et al., 2014; Verma et al., 2017). En effet, dans des conditions d'ischémie, l'ATP et les différentes molécules libérées massivement par les cellules lésées, induisent la chémotaxie de la microglie vers le site de lésion, son activation et l'activation des récepteurs P2X4 présents à sa surface. Cela engendre la libération de cytokines pro-inflammatoires par la microglie via la voie de signalisation PI3K (Cheng *et al.*, 2014; Li et al., 2011; Ohsawa et al., 2007).

Les récepteurs P2X4 possèdent également un rôle neuro-protecteur durant l'ischémie. Effectivement, l'activation de P2X4 exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires par l'ATP venant de la compression des vaisseaux engendre une augmentation de l'ostéopontine, une molécule neuroprotectrice. Ces résultats indiquent alors un nouveau mécanisme par lequel P2X4 induit une tolérance ischémique (Ozaki et al., 2016).

iii. Épilepsie

L'épilepsie est une pathologie neurologique chronique caractérisée par une hyperexcitabilité neuronale donnant lieu à des convulsions récurrentes. Ceci entraîne une perte neuronale et une activation microgliale. A ce jour, l'implication de P2X4 dans l'épilepsie reste floue. Si certaines études ont suggéré une absence de changement de l'expression de P2X4 voire même une diminution de son expression lors de l'induction de crise d'épilepsie chez le rongeur (Kang et al., 2003), d'autres études ont montré une augmentation de l'expression de P2X4 dans les microglies activées du stratum radiatum de l'hippocampe, associée à une augmentation de la mort cellulaire, après un épisode épileptique. Une augmentation de l'expression *de novo* de P2X4 dans les microglies activées après l'induction de l'épilepsie faciliterait la libération de BDNF microglial et l'induction de l'hyperexcitabilité en promouvant l'épileptogénèse (Ulmann et al., 2013).

iv. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est l'une des plus communes des maladies neurodégénératives et est principalement caractérisée par l'accumulation d'agrégats de fragments β -amyloïdes ($A\beta_{1-42}$) insolubles et de la protéine tau qui induisent une dysfonction synaptique et une mort neuronale. Ceci est accompagné par une perte de mémoire progressive, des troubles des fonctions exécutives, ou encore des troubles d'orientation spatio-temporelle (Murphy and LeVine, 2010; Sadigh-Eteghad et al., 2015). Comme d'autres maladies neurodégénératives, l'augmentation de nucléotides extracellulaires et l'augmentation de la neuro-inflammation jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de la MA (Erb et al., 2019).

Il a été proposé que l'ATP, agissant via les récepteurs P2X participerait directement à certains effets toxiques des peptides $A\beta$ dans les neurones, avec un rôle important de P2X4 (Godoy et al., 2019; Saez-Orellana et al., 2016; Varma et al., 2009). L'accumulation de fragments β -amyloïdes provoque une augmentation de l'expression de P2X4 dans les neurones hippocampiques, d'abord au niveau des corps cellulaires puis se propageant ensuite vers les neurites. Ceci serait lié au clivage protéolytique de P2X4 par la caspase 3 qui induirait

l'augmentation du trafic à la surface des neurones d'une forme tronquée de P2X4, peut-être due à la perte de son motif d'internalisation du domaine C-term. Ce clivage ralentit également le temps de fermeture du pore. L'activation de P2X4 sous sa forme tronquée pourrait induire une toxicité neuronale due à l'augmentation des influx de calcium. Une augmentation de P2X4 favorise donc la toxicité des fragments β -amyloïdes et ainsi la mort neuronale.

v. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par une perte progressive et spécifique de neurones dopaminergiques nigro-striés, causant un dysfonctionnement de l'homéostasie de la dopamine associé à des troubles moteurs. Une caractéristique de la MP est la présence d'agrégats intracytoplasmiques anormaux d' α -synucléine, appelés corps de Lewy, dans les corps cellulaires neuronaux.

Comme décrit précédemment, le récepteur P2X4 pré-synaptique module la libération de nombreux neurotransmetteurs comme le GABA ou le glutamate, mais aussi de la dopamine (Krugel et al., 2003; Xiao et al., 2008). En effet, le récepteur P2X4 serait directement lié à la régulation de l'homéostasie de la dopamine qui est altérée dans la MP. Plus précisément, des études biochimiques et pharmacologiques utilisant des modèles transgéniques de souris n'exprimant plus P2X4 (P2X4KO) ont suggéré que P2X4 était capable d'affecter la synthèse et le transport de la dopamine ainsi que le nombre de récepteurs dopaminergiques, ce qui pourrait avoir un impact sur le contrôle moteur et la synchronisation sensorimotrice (Khoja et al., 2016).

La neuroinflammation est également une caractéristique principale de la MP (Doorn et al., 2014; Imamura et al., 2003; Mount et al., 2007; Nagatsu et al., 2000) et la microglie semble être un acteur clé de cette maladie neurodégénérative (Joers et al., 2017; Saijo and Glass, 2011). Comme discuté précédemment, le P2X4 microglial pourrait être impliqué dans les mécanismes neuro-inflammatoires communs aux maladies neurodégénératives. Néanmoins, l'implication de la microglie dans la physiopathologie de la MP n'est toujours pas claire et on ne sait toujours pas si les altérations microgliales sont la cause ou la conséquence de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Le et al., 1998).

vi. Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative mortelle caractérisée par la perte progressive et sélective des motoneurones (MN) spinaux et corticaux. Les causes de la SLA sont multifactorielles et les mécanismes sous-jacents à la dégénérescence sélective des MN sont encore inconnus.

Néanmoins, un lien a été établi entre la SLA et P2X4 (Volonte et al., 2016). En effet, dans des modèles de SLA utilisant des souris transgéniques présentant une mutation du gène SOD1, il a été révélé que les niveaux de P2X4 augmentaient dans les MN de la corne ventrale de la moelle épinière juste avant leur mort cellulaire. Aussi, la potentialisation de P2X4 par l'IVM a révélé avoir un double effet sur la survie du MN en fonction de la concentration en ATP, entraînant une action bénéfique à de faibles niveaux d'ATP, mais ayant des effets délétères à des concentrations plus élevés. L'effet neuroprotecteur de P2X4 sur les MN à de faibles niveaux d'ATP, est probablement dû à l'augmentation de la fonction P2X4 et/ou de la densité de surface cellulaire du récepteur (Andries et al., 2007).

La SLA provoque une neuroinflammation (Hernandez et al., 2010) et on observe une augmentation de l'expression de P2X4 dans la microglie activée dans la moelle épinière (D'Ambrosi et al., 2009; Liu and Wang, 2017). Plusieurs études ont mis en évidence aussi le rôle de P2X7 dans cette maladie (Cieslak et al., 2019), notamment via la modulation de l'autophagie (Fabrizio et al., 2017) ainsi que des processus neuro-inflammatoires médiés par la microglie qui peuvent être à la fois bénéfiques et délétères selon le stade de la maladie (Apolloni et al., 2013; Sluyter et al., 2017). Une interaction entre les voies de signalisation des récepteurs P2X4 et P2X7 pourrait également être impliquée dans les actions inflammatoires microgliales, une voie activant la signalisation de l'autre. Une telle diaphonie est déjà connue dans les macrophages, où les récepteurs P2X4 régulent les fonctions inflammatoires des récepteurs P2X7 (Kawano et al., 2012a).

Plus récemment, dans un modèle de SLA, une augmentation de l'expression de P2X4 a été observée dans le système nerveux périphérique, au niveau du nerf sciatique (Volonte *et al.*, 2016).

Bien que l'implication de P2X4 dans la pathogenèse de la SLA reste à être clairement établie, il semble être une cible thérapeutique potentielle pour faire face à cette maladie (Bertin, 2019).

vii. Sclérose en plaque

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie auto-immune chronique caractérisée par une infiltration massive de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, une démyélinisation et une perte axonale. Cette maladie neurodégénérative se caractérise également par une inflammation précoce qui est bénéfique et retarde dans un premier temps l'apparition de la neuro-dégénérescence, qui évolue ensuite de manière complexe au fur et à mesure que la maladie progresse. La phase régénérative initiale est due aux actions réparatrices des macrophages infiltrés et des microglies anti-inflammatoires (Dendrou et al., 2015). Dans un modèle de SEP, mimé par une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), il a été démontré que P2X4 était surexprimé dans les microglies et macrophages (Vazquez-Villoldo *et al.*, 2014) et semble jouer un rôle important. En effet, le blocage pharmacologique de P2X4 exacerberait les symptômes neurologiques tandis que sa potentialisation par l'IVM et la régulation positive de son expression sont toutes deux bénéfiques dans la SEP. De plus, la potentialisation de P2X4 par l'IVM augmenterait l'absorption et la dégradation de la myéline, étape clé de la remyélinisation. Sachant que l'activation de P2X4 dans la microglie induit la fusion de la membrane endolysosomale et l'acidification des lysosomes, mécanisme essentiel des voies phagocytaires, P2X4 pourrait contrôler la phagocytose de la myéline (Zabala et al., 2018). P2X4 contribuerait alors à la sécrétion et la biogenèse de la myéline *via* l'exocytose des lysosomes et favoriserait la myélinisation (Chen et al., 2012; Feldmann et al., 2011; Fois et al., 2018).

De plus, il a été révélé que la surexpression de P2X4 au niveau des cellules de Schwann favorisait la remyélinisation et donc pourrait potentiellement contrebalancer la démyélinisation des patients atteints de SEP (Su *et al.*, 2019).

viii. Troubles liés à l'alcool

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle de P2X4 dans le comportement induit par l'alcool (Davies *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 2014; Franklin *et al.*, 2015; Ostrovskaya *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2014; Yardley *et al.*, 2012). En effet, les récepteurs P2X4 sont exprimés dans des régions cérébrales impliquées dans le renforcement de la consommation d'alcool et d'autres drogues (Kimpel *et al.*, 2007) et seraient impliqués dans la régulation de la dopamine mésolimbique, actrice clé du système de récompense (Khoja *et al.*, 2016). La sous-expression de P2X4 lors d'une préférence à l'alcool confirme la corrélation entre l'expression de P2X4 et la préférence pour l'alcool (Franklin *et al.*, 2015; Kimpel *et al.*, 2007). Effectivement, le récepteur P2X4 permettrait de réguler la consommation d'alcool (Asatryan *et al.*, 2011) (Franklin *et al.*, 2015). L'alcool en lui-même est capable d'agir sur P2X4 en l'inhibant, en bloquant l'ouverture de son canal sans en affecter pour autant sa désactivation (Davies *et al.*, 2005; Ostrovskaya *et al.*, 2011). Ceci renforcerait par la même occasion la consommation d'alcool qui agit alors comme un modulateur allostérique positif, en utilisant les mêmes sites de liaison que ceux de l'IVM (Asatryan *et al.*, 2010).

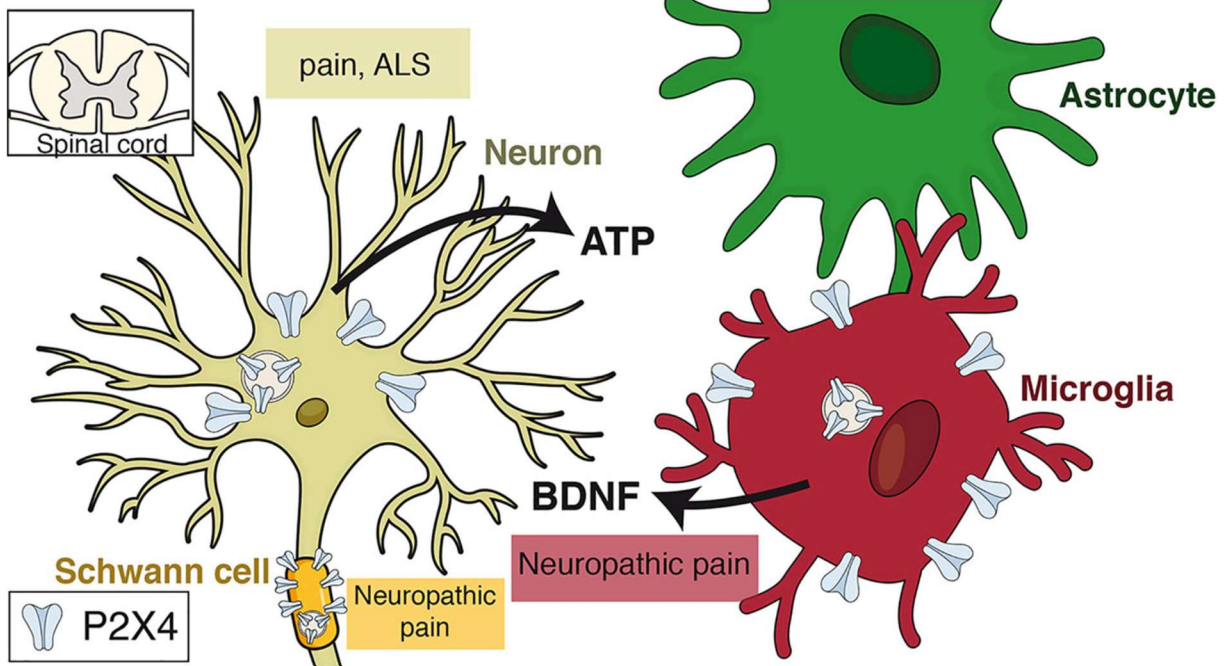
L'abus d'alcool est également connu pour favoriser la neuro-inflammation (Potula *et al.*, 2006) dans laquelle P2X4 joue un grand rôle dans plusieurs autres pathologies. La surexpression de P2X4 induite par l'abus de consommation d'alcool affecterait également la migration microgliale et la phagocytose (Gofman *et al.*, 2014).

ix. Troubles neuropsychiatriques

La dépression, les troubles bipolaires, la schizophrénie, l'hyperactivité avec déficit de l'attention et l'anxiété sont des troubles neuropsychiatriques dans lesquels l'homéostasie de la dopamine est altérée. Comme indiqué ci-dessus, P2X4 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie de la dopamine et dans la synchronisation sensori-motrice. Il existe de plus en plus de preuves que P2X4 joue un rôle essentiel dans les troubles psychiatriques (Bortolato *et al.*, 2013; Khoja *et al.*, 2019; Khoja *et al.*, 2016). Des études pharmacologiques et génétiques ont révélé que la potentialisation de P2X4 ou l'augmentation de sa densité à la surface dans les neurones excitateurs induisaient un comportement anxiolytique, voire même dépressif chez la souris (Bortolato *et al.*, 2013) (Bertin *et al.*, 2020).

Une autre étude a montré que la suppression de P2X4 prédispose les animaux à un comportement de type dépression chronique après un AVC (Verma *et al.*, 2017). Dans ce contexte, une étude récente a démontré que la potentialisation de P2X4 par l'ivermectine entraîne une hyperactivité dopaminergique et une perturbation du traitement de l'information en raison d'une perturbation potentielle de l'interaction entre les récepteurs P2X4 et dopaminergiques. Ces résultats suggèrent alors que les antagonistes P2X4 pourraient servir de nouveaux traitements antipsychotiques pour les troubles psychiatriques résultant de troubles de la synchronisation sensorimotrice liés à la perturbation de l'homéostasie de la dopamine (Khoja *et al.*, 2019).

A

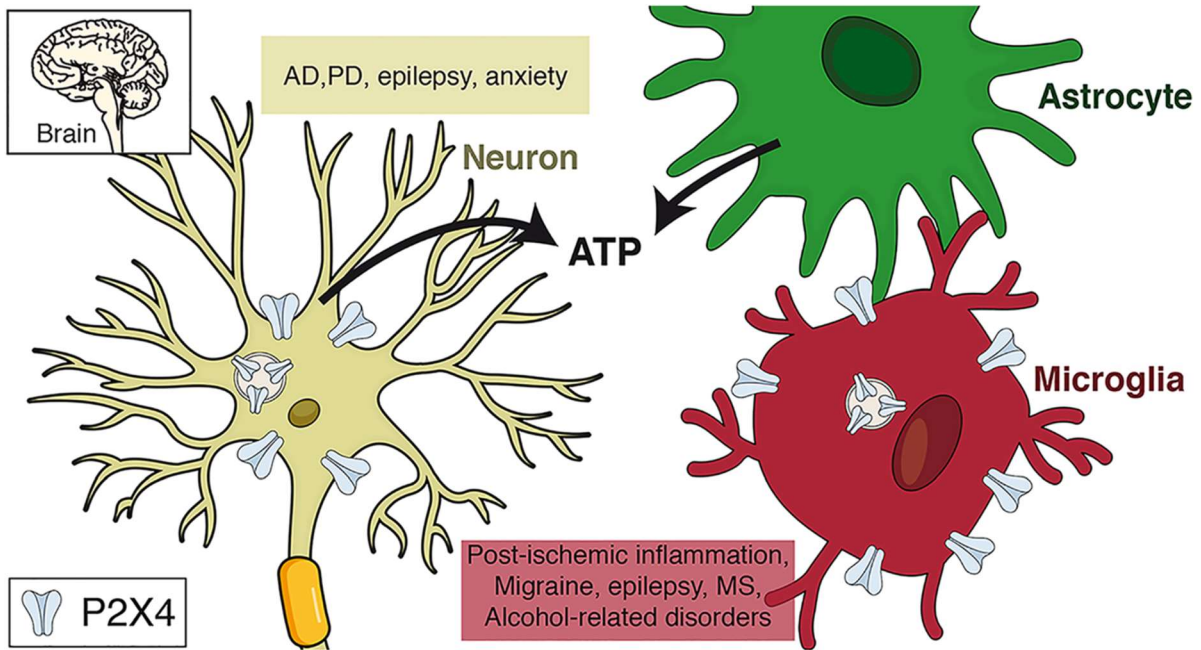


Increase of P2X4

Function of P2X4

Neuropathic pain	spinal microglia, sensory neurons, Schwann cells, SGC	release microglial BDNF and activate BDNF-TrkB-KCC2 pathway, spinal neuron hyperexcitability, tactile allodynia
Inflammatory pain	macrophages, sensory neurons, SGC	release of cytokines, release of BDNF by sensory neurons termini
ALS	spinal motoneurons, microglia, sciatic nerves	P2X4 potentiation: MN degeneration (high ATP) or neuroprotective effect (low ATP)

B



	Increase of P2X4	Function of P2X4
Post-ischemic inflammation	brain microglia, vascular endothelial cells	chemotaxis of microglia, release of cytokines upregulation of osteopontin (neuroprotective)
AD	hippocampal neurons	promote the toxic effect of beta-amyloid fragments increased P2X4: induced alteration of synaptic plasticity and memory deficits
Migraine	trigeminal nucleus caudalis microglia	microglial release of BDNF P2X4 potentiation: MN degeneration (high ATP), Increase p-ERK and CGRP release
Epilepsy	hippocampal neurons, stratum radiatum microglia	release of BDNF, neuronal hyperexcitability, cell death
MS	microglia, macrophages	release of microglial BDNF; Increase of myelin phagocytosis P2X4 potentiation: promotes remyelination
Alcohol-related disorders	dopaminergic neurons, microglia	ethanol induced P2X4 inhibition, reinforce alcohol intake/preference
PD	dopaminergic neurons	regulate DA homeostasis
Anxiety	forebrain neurons	increased P2X4: induced anxiolytic effects

Figure 7: Implication de P2X4 dans différentes pathologies

P2X4 est impliqué dans de nombreuses pathologies avec des implications spinales (A) ou cérébrales (B). Une expression de novo et/ou une augmentation du trafic à la surface du pool intracellulaire intervient dans de nombreuses pathologies du SNC au niveau de différents types cellulaires tels que les neurones, les microglies, les astrocytes, les oligodendrocytes ou encore les cellules de Schwann.

II. LE SYSTÈME SENSORIEL

Le système sensoriel correspond à l'ensemble des neurones qui traitent les informations sensorielles, provenant des cinq sens ou d'autres informations perçues par l'organisme. Il est composé de récepteurs sensoriels, de neurones sensoriels faisant partie du SNP et du SNC. Ils sont respectivement responsables de la détection d'un stimulus sensoriel, de la transmission de l'information sensorielle, de la perception et la modulation de cette information. L'information sensorielle peut être de nature nociceptive. Dans ce cas, on parle de nociception (Ellison, 2017; Renn and Dorsey, 2005).

A. La nociception

Le terme de nociception a été pour la première fois proposé par Charles S. Sherrington en 1906 et a ensuite été adopté par la communauté scientifique (Bessou and Perl, 1969; Burgess and Perl, 1967; Whitehorn and Burgess, 1973). Il est alors défini comme étant le processus physiologique menant à la détection consciente d'un stimulus dangereux réel ou potentiel (Smith and Lewin, 2009).

Le message sensoriel transmis est considéré comme étant nociceptif lorsque l'intensité du stimulus donnant lieu à ce message dépasse un certain seuil pouvant provoquer des dommages tissulaires. Un stimulus de faible intensité (non nocif) va ainsi donner lieu à une réponse sensorielle. Au-delà de ce seuil, le stimulus devient nocif et donne lieu à une réponse nociceptive (Smith and Lewin, 2009).

B. Détection de l'information nociceptive

L'information nociceptive est détectée par les terminaisons périphériques des neurones nociceptifs (ou nocicepteurs). Les nocicepteurs sont des neurones sensoriels primaires dont le corps cellulaire se situe dans les DRG pour le corps ou dans les ganglions du trijumeau pour la tête. Ce sont des neurones pseudo-unipolaires en T possédant un axone unique qui se divise

en 2 branches : la branche périphérique qui va détecter le stimulus au niveau des tissus cibles et la branche centrale qui va projeter l'information détectée à la corne dorsale de la moelle épinière (CDME). Ces 2 branches possèdent des extrémités similaires, équivalentes biochimiquement, qui peuvent envoyer et recevoir des informations sensorielles (Basbaum et al., 2009; Yam *et al.*, 2018). Lorsqu'elles envoient l'information vers le SNC, elles sont également appelées fibres afférentes primaires.

Les nocicepteurs sont capables de détecter les informations nociceptives grâce à différents récepteurs présents au niveau des terminaisons périphériques de leurs axones. Ces récepteurs sont capables de détecter des informations nociceptives de plusieurs modalités : mécanique, thermique et chimique (Basbaum *et al.*, 2009) (Figure 8). La plupart sont spécifiques d'une modalité néanmoins certains sont sensibles à plusieurs types de stimuli : ce sont des récepteurs polymodaux (Emery et al., 2016; Wang et al., 2018a).

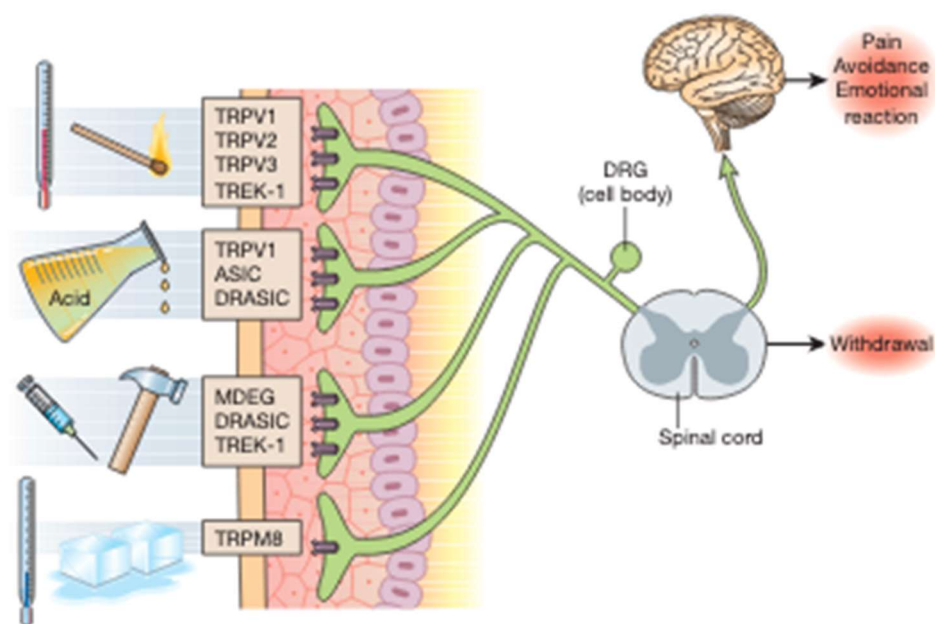


Figure 8: Détection du stimulus sensoriel

Les différents stimuli sont détectés en périphérie par des récepteurs sensoriels qui peuvent être ou non des récepteurs nociceptifs, présents au niveau des terminaisons libres des fibres afférentes primaires (Scholz and Woolf, 2002). Le stimulus peut être soit de nature mécanique, thermique au chaud, thermique au froid, ou de nature chimique. Certains récepteurs peuvent détecter des stimuli venant de plusieurs modalités. Ce sont des récepteurs polymodaux.

Les stimuli mécaniques nociceptifs, de fortes intensités, sont détectés par des mécanoccepteurs. Parmi eux, on peut compter les canaux ioniques sensibles à l'acide (ASIC), et plus particulièrement le récepteur ASIC3 (Mogil et al., 2005; Price et al., 2001), les récepteurs canaux à potentiel transitoire (TRP) TRPA1 (Kwan et al., 2009) et sensibles aux molécules de la famille des vanilloïdes (TRPV) TRPV4 (Suzuki et al., 2003), le canal PIEZO2 (Murthy et al., 2018) et le canal potassique TREK-1 (Alloui et al., 2006).

Les variations de température sont détectées par des thermorécepteurs qui appartiennent à la famille des TRP. Ils sont capables de détecter des variations de températures nociceptives froides (<20°C) grâce à l'expression de TRPM8 (<16°C) et chaudes (>40°C) grâce à l'expression notamment des canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV3 (Caterina et al., 1999) (Vandewauw et al., 2018).

Les stimuli chimiques activent les chémorécepteurs. Il existe plusieurs types de médiateurs chimiques tels que l'histamine qui sont libérés localement par des cellules immunitaires ou la capsaïcine, molécule exogène. Des changements de pH peuvent également activer ces récepteurs. Ils sont composés des récepteurs ASIC3, TRPA1 et TRPV1 (Jones et al., 2004; Price *et al.*, 2001; Tominaga et al., 1998; Ugawa et al., 2002). La plupart des chémorécepteurs sont des récepteurs polymodaux car ils sont également sensibles aux stimuli mécaniques et/ou thermiques (Davis et al., 1993).

La découverte et la caractérisation des récepteurs TRPV1, TRPM8 et PIEZO2 par D. Julius et A. Patapoutian a été récompensée par le prix Nobel de physiologie et de médecine 2021.

C. Transmission de l'information par les fibres afférentes primaires

Une fois l'information détectée, les nocicepteurs acheminent l'information vers la CDME qui va intégrer et encoder ces informations par le biais des fibres afférentes primaires. Elles sont caractérisées par leur morphologie (diamètre et myélinisation), leurs propriétés électrophysiologiques (seuil d'activation) et leur neurochimie (expression de peptides). Ainsi, 4 types ont été caractérisés : les fibres A α , A β , A δ et C (Millan, 1999; Todd, 2010) (figure 9).

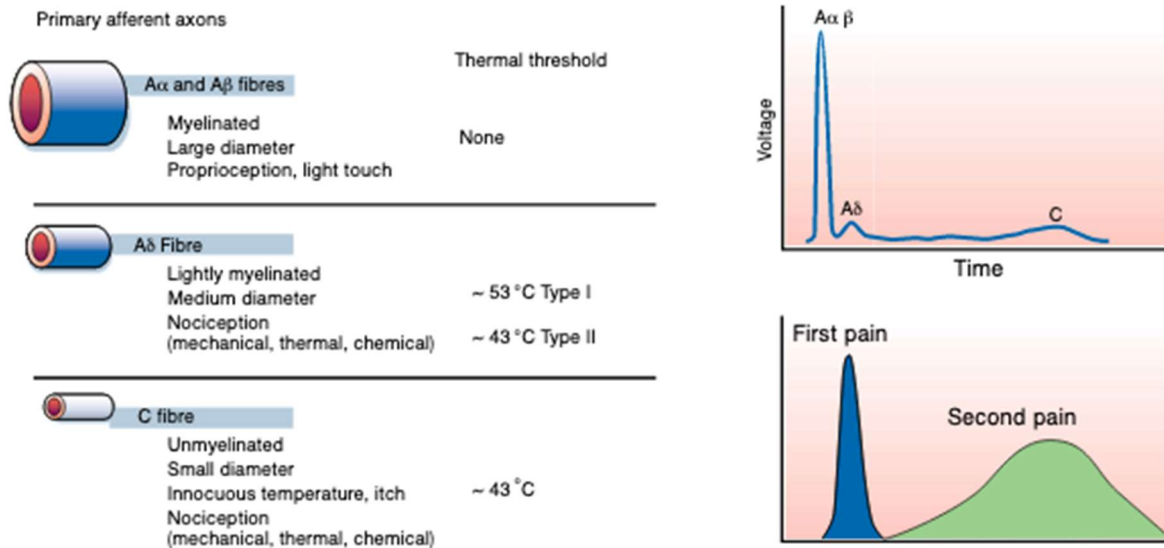


Figure 9: Caractérisation des fibres afférentes primaires

La transmission du signal nociceptif peut se faire via différents types de fibres afférentes primaires présentant des caractéristiques morphologiques différentes (Julius and Basbaum, 2001). Les fibres Aβ sont fortement myélinisées et ont un gros diamètre. Ce sont principalement des fibres non-nociceptives. Les fibres Aδ sont des fibres de moyen diamètres faiblement myélinisés. Les fibres C sont des fibres de petits diamètres non myélinisés. Les fibres Aδ et C sont des fibres nociceptives qui induisent respectivement la première réponse et la deuxième réponse à la douleur.

Les fibres Aα et Aβ sont des fibres de gros diamètre (6-12 μm) et sont fortement myélinisées, ce qui leur confère une grande vitesse de conduction des PA (30 à 100 m/sec). Elles transmettent les informations non nociceptives mécaniques de proprioception pour les Aα et du toucher pour les Aβ (Zeilhofer et al., 2012).

Une faible proportion de fibres Aβ peut également transmettre des informations nociceptives, dans des conditions pathologiques d’inflammation ou de douleur chronique (Djouhri and Lawson, 2004) (Woodbury et al., 2008).

Les fibres Aδ sont caractérisées par un diamètre moyen (1-5 μm). Elles sont faiblement myélinisées et possèdent une vitesse de conduction du message sensoriel modérée (12-30 m/sec). Ce sont des fibres nociceptives capables de détecter des stimuli nociceptifs de modalités mécanique, thermique ou chimique (Meyer and Campbell, 1981) (Treede et al., 1998) (Khasabov et al., 2001). Ainsi, elles permettent la transmission de la réponse aiguë, intense et localisée, première sensation de douleur, à la suite d’un stimulus nociceptif

(Handwerker and Kopal, 1993; Torebjork and Hallin, 1973; Treede et al., 1992). Les fibres A δ sont des fibres dites peptidergiques. Elles sont capables de sécréter centralement de la substance P, peptide caractéristique des neurones nociceptifs peptidergiques (Bae et al., 2015; Lawson et al., 1997).

Elles sont souvent divisées en deux types I et II (Treede *et al.*, 1998). Les fibres A δ de type I sont caractérisées par un seuil mécanique modérée, donc faiblement nociceptif, et par un seuil d'activation thermique élevée (>53°C). Les fibres A δ de type II se distinguent par un seuil d'activation mécanique élevé, venant de stimuli fortement nociceptifs, et d'un seuil thermique plus faible (>46°C) (Basbaum *et al.*, 2009; Julius and Basbaum, 2001; Yam *et al.*, 2018).

Certaines fibres A δ sont néanmoins capable de transmettre des informations mécaniques non nociceptives (Alvarez et al., 2000; Braz et al., 2014).

Les fibres C se distinguent des autres fibres par leur vitesse de conduction lente des PA (0,5-2m/sec), conséquence de leur non myélinisation et de leur petit diamètre (0,2-0,5 μ m). Ce sont des fibres nociceptives principalement polymodales (Caterina et al., 2000; McKemy et al., 2002; Tominaga *et al.*, 1998) et sont responsables de la transmission de la douleur secondaire qui est moins intense, plus tardive et qui dure plus longtemps que la douleur primaire détectée par les fibres A δ (Handwerker and Kopal, 1993; Torebjork and Hallin, 1973; Treede *et al.*, 1992). Les fibres C peuvent être peptidergiques ou non peptidergiques (Zeisel et al., 2018). Les fibres C peptidergiques sont capables de libérer, dans la ME, de la substance P et du CGRP (Snider and McMahon, 1998).

Certaines fibres C participent également à la transmission de stimuli mécaniques et thermiques non nociceptifs (Bessou and Perl, 1969). Elles sont appelées fibres C LTMR (low threshold mechanical receptor) (Zeilhofer *et al.*, 2012). Elles jouent un rôle crucial dans l'établissement de la douleur pathologique (Alvarez *et al.*, 2000; Braz *et al.*, 2014; Delfini et al., 2013; Francois et al., 2015; Seal et al., 2009).

D. Projection centrale de l'information

L'information transmise par les fibres afférentes primaires est envoyée vers le système nociceptif spinal dans la CDME. Ce dernier comprend des interneurons qui modulent localement l'information transmise et des neurones de projection qui vont véhiculer l'information reçue vers les centres supra-spinaux.

1) *Organisation anatomique et laminaire de la moelle épinière*

Chez les mammifères, la moelle épinière (ME) est divisée en 5 régions : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et coccygienne. Elle possède 2 renflements, l'un au niveau de la moelle cervicale qui permet le traitement des informations provenant des membres antérieurs, et l'autre au niveau de la moelle lombaire, qui supporte le traitement des informations venant des membres postérieurs. La ME se compose d'une partie interne, la substance grise (SG), composée des corps cellulaires des neurones centraux et des cellules gliales, et d'une partie externe, la substance blanche (SB), comprenant les axones ascendants et descendants du SN. La SG de la ME peut se diviser en corne dorsale, qui reçoit les informations sensorielles, en corne ventrale, qui véhicule les informations motrices vers la périphérie et en une zone intermédiaire, qui contient des interneurons qui intègrent les informations périphériques et descendantes du cerveau. La SG de la ME est également subdivisée en différentes laminae, suivant la classification initialement effectuée par Bror Rexed chez le chat. Cette classification se fonde sur les propriétés cyto-architecturales des neurones de la ME : densité, morphologie, taille des corps cellulaires et de l'arborisation dendritique (Rexed, 1952). Ainsi, la corne dorsale est composée des laminae I à VI, avec les laminae I et II correspondant aux couches superficielles, et la corne ventrale comprenant les laminae VII à IX. La lamina X entoure le canal de l'épendyme (Braz *et al.*, 2014; Zeilhofer *et al.*, 2012) (Figure 10).

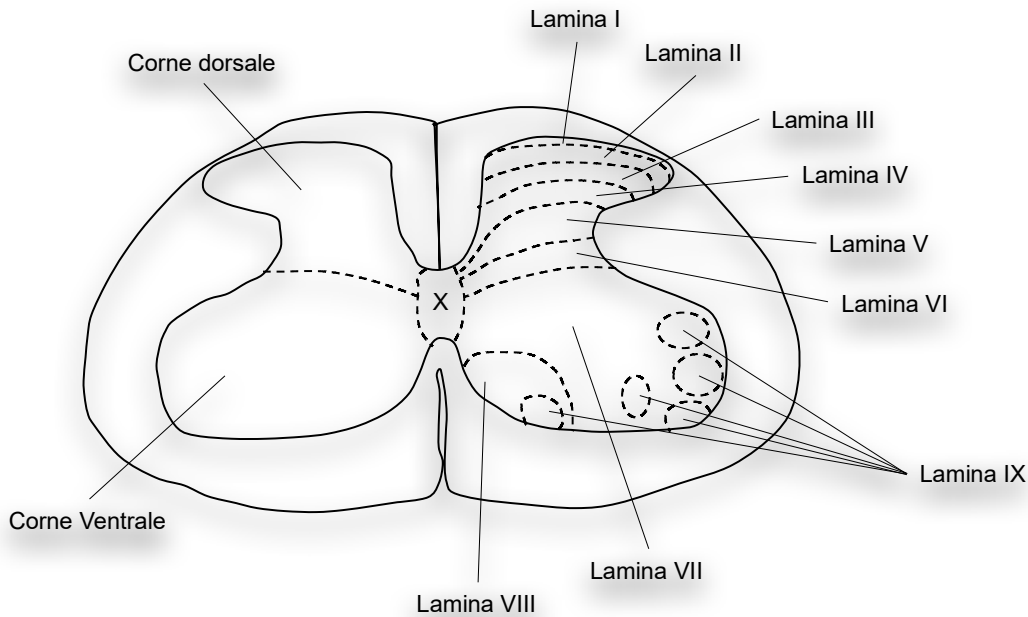


Figure 10: Représentation schématique d'une coupe transversale de moelle épinière

La substance grise de la moelle épinière est composée d'une corne ventrale et d'une corne dorsale toutes les deux divisées en laminae (Rexed, 1952).

La lamina I est constituée d'une fine couche de neurones. Ces neurones sont principalement des interneurones excitateurs et inhibiteurs et dans une faible proportion des neurones de projection. Ces neurones sont des neurones nociceptifs spécifiques polymodaux qui reçoivent les informations provenant des fibres A δ et des fibres C peptidergiques (Figure 11). Ils participent donc au traitement des informations sensorielles nociceptives.

La lamina II est composée d'interneurones excitateurs et inhibiteurs. Elle est souvent divisée en une partie externe (Ile), qui est innervée par les fibres C peptidergiques, et une partie interne (Ili), qui reçoit les informations nociceptives par les fibres C non peptidergiques (Figure 11). La lamina II joue également un rôle dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives.

Les laminae III et IV font partie des couches profondes de la CDME et intègrent l'information provenant des fibres myélinisées de type A β et A δ (Figure 11). Elles sont constituées d'interneurones.

Les laminae V et VI reçoivent des informations à la fois des fibres non nociceptives A β et des fibres nociceptives A δ et C (Figure 11). Elles sont constituées de neurones de projection polymodaux, qui reçoivent à la fois les informations non nociceptives et nociceptives. La lamina VI n'est présente qu'au niveau du renflement cervical et du renflement lombaire.

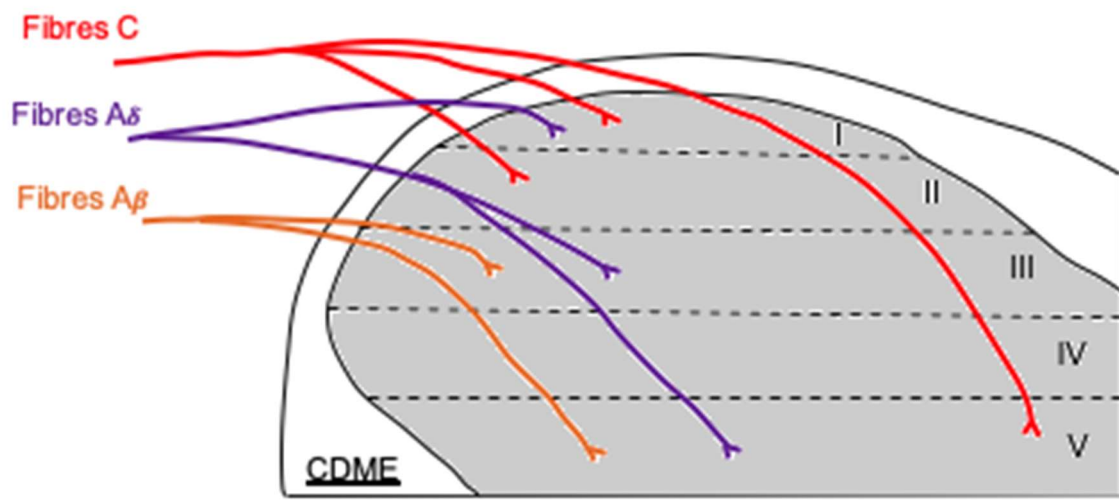


Figure 11: Projections centrales des fibres afférentes primaires

Les fibres A β (orange) projettent vers les laminae profondes de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nociceptives A δ (violet) projettent vers les neurones des laminae I, III et V. Les fibres C (rouge) projettent vers les neurones des laminae I, II et V (Adapté de Basbaum, 2009).

2) Les neurones de projection

Les neurones de projection sont des neurones excitateurs qui représentent environ 10% de la population neuronale de la CDME. Ils reçoivent directement ou indirectement les informations sensorielles provenant de la périphérie et projettent ensuite vers les centres supra-spinaux. Les neurones de projection sont retrouvés dans toutes les laminae de la CDME, à l'exception de la lamina II qui ne contient que des interneurones (Todd, 2010).

Dans la lamina I, la plupart des neurones de projection sont dits nociceptifs spécifiques car ils ne répondent qu'aux stimuli nociceptifs transmis par les fibres A δ et C. Ils expriment le récepteur NK1, récepteur de la substance P qui est libérée par les fibres afférentes nociceptives (Littlewood et al., 1995).

Il existe également des neurones de projection définis comme nociceptifs non spécifiques qui répondent principalement aux stimuli nociceptifs, transmis par les fibres A δ et C, mais aussi, dans une plus faible mesure, aux stimuli non nociceptifs, transmis par les fibres A β . Ils sont présents en petite quantité au niveau des laminae I, II et IV à VI. Dans les couches IV à VI, ils représentent la majorité des neurones nociceptifs et sont appelés neurones Wide Dynamic range (WDR). Ils sont donc capables d'identifier et de coder l'intensité de la stimulation reçue et ainsi, de différencier un stimulus nociceptif d'un stimulus non nociceptif. Cela se traduira par différentes fréquences de décharges des neurones. Un stimulus nociceptif entraînera alors une plus grande fréquence de décharge, c'est à dire l'établissement de plus de potentiel d'action qu'un stimulus non nociceptif. En plus des informations périphériques, les WDR reçoivent également des informations intra-spinales transmises par les interneurones et supra-spinales envoyées par les voies descendantes (Beenhakker et al., 2007; Chu et al., 2004; Wang et al., 2005). Les neurones WDR sont alors considérés comme étant un bon reflet du fonctionnement du réseau sensoriel de la CDME. Dans ce manuscrit, l'activité de ces neurones sera étudiée lors de nos approches électrophysiologiques.

3) *Les interneurones*

Les interneurones sont les neurones majoritaires de la CDME (90%). Ils sont présents dans les laminae I, II et III où ils jouent un rôle dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives (Graham et al., 2007; Todd, 2010; Zeilhofer *et al.*, 2012). Il existe deux types d'interneurones : excitateurs et inhibiteurs (Polgar et al., 2013; Polgar et al., 2003; Todd, 1990).

i. Les interneurones excitateurs

Les interneurones excitateurs représentent 75% des interneurones de la CDME. Ils utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Landry et al., 2004). Ils sont impliqués dans l'activation indirecte des neurones de projection et dans le rétrocontrôle positif des fibres afférentes primaires. Il existe plusieurs types d'interneurones excitateurs, classés selon leur localisation,

morphologie, et profil de décharge : les interneurones verticaux, centraux et radiaux excitateurs.

Les interneurones verticaux excitateurs (Ramon y Cajal, 1909-1911) sont une sous-population hétérogène, retrouvés principalement dans la lamina II et en plus faible quantité dans la lamina III. Ils se différencient morphologiquement par une arborisation dorso-ventrale allant de la lamina I à la lamina III et électrophysiologiquement par un profil de décharge variable mais jamais transitoire (Gobel and Falls, 1979). Ils modulent l'activité des neurones de la lamina I (Heinke et al., 2004).

Les interneurones centraux excitateurs (Ramon y Cajal, 1909-1911) sont localisés dans la lamina III. Ils présentent une arborisation rostro-caudale et dorso-ventrale et possèdent un profil de décharge de PA de type transitoire/phasique (Grudt and Perl, 2002). Ils reçoivent des afférences des fibres nociceptives C non peptidergiques et A δ et modulent l'activité des interneurones verticaux excitateurs (Benarroch, 2016).

Les interneurones radiaux excitateurs sont localisés au niveau de la jonction entre les laminae III et II (Dickie et al., 2019; Grudt and Perl, 2002). Ils sont caractérisés par une arborisation dendritique multidirectionnelle sans orientation prédominante et présentent un profil de décharge temporellement retardée à la suite d'une stimulation (Bicknell and Beal, 1984; Polgar et al., 2008). Ils reçoivent principalement des projections des fibres A β et agissent sur les autres interneurones excitateurs (Benarroch, 2016).

ii. Les interneurones inhibiteurs

Les interneurones inhibiteurs sont les interneurones minoritaires de la CDME et ne représentent que 25%. Ils utilisent le GABA et/ou la glycine comme principal neurotransmetteur et ont pour rôle de réguler les informations nociceptives afin d'éviter qu'elles ne deviennent aberrantes et donc pathologiques en agissant sur les neurones de projections et les autres interneurones (Heinke *et al.*, 2004; Todd, 1990; Yasaka et al., 2010). Tout comme les interneurones excitateurs, il existe plusieurs types d'interneurones

inhibiteurs dans la ME : les interneurones centraux et verticaux inhibiteurs et les interneurones en ilots.

Les interneurones centraux inhibiteurs sont localisés dans la lamina II et présentent une arborisation rostro-caudale et dorso-ventrale. Ils se distinguent des interneurones centraux excitateurs de par leur profil de décharge de PA de type tonique. Ils reçoivent des afférences des fibres A β et participent à l'inhibition des interneurones excitateurs et des fibres projetant sur ces derniers (Grudt and Perl, 2002) (Lu and Perl, 2005).

Les interneurones verticaux inhibiteurs sont principalement retrouvés dans la lamina IIe et en plus faible quantité dans la lamina Iii. Ils présentent une arborisation dorso-ventrale qui s'étend de la lamina I à la lamina III. Tout comme les interneurones verticaux inhibiteurs, leur profil de décharge peut être tonique ou phasique mais jamais transitoire (Heinke *et al.*, 2004; Maxwell et al., 2007). Ils inhibent également les interneurones excitateurs et les neurones de projection.

Enfin, les interneurones en ilots (Gobel, 1975) sont retrouvés dans la lamina IIe et répondent uniquement à des stimuli nociceptifs (Bennett et al., 1980). ils se caractérisent par une forte arborisation dendritique sur le plan rostro-caudal, associée à un faible déploiement sur l'axe dorso-ventral et médio-latéral (Schoenen, 1982). Malgré une similitude morphologique avec les cellules centrales inhibitrices, les cellules en ilots se distinguent par une arborisation plus importante. Sur le plan électrophysiologique, elles possèdent un profil de décharge tonique (Abraira et al., 2017; Alba-Delgado et al., 2015; Boyle et al., 2019; Melnick, 2008; Smith et al., 2015; Smith et al., 2016).

E. Transmission supra-spinale

Les informations non-nociceptives cutanées tactiles et proprioceptives conscientes sont envoyées par les neurones de projection vers le thalamus et le cortex sensoriel, en empruntant la voie des cordons dorsaux. Les informations proprioceptives inconscientes provenant des muscles et des articulations affèrent vers le cervelet (Peirs and Seal, 2016).

Les informations nociceptives sont transmises vers le cerveau en utilisant trois voies principales (Figure 12).

La voie spinothalamique est la voie nociceptive la plus importante dans la perception de la douleur. Elle est composée de neurones de projection localisés dans les laminae I, IV et V qui projettent les informations nociceptives vers le noyau ventro-postéro-latéral (VPL) du thalamus, puis vers le cortex pariétal somesthésique S1 et S2 (Almeida et al., 2004). Cette voie est importante pour la sensori-discrimination de la douleur car elle est responsable de la sensation consciente de la douleur aiguë. Elle est nécessaire à l'envoi des informations permettant de définir la nature, la durée, la localisation et l'intensité de la douleur (Basbaum *et al.*, 2009; Chung et al., 1986; Reddi et al., 2013; Willis and Westlund, 1997).

La voie spino-réticulo-thalamique est composée de neurones de projections des laminae I et V. Ces neurones transmettent les informations nociceptives vers les noyaux de la formation réticulée du tronc cérébral, puis vers le noyau ventro-postéro-médian (VPM) du thalamus. Cette voie est impliquée dans la composante émotionnelle et affective de la douleur (Basbaum *et al.*, 2009; De Broucker et al., 1990; Haber et al., 1982; Millan, 1999).

La voie spino-mésencéphalique est constituée uniquement d'axones de neurones de projections de la lamina I, qui sont uniquement nociceptifs. Ces axones transmettent l'information vers la substance grise périaqueducale (PAG) et l'aire parabrachiale. La transmission sur l'aire parabrachiale, permet la connexion rapide avec l'amygdale qui est impliquée dans la composante aversive de la douleur (Bernard and Besson, 1990). La voie spino-mésencéphalique projette également sur le noyau prétectal qui de par son contact avec les colliculi supérieurs entraîne le réflexe locomoteur visuel à la suite d'une stimulation. Cette voie est donc associée au caractère aversif de la douleur et est responsable de certains effets

autonomes, cardiovasculaires, motivationnels et affectifs et est impliquée dans le recrutement des voies descendantes (Basbaum *et al.*, 2009; Rees and Roberts, 1993).

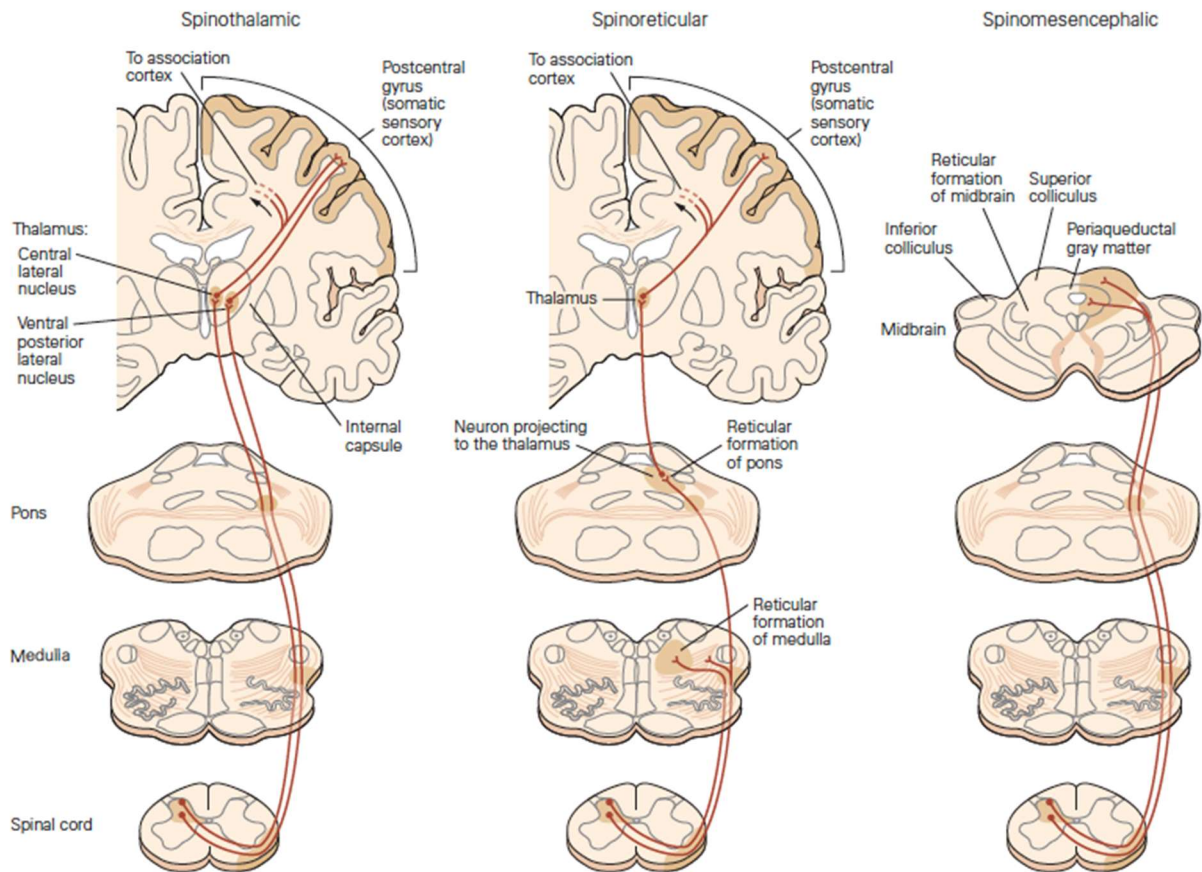


Figure 12: Les voies supra-spinales ascendantes nociceptives

Le message nociceptif atteint la corne dorsale de la moelle épinière et est envoyé vers les centres supra-spinaux en empruntant les voies spino-thalamique, spino-réticulo-thalamique et spino-mésencéphalique (Kandel, 2013).

F. Douleur aiguë ou douleur physiologique

Selon l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), la douleur est « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ». La douleur comprend les dimensions sensori-discriminative, émotionnelle, cognitive et comportementale.

La dimension sensori-discriminative est définie par l'intensité du stimulus qui, lorsqu'il dépasse un certain seuil devient douloureux et est transmise aux fibres afférentes primaires

nociceptives A δ et C. La douleur induit alors un comportement d'évitement et/ou de protection. La douleur peut être physiologique (ou aigüe) ou pathologique lorsqu'elle est anormalement prolongée. On parle alors de douleur chronique (Bouhassira *et al.*, 2008; Treede *et al.*, 2015).

La douleur aigüe ou physiologique est une douleur dite utile car elle a pour but de prévenir l'organisme d'un danger imminent ou existant. Elle agit alors comme un système d'alarme. La douleur aigüe est une douleur dite essentielle, elle ne persiste pas et s'arrête lorsqu'il n'y a plus de stimulus ou lors de la guérison du traumatisme. Elle peut cependant se transformer en douleur chronique si la cause n'est pas traitée. Elle s'accompagne d'un réflexe de retrait si le stimulus est externe, on parle alors de douleur nociceptive somatique ou de repli, si le phénomène est interne on parle de douleur nociceptive viscérale (Costigan *et al.*, 2009; Ellison, 2017; Orr *et al.*, 2017).

A la suite d'un dommage périphérique, les cellules immunitaires périphériques vont libérer localement des médiateurs inflammatoires tels que la substance P, des protons extracellulaires, de la bradykinine, de l'histamine, du NGF, du CGRP ou encore de l'ATP qui vont activer des récepteurs ionotropiques et métabotropiques (canaux TRP, ASIC, P2X, NK1, ...) situés sur les fibres afférentes primaires, dans le but de réparer les tissus ou nerf impactés. (Figure 13). Ceci va activer les fibres afférentes primaires nociceptives qui transmettront l'information au SNC. Des modifications à court et moyen terme de l'expression et/ou de l'activité des récepteurs qu'elles contiennent peut entraîner une augmentation de l'excitabilité de ces dernières. C'est la sensibilisation périphérique.

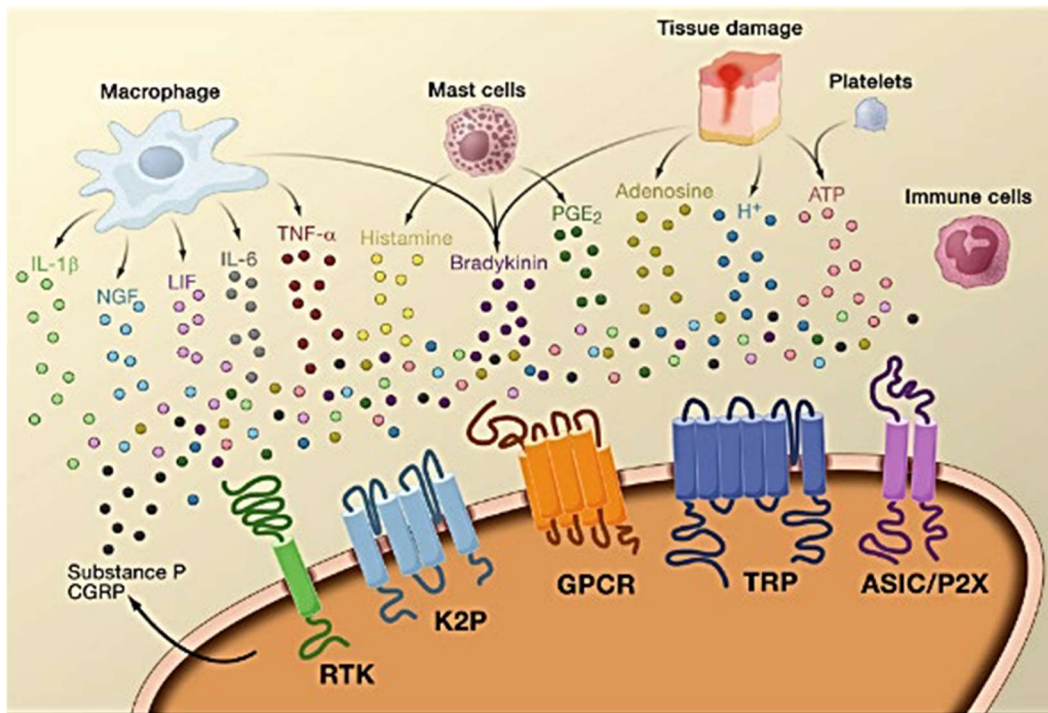


Figure 13: Sensibilisation inflammatoire périphérique

Suite à une lésion tissulaire, les cellules immunitaires et les tissus endommagés libèrent de nombreuses substances capables de moduler la transmission du signal nociceptif (Basbaum et al., 2009).

Les fibres excitées vont alors libérer du glutamate dans la ME qui va agir sur les récepteurs glutamatergiques AMPA et générer des courants post-synaptiques excitateurs (CPSE). La sommation de ces derniers peut induire l'émission de PA qui activent les différents neurones spinaux (Latremoliere and Woolf, 2009; Woolf and Salter, 2000). Cette hyperactivation glutamatergique est l'un des mécanismes responsable de la sensibilisation centrale.

Le système sensoriel nociceptif est un système plastique et peut donc être modulé en condition physiologique par des phénomènes de plasticité à court terme (PCT) et à long terme (PLT). La plasticité à court terme est représentée par un changement de l'efficacité synaptique qui perdure jusqu'à quelques minutes à la suite du stimulus. Elle est caractérisée par une facilitation (ou Wind up) ou une désensibilisation de la synapse. Le Wind up est un mécanisme physiologique (Sandkuhler, 2009) décrit comme étant une augmentation progressive de la décharge des neurones nociceptifs de la CDME en réponse à des stimuli répétés à basse fréquence des fibres C et une post décharge prolongée (Mendell and Wall, 1965). Le Wind up dépend de l'activation des récepteurs NMDA et du recrutement des canaux calciques de type

L qui induisent une sommation temporelle des CPSE (Fossat et al., 2007; Morisset and Nagy, 2000; Radwani et al., 2016; Aby et al 2019, IJMS). Ce phénomène de Wind up est retrouvé au niveau des neurones de projection et notamment au niveau des neurones WDR présents dans les laminae 4 et 5.

Ce système est également capable de plasticité à long terme. La libération de glutamate par les fibres afférentes primaires, à la suite d'un stimuli nociceptif, induit l'activation des récepteurs NMDA post-synaptiques qui sont physiologiquement silencieux en présence de magnésium (inhibiteur des récepteurs NMDA). Cela va induire une entrée de calcium ce qui facilitera, via l'activation des voies de signalisation calcium-dépendantes MAPK et PKC, la transmission du message nociceptif au cerveau par les voies supra-spinales (Basbaum *et al.*, 2009; Latremoliere and Woolf, 2009; Lu et al., 1999; Woolf and Salter, 2000).

Au niveau de la CDME, plusieurs mécanismes sont mis en place afin de moduler la transmission nociceptive afin qu'elle ne devienne pas chronique. Le premier se réfère à la théorie du portillon (Figure 14). Elle correspond à la capacité des fibres non nociceptives A β d'activer les interneurons inhibiteurs de la lamina II, permettant l'inhibition des fibres nociceptives A δ et C et ainsi une hypoalgésie. Au contraire, une forte activation des fibres A δ et C conduit à une inhibition de ces interneurons et donc une hyperalgésie. Sans altération de ce système, l'hypoalgésie prévaut du fait de la conductance rapide des fibres A β (Baba et al., 2003; Kaneko and Hammond, 1997; Melzack and Wall, 1965; Petitjean et al., 2015; Sivilotti and Woolf, 1994).

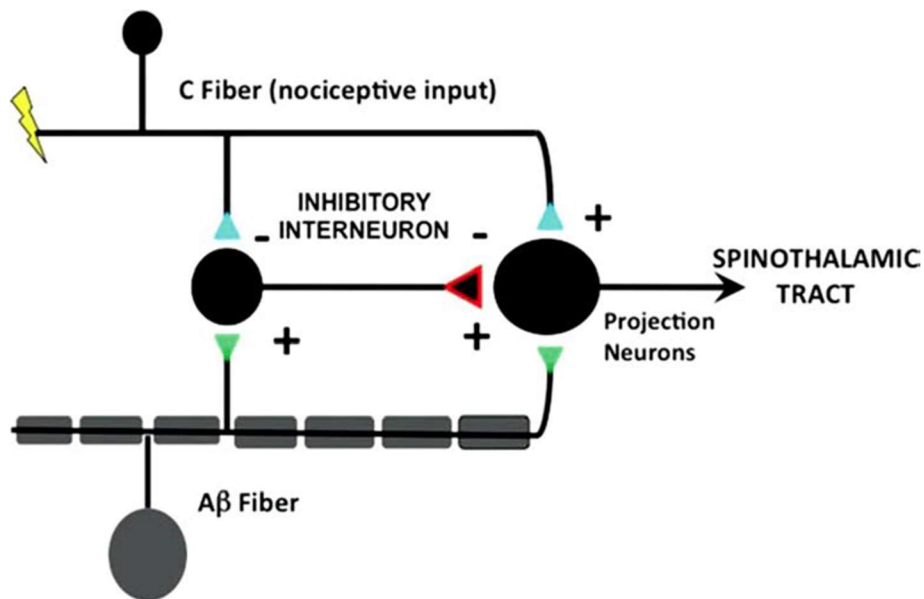


Figure 14: La théorie du portillon

Un stimulus nociceptif active les fibres A β non nociceptives qui activent les interneurones inhibiteurs de la lamina II. Ces derniers inhibent les neurones de projections. L'activation des fibres nociceptives A δ et C participent à la désinhibition de ces neurones de projections (Sufka, 2002).

Le deuxième mécanisme mis en place est le contrôle inhibiteur diffus (CIDN). Il correspond à l'effet analgésique produit dans l'ensemble de l'organisme à la suite d'un stimulus nociceptif localisé. La liaison de composés endogènes (enképhaline, endorphine et dynorphine) avec des récepteurs des opioïdes présents au niveau du PAG et de la lamina II induit une inhibition des neurones de la CDME et ainsi une analgésie (de Resende et al., 2011; Fields, 2004; Lima et al., 2017; Marinelli et al., 2002).

G. La douleur chronique

La douleur chronique est souvent considérée comme étant une pathologie en elle-même mais est souvent la comorbidité de nombreuses autres pathologies telles que le diabète, les cancers ou encore les maladies neurodégénératives. Au total, la douleur chronique touche en moyenne 1 adulte sur 5, soit 10 millions de français. C'est le premier motif de consultation dans les services d'urgences ou chez le médecin généraliste, mais 2 patients sur 3 ne sont pas soulagés par leur traitement. Aussi, 70% des malades souffrant de douleur chronique présentent des répercussions psycho-sociales (troubles du sommeil, anxiété, dépression, troubles cognitifs). Ceci en fait donc un sujet de recherche majeur afin de trouver des

traitements appropriés (Bair et al., 2003; Bouhassira *et al.*, 2008; Breivik et al., 2006; Breivik et al., 2013; Serrie, 2015; van Hecke et al., 2013; Williams et al., 2003).

La douleur devient pathologique quand elle persiste (plus de 3 mois consécutifs de sensation douloureuses quotidiennes chez l'homme) et perd donc son rôle physiologique d'alarme. La douleur chronique est donc le reflet du fonctionnement aberrant des circuits nociceptifs. Elle est définie par la haute autorité de santé, comme étant « un syndrome multidimensionnel et lorsque la douleur est exprimée, quelles que soient sa topographie et son intensité, persiste ou est récurrente au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale présumée, répond insuffisamment au traitement, ou entraîne une détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient ».

Tout comme la douleur dite physiologique, la douleur chronique est due à l'activation des fibres nociceptives A δ et C, mais elle est aussi parfois accompagnée par l'activation de fibres A β qui deviennent anormalement nociceptives. Ces fibres peuvent être soit activées par des stimuli nociceptifs, mais aussi en l'absence de stimulus. C'est la douleur spontanée.

La douleur chronique peut être caractérisée par deux « symptômes » en lien avec le stimulus appliqué : l'allodynie et l'hyperalgésie. L'allodynie se traduit par une réponse nociceptive causée par un stimulus normalement non nociceptif. L'hyperalgésie est caractérisée par une réponse nociceptive exacerbée face à un stimulus normalement faiblement nociceptif. Elle reflète une augmentation du nombre de PA générés à la suite du stimulus (Figure 15).

L'allodynie et l'hyperalgésie sont donc des marqueurs du dysfonctionnement du système sensoriel.

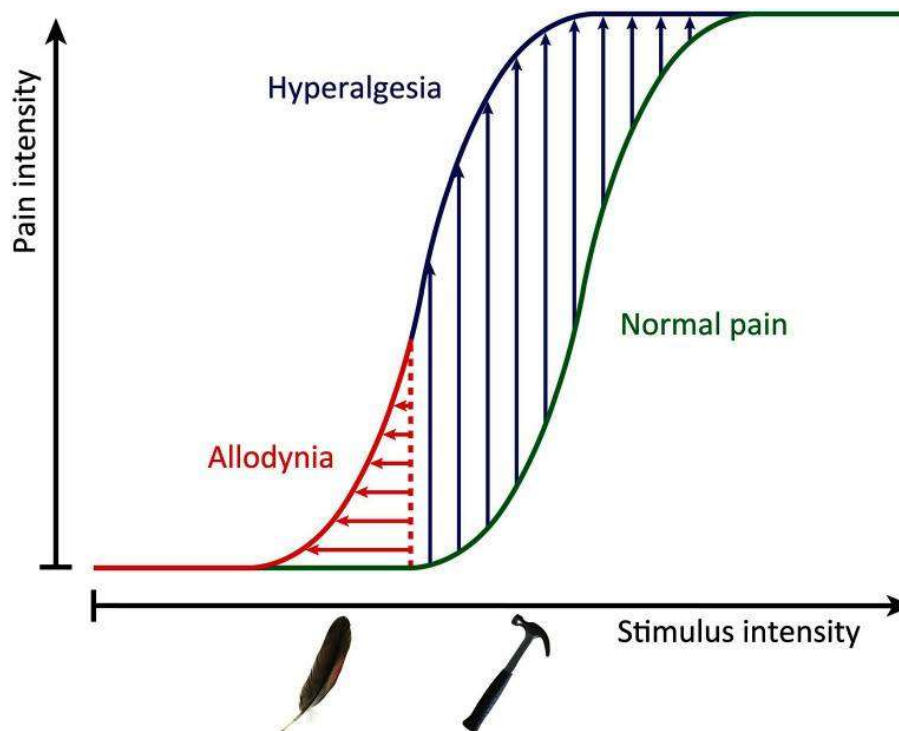


Figure 15: Caractérisation de la douleur

En condition physiologique, un stimulus atteint un certain seuil, devient nociceptif et engendre une réponse nociceptive. En condition pathologique, un stimulus normalement non nociceptif devient nociceptif (baisse du seuil). C'est l'allodynie. Aussi, un stimulus nociceptif peut engendrer une réponse nociceptive exacerbée. C'est l'hyperalgésie (Lolignier et al., 2015).

Il est considéré que la douleur chronique peut avoir deux origines : elle peut être soit inflammatoire, résultant d'un tissu lésé ; soit neuropathique, ayant pour origine une lésion nerveuse. Bien qu'ayant des origines différentes, ces 2 types de douleurs se regroupent sur certains mécanismes communs. En effet, les douleurs neuropathiques et inflammatoires se rejoignent et sont caractérisées par une hyperactivation glutamatergique aberrante et non réversible. Cela est lié à un phénomène de désinhibition centrale qui est la perte du contrôle inhibiteur glycinergique et GABAergique exercé par les interneurons (Schoffnegger et al., 2008). En effet, en condition pathologique, les interneurons inhibiteurs localisés dans la lamina II de la CDME présentent un défaut de libération de GABA produit par une augmentation des transporteurs du GABA (GAT), qui augmente la recapture du GABA par les neurones. La diminution de libération GABAergique est aussi corrélée avec la diminution de l'expression de l'enzyme de synthèse du GABA, l'acide glutamique décarboxylase 65 (GAD65). Tous ces phénomènes de désensibilisation centrale induisent une augmentation de la

transmission du message nociceptif et une hyperalgésie (Basbaum *et al.*, 2009; Melzack and Wall, 1965) (Gwak and Hulsebosch, 2011) (Petitjean *et al.*, 2015) (Polgar *et al.*, 2008).

Malgré ces mécanismes communs, les douleurs chroniques inflammatoire et neuropathique présentent également certaines différences.

1) La douleur inflammatoire

Dans le cas de douleur inflammatoire chronique, le phénomène de sensibilisation périphérique perd son rôle protecteur. Une libération aberrante de marqueurs inflammatoires et des modifications transcriptionnelles des récepteurs nociceptifs présents sur les fibres afférentes primaires sont responsables de l'amplification du message inflammatoire, qui va induire le recrutement de ces fibres, non seulement localement, mais aussi au niveau des sites voisins. Leur seuil d'activation va alors diminuer et se traduira par une allodynie et une hyperalgésie (Ciaramella, 2019; Costigan *et al.*, 2009; Yam *et al.*, 2018). L'inflammation est également maintenue par le biais de l'activation antidromique des fibres nociceptives qui vont elles-mêmes libérer des médiateurs inflammatoires (substance P, CGRP, ATP) sur le site du stimulus. C'est l'inflammation neurogénique (Julius and Basbaum, 2001). Certains de ces médiateurs inflammatoires étant également de puissants vasodilatateurs, ils vont engendrer un afflux de cellules immunitaires sur le site de lésion et donc une libération de molécules inflammatoires encore plus importante. A noter que, certaines fibres nociceptives C sont silencieuses en condition physiologique et vont être également activées en condition pathologique car elles auront été préalablement sensibilisées par les médiateurs inflammatoires persistants (Feng *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 1995; Prato *et al.*, 2017). Cela va également participer à l'augmentation du message nociceptif en cas de stimulation inflammatoire.

Les phénomènes inflammatoires induisent la libération par les fibres afférentes primaires de prostaglandine E2 (PGE2) dans la ME, qui active les récepteurs EP2 présents à la membrane des interneurons excitateurs et des neurones de projection des couches superficielles de la

CDME. L'activation de ces récepteurs va engendrer la phosphorylation du récepteur glycinergique GlyR α 3 et le rendre inactif. Cela va donc participer à la désinhibition centrale (Ahmadi et al., 2002; Harvey et al., 2004; Reinold et al., 2005).

La douleur chronique inflammatoire est également accompagnée au niveau central par une plasticité à court terme (PCT) exacerbée, caractérisée par l'augmentation de l'amplitude du wind up généré par les neurones WDR. Cette altération du wind up serait un marqueur de l'amplification du signal. En effet, la désinhibition centrale observée en condition d'inflammation chronique permet entre autres la levée de l'inhibition d'interneurones exprimant la neurotensine, impliqué dans l'inhibition du wind up des neurones de projection de la lamina 1 qui projettent vers le noyau parabrachial (Hachisuka et al., 2018). Cette levée d'inhibition observée en condition pathologique pourrait alors contribuer à l'amplification du wind up dans les cas de douleur inflammatoire (Aby et al., 2018).

2) *La douleur neuropathique*

L'IASP définit la douleur neuropathique comme étant « une douleur liée à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel ». Elle se caractérise par une lésion du SNP ou du SNC et par une douleur persistante même après la réparation de la lésion (Bouhassira *et al.*, 2008; Yam *et al.*, 2018). Cette lésion peut être causée par des traumatismes, du diabète, des infections, des cancers et leurs traitements, des accidents vasculaires cérébraux ou encore dans des cas de maladies neurodégénératives (Costigan *et al.*, 2009; Ellison, 2017; Yam *et al.*, 2018). La douleur neuropathique se caractérise par une augmentation de la sensibilité centrale et périphérique vis à vis de stimuli douloureux et non douloureux (Ellison, 2017).

En condition neuropathique, on observe une augmentation de libération de médiateurs inflammatoires et de neurotransmetteurs par les cellules lésées induisant une hausse de la sensibilisation périphérique (Basbaum *et al.*, 2009). Ces médiateurs vont alors entraîner la sensibilisation des nocicepteurs en augmentant l'excitabilité de leurs fibres nerveuses.

Au niveau central, on observe un rôle prépondérant des cellules gliales et notamment de la microglie. En effet, une lésion nerveuse induit la libération d'ATP qui va stimuler la microglie et augmenter son nombre (Kohno et al., 2018) par le biais de récepteurs membranaires et notamment les récepteurs purinergiques P2X4, P2X7 et P2Y12 (cf. Partie 3). L'activation microgliale entraîne alors la libération de BDNF et d'un éventail de cytokines qui contribuent à la sensibilisation centrale et qui va favoriser l'hyperexcitabilité neuronale au niveau de la CDME menant à l'hyperalgésie et à l'allodynie (Basbaum *et al.*, 2009; Donnelly et al., 2020). Contrairement à la douleur inflammatoire chronique, très peu d'études se sont intéressées au phénomène de PCT et de wind up au niveau des neurones de projection en condition neuropathique. Cependant une étude récente a observé que l'amplitude du wind up serait diminuée en condition de douleur neuropathique basée sur un modèle de ligature de nerf sciatique (SNL) (Radwani *et al.*, 2016). Ceci reste néanmoins à confirmer.

III. DOULEUR ET P2X4

A. P2X4 et douleur neuropathique

1) *Première découverte et rôle clé de la microglie*

Malgré le rôle clé des neurones dans l'établissement de la douleur neuropathique, les cellules gliales ne sont pas en reste, et en particulier la microglie.

Dans les années 1970, il a été observé qu'en condition neuropathique à la suite d'une lésion de nerf périphérique (LNP), la microglie était soumise à des changements morphologiques, passant d'un état quiescent sous forme ramifiée à un état activé amiboïde, représenté par une hypertrophie de son corps cellulaire et la rétractation de ses prolongements (Gilmore and Skinner, 1979). Cette activation microgliale et les études relatant l'importance de la signalisation purinergique au niveau de la microglie ont mené à la découverte d'un lien de cause à effet entre la microglie et le récepteur P2X4 dans la douleur neuropathique.

En 2003, Tsuda et ses collaborateurs ont montré que l'injection intrathécale de TNP-ATP (antagoniste non sélectif P2X1 à P2X4) et d'oligonucléotides anti-sens afin de réduire l'expression de l'ARNm de P2X4, prévenaient l'allodynie mécanique dans un modèle neuropathique chez le rat induit par ligature du nerf sciatique. Ils ont ensuite observé que la neuropathie induisait une augmentation de l'expression de P2X4 dans la microglie de la CDME ipsilatérale, qui était corrélée avec la diminution de la sensibilité mécanique jusqu'à 14 jours après la lésion du nerf sciatique. De plus, ils ont remarqué, chez des rats sains, que l'administration intrathécale de microglies activées, préalablement stimulées *in vitro* par de l'ATP, entraînait une allodynie mécanique importante. Cette dernière étant également bloquée par le TNP-ATP. Ces résultats proposaient donc pour la première fois que l'augmentation de l'expression de P2X4 dans la microglie activée de la CDME, causée par la neuropathie, était nécessaire et suffisante au développement de l'allodynie tactile (Tozaki-Saitoh et al., 2019; Tsuda *et al.*, 2003).

De nombreuses autres études ont ensuite confirmé ces résultats en utilisant de nouveaux outils pharmacologiques, comme des antagonistes sélectifs de P2X4 (Matsumura *et al.*, 2016)

et des outils génétiques. L'utilisation de la souris transgénique P2X4 KO (délétion du gène P2X4 dans toutes les cellules exprimant P2X4) a permis de renforcer l'idée que l'augmentation de l'expression des récepteurs P2X4 microgliaux était nécessaire au développement de la douleur neuropathique (Tsuda *et al.*, 2009b; Ulmann *et al.*, 2008) (Tsuda *et al.*, 2009a). En outre, l'activation microgliale dans la CDME observée lors d'une neuropathie n'est pas modifiée chez les souris P2X4 KO indiquant donc que l'augmentation de P2X4 dans la microglie n'est pas nécessaire à l'activation microgliale (Ulmann *et al.*, 2008).

2) Mécanismes

i. Activation de P2X4 microglial et libération de BDNF

Lors d'une neuropathie, les microglies s'activent et induisent une augmentation de P2X4 à leur surface (Toyomitsu *et al.*, 2012). L'activation de P2X4 par l'ATP extracellulaire induit une réponse biochimique en activant la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) qui va phosphoryler p38MAPK (Jin *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 2012b; Lu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018b). Cette phosphorylation conduit alors à la synthèse et la libération par exocytose de BDNF par la microglie (Figure 16) (Liu *et al.*, 2018; Trang *et al.*, 2009; Ulmann *et al.*, 2008). L'utilisation de souris BDNF KO conditionnelles, chez lesquelles le BDNF a été supprimé spécifiquement dans la microglie, montre également que le BDNF microglial est nécessaire à l'induction de l'allodynie mécanique et donc à l'établissement de la douleur neuropathique (Sorge *et al.*, 2015).

Outre la libération de BDNF P2X4-dépendante, la neuropathie mène également à une libération de cytokines inflammatoires par la microglie, telles que IL1 β et TNF α , qui contribuent à la modulation de l'excitabilité neuronale (Inoue and Tsuda, 2018; Ji *et al.*, 2014). L'IL1 β agit sur les neurones de la CDME et augmente l'amplitude de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique via la phosphorylation des récepteurs glutamatergiques NMDA et la diminution de l'inhibition GABAergique (Clark *et al.*, 2015; Kawasaki *et al.*, 2008; Reeve *et*

al., 2000; Viviani et al., 2003). Le TNF α augmente rapidement la transmission glutamatergique dans la CDME sans changer la réponse GABA/glycine (Kawasaki *et al.*, 2008).

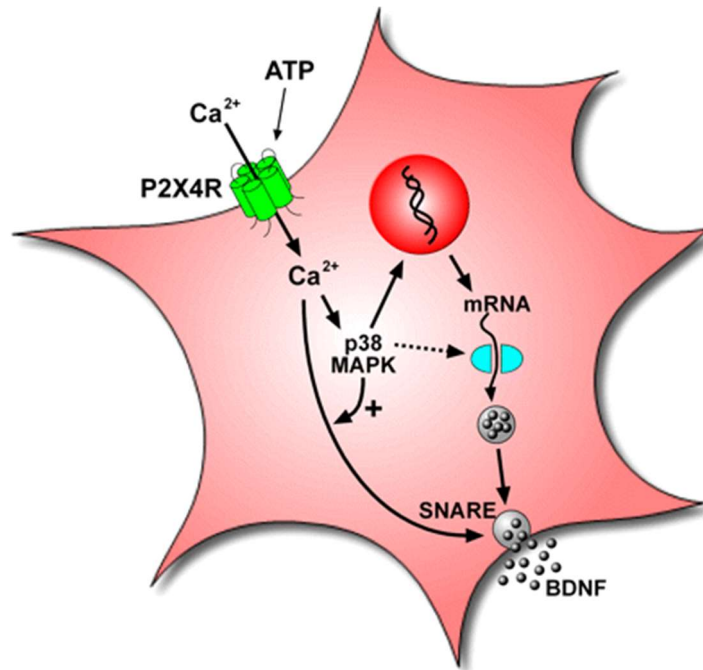


Figure 16: Libération P2X4-dépendante de BDNF par la microglie en condition neuropathique
 L'activation de P2X4 par l'ATP extracellulaire engendre un flux entrant de calcium dans la microglie, ce qui entraîne la phosphorylation de p38-MAPK. Ce dernier favorise la synthèse et la libération exocytotique par les vésicules à cœur dense de BDNF (Trang *et al.*, 2009).

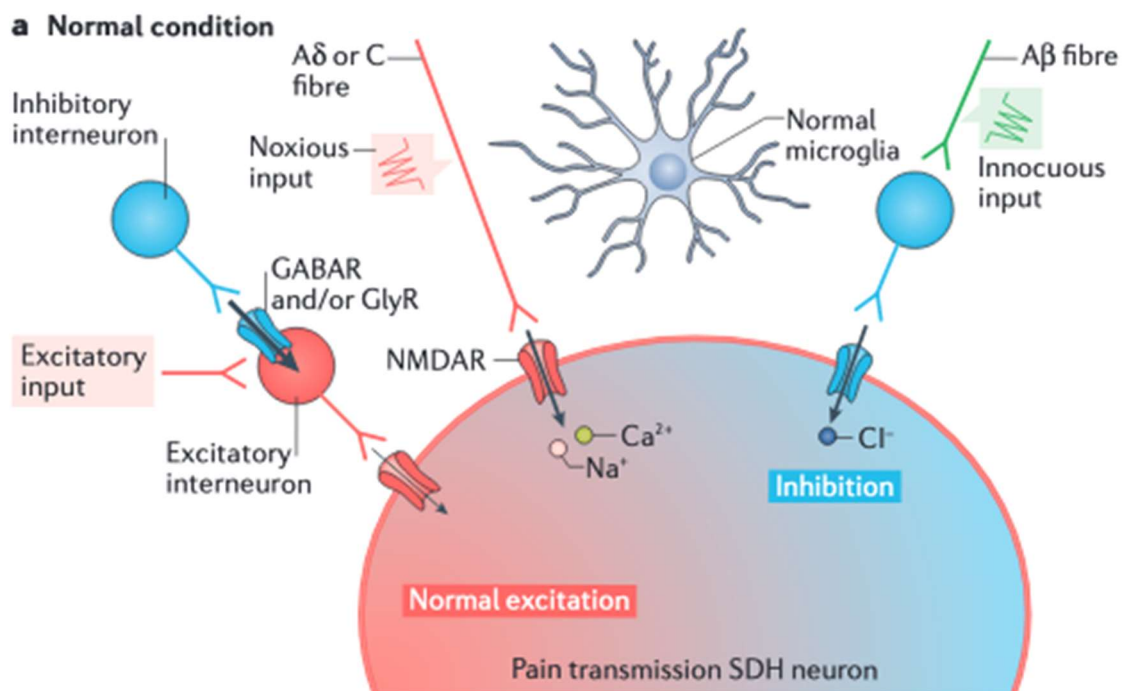
ii. TrkB, KCC2 et hyperactivité neuronale

Une fois libéré dans la CDME par la microglie, le BDNF se fixe sur son récepteur tropomyosine kinase B (TrkB) qui est exprimé à la surface des neurones de projection de la CDME et au niveau des terminaisons des fibres afférentes primaires (Keller *et al.*, 2007) (Coull *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2007; Ulmann *et al.*, 2008).

L'activation du récepteur TrkB va alors activer différentes protéines kinases telles que les MAPK, les PI3K et PLC γ 1. Ces trois voies sont impliquées dans l'inhibition du facteur de transcription CREB, qui contrôle la transcription du co-transporteur potassique et chlorure KCC2. Ainsi, l'activation de TrkB par le BDNF microglial P2X4-dépendant diminue l'expression de KCC2, transporteur qui maintient le gradient chlore transmembranaire, nécessaire à l'hyperpolarisation induite lors de l'activation des récepteurs-canaux GABA_A et glycine, qui sont perméables aux ions chlorures (Coull *et al.*, 2005; Coull *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2007).

L'inhibition de KCC2 provoque une augmentation du chlore intracellulaire, ce qui va diminuer le gradient chlorure, voire l'inverser. Ainsi, l'activation des récepteurs GABA et/ou glycine va diminuer l'hyperpolarisation ou induire une dépolarisation neuronale, provoquant une augmentation de l'excitabilité neuronale des neurones de projection de la CDME (Coull *et al.*, 2005; Coull *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2013; Lee and Prescott, 2015; Mapplebeck *et al.*, 2019). En condition de douleur neuropathique, l'augmentation des récepteurs P2X4 microgliaux via la cascade de signalisation BDNF-TrkB-KCC2 contribue donc à l'hyperexcitabilité des neurones de la ME. Ceci se traduit par une augmentation de la transmission de messages nociceptifs (Inoue and Tsuda, 2018) (Figure 17).

L'activation du récepteur TrkB par le BDNF microglial augmente également l'activité des récepteurs NMDA (Hildebrand *et al.*, 2016). En effet, l'activation de la voie de signalisation PI3K du récepteur TrkB provoque la phosphorylation de la Tyrosine-1472 de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA en augmentant l'activité de la tyrosine kinase Fyn (Abe *et al.*, 2005) et en diminuant l'activité tyrosine phosphatase STEP61 (Dedek *et al.*, 2019). Ce mécanisme, qui est à la fois visible chez des modèles murins et chez l'homme (Dedek *et al.*, 2019), contribue donc également à l'excitation anormale des neurones de projections de la CDME et aux comportements douloureux.



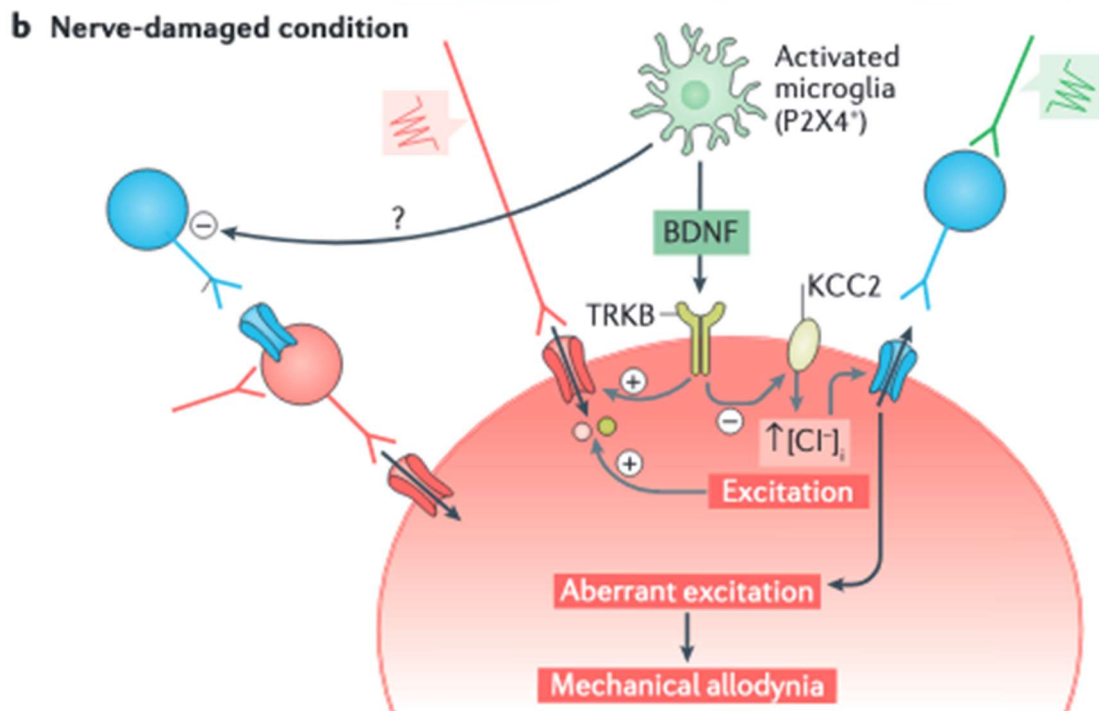


Figure 17: Implication du récepteur P2X4 microglial en condition normale et neuropathique

(a) En condition normale, des stimuli douloureux évoquent un potentiel d'action transmis par les fibres afférentes A δ et C et excitent les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) via les neurones glutamatergiques. Les interneurons inhibiteurs de la CDME inhibent les interneurons excitateurs qui innervent les neurones de projections. Des stimuli non nociceptifs, transmis par les fibres afférentes A β innervent des interneurons inhibiteurs qui activent les récepteurs GABAergiques des neurones de projection et entraînent une inhibition.

(b) Une lésion nerveuse active la microglie de la CDME et stimule le P2X4 microglial présent à sa surface. L'activation de P2X4 entraîne une synthèse et libération de BDNF qui en se fixant sur son récepteur TrkB inhibe KCC2 et active les récepteurs NMDA. L'inhibition de KCC2 induit un shift du gradient chlore des récepteurs GABA, ce qui conduit à une dépolarisation et donc une hyperexcitabilité neuronale qui est amplifiée par l'activation des récepteurs NMDA. L'hyperexcitabilité résultante de la transmission de la douleur dans les neurones contribue à l'hypersensibilité mécanique (Inoue and Tsuda, 2018).

iii. Facteurs régulant la transcription de P2X4

En condition physiologique, le récepteur P2X4 est peu exprimé dans la microglie, alors qu'en condition neuropathique, après une LNP, son expression y est augmentée. Il a été montré que les facteurs de transcription IRF8, IRF5 et MAFB contribuaient à cette régulation à la hausse (Holtman et al., 2017; Inoue and Tsuda, 2018; Masuda et al., 2020) (Figure 18).

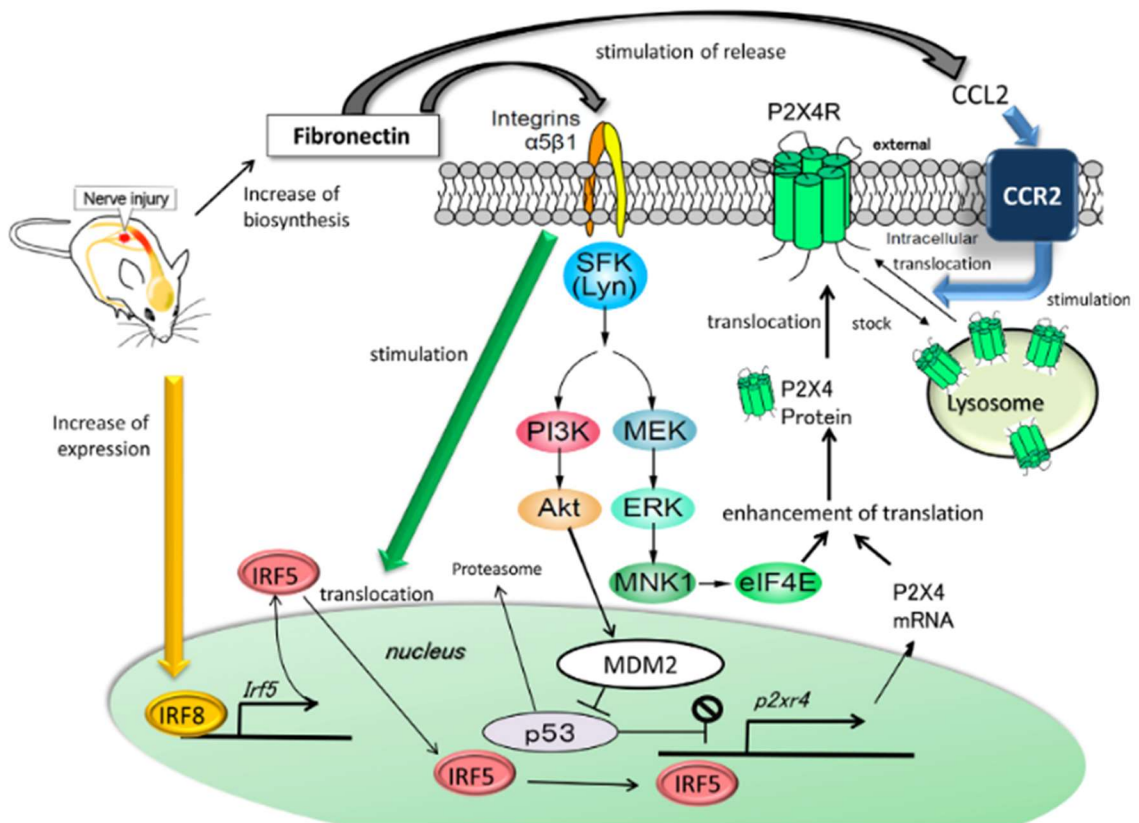


Figure 18: Facteurs régulant la transcription et le trafic en surface de P2X4 en condition neuropathique.

Une lésion de nerf périphérique induit l'expression de fibronectine qui augmente la transcription de P2X4 par l'activation de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et son trafic à la surface en stimulant la libération de CCL2. Cette lésion mène également à l'augmentation de l'expression d'IRF8 qui favorise la synthèse d'IRF5 qui conduit à la synthèse de P2X4 (Inoue, 2019).

Il a tout d'abord été observé qu'IRF8 était surexprimé spécifiquement dans la microglie et pas dans les astrocytes et les neurones de la CDME en cas de neuropathie (Masuda et al., 2012). La diminution de l'expression de IRF8 dans la ME à l'aide d'ARN interférants (siRNA) ou sa suppression en utilisant des souris IRF8 KO, a montré qu'IRF8 était nécessaire à l'établissement de l'allodynie tactile et à la suppression de l'augmentation de P2X4 à la suite d'une LNP, établissant un lien entre l'expression de P2X4 et IRF8 en condition neuropathique. Ce lien fut alors confirmé *in vitro*, en montrant que l'injection virale d'IRF8 dans des microglies en culture induisait l'expression de P2X4 (Masuda *et al.*, 2012). Néanmoins, IRF8 n'agit pas directement sur l'expression de P2X4. En effet, IRF8 régule la transcription d'IRF5 en se fixant sur son promoteur, puis IRF5 se fixe à son tour sur le promoteur du gène *p2rx4* et augmente ainsi sa transcription (Masuda et al., 2014). IRF8 et IRF5 sont donc tous deux nécessaires à l'augmentation de la synthèse *de novo* de P2X4 en condition neuropathique (Masuda *et al.*, 2014; Masuda *et al.*, 2012).

MAFB est un facteur de transcription également impliqué dans le maintien du profil de transcription de la microglie chez l'adulte (Matcovitch-Natan et al., 2016; Tozaki-Saitoh *et al.*, 2019). Bien que son expression ne soit pas spécifique de la microglie, après une LNP, l'expression de MAFB augmente uniquement dans la microglie et modulerait l'expression de P2X4 microglial. Effectivement, la suppression de MAFB, à l'aide de siRNA, ou l'utilisation de modèle transgénique MAFB KO, prévient aussi l'augmentation de P2X4 dans la microglie et le développement de l'allodynie tactile à la suite d'une neuropathie. MAFB est donc aussi impliqué dans le développement des douleurs neuropathiques P2X4-dépendantes. Néanmoins son implication directe ou indirecte n'est pas encore établie (Tozaki-Saitoh *et al.*, 2019).

La fibronectine est une molécule de la matrice extracellulaire dont l'expression est également augmentée dans la CDME à la suite de l'induction d'une neuropathie (Nasu-Tada et al., 2006; Tsuda et al., 2008a). Elle participerait également à l'augmentation de l'expression de P2X4 et de son trafic en surface dans la microglie. L'activation du récepteur des intégrines $\alpha 5\beta 1$ par la fibronectine, via l'activation de la voie de signalisation Lyn (famille des kinases SFK), active les voies PI3K-Akt, qui stimule l'expression d'ARNm de P2X4 et MAPK, qui augmentent la

production de protéines P2X4 (Figure 18) (Tsuda *et al.*, 2008a; Tsuda *et al.*, 2009b; Tsuda *et al.*, 2008b).

La fibronectine participe également à l'augmentation de l'expression de P2X4 en stimulant la translocation d'IRF5 dans le noyau de la microglie, qui pourra alors se fixer au promoteur du gène *p2rx4* et ainsi augmenter la traduction de P2X4 (Masuda *et al.*, 2014). La fibronectine est aussi essentielle au trafic en surface de P2X4 en augmentant la libération de chimiokines.

Les chimiokines sont des petites molécules sécrétrices qui jouent un rôle dans la pathogenèse des douleurs chroniques au niveau du SNC et du SNP. En effet, comme évoqué précédemment, la fibronectine participe à l'augmentation de la libération de la chimiokine CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2) par la microglie (Figure 18). Le CCL2 se fixe alors sur son récepteur CCR2 (Abbadie *et al.*, 2009), présent au niveau de la membrane plasmique de la microglie et va stimuler le trafic à la membrane du P2X4 lysosomal dans la microglie (Qureshi *et al.*, 2007; Toyomitsu *et al.*, 2012). Ainsi, en condition neuropathique, la libération de fibronectine induit l'augmentation de CCL2 qui favorise le trafic en surface de P2X4 et augmente l'allodynie tactile (Abbadie *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007a).

La chimiokine CCL21 est exprimée dans les neurones des DRG et est transportée et libérée dans la CDME par les fibres afférentes primaires. Il a été suggéré que cette chimiokine était également nécessaire à l'augmentation de l'expression de P2X4 et à l'hypersensibilité mécanique provoquée par une neuropathie. Cependant, la délétion de CCL21 dans la CDME ne provoque pas de changement morphologique ou de la prolifération de la microglie ni ne change sa prolifération. CCL21 contribuerait donc à la douleur neuropathique par des mécanismes P2X4-dépendants sans changement d'activation de la microglie dans la CDME (Biber *et al.*, 2011).

Le colony stimulating factor 1 (CSF1) est un médiateur crucial de l'activation microgliale (Guan *et al.*, 2016; Okubo *et al.*, 2016). Dans des conditions de douleurs neuropathiques, il a été observé une augmentation de CSF1 dans les neurones des DRG qui est ensuite transporté et libéré par les fibres afférentes primaires, dans la CDME. La fixation de CSF1 sur son récepteur CSF1R, exprimé sur la membrane plasmique des microglies, induit une prolifération microgliale et une hypersensibilité douloureuse (Guan *et al.*, 2016). Le CSF1 est suffisant et nécessaire pour l'activation de la microglie spinale après une LNP. Aussi, CSF1 médierait

l'augmentation de P2X4 dans la microglie mais ne supprimerait l'hypersensibilité mécanique que durant la deuxième phase de douleur. Le CSF1 semble donc être un acteur de la douleur neuropathique dépendante de P2X4 mais pas durant la phase de douleur aiguë (Guan *et al.*, 2016).

iv. D'où vient l'ATP qui active les récepteurs P2X4 microgliaux ?

Dans les cas de douleurs neuropathique, la quantité d'ATP extracellulaire augmentée dans la CDME via la libération d'ATP par exocytose est dépendante des transporteurs vésiculaires de nucléotides (VNUT) (Masuda *et al.*, 2016; Sawada *et al.*, 2008). En effet, l'utilisation de souris VNUT KO conditionnelles, mimant la délétion de VNUT dans les neurones de la CDME, semble montrer que la nociception basale n'est pas altérée mais que la libération d'ATP extracellulaire et l'hypersensibilité mécanique après une neuropathie sont atténuées (Kato *et al.*, 2017; Masuda *et al.*, 2016). Ceci laisse alors penser que les neurones de la CDME et non les neurones sensoriels primaires, la microglie ou les astrocytes, seraient la source de libération d'ATP extracellulaire qui activerait les récepteurs P2X4 de la microglie et une allodynie tactile en condition neuropathique. Comme évoqué précédemment, au sein de la CDME, plusieurs types de neurones sont présents tels que des neurones de projections et des interneurones excitateurs et inhibiteurs. La délétion de VNUT spécifiquement dans les interneurones inhibiteurs n'entraîne pas d'augmentation d'ATP extracellulaire ni d'allodynie tactile chez la souris ayant eu une LNP. Ceci induit que la libération d'ATP VNUT-dépendante par les interneurones inhibiteurs serait importante dans l'établissement de la douleur neuropathique en agissant sur les P2X4 microgliaux (Masuda *et al.*, 2016).

3) Implication de P2X4 dans la périphérie

Au sein du système nerveux périphérique, si l'expression de l'ARNm codant P2X4 a été détectée depuis longtemps dans les neurones des DRG, et plus particulièrement les neurones nociceptifs possédant des corps cellulaires de petit diamètre (Collo *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2013; Toulme *et al.*, 2010), l'expression du récepteur P2X4 fonctionnel dans les neurones sensoriels a été mise en évidence bien plus récemment (Lalisse *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2019). En outre, une étude suggère que le récepteur P2X4 y serait surexprimé en condition de douleur neuropathique (Ying *et al.*, 2017). Bien qu'il existe encore peu d'évidences à ce sujet, la présence des récepteurs TrkB sur la membrane des neurones de moyen et gros diamètre des DRG, qui produisent et libèrent également le BDNF en condition neuropathique, laisse ainsi présager que la voie de signalisation P2X4-BDNF-TrkB pourrait également intervenir au niveau des DRG en condition neuropathique (Kobayashi *et al.*, 2008; Obata *et al.*, 2006). D'ailleurs, la réalisation d'une LNP chez une souris conditionnelle BDNF KO, qui n'exprime plus le BDNF spécifiquement dans les neurones des DRG, montre une diminution de l'allodynie mécanique 5 jours après la lésion indiquant la contribution du BDNF neuronal des DRG dans la chronicité et le maintien de la douleur neuropathique (Sikandar *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2006). On remarque également une augmentation de CCL2 dans les neurones sensoriels primaires nociceptifs des DRG (White *et al.*, 2005; Zhang and De Koninck, 2006), qui participe, dans la CDME, à l'augmentation du trafic de P2X4 à la surface de la microglie. On peut alors émettre l'hypothèse que lors d'une neuropathie, le CCL2 pourrait augmenter P2X4 à la surface des neurones nociceptifs, provoquant la libération de BDNF et sa fixation sur le récepteur TrkB. Cela engendrerait *in fine* une hyperexcitabilité des neurones sensoriels, qui participerait au maintien de l'hyperexcitabilité des neurones de la moelle épinière. De nombreuses études seront donc nécessaires afin de conforter ou de réfuter cette hypothèse.

L'établissement de la neuropathie par LNP augmente également la communication neurones-glie et glie-glie, en augmentant les jonctions serrées qui lient les SGC aux neurones et entre elles (Hanani *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016; Spray *et al.*, 2019). Cette augmentation induit la libération de médiateurs inflammatoires et d'autres modulateurs qui contribuent également à l'hyperexcitabilité neuronale et l'hypersensibilité douloureuse (Hanani and Spray, 2020). Ce rôle des SGC coïncide également avec l'augmentation de l'expression de P2X4 dans les SGC

qui entourent les neurones nociceptifs en condition neuropathique (Kobayashi *et al.*, 2013; Kushnir *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2019; Ying *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2018). Cependant, il est difficile de distinguer la membrane plasmique des neurones et celle des SGC de par le faible écart entre les deux (quelques nanomètres). Des études microscopiques plus poussées restent à être menées pour confirmer la présence de P2X4 sur la membrane plasmique de l'un, de l'autre ou des deux types cellulaires.

En périphérie, une étude récente a montré qu'en condition neuropathique P2X4 dans les cellules de Schwann jouait un rôle bénéfique dans la remyélinisation et la réparation du nerf sciatique lésé. De plus, le blocage pharmacologique de P2X4 dans ces mêmes cellules entravait également la récupération fonctionnelle (Su *et al.*, 2019).

L'ATP libérée par les kératinocytes aide également la transmission d'un stimulus mécanique ou thermique, de forte ou faible température, à travers P2X4 présent au niveau des terminaisons périphériques des fibres afférentes primaires (Moehring *et al.*, 2018; Sadler *et al.*, 2020).

Les cellules immunitaires jouent également un grand rôle dans la douleur neuropathique au niveau périphérique. En effet, après une LNP, les macrophages qui expriment également P2X4 s'accumulent dans les DRG, ou au niveau du site de lésion et participent au développement de la douleur neuropathique (Cobos *et al.*, 2018; Shepherd *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2020). Les mécanismes mis en place restent cependant à être élucidés.

4) Dimorphisme sexuel

Jusqu'à récemment, les études sur les douleurs chroniques et la plupart des études comportementales chez les animaux n'étaient effectuées que chez les mâles, laissant de côté un éventuel dimorphisme sexuel. Concernant la douleur neuropathique, la différence observée entre les mâles et les femelles est débattue mais certains arguments récents

suggèrent des différences mécanistiques dans l'établissement de cette douleur entre les mâles et les femelles (Figure 19).

Le premier argument en faveur d'un dimorphisme sexuel dans la douleur chronique concernait l'activation microgliale. En effet, il a été observé que l'activation des récepteurs TLR4, récepteurs spécifiques de la microglie et marqueurs de son activité, n'engendrait un comportement douloureux que chez les mâles et pas chez les femelles (Sorge et al., 2011). Cependant, plusieurs études suivantes ont démontré que l'inhibition de la microglie par la minocycline (Barragan-Iglesias et al., 2014), la délétion de la microglie et des macrophages (Peng et al., 2016), ou le retrait génétique de différentes molécules microgliales (Batti et al., 2016; Gu et al., 2016; Staniland et al., 2010), supprimaient l'hypersensibilité causée par la neuropathie, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Ceci montrant donc que la microglie était nécessaire à l'établissement de la douleur neuropathique à la fois chez les mâles et chez les femelles, sans dimorphisme sexuel.

L'expression de P2X4 dans la microglie pourrait également être différente en fonction du sexe. En effet, en condition basale, il a été observé une plus grande quantité d'ARNm et de protéine P2X4 dans la microglie chez les mâles que chez les femelles (Crain et al., 2009; Guneykaya et al., 2018). En condition neuropathique, l'expression de P2X4 dans la CDME serait augmentée uniquement chez les mâles (Sorge *et al.*, 2015) (Mapplebeck et al., 2018) mais la LNP induirait une activation microgliale et une réponse douloureuse similaires chez les rongeurs mâles et femelles. Cependant, l'inhibition pharmacologique de P2X4 ou la suppression génétique des acteurs de la cascade de signalisation, BDNF et TrkB bloqueraient uniquement l'hypersensibilité douloureuse neuropathique chez les souris mâles et pas chez les femelles (Sorge *et al.*, 2015) (Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent qu'en condition neuropathique, le récepteur P2X4 serait surexprimé dans la microglie chez les mâles mais pas chez les femelles. En effet, l'injection intrathécale de microglies activées, exposées à de l'ATP provenant de rats mâles naïfs induisait une hypersensibilité mécanique chez des rats mâles et femelles naïfs. A l'inverse, l'injection intrathécale de microglies activées, exposées à de l'ATP, provenant de rates naïves n'induisait aucune hypersensibilité mécanique ni chez les mâles, ni chez les femelles. En concordance avec les résultats précédents, il a été montré que la neuropathie n'induisait pas de phosphorylation de p38-MAPK ni de synthèse et libération de BDNF chez les femelles (Luo et al., 2018; Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015; Taves

et al., 2016). Ceci suggère l'existence d'une différence sexuelle quant au rôle de la microglie dans le développement de douleurs neuropathiques induites par P2X4 (Mapplebeck *et al.*, 2018).

Les différences de transcription du gène *p2rx4* dans la microglie entre les mâles et les femelles pourraient s'expliquer par des différences d'accessibilité de la chromatine par ses facteurs de transcription. En effet, IRF8 et IRF5 sont augmentés de la même manière chez les mâles et chez les femelles en condition neuropathique, mais l'inhibition d'IRF5 diminue l'expression de P2X4 dans la microglie uniquement chez les mâles (Masuda *et al.*, 2014; Sorge *et al.*, 2015). Il a été suggéré que l'affinité de liaison d'IRF5 sur le promoteur du gène *p2rx4* augmenterait en condition neuropathique uniquement chez les mâles (Mapplebeck *et al.*, 2018). Chez les femelles, une LNP n'induirait donc pas d'expression *de novo* de P2X4 dans la microglie ce qui préviendrait la synthèse de BDNF et la cascade de signalisation qui s'en suit.

Le mécanisme qui régule la liaison d'IRF5 sur le promoteur de *p2rx4* est inconnu. Cependant, une des possibilités est que le site de liaison soit soumis à des modifications épigénétiques chez les femelles. Néanmoins, le dimorphisme sexuel du rôle de P2X4 n'est pas observé dans tous les types de modèles de douleurs neuropathiques et reste controversé. Par exemple, chez un modèle de souris de douleur herpétique, une forme de douleur neuropathique, le blocage pharmacologique de P2X4 par le NP-1815-PX diminue la douleur chez les mâles et les femelles. De même, l'utilisation d'un agent séquestrant de BDNF, TrkB-Fc, supprime aussi l'hypersensibilité douloureuse suggérant que la voie P2X4-BDNF peut jouer un rôle dans les douleurs neuropathiques chez les femelles (Matsumura *et al.*, 2016). Une autre étude montre que cette voie peut être activée chez les femelles. Bien que la testostérone, hormone sexuelle mâle, n'est pas requise pour induire la douleur, il a été observé que l'administration de testostérone à des femelles provoque l'activation de la voie P2X4-BDNF microgliale dans un modèle de douleur inflammatoire (Mapplebeck *et al.*, 2018) (Sorge *et al.*, 2015). Cela suggère que la testostérone pourrait participer à l'augmentation de l'affinité entre IRF5 et *p2rx4* et ainsi déclencher cette voie de signalisation P2X4-dépendante.

En condition neuropathique, KCC2 est inhibé et permet l'augmentation de la sortie de chlore par les récepteurs GABA/glycine, ce qui induit une hyperexcitabilité neuronale et une hypersensibilité mécanique à la fois chez les mâles et les femelles (Mapplebeck *et al.*, 2019).

De plus, l'inhibition pharmacologique, par injection intrathécale, des récepteurs NMDA empêche l'hypersensibilité mécanique chez les deux sexes (Sorge *et al.*, 2015). Donc, bien que non libéré par la microglie par une voie P2X4-dépendante chez les femelles, une libération de BDNF par d'autres cellules induit quand même une activation de TrkB et les mécanismes qui s'ensuivent.

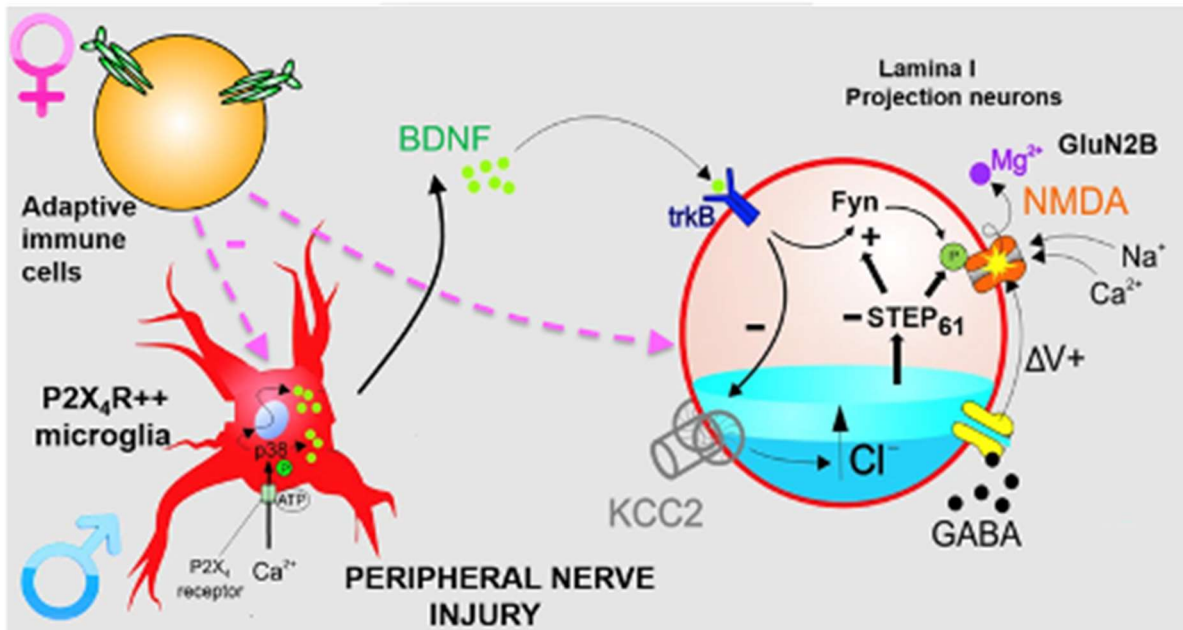


Figure 19: Douleur neuropathique et dimorphisme sexuel

Une lésion nerveuse périphérique conduit à la libération de BDNF, P2X4-dépendante par la microglie pour les mâles et, potentiellement par les cellules immunitaires de type lymphocytes T chez les femelles, dans la corne dorsale de la moelle épinière. Chez les deux sexes, la fixation de BDNF sur son récepteur TrkB au niveau des neurones de projections induit une désinhibition neuronale via les récepteurs GABA et une excitabilité neuronale par activation des récepteurs NMDA. Cela induit in fine à une hyperexcitabilité neuronale et à l'établissement de la douleur neuropathique (Tam and Salter, 2021).

En résumé, une LNP induit une microgliose chez les mâles et chez les femelles ce qui induit une augmentation d'IRF8/IRF5. Mais le point de divergence serait l'activation par IRF5 de la transcription du gène p2rx4. L'absence de synthèse *de novo* de P2X4 dans la microglie, empêcherait l'activation de p38MAPK et donc pas la synthèse et libération de BDNF par la microglie chez les femelles. Néanmoins, en condition neuropathique, une hyperexcitabilité neuronale est observée chez les femelles et serait induite par les mêmes mécanismes que

ceux décrits chez les mâles, à savoir l'augmentation fonctionnelle des récepteurs NMDA (Sorge *et al.*, 2015) et la diminution de l'inhibition GABAergique, dépendante de KCC2 (Mapplebeck *et al.*, 2019). Ceci suggère que l'activation de TrkB et les voies de signalisation sous-jacentes sont conservées chez les mâles et les femelles en condition neuropathique. Donc, bien que l'origine du BDNF chez les femelles reste inconnu, l'une des hypothèses serait que les lymphocytes T des femelles s'infiltreraient dans la ME en condition neuropathique et pourraient jouer le rôle de la microglie en libérant le BDNF P2X4-dépendant (Sorge *et al.*, 2015).

Disséquer ce dimorphisme sexuel serait utile dans l'établissement de futures stratégies thérapeutiques adaptées aux hommes et aux femmes pour lutter efficacement contre les douleurs neuropathiques.

B. P2X4 et douleur inflammatoire

Contrairement aux douleurs neuropathiques, en conditions inflammatoires chroniques, provoquées par l'injection intra-plantaire d'adjuvant complet de Freund (CFA), l'augmentation de P2X4 dans la CDME ipsilatérale n'est pas présente (Tsuda *et al.*, 2003). Cependant, il a par la suite été montré qu'après injection de CFA, les souris P2X4 KO ne présentaient pas d'allodynie mécanique (Tsuda *et al.*, 2009b). L'ensemble de ces résultats suggère que P2X4 serait nécessaire au développement de la douleur inflammatoire mais pas au niveau de la moelle épinière. Ainsi, les mécanismes P2X4-dépendants impliqués dans l'établissement de la douleur inflammatoire seraient différents de ceux concernés dans la douleur neuropathique.

1) Rôle dans la sensibilisation périphérique

i. Implication des cellules immunitaires

Dans un modèle d'inflammation persistante (CFA), la présence de P2X4 dans les macrophages résidents de la peau contribue à la sensibilisation des terminaisons nerveuses sensorielles périphériques et induit une hypersensibilité mécanique due à la production du facteur inflammatoire PGE2 (Ulmann et al., 2010). En effet, la libération d'ATP par les tissus endommagés active les récepteurs P2X4 présents à la surface des macrophages et induit une entrée de calcium. Cette entrée de calcium permet la phosphorylation de p38-MAPK, l'activation de la phospholipase A2 et de l'enzyme cyclo-oxygénase 2, qui conduit à la formation de PGE2 (Figure 20). Ceci va alors initier la réponse inflammatoire aiguë (Ulmann et al., 2010). Outre PGE2, l'activation de P2X4 présent dans les cellules immunitaires permet également la libération d'autres facteurs qui favorisent l'établissement de la douleur inflammatoire (IL-6, ROS, IL-10) (Paalme et al., 2019; Silva et al., 2015).

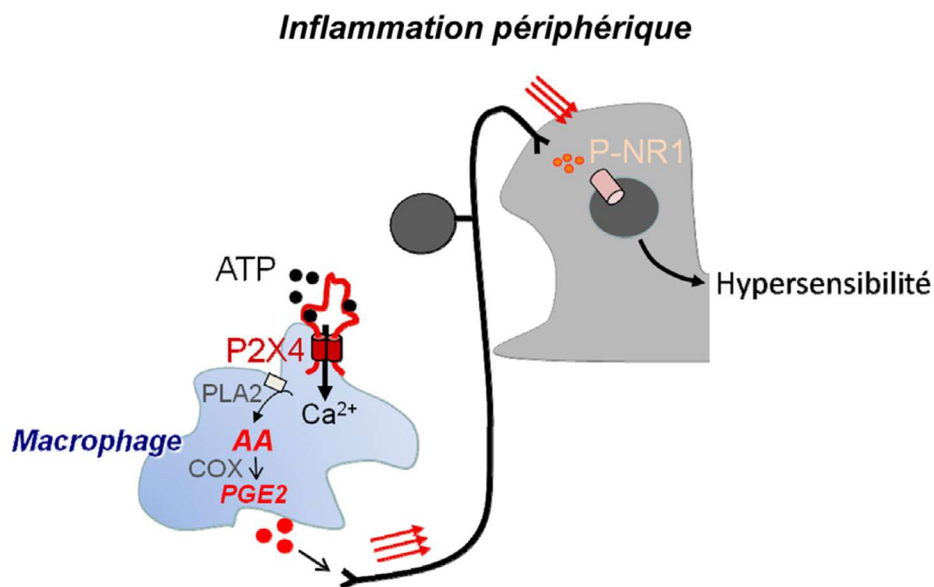


Figure 20: Implication du récepteur P2X4 au niveau des macrophages dans la douleur inflammatoire.

Lors d'une inflammation périphérique, la libération d'ATP par les tissus lésés entraîne l'activation de P2X4 et l'entrée de calcium intracellulaire. Cela va activer la phospholipase A2 (PLA2) et induit la formation d'acide arachidonique (AA). L'entrée de calcium active également l'enzyme COX2 qui va participer à la formation de prostaglandine E2 (PGE2). La PGE2 est ensuite libérée par les macrophages et active les fibres afférentes primaires (Ulmann, 2014).

ii. Implication des DRG

Il a récemment été montré que l'expression de P2X4 pouvait être augmentée dans les neurones nociceptifs de petit diamètre CGRP-négatifs et TRPV1-positifs, des DRG en condition inflammatoire (Lalisse *et al.*, 2018). De plus, ces neurones sensoriels expriment le BDNF, qui peut être stocké avec des neuropeptides comme le CGRP ou la substance P dans les terminaisons axonales (Salio *et al.*, 2007). En condition d'inflammation chronique, la libération de BDNF dans les DRG augmente (Lalisse *et al.*, 2018) et induirait la phosphorylation de TrkB, également présent dans les DRG (Pezet *et al.*, 2006). Outre sa libération au sein même des DRG, le BDNF peut également subir un transport antérograde dans les terminaisons centrales des fibres afférentes de la CDME et ainsi être libéré dans la ME (Cho *et al.*, 1997; Pezet *et al.*, 2006).

P2X4 est également exprimé dans les SGC où il contribuerait également à la douleur inflammatoire chronique (Kushnir *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2019) en libérant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 β et le TNF α suite à l'activation de l'inflammasome NLRP1 (Ulmann *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2019).

2) *Rôle dans la sensibilisation centrale*

Contrairement à la douleur neuropathique, la douleur inflammatoire n'induit pas de microglie et la microglie n'exprime pas le BDNF (Lalisse *et al.*, 2018). Néanmoins, P2X4 joue également un rôle dans l'hypersensibilité mécanique suite à une inflammation chronique en favorisant l'hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale dans des modèles murins d'inflammation chronique (Ulmann *et al.*, 2010).

En effet, dans des conditions inflammatoires chroniques, il est suggéré que le BDNF serait libéré de manière P2X4-dépendante par les terminaisons des fibres afférentes des neurones sensoriels dans la CDME (Lalisse *et al.*, 2018; Lever *et al.*, 2001; Pezet *et al.*, 2002a; Zhao *et al.*, 2006), conduisant à l'activation et à la phosphorylation du récepteur TrkB au niveau des neurones de projections de la ME (Renn *et al.*, 2009). La fixation de BDNF sur TrkB induirait par activation de la voie MAPK/ERK, la synthèse de neuropeptides par les neurones spinaux

(Pezet et al., 2002b) et l'inhibition du co-transporteur KCC2, conduisant à une désinhibition centrale (Lalisse *et al.*, 2018; Zhang et al., 2008). L'activation de TrkB par le BDNF neuronal, en condition inflammatoire, induirait également une potentialisation glutamatergique par phosphorylation du résidu Ser 896 de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA (Brenner et al., 2004; Lalisse *et al.*, 2018).

A l'image de la douleur neuropathique, en condition inflammatoire, la chimiokine CCL2 induit une activation des courants induits par les récepteurs NMDA dans les neurones de la lamina IIe. De plus, l'inhibition pharmacologique de son récepteur CCR2 dans la ME atténue l'hyperalgésie causée par CCL2, en condition d'inflammation (Xie et al., 2018). On peut alors émettre l'hypothèse qu'une inflammation chronique induirait la libération de CCL2, qui favoriserait le trafic à la surface de P2X4 et entrainerait la libération de BDNF neuronal et ainsi l'hyperexcitabilité neuronale en potentialisant les récepteurs NMDA et en désinhibant les neurones.

D'autre part, une inflammation chronique augmente également de manière P2X4-dépendante la plasticité neuronale dans la CDME. En effet, comme évoqué dans le chapitre précédent, une inflammation provoquée par l'injection intra-plantaire de CFA diminue le seuil d'activation des fibres C et augmente l'amplitude du phénomène de wind up des neurones WDR, ce qui entraîne une transmission facilitée de la douleur. Or, ce phénomène n'est pas présent lors de la délétion génétique de P2X4, indiquant qu'il est P2X4-dépendant (Aby *et al.*, 2018).

3) *Dimorphisme sexuel*

Au contraire de la douleur neuropathique, très peu d'études ont été réalisées concernant le dimorphisme sexuel P2X4-dépendant en condition inflammatoire. Néanmoins, une étude a montré que la délétion constitutive de P2X4 prévenait l'hypersensibilité chez les mâles et les femelles (Lalisse *et al.*, 2018). Aussi, l'activation de p38-MAPK par P2X4 dans les macrophages n'est présente que chez les mâles (Paige *et al.*, 2018).

En outre, bien que le comportement douloureux induit par P2X4 soit présent chez les mâles et chez les femelles, les mécanismes sous-jacents divergeraient entre les deux sexes. Cet aspect a été largement abordé au cours de ma thèse.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le récepteur P2X4 est présent dans de nombreux types cellulaires de l'organisme, et en particulier dans les neurones et les cellules gliales du SNC. Si son implication semble mineure en condition physiologique, de par son internalisation constitutive dans les lysosomes, l'augmentation de son expression et/ou de son trafic à la surface a permis de révéler son implication dans de nombreuses pathologies incluant la douleur chronique. Si le rôle clé de P2X4 dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires est bien établi, son rôle spécifique au sein des neurones et des microglies reste à être élucidé. Dans le cas des douleurs neuropathiques, le rôle prépondérant de P2X4 dans les microglies a été démontré ces dernières années, laissant de côté le rôle potentiel de P2X4 exprimé dans les neurones des DRG ou de la moelle épinière. Dans le cas des douleurs inflammatoires, l'implication de P2X4 dans la microglie reste controversée et son rôle dans les neurones inconnu. Aussi, l'importance et le rôle du trafic en surface de P2X4 dans les conditions pathologiques restent à étudier. Il a également été suggéré qu'il existerait un dimorphisme sexuel des mécanismes cellulaires impliqués dans les développements et le maintien des douleurs chroniques avec une contribution différente du récepteur P2X4 entre les mâles et les femelles.

Les objectifs de ma thèse étaient donc de mieux comprendre l'implication des récepteurs P2X4 neuronaux et microgliaux dans la nociception basale et les douleurs neuropathiques et inflammatoires en combinant des approches comportementales, électrophysiologiques et immunohistochimiques sur différents modèles murins transgéniques mâles et femelles afin de déceler également les possibles différences intersexuelles.

Nous avons entrepris de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les conséquences de l'augmentation de P2X4 à la surface sur les sensibilités mécaniques et thermiques et la transmission nociceptive en condition basale ?

- De quelle manière la suppression ou l'augmentation de P2X4 à la surface modulent l'hyperalgésie et la transmission nociceptive en condition neuropathique ?
- Quelle est l'implication de P2X4 présent spécifiquement dans les microglies et/ou les neurones dans la nociception basale et neuropathique ?
- Dans quelles mesures l'expression et la localisation subcellulaire de P2X4 module l'hyperalgésie mécanique et thermique en condition inflammatoire chronique ?

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ÉTHIQUE

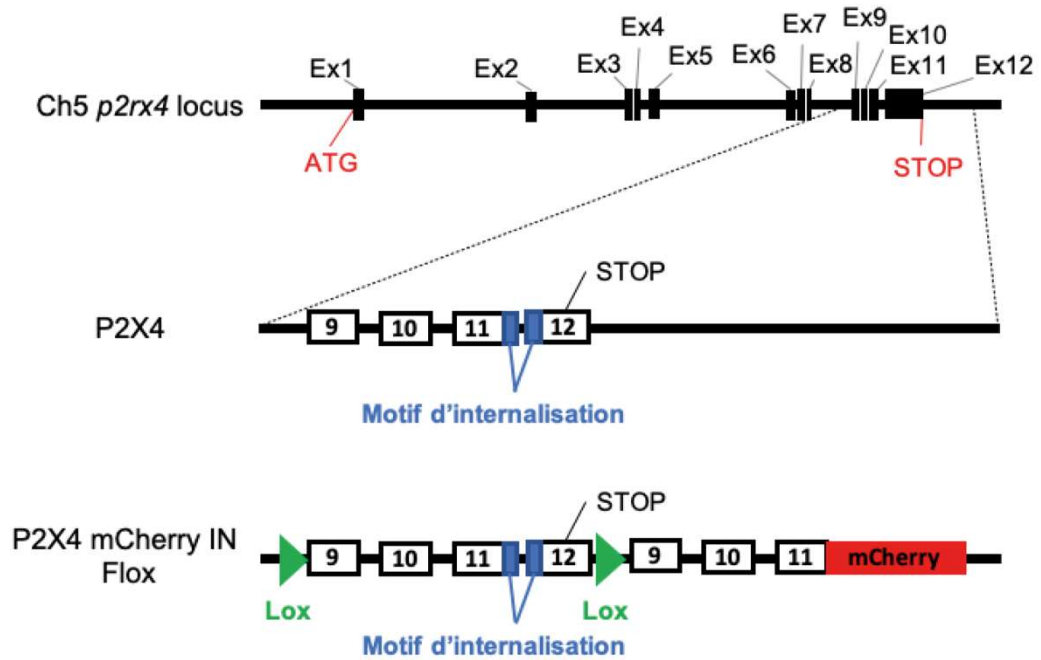
Toutes les expériences menées au cours de cette thèse ont été effectuées suivant les directives européennes, respectant l'utilisation des animaux et le bien-être animal. Elles ont été validées par le comité d'éthique de l'université de Bordeaux (APAFIS #21135). Toutes les mesures nécessaires ont été mises en place afin de respecter la règle des 3R : **R**éduire le nombre d'animaux utilisés, **R**emplacer le modèle animal par un autre modèle, si possible et **R**affiner, en respectant des points limites signalant une détérioration de la santé des animaux.

ANIMAUX

Les expériences ont été menées sur des souris C57BL6 mâles et femelles âgées de 8 à 16 semaines. Les souris ont été hébergées dans des cages communes en portoirs ventilés, par nombre de 2 à 4 et ne sont jamais restées isolées. Elles ont eu un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture et étaient maintenues en cycle jour/nuit standard (7h : 19h). Le change des cages a été effectué au minimum une fois par semaine et le bien-être des animaux a été surveillé tout le long des expériences par un personnel animalier formé à cet effet. Les animaux utilisés sont tous issus de lignées transgéniques, pour la plupart produites dans la zone de production du Neurocentre Broca soumise à un statut sanitaire de type SOPF (Exempt d'organismes pathogènes spécifiques et opportunistes). Ils ont ensuite été transférés dès sevrage (4 à 5 semaines) au pôle *in vivo* (PIV) présent dans le même bâtiment. Une période d'acclimatation d'au moins une semaine a été respectée entre la réception des animaux en animalerie PIV et le début des expérimentations.

P2X4mCherryIN Flox

A



B

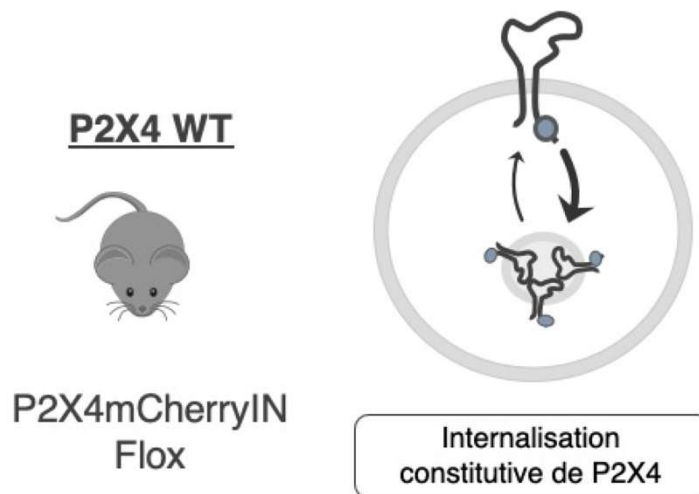


Figure 21: Représentation schématique de la modification génétique chez les souris *P2X4mCherryIN Flox* (*P2X4* WT).

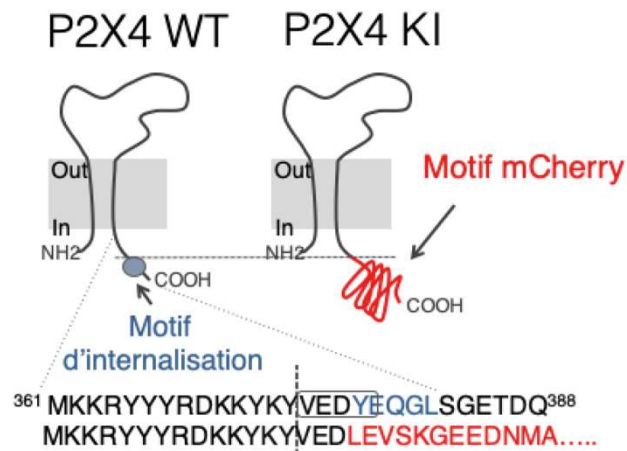
(A) Deux sites *LoxP* ont été insérés en amont de l'exon 9 et après l'exon 12 du gène *p2rx4*. Les exons 9 à 11 suivis d'un marqueur fluorescent *mCherry* ont été insérés à la suite du codon *STOP*. (B) Les souris *P2X4* WT présentent une internalisation constitutive de *P2X4* dans les lysosomes (Bertin et al., 2020).

Les souris P2X4mCherryIN Flox sont des souris présentant un gène P2X4 floxé, dans lequel il a été inséré une construction virale, à la suite du codon STOP. Au sein de cette construction virale, le motif d'internalisation Y₃₇₈XXGL présent sur les exons 11 et 12 du gène a été supprimé et un marqueur fluorescent mCherry a été ajouté à la suite de l'exon 11 (Figure 21). La fonctionnalité du récepteur n'a pas été modifiée par cette insertion (Bertin *et al.*, 2020).

Les souris P2X4mCherryIN Flox expriment la forme sauvage du récepteur. Nous avons donc utilisé ces souris en tant que contrôles dans nos expériences où nous les avons renommées souris P2X4 WT.

P2X4 KI

A



B

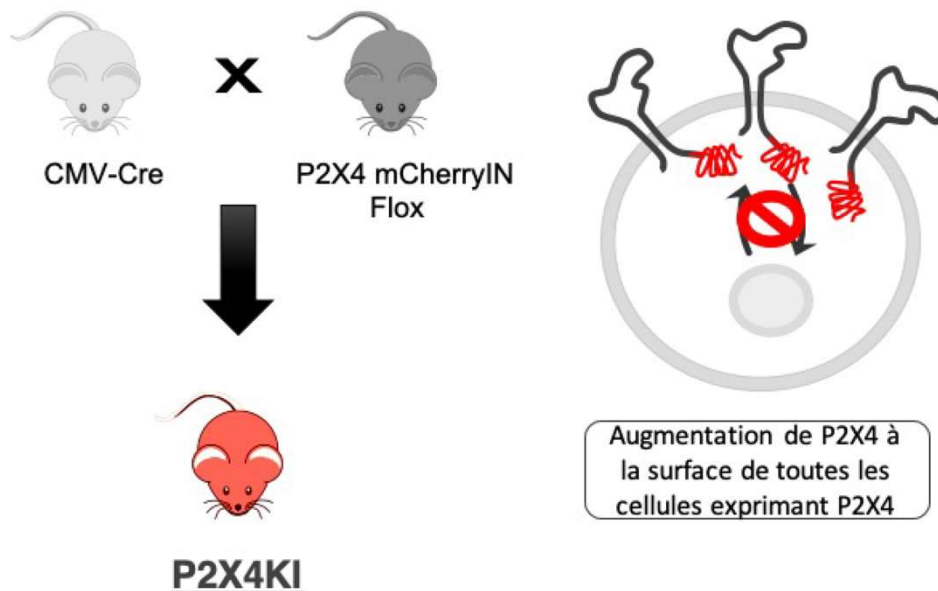


Figure 22: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris P2X4 KI.

(A) Le motif d'internalisation $Y_{378}XXGL$ a été remplacé par un marqueur fluorescent mCherry. (B) Des souris CMV-Cre ont été croisées avec des souris P2X4mCherryIN Flox pour former les P2X4 KI. Le récepteur P2X4 est donc constitutivement exprimé à la membrane plasmique et exprime la mCherry.

Des souris CMV-Cre ont été croisées avec nos souris P2X4mCherryIN Flox. Ce croisement a permis de générer les souris P2X4 KI qui présentent une substitution du motif d'internalisation $Y_{378}XXGL$, qui a été remplacé par un marqueur fluorescent mCherry. Le récepteur P2X4 ne

peut donc plus être constitutivement internalisé et se retrouve alors à la surface des membranes plasmiques de toutes les cellules de l'organisme exprimant P2X4 (Figure 22).

Cette excision a été remarquée également dans les gamètes ce qui nous permet désormais de croiser des souris P2X4 KI entre elles afin de générer d'autres animaux.

Cd11b-Cre P2X4 KI

Nous avons croisé des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur Cd11b, avec des souris P2X4mCherryIN Flox. Ce croisement nous a permis de générer des souris Cd11b-Cre P2X4 KI qui présentent une expression constitutive de P2X4 à la surface de la membrane plasmique des microglies et des macrophages (Figure 23).

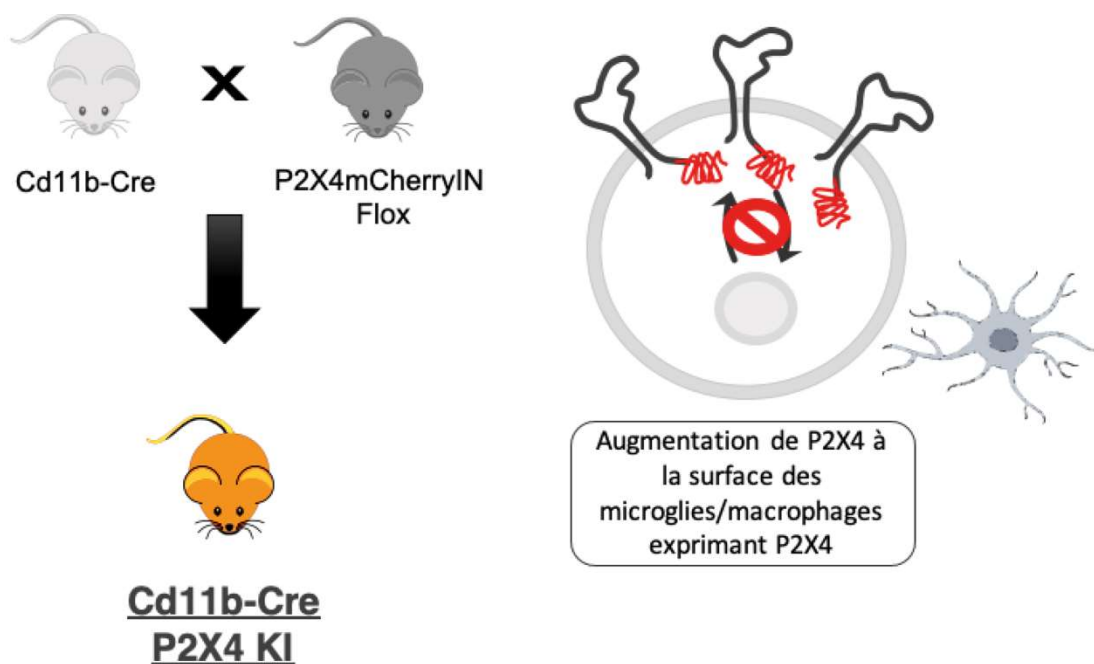


Figure 23: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI.

Des souris Cd11b-Cre ont été croisées avec des souris P2X4mCherryIN Flox pour former les souris Cd11b-Cre P2X4 KI. Le récepteur P2X4 est donc constitutivement exprimé à la membrane plasmique des microglies et des macrophages et exprime la mCherry.

Synapsin-Cre P2X4 KI

Nous avons croisé des souris exprimant la Cre sous le contrôle d'un promoteur Synapsin, avec des souris P2X4mCherryIN Flox. Ce croisement nous a permis de générer des souris Synapsin-Cre P2X4 KI qui présentent une expression constitutive de P2X4 à la surface de la membrane plasmique des neurones (Figure 24).

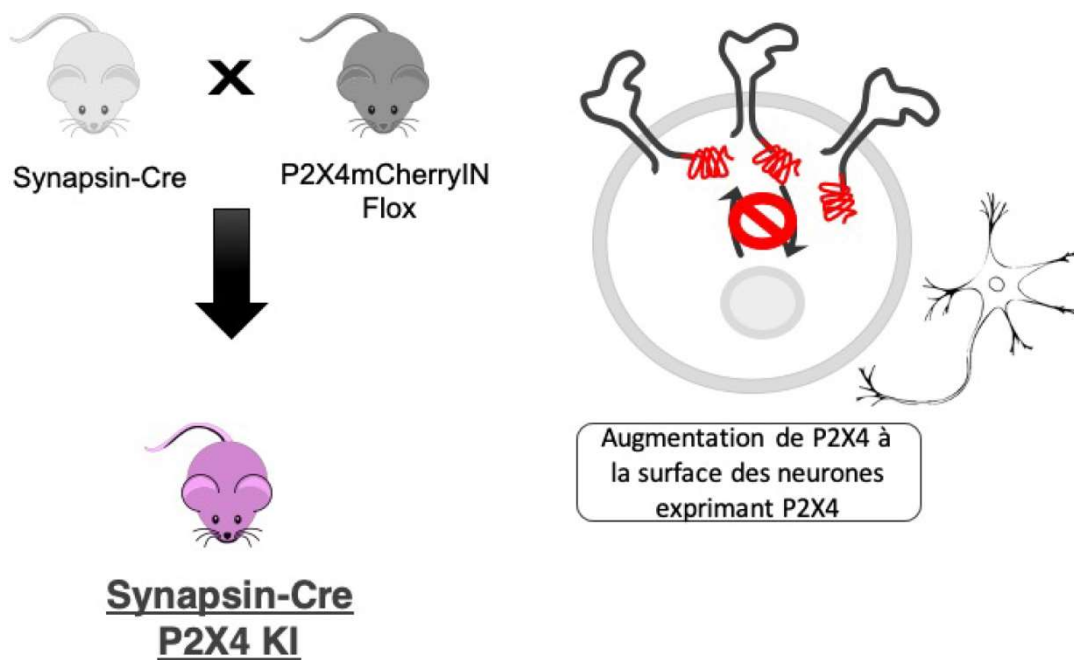


Figure 24: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI.

Des souris Synapsin-Cre ont été croisées avec des souris P2X4mCherryIN Flox pour former les souris Synapsin-Cre P2X4 KI. Le récepteur P2X4 est donc constitutivement exprimé à la membrane plasmique des neurones et exprime la mCherry.

P2X4 KO

Nous avons généré un autre modèle de souris transgéniques dans lequel le récepteur P2X4 a été supprimé dans toutes les cellules qui l'exprimaient. Cette délétion totale supprime le récepteur P2X4 aussi bien à la surface des membranes plasmiques que dans les lysosomes (Figure 25).

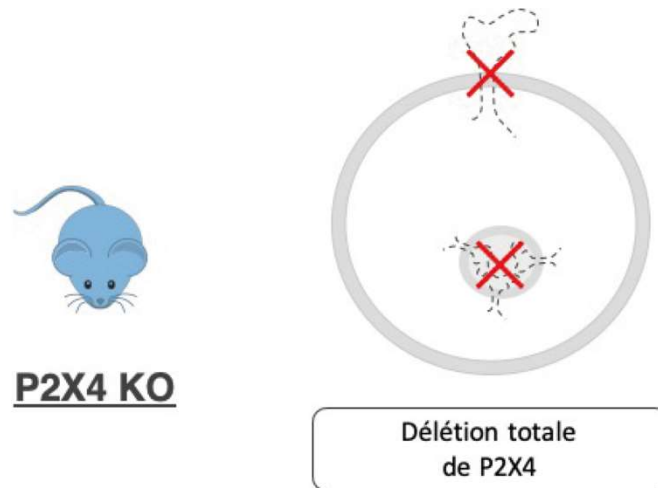


Figure 25: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris P2X4 KO. Les souris P2X4 KO présentent une délétion totale du récepteur P2X4, aussi bien à la surface des cellules, qu'au niveau de leur pool intra-cellulaire.

CX3CR1-Cre P2X4 KO

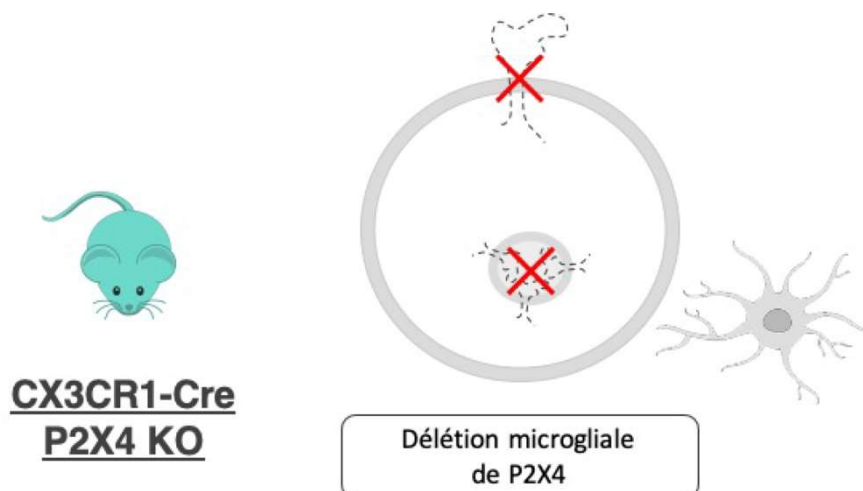


Figure 26: Représentation schématique de l'expression de P2X4 chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO.

Des souris CX3CR1-Cre ont été croisées avec des souris P2X4 KO floxées pour former les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO. Le récepteur P2X4 n'est plus exprimé dans les microglies.

Grâce à une collaboration avec l'équipe de F. Rassendren à l'institut de génomique fonctionnelle de Montpellier, nous avons obtenu des souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, qui présentent une délétion de P2X4 spécifiquement dans les microglies (Figure 26).

Contrairement aux autres modèles transgéniques que nous avons utilisés, ce modèle est un modèle inducible. En effet, la délétion de P2X4 est due à l'injection de tamoxifène, qui permet l'activation de la Cre recombinase. Nous avons injecté 0,1 mL de tamoxifène (10mg/mL), dilué dans de l'huile de maïs, contenant 2,5% d'éthanol absolu, une fois par jour pendant 3 jours. Nous avons attendu 3 semaines afin que la délétion soit complète avant de commencer nos expériences sur ces souris. Même si le promoteur CX3CR1 est un promoteur présent au niveau des microglies et des macrophages, 2 semaines suivant l'injection de tamoxifène, il a été remarqué que P2X4 était délété uniquement dans la microglie. Ce modèle est donc microglie-spécifique deux semaines après l'injection de tamoxifène.

TESTS COMPORTEMENTAUX

Test de von Frey

La sensibilité mécanique est déterminée par le test de von Frey. Le seuil de retrait de la patte est mesuré à la suite de plusieurs stimulations mécaniques effectuées par des filaments de von Frey (Ugo Basile, Italie). L'animal est placé dans des cages d'expérimentation, composées de plexiglas et d'un sol sous forme de grilles métalliques et est laissé pour une période d'habituation d'environ 15 minutes. La sensibilité des pattes postérieures est ensuite testée, en utilisant premièrement un filament de von Frey de 1g (force nécessaire au plissement du filament), qui est appliqué perpendiculairement à la patte de la souris (Figure 27). Une réponse est considérée positive lorsque l'animal émet un retrait de patte à la suite du plissement du filament. Au contraire, une réponse est considérée négative lorsque l'animal ne retire pas sa patte. Cette étape est répétée de 3 à 5 fois par filaments, respectant un délai de 30 secondes entre chaque application, afin de prévenir toute sensibilisation. Un total de 3 réponses négatives ou positives est nécessaire pour changer de filament. Si la réponse est positive à 1g, un filament plus fin est utilisé (ex : 0,6g), alors que si la réponse est négative, un

filament plus épais est utilisé (ex : 1,4g), et ainsi de suite. Plus le filament sera épais, plus la force nécessaire pour le plier va être grande et donc plus le seuil de retrait va être élevé.

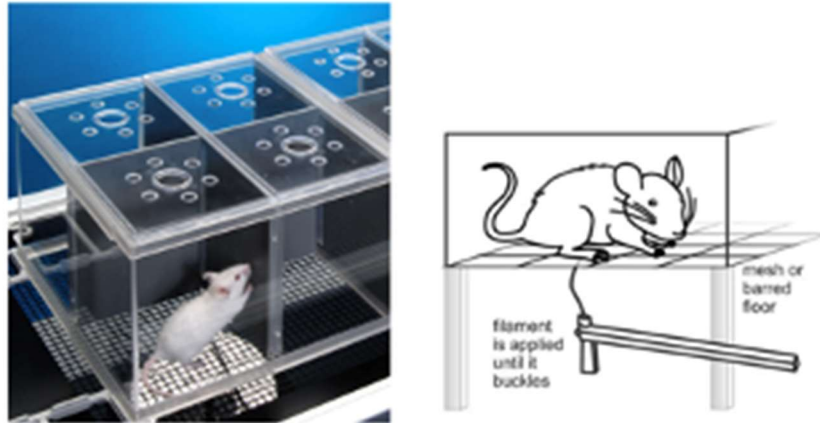


Figure 27: Test de von Frey.

L'animal est placé dans la cage d'expérimentation puis testé à l'aide de plusieurs filaments de von Frey possédant des forces différentes. Ceci permet de déterminer le seuil de sensibilité mécanique (Deuis et al., 2017).

Test plantaire

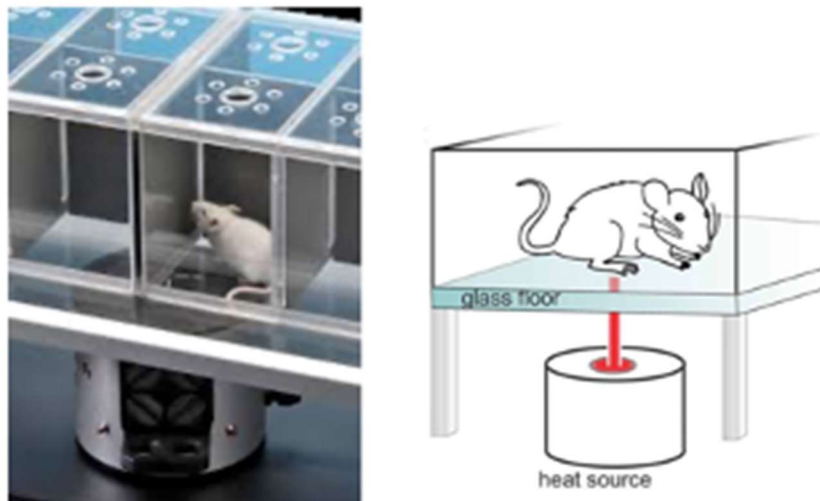


Figure 28: Test plantaire.

L'animal est placé dans la cage d'expérimentation puis testé à l'aide d'une lampe infrarouge qui vient appliquer un stimulus thermique. Ceci permet de déterminer le seuil de sensibilité thermique (Deuis et al., 2017).

La sensibilité thermique est déterminée par le test plantaire suivant la méthode décrite par Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Les animaux sont placés dans la cage d'expérimentation composée de parois en plexiglas et d'un sol en verre laissant passer la lumière, pour une période d'habituation de 45 minutes (Figure 28). Les souris sont ensuite testées en mesurant la latence de retrait de leurs pattes postérieures testées, à la suite d'une stimulation thermique. Une lampe émettant dans l'infrarouge (intensité = IR50), illumine un endroit spécifique et chauffe la patte de l'animal. Le test est répété de 3 à 5 fois par patte en respectant une durée de 2 minutes entre chaque application afin de diminuer le risque de sensibilisation de la patte. Une moyenne de ces valeurs est ensuite calculée afin d'avoir le seuil thermique.

NEUROPATHIE PAR LÉSION PARTIELLE DU NERF SCIATIQUE

La neuropathie a été induite par une ligature partielle du nerf sciatique (SNI) (Decosterd and Woolf, 2000). Les souris ont été anesthésiées par isoflurane (4%) puis placées sur couverture chauffante à 38°C et maintenues sous anesthésie (2-0,5% isoflurane) durant toute la chirurgie. Une injection sous-cutanée de buprénorphine (50µL à 0,03mg/mL) et de lidocaïne (50µL à 2mg/mL) a été faite au préalable. Une incision d'environ 1cm a été faite au niveau de l'une des pattes postérieures de la souris, sur une peau rasée et désinfectée à l'aide de Bétadine. Après dégagement des muscles, le nerf sciatique et ses 3 principales branches sont exposés. Deux des trois branches, les nerfs péronéal commun et tibial sont ligaturés (fil de nylon 6-0 non résorbable) puis incisés distalement à la ligature. Le nerf sural est laissé libre. L'incision est ensuite refermée à l'aide de fil de suture 6-0. A la fin de la chirurgie, les souris sont réhydratées grâce à une injection sous-cutanée de NaCl 0,9% (0,2 mL) puis placées sur un tapis chauffant jusqu'à leur réveil. Une coupelle de nourriture enrichie est placée dans la cage et un suivi post-opératoire de 3 jours est effectué. Un contrôle de cette chirurgie est effectué. Les souris, que nous appellerons Sham, reçoivent les mêmes traitements préopératoires que les souris SNI. Leur nerf sciatique est exposé mais n'est pas ligaturé. Les mêmes traitements post-opératoires sont mis en place. Les sensibilités mécaniques et thermiques sont mesurées par l'application des filaments de von Frey ou de la lumière au niveau de l'extrémité latérale de la patte correspondante à l'innervation surale (Figure 29).

Lors de nos expériences, des tests de douleurs sont effectués avant la chirurgie, puis 7 jours, 14, 16, 18 et 21 jours après la chirurgie. Cela a permis de déterminer la temporalité de la neuropathie. A la suite de cela, tous nos tests de comportements, d'électrophysiologie et d'immunohistologie ont été menés 14 jours après la neuropathie.

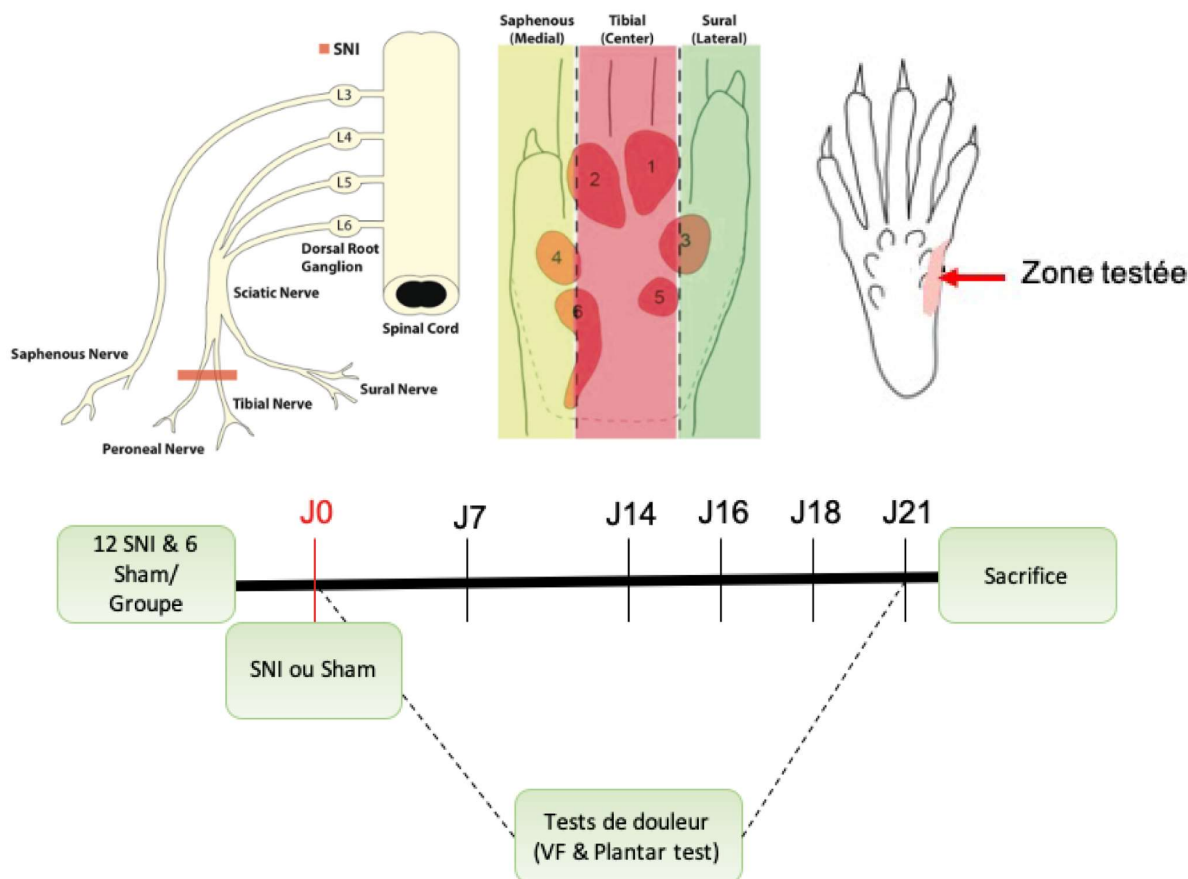


Figure 29: Établissement du modèle neuropathique

Le modèle neuropathique est induit par lésion partielle du nerf sciatique correspondant à la lésion des branches péronéale commune et tibiale. La branche surale du nerf sciatique n'est pas ligaturée, permettant de mesurer les sensibilités mécaniques et thermiques en stimulant la partie latérale de la patte. Lors de l'étude temporelle, les tests de douleur sont effectués avant la lésion, puis 7, 14, 16, 18 et 21 jours après la neuropathie (Duraku et al., 2012).

INFLAMMATION CHRONIQUE PAR INJECTION DE CFA

Le modèle d'inflammation chronique a été modélisé par l'injection intra-plantaire d'adjuvant complet de Freund (CFA). Les souris ont été anesthésiées par isoflurane (induction 4%) puis placées sur une couverture chauffante. Une injection intra-plantaire de CFA (30 μ L, 100%) a ensuite été effectuée dans l'une des deux pattes postérieures de la souris (Figure 30).

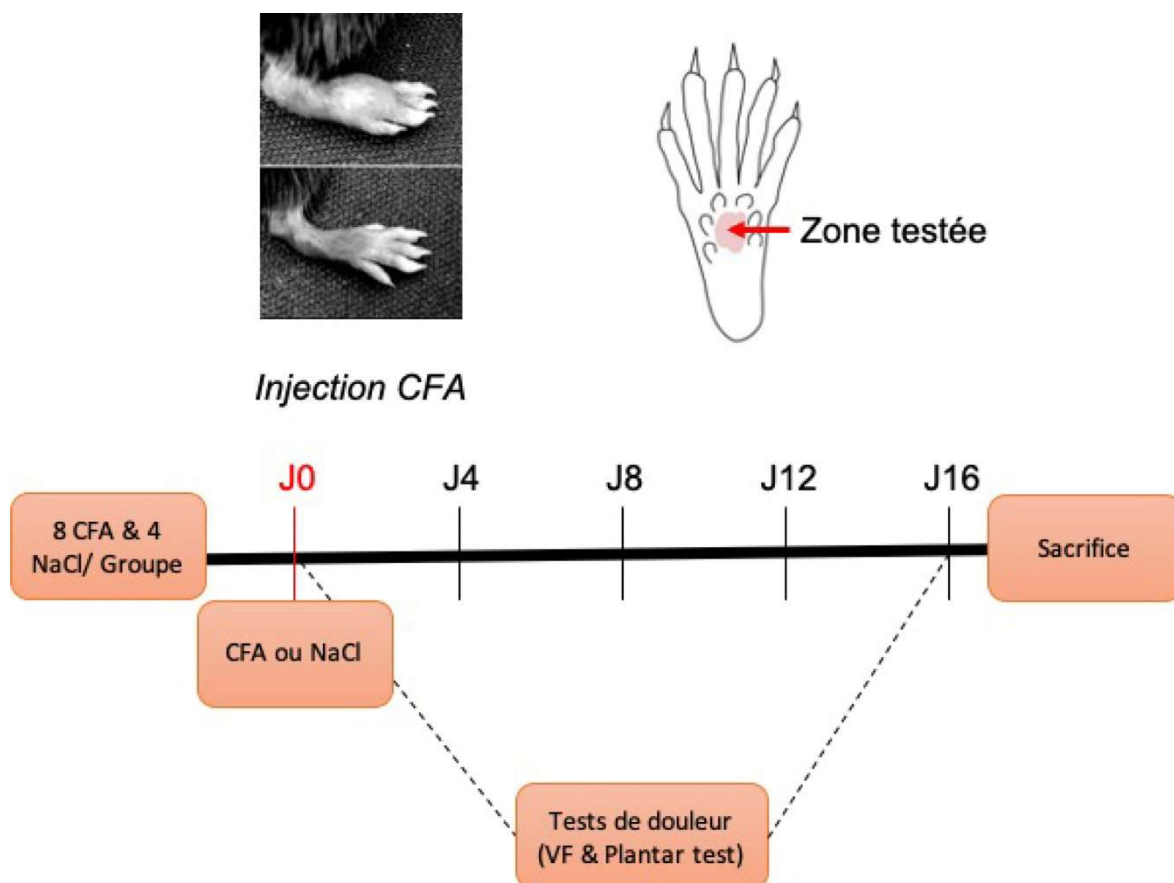


Figure 30: Établissement du modèle inflammatoire

Le modèle d'inflammation chronique est induit par injection intra-plantaire de CFA. Lors de l'étude temporelle, les tests de douleur sont effectués avant l'injection, puis 4, 8, 12 et 16 jours après l'inflammation.

L'animal est ensuite placé dans une cage de réveil sur couverture chauffante jusqu'à son réveil. Une coupelle de nourriture enrichie est placée dans la cage d'hébergement et un suivi post opératoire de 3 jours suivant l'injection est effectué. Un contrôle de ces injections a été effectué en remplaçant l'injection de CFA par l'injection de NaCl (30µL, 0,9%).

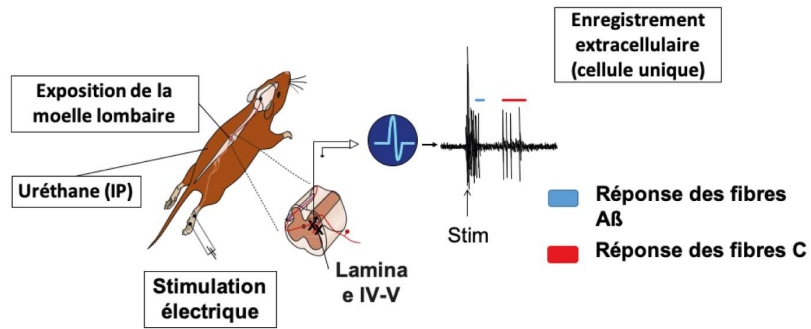
Une évaluation temporelle des sensibilités mécaniques et thermiques a été effectuée avant l'injection de CFA (ou de NaCl), 4, 8, 12 et 16 jours après l'injection. A la suite de cette étude, il a été déterminé que les tests comportementaux seraient effectués 8 jours après l'injection.

PHARMACOLOGIE

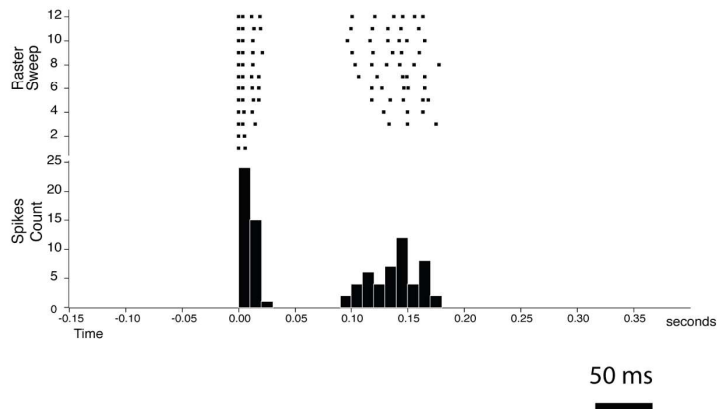
Afin d'étudier l'effet de P2X4 à la surface, sur la sensibilité mécanique en condition neuropathique, nous avons bloqué pharmacologiquement P2X4 grâce à un antagoniste spécifique, le 5-BDBD (Tocris #3579). Les souris ont été injectées en intra-péritonéal avec du 5-BDBD (40mM, 2mL/kg) dilué dans du DMSO 1% ou avec du DMSO 1% (2mL/kg). Les sensibilités mécaniques et thermiques ont été évaluées avant et 2h après l'injection. Ces expérimentations ont été effectuées 14 jours après la SNI.

ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES *IN VIVO*

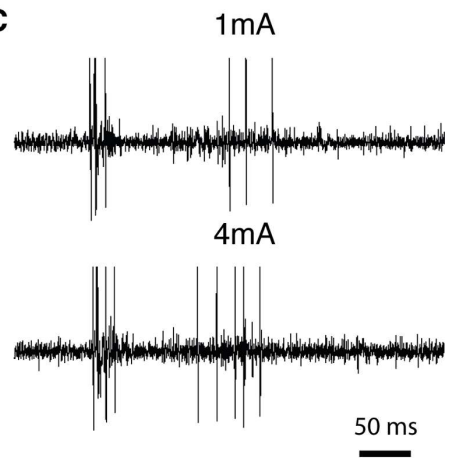
A



B



C



D

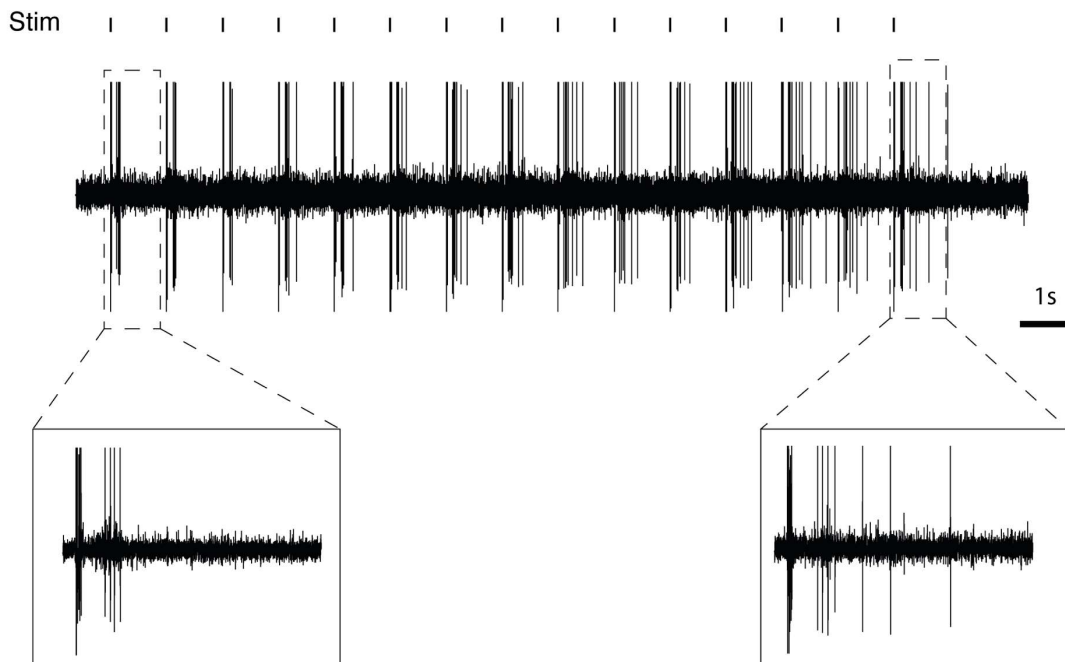


Figure 31: Protocole d'enregistrements extracellulaires in vivo des neurones WDR.

(A) Les neurones WDR sont enregistrés dans les couches profondes des segments L4-L5 de la moelle épinière lombaire, à la suite d'une stimulation électrique de la patte arrière ipsilatérale. Ces neurones sont caractérisés par une réponse rapide A β et une réponse lente C. Le seuil d'activation des neurones WDR par stimulation des fibres C est déterminé. (B) Péris-stimulus histogramme montrant les réponses des neurones WDR suite à une stimulation des fibres C en fonction de l'intensité de stimulation. Le temps 0s correspond à la stimulation. (C) Exemple de réponse d'un neurone WDR à la suite d'une stimulation à 1mA et à 4mA. Le nombre de réponses C augmente en fonction de la stimulation. (D) Exemple de wind up montrant une augmentation des réponses C par les neurones WDR entre la 1^{ère} stimulation et la 15^{ème} stimulation.

Les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale d'uréthane 20% (1,5g/kg) et placées sur un cadre stéréotaxique (Unimécanique, Asnières, France). Une laminectomie des vertèbres lombaires L1-L3 a permis d'exposer les segments L4-L5 de la moelle épinière lombaire. A ce niveau, les neurones wide dynamic range (WDR) ont été enregistrés (Aby *et al.*, 2018) par enregistrements extracellulaires, à l'aide de capillaires en verre borosilicaté (2 M Ω , remplis avec du NaCl 684 mM) (Harvard Apparatus, Cambridge, MA, USA). Une stimulation électrique de la patte ipsilatérale de la souris a été effectuée grâce à des électrodes bipolaires implantées en sous-cutanées reliées à un stimulateur (AMPI, Israël).

A la suite de cette stimulation, le signal reçu a été amplifié et les hautes fréquences ont été filtrées à l'aide d'un amplificateur DAM80 (WPI, FL, USA), connecté à un CED1401 (CED, UK) qui a permis la transformation du signal électrique en signal analogique. L'acquisition a été réalisée à l'aide du logiciel spike2 (CED, UK) (Figure 31A).

Le critère de sélection d'un neurone était la présence d'une réponse des neurones WDR évoquée par les fibres A (0-80ms), suivie d'une réponse évoquée par les fibres C (80-300ms) après une stimulation électrique. L'intensité de stimulation minimale nécessaire pour engendrer une réponse évoquée C a été déterminée. Cette valeur correspond au seuil d'activation des neurones WDR par stimulation des fibres C. Ensuite, la courbe intensité-réponse a été réalisée en augmentant progressivement l'intensité de stimulation de 0,5 à 5mA. Deux stimulations ont été effectuées pour chaque intensité, espacées chacune de 30 secondes afin d'éviter tout phénomène de potentialisation. Les réponses des neurones WDR

évoquées par les fibres C ont été quantifiées pour chaque intensité de stimulation (Figure 31B, 31C).

Afin de déterminer si les neurones enregistrés étaient capables de potentialisation à court terme, nous avons enregistré le wind up de ces derniers (Figure 31D). Les réponses des neurones WDR évoquées par les fibres C ont été enregistrées à la suite de 15 stimulations électriques (fréquence de 1 Hz), d'une intensité équivalente à 3 fois le seuil d'activation des neurones WDR. Les réponses évoquées par les fibres C ont été prises comme étant les potentiels d'action dans un laps de temps de 80 à 300 ms, comme indiqué précédemment. La sensibilisation a été évaluée en calculant un coefficient de wind up en utilisant la formule suivante : (Somme des réponses C après stim 1+ stim 2...stim 15)-(15*Réponse C après stim 1).

RÉCUPÉRATION ET PRÉPARATION DES TISSUS

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'une solution composée de NaCl 0,9% (72,5%), de lidocaïne (20mg/mL, 15%) et d'exagon (400mg/mL, 7,5%). Lorsqu'elles ne présentent plus de réflexes, les souris sont perfusées par voie intracardiaque avec du NaCl 0,9%, jusqu'à extraction du sang, puis avec du paraformaldéhyde (PFA) 2% (environ 50mL/souris de 30g). La moelle épinière lombaire et les DRG sont ensuite prélevés et post-fixés dans du PFA 2% pendant 3h à 4°C. Les tissus sont ensuite lavés à trois reprises à l'aide de PBS puis laissés dans une solution de PBS sucrose 20% pendant la nuit à 4°C. Ils sont ensuite congelés dans de l'isopentane à -50°C et conservés au congélateur -80°C.

Les moelles épinières ont été coupées au cryostat et les coupes coronales de 50µm ont été déposées dans une plaque 12 puits contenant du PBS azide 0,02%. Elles sont ensuite transférées dans une solution cryoprotectrice composée de PBS glycérol 10% et sucrose 25%, puis conservée à -80°C.

Les DRG ont été coupés au cryostat et les coupes de 14µm ont été déposées sur des lames gélatinées. Les lames ont ensuite été conservées à -20°C.

IMMUNOHISTOCHIMIE (IHC)

Marquage et quantification microgliale

La surface occupée par la microglie dans la CDME a été évaluée par IHC à l'aide d'un marquage Iba1, marqueur microglial. Des sections de moelles épinières lombaires ont été incubées avec un anticorps polyclonal anti-Iba1 fait chez le lapin (Wako, #019-19741, 1 :2000) pendant une nuit à température ambiante et révélées par le système de peroxydase EnVision™ anti-lapin (DAKO, K400311), suivi d'une visualisation par DAB. Les coupes ont ensuite été montées sur des lames gélatinées, puis déshydratées avant de positionner la lamelle. Les lames ont ensuite été scannées par un scanner de haute résolution (Epson expression 10000XL). La surface occupée par le marquage Iba1 a ensuite été quantifiée dans les couches superficielles des CDME ipsilatérales et contralatérales en utilisant le logiciel ImageJ. Le ratio de la surface occupée par le marquage Iba1 dans la CDME ipsilatérale par rapport à la CDME contralatérale a ensuite été calculé.

Co-marquage Iba1 et P2X4

L'expression de P2X4 à la surface des microglies dans la CDME a été évaluée par IHC à l'aide d'un marquage microglial (Iba1) et P2X4 (Nodu 246). Les coupes de moelle épinière ont été décongelées puis lavées dans du PBS. Elles ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 45 minutes, dans une solution composée de PBS Tween 0,05% et de sérum naturel de chèvre (NGS) 5%. Les coupes de moelle épinière ont été incubées avec un anticorps polyclonal anti-Iba1 fait chez le lapin (Wako, #019-19741, 1:2000) et un anticorps anti-P2X4, Nodu 246, fait chez le rat (1 :400) (Bergmann et al., 2019), dans une solution de PBS et NGS 1%, pendant la nuit à température ambiante. Après lavage dans du PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires Alexa 488 anti-lapin (1 :400) et Alexa 568 anti-rat (1 :400) faits chez la chèvre dans une solution de PBS, pendant 1h30 à température ambiante. Les coupes sont ensuite lavées avec du PBS puis montées sur lames. Du milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, H-1200) est déposé avant de positionner la lamelle.

Les lames ont ensuite été scannées par un scanner de haute résolution (Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT). Le contraste et la luminosité des images ont été ajustés en utilisant les logiciels NDP view et ImageJ.

Co-marquage P2X3 et P2X4

L'expression de P2X4 dans les neurones nociceptifs des DRG a été évaluée par IHC à l'aide d'un co-marquage des neurones nociceptifs non peptidergiques (P2X3) et P2X4 (Nodu 246). Les lames ont été décongelées et une barrière hydrophobe a été mise autour des coupes de DRG à l'aide d'un style hydrophobe (Dako, #2002). Les lames sont ensuite placées dans une chambre humide tout le long du protocole. Les coupes ont été lavées avec du PBS puis incubées à température ambiante pendant 1 heure, dans une solution composée de PBS Tween 0,05% et de NGS 5%. Elles ont été incubées avec un anticorps polyclonal anti-P2X3 fait chez le lapin (Alomone, #APR-016, 1:400) et un anticorps anti-P2X4, Nodu 246, fait chez le rat (1 :400) (Bergmann *et al.*, 2019), dans une solution de PBS et NGS 5%, pendant la nuit à 4°C. Après lavage dans du PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires Alexa 488 anti-lapin (1 :1000) et Alexa 568 anti-rat (1 :1000) faits chez la chèvre, dans une solution de PBS, pendant 1h à température ambiante. Les coupes sont ensuite lavées avec du PBS puis séchées à température ambiante. Du milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, H-1200) est déposé avant de positionner la lamelle.

Les DRG sont ensuite imagées par un microscope à épi-fluorescence (49 Zeiss Imager M2) composé d'une caméra digitale (Hamamatsu), en utilisant le logiciel Explora Nova MorphoStrider. Le contraste et la luminosité des images ont été ajustés en utilisant le logiciel ImageJ.

ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Student, lors de la comparaison de 2 groupes, 1-way ANOVA lors de la comparaison de plus de deux groupes ou 2-way ANOVAs lorsqu'il y a plusieurs facteurs de comparaison. Ces tests ont été effectués par le logiciel Graphpad prism qui a également contribué à l'élaboration des graphiques de résultats. Sur ces derniers, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les tests utilisés seront détaillés par la suite dans la légende de chaque figure.

RÉSULTATS

PARTIE 1 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION BASALE

En condition basale, le récepteur P2X4 est très faiblement exprimé à la surface de la membrane plasmique car il est constitutivement internalisé dans les lysosomes (Robinson and Murrell-Lagnado, 2013). Dans certaines conditions pathologiques, incluant les douleurs chroniques neuropathique et inflammatoire, l'expression *de novo* de P2X4 est augmentée ainsi que son trafic à la surface (Duveau *et al.*, 2020). Afin d'étudier le rôle de l'augmentation du trafic à la surface de P2X4, observée en condition pathologique, nous avons généré au sein de notre équipe de recherche, un modèle de souris transgéniques présentant un déficit d'internalisation du récepteur (P2X4 KI) et ainsi une augmentation de sa densité à la surface. Ce modèle nous permet en partie de mimer les altérations pathologiques de la localisation subcellulaire de P2X4. De plus, l'utilisation de souris transgéniques P2X4 KO, n'exprimant plus le récepteur P2X4 nous a permis de confirmer la nécessité (ou pas) du récepteur dans les différentes conditions étudiées.

L'ensemble de nos études ont été réalisées chez les souris mâles et femelles. Étant donné les études controversées à ce sujet, aussi bien en douleur neuropathique qu'en condition inflammatoire, nous avons décidé d'analyser séparément ces résultats.

Avant d'étudier à proprement parler le rôle du récepteur P2X4 à la surface en conditions pathologiques de douleurs neuropathique et inflammatoire, nous avons tout d'abord voulu comprendre son rôle en condition basale et voir si cette altération provoquait des changements de sensibilités mécanique et thermique.

Pour cela nous avons évalué la pression nécessaire pour provoquer un retrait des pattes postérieures des souris par le test de von Frey. Ceci est caractérisé par le seuil de retrait mécanique de la patte (en grammes) et donne une indication sur la sensibilité mécanique de l'animal. Nous avons également évalué le temps de retrait de la patte (en secondes) à la suite d'un stimulus thermique grâce à l'utilisation du test plantaire. Ce test nous permet de caractériser la sensibilité thermique des souris. Ces expériences comportementales vont nous permettre de déceler de potentielles altérations de sensibilités mécanique et thermique chez nos différentes souris transgéniques et ce chez les mâles et les femelles.

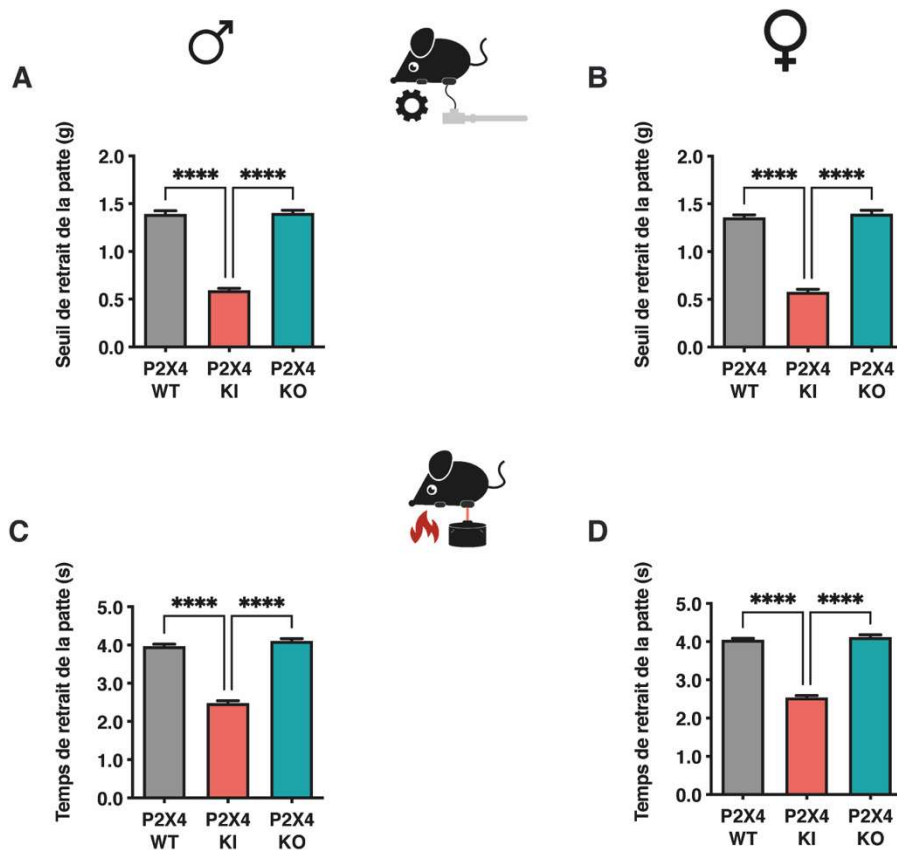


Figure 32: Diminution des seuils mécaniques et thermiques chez les souris P2X4 KI mâles et femelles.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition basale. (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (C-D) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=29-31. 1-way ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. ****= $p < 0,0001$.

Nous observons que la suppression de P2X4 chez les souris P2X4 KO n'induit pas de changements du seuil de retrait mécanique et du temps de retrait thermique de la patte, par rapport aux souris P2X4 WT (Figure 32). Cependant, nous remarquons une diminution significative du seuil de retrait mécanique de la patte chez les souris P2X4 KI par rapport aux souris P2X4 WT mâles ($0,59 \pm 0,02\text{g}$ vs $1,39 \pm 0,03\text{g}$) (Figure 32A) et femelles ($0,58 \pm 0,03\text{g}$ vs $1,36 \pm 0,02\text{g}$) (Figure 32B), traduisant une allodynie tactile. De même, le temps de retrait de la patte, à la suite d'un stimulus thermique, est significativement diminué chez les souris P2X4 KI par rapport aux P2X4 WT mâles ($2,48 \pm 0,06\text{s}$ vs $3,97 \pm 0,05\text{s}$) (Figure 32C) et femelles ($2,54 \pm 0,05\text{s}$ vs $4,05 \pm 0,04\text{s}$) (Figure 32D), caractérisant une hypersensibilité thermique.

Afin de voir si des différences existaient entre les mâles et les femelles, nous avons comparé statistiquement les résultats comportementaux de ces souris. Nous ne retrouvons aucunes différences significatives de sensibilités mécanique (Figure 33A) et thermique (Figure 33B) entre les groupes mâles et femelles, et ceci pour l'ensemble de nos génotypes.

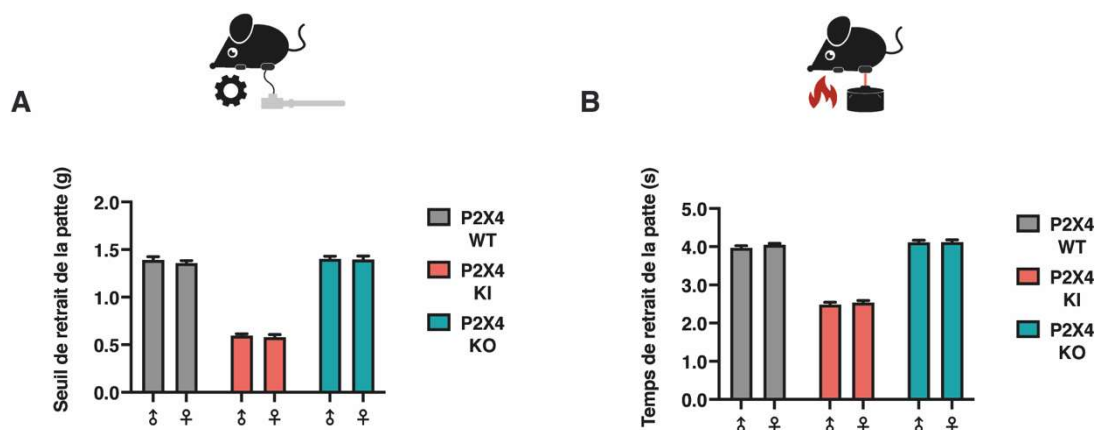


Figure 33: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre mâles et femelles. Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu), comparant les mâles et les femelles en condition basale. (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=29-31. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

L'ensemble de ces résultats montrent qu'en condition basale, l'augmentation de P2X4 à la surface serait suffisante pour induire une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique de la même manière chez les souris P2X4 KI mâles et femelles en condition basale.

Afin de vérifier que l'augmentation de P2X4 à la surface est bien responsable de cette hyperalgésie observée chez les souris P2X4KI en condition basale, nous avons testé la sensibilité mécanique en présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs P2X4, le 5-BDBD (Figure 34).

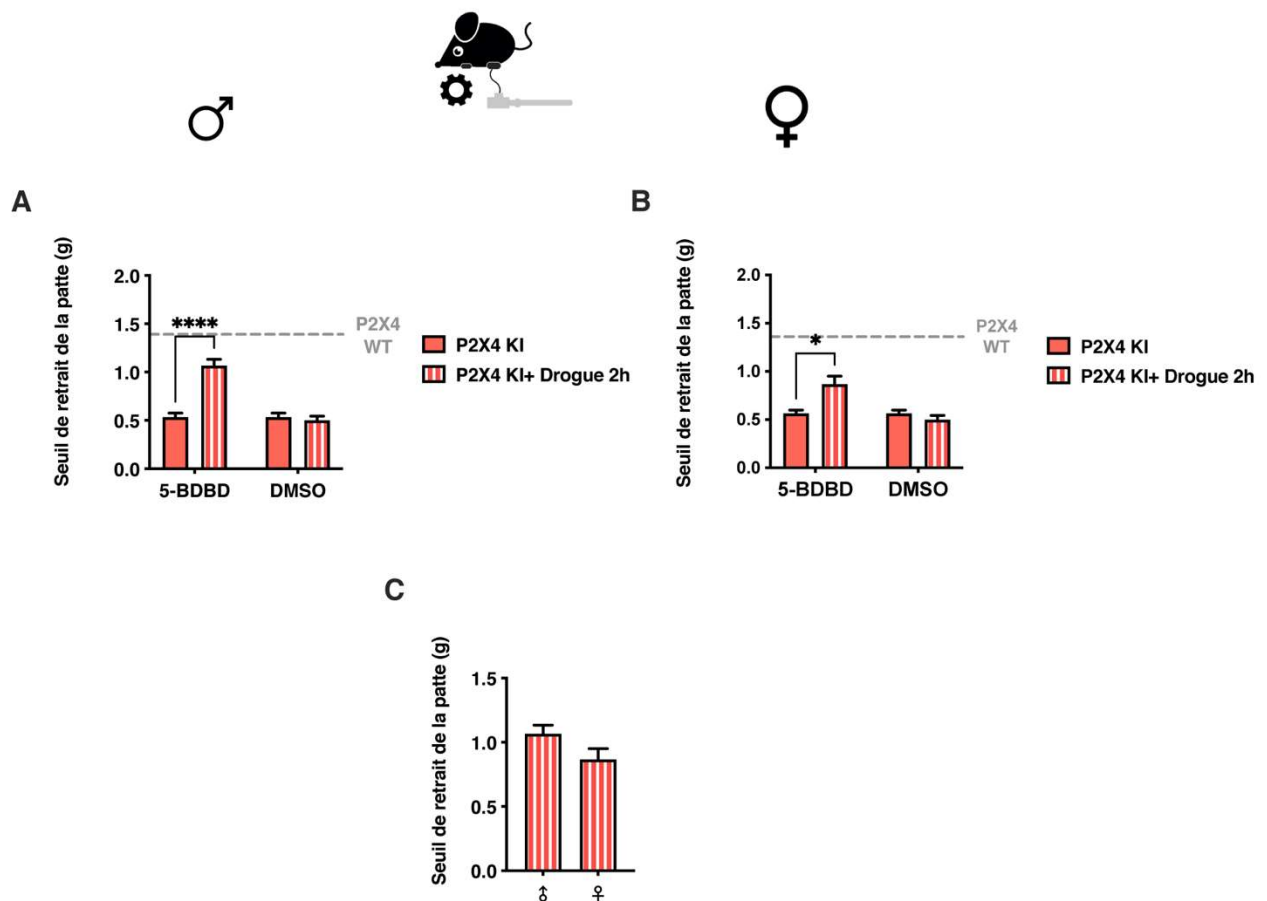


Figure 34: Effet analgésique du 5-BDBD chez les souris P2X4 KI.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez les souris transgéniques P2X4 KI mâles (gauche) et femelles (droite) en condition basale avant et après injection d'antagoniste P2X4 (5-BDBD) et son control (DMSO). (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. Le seuil de retrait des souris P2X4 WT est représenté en pointillé gris. (C) Comparaison mâles/femelles du seuil de retrait mécanique des P2X4 KI en présence de 5-BDBD. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6. (A-B) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. (C) Test de Student paramétrique non apparié. *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$.

Nous observons que l'injection de 5-BDBD (40mM, 2mL/kg) à des souris P2X4 KI induit une augmentation significative du seuil de retrait mécanique comparé à l'injection de son véhicule (DMSO) chez les mâles ($1,07 \pm 0,07g$ vs $0,53 \pm 0,04g$) et chez les femelles ($0,87 \pm 0,08g$ vs $0,5 \pm 0,05g$).

Ces résultats confirment que l'augmentation des récepteurs P2X4 à la surface est bien responsable de l'allodynie mécanique chez les P2X4 KI en condition basale.

Afin de comprendre cette hypersensibilité mécanique et thermique chez nos souris P2X4 KI, nous avons regardé si la transmission nociceptive était impactée. Pour cela, nous avons étudié l'activité des neurones de projections WDR, présents dans les couches profondes de la CDME, en réponse à une stimulation électrique des fibres afférentes primaires au niveau de la patte arrière (cf. Méthodes ; Figure 31). L'étude de ces neurones est un bon moyen de comprendre comment le SNC encode le signal douloureux perçu car ils reçoivent des afférences de tous les types de fibres afférentes primaires (A β , A δ et C) et sont modulés par les interneurons excitateurs et inhibiteurs de la CDME, ainsi que par les voies descendantes. Ainsi, nous avons évalué la présence et le nombre de PA générés par les neurones WDR en réponse à une activation spécifique des fibres C nociceptives (réponse C). Nous avons pu différencier l'activation des neurones WDR par les différentes fibres en fonction de la latence séparant la stimulation de la réponse engendrée. En effet, les PA générés par une activation des fibres A β et A δ correspondent à une réponse rapide (0-80ms) alors que ceux générés par l'activation des fibres C correspondent à une réponse lente des neurones WDR (80-300ms) (Figure 31).

Nous avons tout d'abord évalué si la sensibilisation périphérique était impactée par la suppression ou l'augmentation de P2X4 à la surface en condition basale, par enregistrements extracellulaires *in vivo* des neurones WDR. Pour cela, nous avons déterminé l'intensité de stimulation électrique minimale, de la patte postérieure de la souris, nécessaire aux neurones WDR pour déclencher une réponse C (Seuil d'activation électrique) (Figure 35A, 35B).

Ainsi, nous avons observé que le seuil d'activation des fibres C induisant une réponse nociceptive n'était pas modifié chez les souris P2X4 KO mais était significativement diminué chez les souris P2X4 KI mâles ($0,39 \pm 0,07\text{mA}$ vs $0,92 \pm 0,07\text{mA}$) et femelles ($0,41 \pm 0,05\text{mA}$ vs $0,91 \pm 0,11\text{mA}$), par rapport au souris P2X4 WT. Ces résultats montrent que l'augmentation de P2X4 à la surface induit une diminution du seuil d'activation des fibres C menant à une réponse nociceptive par les neurones WDR des couches profondes de la CDME, traduisant une hypersensibilité synaptique périphérique.

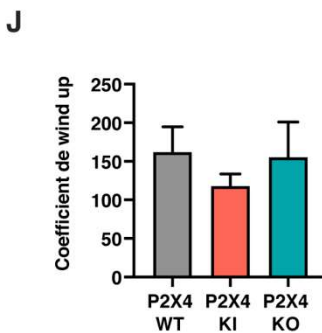
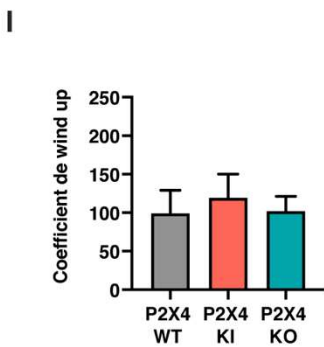
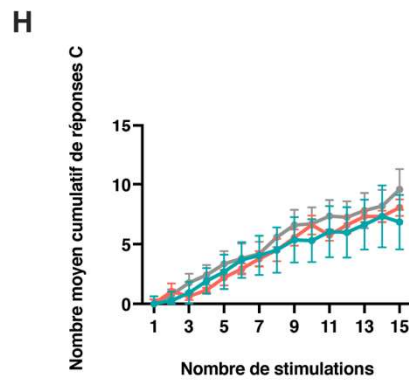
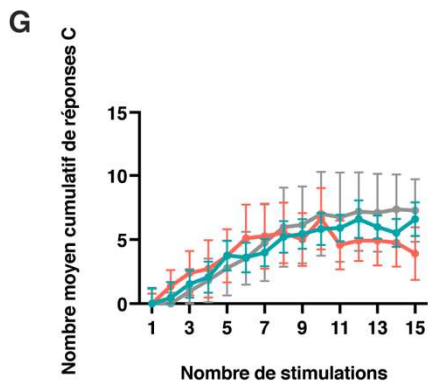
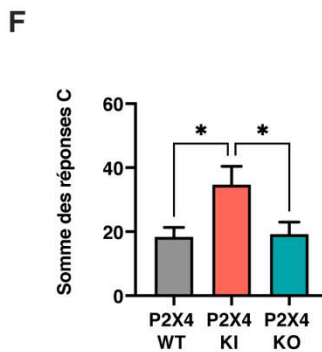
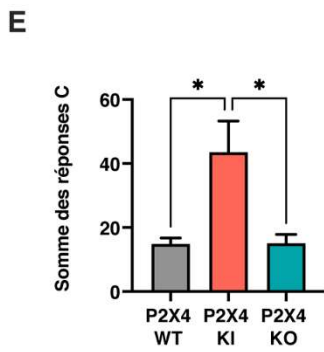
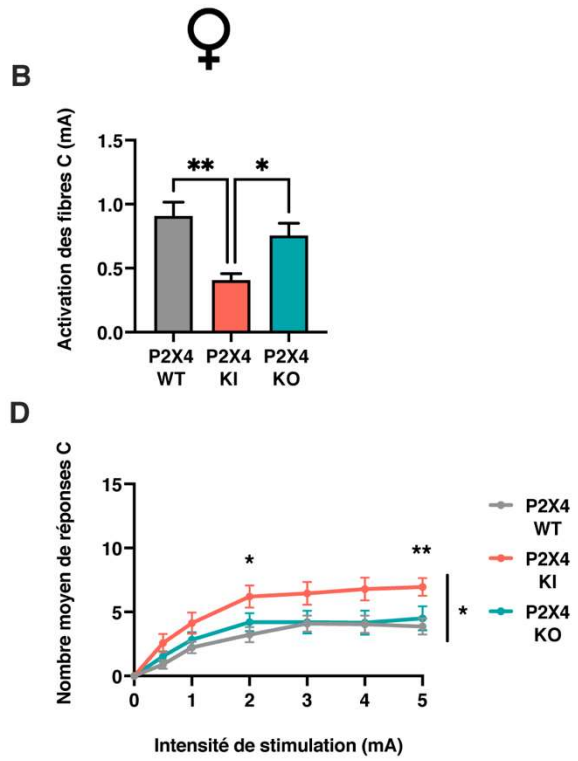
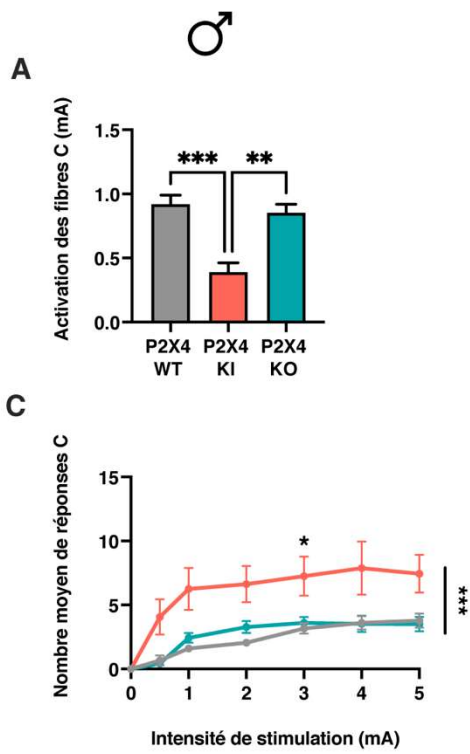


Figure 35: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris P2X4 KI.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition basale. (A-B) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (C-D) Courbe intensité-réponse (IR) représentant le nombre de réponses C en fonction de l'intensité de stimulation (0-5 mA). (E-F) Histogramme de la somme des réponses C au cours de l'IR. (G-H) Wind up montrant la réponse C cumulative suite à 15 stimulations (1Hz) de même intensité. (I-J) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=10-17 neurones sur n=3-5 souris. (A-B, E-F) 1-way ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. (C-D, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (I-J) 1-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

Nous avons ensuite déterminé si les modifications d'expression et de localisation subcellulaire de P2X4 modifiait l'excitabilité des neurones WDR. Pour cela, nous avons stimulé électriquement la patte arrière de l'animal à des intensités croissantes à très faible fréquence afin d'éviter tout phénomène de potentialisation (0,033 Hz). Nous remarquons que pour des intensités égales, la réponse C des neurones WDR était supérieure chez les souris P2X4 KI par rapport aux souris P2X4 WT et P2X4 KO (Figure 35C, 35D). D'ailleurs, lorsque nous représentons la somme des réponses C générées par les neurones WDR aux différentes intensités de stimulation, nous observons que le nombre cumulatif de PA est significativement augmenté chez les souris P2X4 KI par rapport aux souris P2X4 WT (Figure 35E, 35F), à la fois chez les mâles ($43,50 \pm 9,77$ vs $14,89 \pm 1,82$) et chez les femelles ($34,67 \pm 5,76$ vs $18,36 \pm 2,95$). Ces résultats indiquent que l'augmentation de P2X4 à la surface induit une hyperexcitabilité des neurones WDR, alors que sa suppression ne module pas cette excitabilité. Ceci traduit une augmentation de la transmission nociceptive chez les P2X4 KI à la suite du stimulus périphérique.

Certains neurones WDR sont capables de générer une forme de plasticité à court terme (PCT) appelé wind up. Ce wind up se traduit par une augmentation progressive du nombre de PA générés par les neurones WDR en réponse à des stimuli répétés à basse fréquence des fibres C et une post-décharge prolongée. Ils sont ainsi capables de moduler centralement les informations reçues par les fibres afférentes et adapter leur réponse nociceptive après un

stimulus. De plus, une étude a révélé que le récepteur P2X4 pouvait amplifier ce phénomène de wind up dans des conditions de douleurs inflammatoire (Aby *et al.*, 2018). Afin d'étudier l'implication du récepteur P2X4 dans de possibles altérations de ce phénomène en condition basale, nous avons stimulé électriquement la patte postérieure de l'animal par 15 stimulations d'intensité constante à basse fréquence (1Hz). Nous avons alors observé le nombre cumulatif de PA générés par les neurones WDR en réponse à une activation spécifique des fibres C nociceptives. L'augmentation du nombre de PA à la suite de chaque stimulation nous permettra alors de visualiser une potentielle amplification ou détérioration de l'information nociceptive perçue par ces neurones. Ces données nous ont également permis de calculer un coefficient de wind up ($CWU = \text{somme réponses C} - (15 * \text{réponse C 1}^{\text{e}} \text{ stimulation})$) qui indique lorsqu'il est positif une amplification de l'information et lorsqu'il est négatif, une inhibition de cette dernière.

Ainsi, nous n'avons pas observé de changement de l'amplitude du wind up entre les souris P2X4 WT, P2X4 KI et P2X4 KO chez les mâles et les femelles (Figure 35G, 35H). De plus, nous remarquons que même si les neurones WDR sont capables de se sensibiliser, la suppression et l'augmentation à la surface de P2X4 ne modifient pas le coefficient de wind up (Figure 35I, 35J). Ces résultats indiquent que les modifications du niveau d'expression en surface de P2X4 n'impactent pas la sensibilisation centrale des neurones WDR en condition basale.

Lors de la comparaison statistique de ces paramètres entre les mâles et les femelles, nous n'observons aucune différence statistique entre les deux sexes (Figure 36).

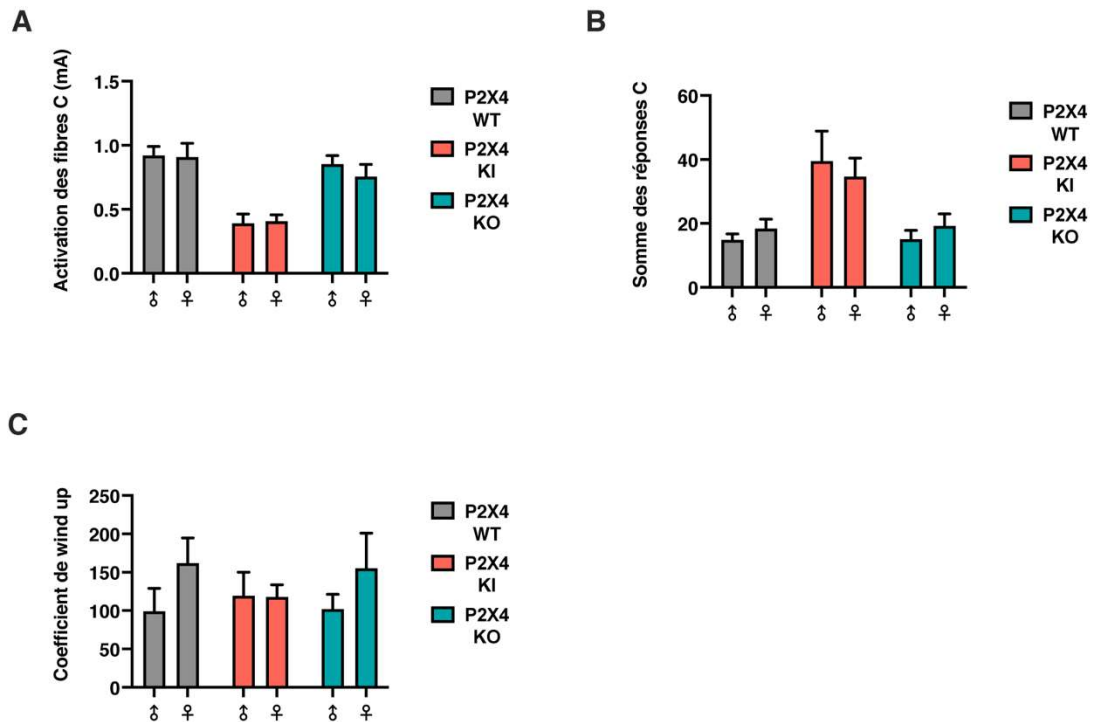


Figure 36: Pas de modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones WDR entre les mâles et les femelles.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) comparant les mâles et les femelles en condition basale. (A) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (B) Histogramme de la somme des réponses C au cours de l'IR. (D) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=10-17 neurones sur n=3-5 souris. (A-C) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

L'ensemble de ces résultats nous indique qu'en condition basale, la suppression de P2X4 chez les souris P2X4 KO ne change pas les propriétés électrophysiologiques des neurones WDR. Cependant, l'augmentation de P2X4 à la surface, chez les souris P2X4 KI, induit une hyperexcitabilité des neurones WDR traduisant une augmentation de la sensibilité synaptique périphérique et de la transmission nociceptive chez les mâles et les femelles.

PARTIE 2 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA DOULEUR NEUROPATHIQUE

En condition neuropathique, il a été révélé que le récepteur P2X4 était nécessaire au développement d'une allodynie mécanique (Tsuda *et al.*, 2003; Ulmann *et al.*, 2008) mais sa nécessité pour induire une hypersensibilité thermique n'a pas encore été démontrée. De plus, il a été montré *in vitro* que l'allodynie mécanique était due, chez les mâles, à une augmentation de P2X4 à la surface des microglies de la CDME (Toyomitsu *et al.*, 2012). Cependant, cela n'a jamais été montré *in vivo*. De plus, le rôle de l'augmentation de P2X4 à la surface n'a jamais été étudié chez les femelles.

Afin de comprendre le rôle de l'augmentation en surface de P2X4 chez nos souris P2X4 KI et de confirmer les effets de la suppression de P2X4, en condition neuropathique, nous avons tout d'abord voulu voir son impact sur l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique au cours du temps (Figure 37). Pour cela, nous avons induit une neuropathie par une ligature partielle du nerf sciatique (SNI) à nos différentes souris transgéniques. De plus, nous avons contrôlé que les effets observés étaient bien dus à la neuropathie et pas à la chirurgie en elle-même (Sham).

Nous confirmons tout d'abord que la neuropathie induit, chez nos souris P2X4 WT mâles et femelles, une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique, caractérisées respectivement par une diminution du seuil de retrait et de la latence de retrait de la patte à la suite de stimuli mécanique et thermique. De plus, nous observons que cette augmentation de sensibilités est visible 7 jours après la lésion et se stabilise à partir de 14 jours (Figure 37C, 37D, 37I, 37J) et se maintient jusqu'à au moins 21 jours après la lésion (Figure 37A, 37B, 37G, 37H). La suppression de P2X4 chez les souris P2X4 KO supprime cette allodynie mécanique et cette hypersensibilité thermique au cours du temps chez les mâles et les femelles. Ainsi, cela confirme la nécessité de P2X4 pour induire l'augmentation de sensibilité mécanique et thermique en condition neuropathique. De plus, nous remarquons que l'augmentation du trafic à la surface de P2X4 chez nos souris P2X4 KI n'altère pas

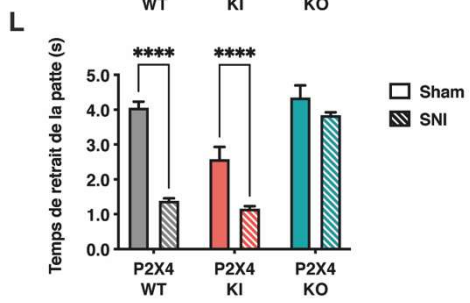
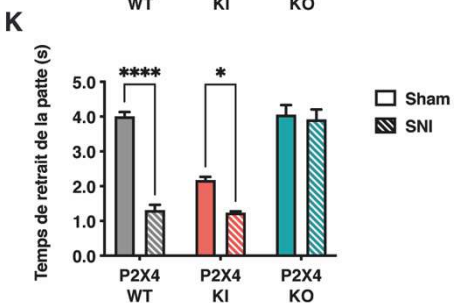
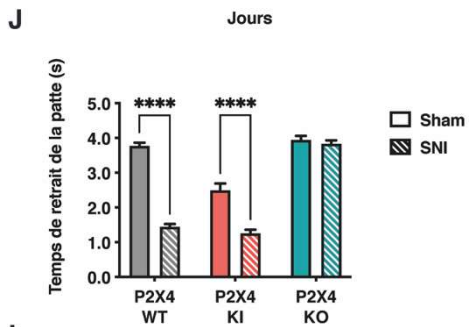
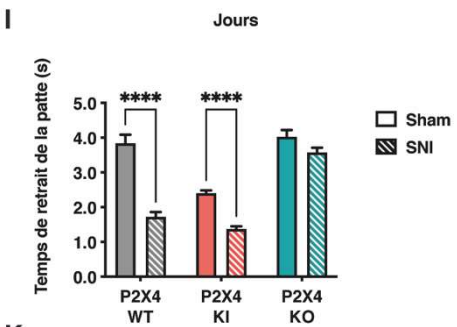
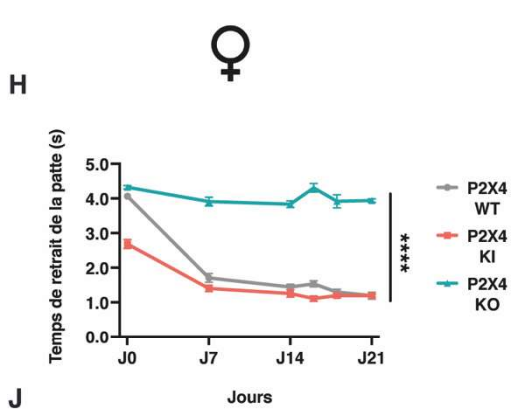
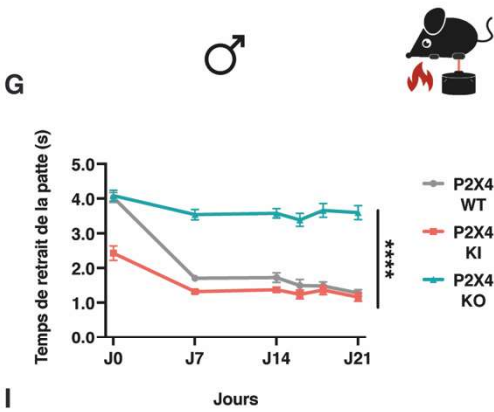
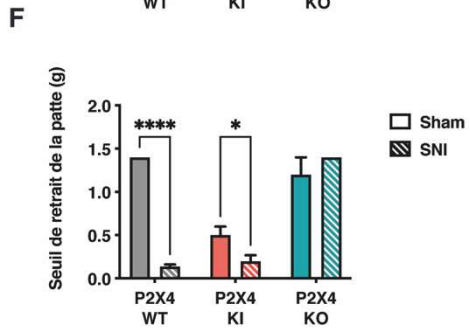
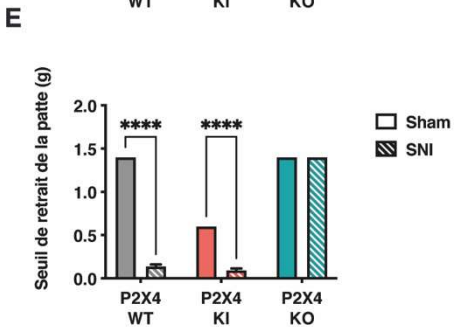
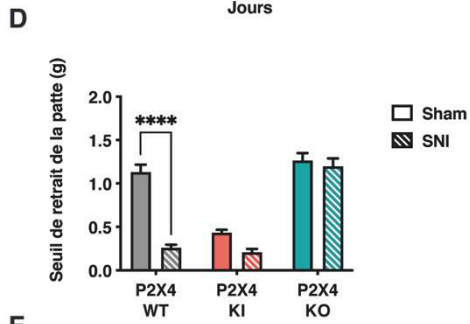
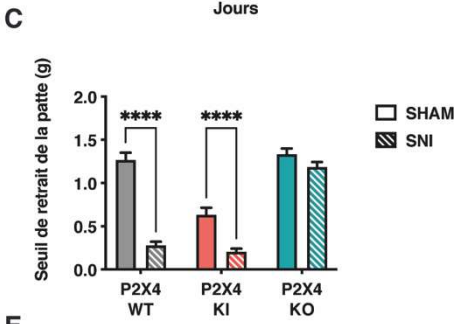
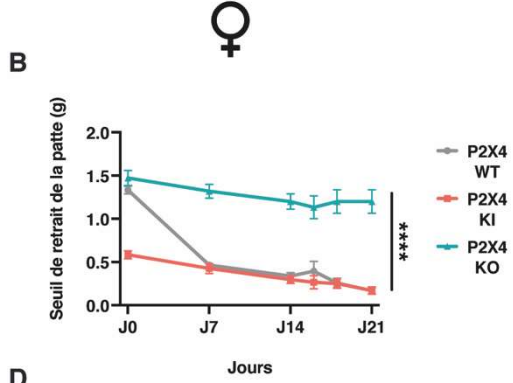
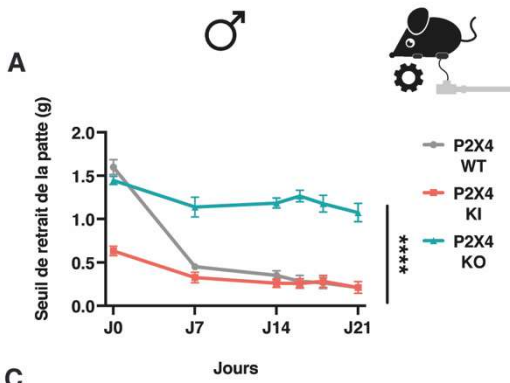


Figure 37: Suppression de la diminution des seuils mécaniques et thermiques en condition neuropathique chez les souris P2X4 KO.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition neuropathique (SNI) et son contrôle (Sham). (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué au cours du temps (0 à 21 jours) après une lésion de nerf sciatique (SNI) par le test de von Frey. (C-D) Histogramme du seuil de retrait mécanique (g) 14 jours après la lésion. (E-F) Histogramme du seuil de retrait mécanique (g) 77 jours après la lésion. (G-H) Latence de retrait thermique (s) mesurée au cours du temps (0 à 21 jours après la lésion) par le test plantaire. (I-J) Histogramme de la latence de retrait thermique (s) 14 jours après la lésion. (K-L) Histogramme de la latence de retrait thermique (s) 77 jours après la lésion. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-13 pour les SNI et n=6 pour les Sham. (A-B, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (C-F, I-L) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$.

L'hypersensibilité causée par la neuropathie et n'induit pas de hausse supplémentaire de cette sensibilité chez les mâles et les femelles.

Nous avons pu également observer l'effet de la neuropathie sur la sensibilité mécanique et thermique à plus long terme, soit 77 jours après la lésion (Figure 37E, 37F, 37K, 37L). Ainsi, nous observons que les seuils et les temps de retraits de la patte des souris P2X4 WT et P2X4 KI neuropathique (SNI) sont toujours diminués par rapport aux souris P2X4 WT et P2X4 KI contrôles (Sham). L'augmentation des sensibilités mécanique et thermique se maintient plus de deux mois après la lésion.

Après analyse statistique comparant les mâles et les femelles, nous observons que la neuropathie affecte les sensibilités mécanique et thermique de la même manière chez les deux sexes (Figure 38).

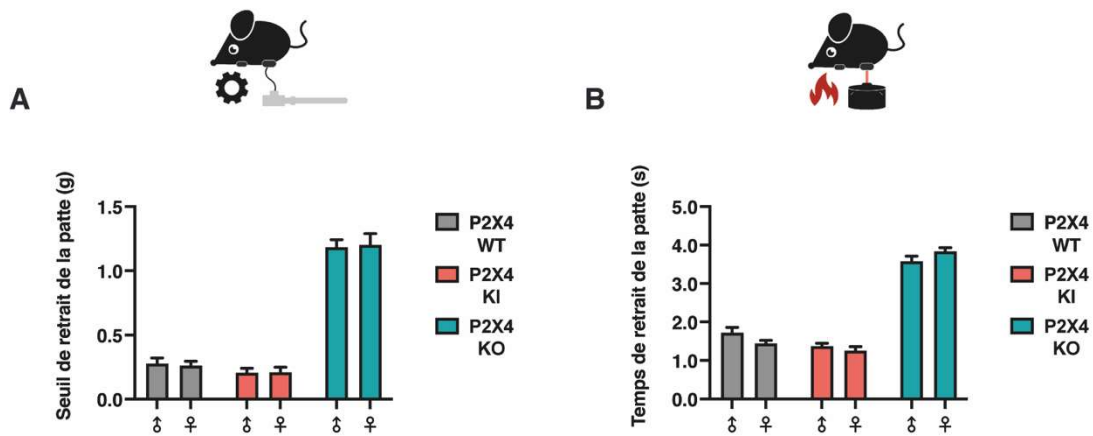


Figure 38: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre mâles et femelles en condition neuropathique.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu), comparant les mâles (gauche) et les femelles (droite) en condition neuropathique. (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=29-31. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Ces résultats confirment que le récepteur P2X4 est nécessaire au développement et au maintien de l'allodynie mécanique et thermique en condition neuropathique. De plus, ces résultats montrent que la seule augmentation de P2X4 à la surface exprimée en conditions normales, ne médierait que partiellement l'hyperalgésie neuropathique.

Afin de confirmer que l'allodynie mécanique provoquée par la neuropathie est partiellement due à l'activation de P2X4 à la surface, nous avons bloqué l'activation de P2X4 par l'administration intra-péritonéale de 5BDBD, 14 jours après la lésion du nerf sciatique (Figure 39).

Ainsi, nous observons, en condition neuropathique, une augmentation du seuil de retrait mécanique de la patte 2 heures après l'injection de 5BDBD chez les souris P2X4 KI en comparaison de l'injection de son solvant (DMSO) chez les mâles ($0,87 \pm 0,08g$ vs $0,12 \pm 0,02g$) et chez les femelles ($0,99 \pm 0,27g$ vs $0,20 \pm 0,08g$). Aussi, nous n'observons pas de différences

entre les deux sexes (Figure 39C). Ainsi, le blocage pharmacologique de P2X4 à la surface induit un effet analgésique.

Cependant, nous remarquons que cet effet analgésique n'est pas total car il ne restaure pas le niveau de sensibilité mécanique des souris P2X4 KI à un niveau basale observé chez les souris P2X4 WT. Ceci suggère que d'autres mécanismes, autre que l'activation de P2X4 à la surface serait impliquée dans l'allodynie mécanique neuropathique.

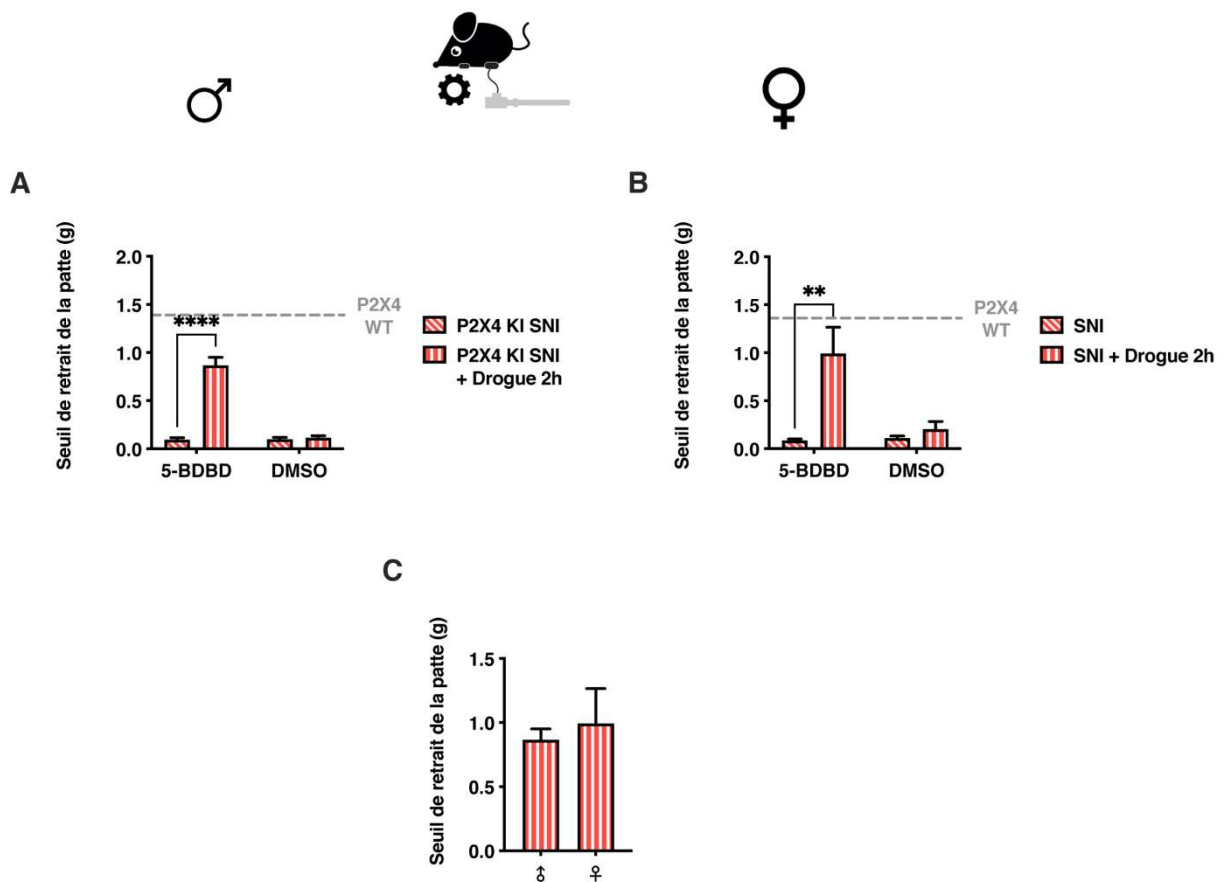


Figure 39: Effet analgésique du 5BDBD chez les souris P2X4 KI SNI.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez les souris transgéniques P2X4 KI mâles (gauche) et femelles (droite) en condition neuropathique (SNI) avant et après injection d'antagoniste P2X4 (5BDBD) et son control (DMSO). (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. Le seuil de retrait des souris P2X4 WT en condition basale est représenté en pointillé gris. (C) Comparaison mâles/femelles du seuil de retrait mécanique des P2X4 KI en présence de 5BDBD. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6 souris. (A-B) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. (C) Test de Student paramétrique non apparié. *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,0001$.

Ces résultats confirment donc qu'en condition neuropathique, l'allodynie mécanique est induite par l'activation de P2X4 à la surface et d'autres mécanismes, potentiellement l'augmentation de la synthèse *de novo* de P2X4.

En condition neuropathique, l'activation de P2X4 à la surface induit partiellement l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique. Nous avons alors observé par enregistrement *in vivo* des neurones WDR, comment la transmission nociceptive était altérée et comment des modifications de P2X4 impactaient cette transmission.

Nous avons tout d'abord évalué comment la neuropathie en elle-même affectait ces neurones WDR chez des souris P2X4 WT 14 jours après la lésion (Figure 40).

Nous observons que le seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C nociceptives est diminué chez les souris P2X4 WT SNI comparées aux souris P2X4 WT Sham chez les mâles ($0,43 \pm 0,04\text{mA}$ vs $0,97 \pm 0,10\text{mA}$) et les femelles ($0,59 \pm 0,11\text{mA}$ vs $0,95 \pm 0,10 \text{mA}$) (Figure 40A, 40B). Ces résultats montrent que la neuropathie induit une hypersensibilité des neurones WDR en réponse à une activation des fibres C.

De plus, nous remarquons que pour une même intensité de stimulation, la réponse C des neurones WDR est augmentée en neuropathie chez les souris mâles (Figure 40C). D'ailleurs, la somme des réponses C générées par les neurones WDR à la suite de stimulation électrique d'intensité croissante est également augmentée en condition neuropathique, chez les souris P2X4 WT SNI mâles par rapport aux souris P2X4 WT Sham ($24,54 \pm 13,46$ vs $12,12 \pm 4,81$) (Figure 40E). Cependant, chez les souris femelles, nous n'observons pas cette augmentation ($17,79 \pm 8,63$ vs $17,23 \pm 9,90$) (Figure 40D, 40F). Ces résultats indiquent que la neuropathie induit une augmentation de l'excitabilité des neurones WDR uniquement chez les mâles et pas chez les femelles.

Nous avons également évalué si les propriétés de sensibilisation centrale des neurones WDR étaient modifiées par la neuropathie, par l'étude de la capacité de wind up. La neuropathie ne semble pas changer la capacité des neurones WDR à se sensibiliser chez les souris P2X4 WT SNI par rapport aux souris P2X4 WT Sham. En effet, ni l'amplitude du wind up, ni le coefficient

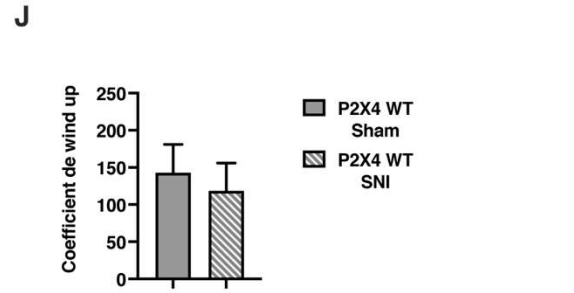
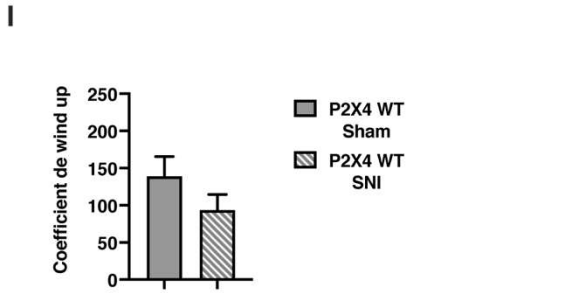
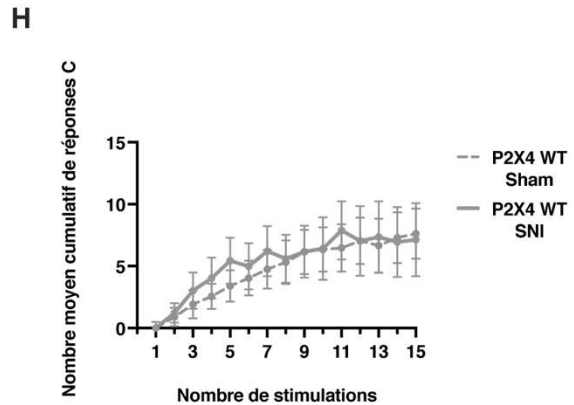
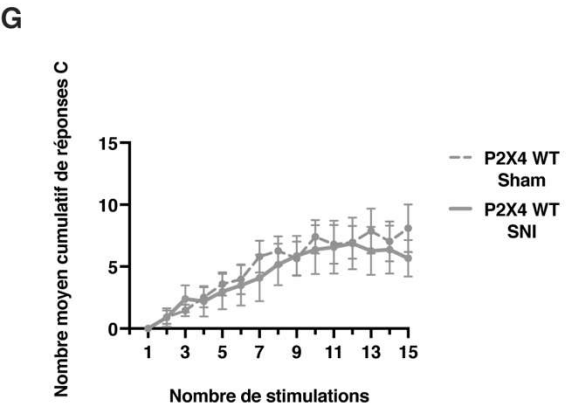
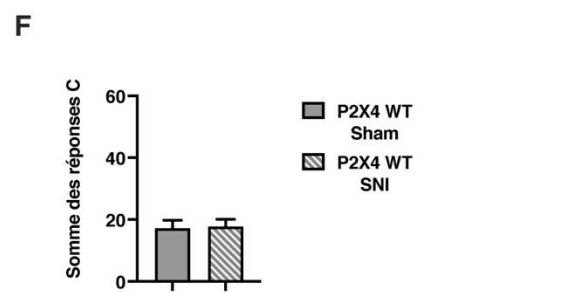
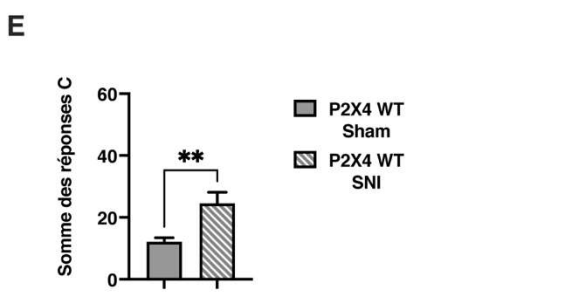
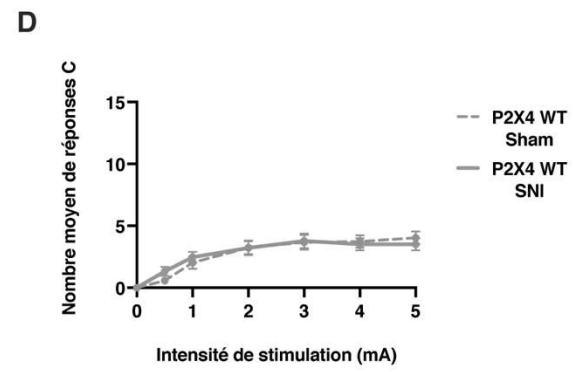
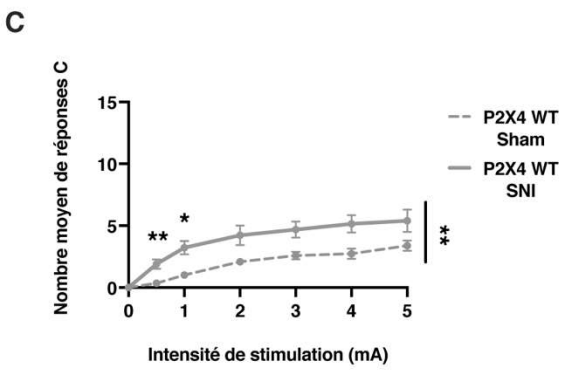
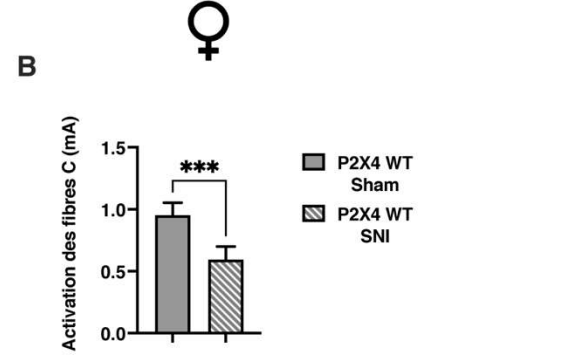
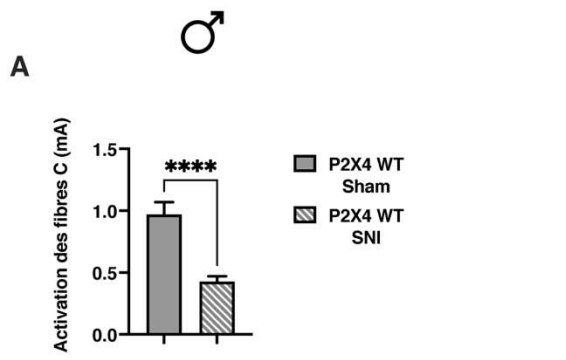


Figure 40: : Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR uniquement chez les mâles en condition neuropathique.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris P2X4 WT (gris) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition neuropathique (SNI) et son contrôle (Sham). (A-B) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (C-D) Courbe intensité-réponse (IR) représentant le nombre de réponses C des neurones WDR en fonction de l'intensité de la stimulation (0-5 mA). (E-F) Histogramme de la somme des réponses C au cours de l'IR. (G-H) Wind up montrant la réponse C cumulative des neurones WDR suite à 15 stimulations (1Hz) de même intensité. (I-J) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=13-21 neurones sur n=3-8 souris. (A-B, E, J) Test de Student non paramétrique non apparié (Mann-Whitney). (C-D, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. (F, I) Test de Student paramétrique non apparié. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$.

de wind up ne sont changés par la neuropathie. Ainsi, en condition neuropathique, les neurones WDR ne montrent pas de modifications de leurs capacités de PCT, aussi bien chez les mâles et chez les femelles.

L'ensemble de ces résultats montre que la neuropathie induit une hyperexcitabilité des neurones WDR et ainsi une augmentation de la transmission nociceptive uniquement chez les souris mâles et pas chez les souris femelles. Ces résultats suggèrent l'implication de voies de transmission nociceptive différentes entre les deux sexes.

Afin de voir si les modifications d'expression ou de localisation subcellulaire de P2X4 modifiaient la transmission nociceptive en condition neuropathique, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques des neurones WDR chez les souris P2X4 KI et P2X4 KO mâles et femelles (Figure 41).

Nous observons que le seuil d'activation des neurones WDR suivant la stimulation électrique des fibres C n'était pas modifié chez les souris n'exprimant plus le récepteur P2X4 en condition neuropathique, P2X4 KO SNI par rapport aux souris P2X4 KO Sham mâles ($0,41 \pm 0,05\text{mA}$ vs $0,44 \pm 0,06\text{mA}$) et femelles ($0,45 \pm 0,05\text{mA}$ vs $0,48 \pm 0,07\text{mA}$) (Figure 41A, 41B). Ceci indique que le récepteur P2X4 est nécessaire à l'activation des fibres C projetant sur les neurones WDR. De plus, l'augmentation de P2X4 à la surface chez les P2X4 KI en condition neuropathique ne diminue pas d'avantage le seuil déjà abaissé en condition basale. Nous pouvons alors en conclure que l'activation des neurones WDR par les fibres C nociceptives est dirigée par l'augmentation de P2X4 à la surface.

Lors de l'étude de l'excitabilité des neurones WDR (Figure 41C-F), nous constatons que la suppression de P2X4 chez les souris P2X4 KO supprime l'hyperexcitabilité neuronale observée en neuropathie chez les mâles et n'affecte pas l'excitabilité des neurones WDR chez les femelles. De plus, nous remarquons que l'augmentation de P2X4 à la surface chez les souris P2X4 KI mâles n'induit pas d'hyperexcitabilité des neurones WDR. Ce résultat est assez surprenant car cette même augmentation provoquait une hausse de l'excitabilité neuronale en condition basale. Chez les souris femelles, le défaut d'internalisation de P2X4 chez les souris P2X4 KI en condition neuropathique induit, comme en condition basale, une augmentation des réponses C des neurones WDR pour une même intensité de stimulation. Ainsi, ces résultats indiquent que le récepteur P2X4 module différemment l'excitabilité des neurones WDR en condition neuropathique chez les mâles et les femelles. En effet, chez les mâles, le récepteur P2X4 semble nécessaire pour induire l'hyperexcitabilité des neurones, mais son augmentation à la surface semble avoir un effet inhibiteur sur cette dernière. En revanche, chez les femelles, l'hyperexcitabilité des neurones WDR n'est observée que lorsque le récepteur P2X4 est augmenté à la surface chez les P2X4 KI indépendamment de la neuropathie.

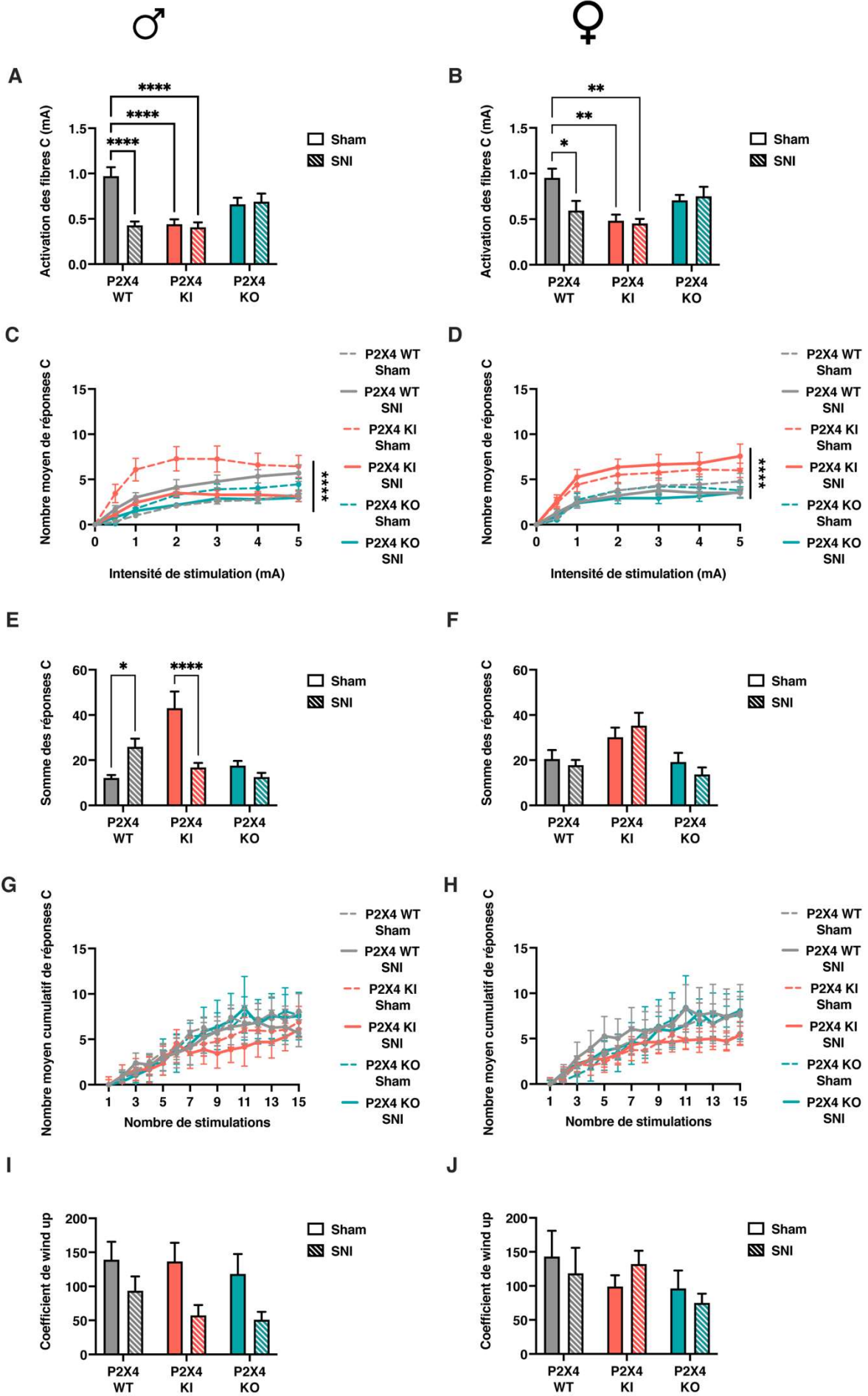


Figure 41: Diminution de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris P2X4 KI mâles en condition neuropathique.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projections WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) des souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite), en condition neuropathique (SNI) et son contrôle (Sham). (A-B) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (C-D) Courbe intensité-réponse (IR) représentant le nombre de réponses C des neurones WDR en fonction de l'intensité de la stimulation (0-5 mA). (E-F) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (G-H) Wind up montrant la réponse C cumulative des neurones WDR suite à 15 stimulations (1Hz) de même intensité. (I-J) Facilitation centrale de la réponse C caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=13-25 neurones sur n=3-8 souris. (A-B) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (C-D, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (E-F, I-J) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$.

En condition neuropathique, la plasticité à court terme des neurones WDR n'est pas modifiée. Néanmoins nous avons regardé si des modifications du récepteur P2X4 pouvait améliorer ou au contraire détériorer cette propriété (Figure 41G-J).

Ainsi, nous observons que la suppression de P2X4 et son augmentation à la surface tend à diminuer le coefficient de wind up en condition neuropathique, respectivement chez les souris P2X4 KI et P2X4 KO mâles. Ceci semble indiquer que le récepteur P2X4 jouerait potentiellement un rôle dans la sensibilisation centrale des neurones WDR. En revanche, nous n'observons pas ce phénomène chez les souris femelles. En effet, l'augmentation à la surface ou la suppression de P2X4 ne module pas la capacité des neurones de moduler l'information nociceptive reçue.

La comparaison statistique de ces précédents résultats obtenus chez les mâles et femelles (Figure 42) montre que l'augmentation de P2X4 à la surface n'impacte pas de la même manière les souris mâles et femelles. En effet, on peut voir que cette augmentation induit une hausse de l'excitabilité des neurones WDR chez les femelles mais pas chez les mâles. De plus, elle module différemment les capacités de sensibilisation centrale des neurones WDR, qui sont détériorées uniquement chez les mâles.

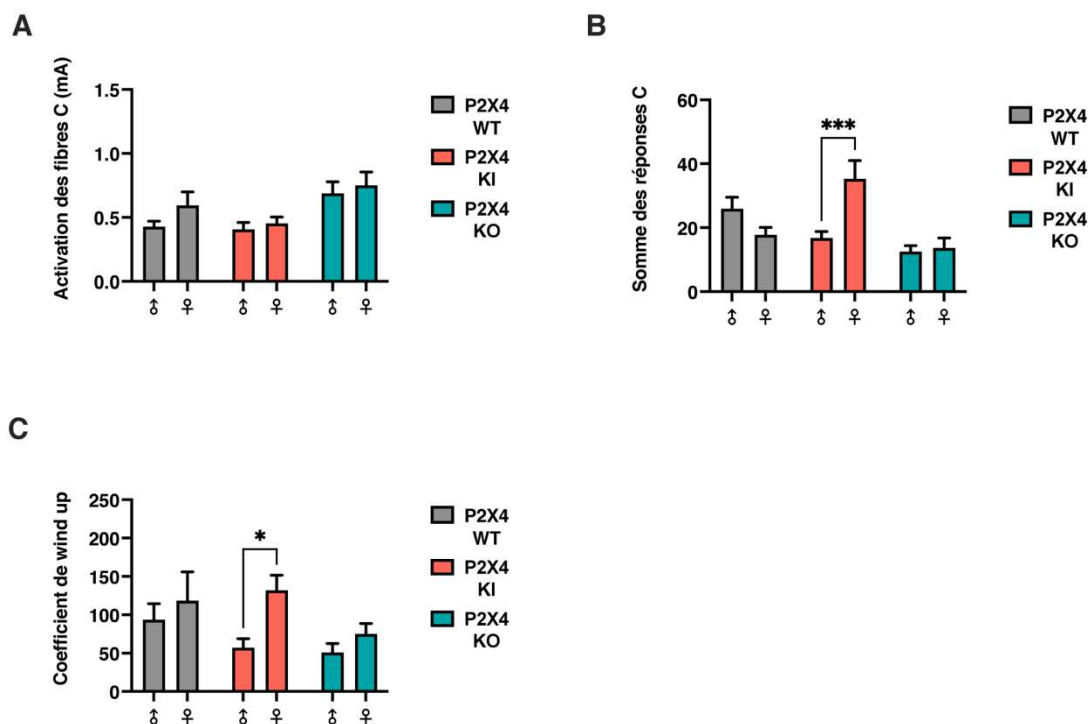


Figure 42: Augmentation de l'excitabilité et de la sensibilisation des neurones WDR chez les souris femelles P2X4 KI.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projections WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) comparant les mâles (gauche) et les femelles (droite) en condition neuropathique (SNI). (A) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (B) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (D) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=13-25 neurones sur n=3-8 souris. (A-C) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$.

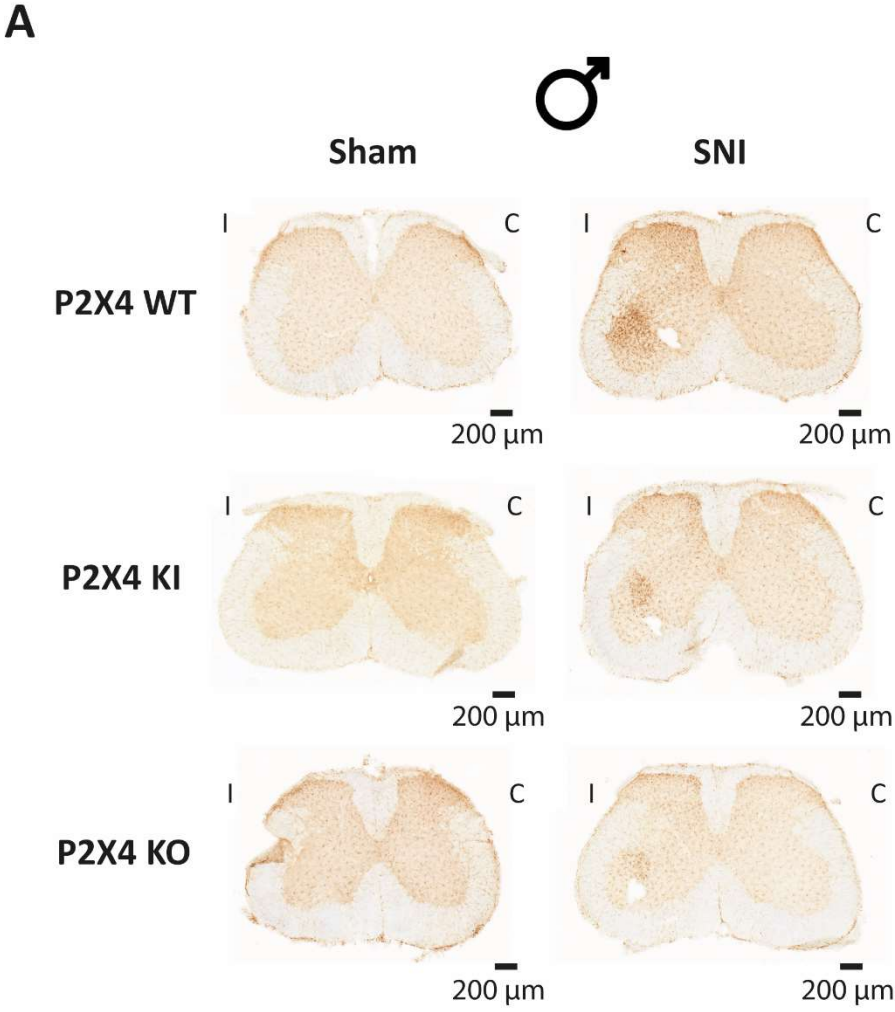
L'ensemble de ces résultats montrent que la transmission nociceptive en condition neuropathique est modulée de manière P2X4-dépendante et ce différemment chez les mâles et les femelles.

Nous savons désormais que la transmission nociceptive et le comportement douloureux qui en résulte dépend de l'augmentation à la surface du récepteur P2X4. Cependant, nous n'avons pas encore établi le type cellulaire concerné.

Bien que de précédentes études aient démontré l'importance du récepteur P2X4 microglial dans l'établissement de la douleur neuropathique, une seule étude a démontré par marquage immunohistochimique la présence de P2X4 à la surface de microglies en culture (Bergmann *et al.*, 2019). De plus, bien que débattu, il a été suggéré que le récepteur P2X4 microglial n'était pas impliqué en condition neuropathique chez les femelles.

Nous avons tout d'abord voulu confirmer à l'aide d'un marqueur microglial (Iba1) que la lésion du nerf sciatique induisait bien une prolifération et une activation microgliale du côté ipsilatérale à la lésion. Aussi, nous avons regardé l'effet de la suppression ou de l'augmentation de P2X4 à la surface sur cette microglie. Pour cela, nous avons quantifié la surface occupée par la microglie dans la CDME ipsilatérale et contralatérale à la lésion et nous avons fait le ratio de ces deux données. Si ce ratio est supérieur à 1, la prolifération et l'activation microgliale seront plus importantes du côté ipsilatéral (Figure 43).

Ainsi, nous confirmons que la neuropathie augmente la prolifération et l'activation microgliale du côté ipsilatérale à la lésion chez les souris P2X4 WT mâles ($1,67 \pm 0,13$ vs $1,02 \pm 0,06$) et femelles ($1,73 \pm 0,19$ vs $0,92$ vs $0,08$). De plus, nous observons que la suppression de P2X4 chez les P2X4 KO et son augmentation à la surface chez les P2X4 KI ne modifient pas cette microgliose due à la neuropathie chez les mâles et les femelles.



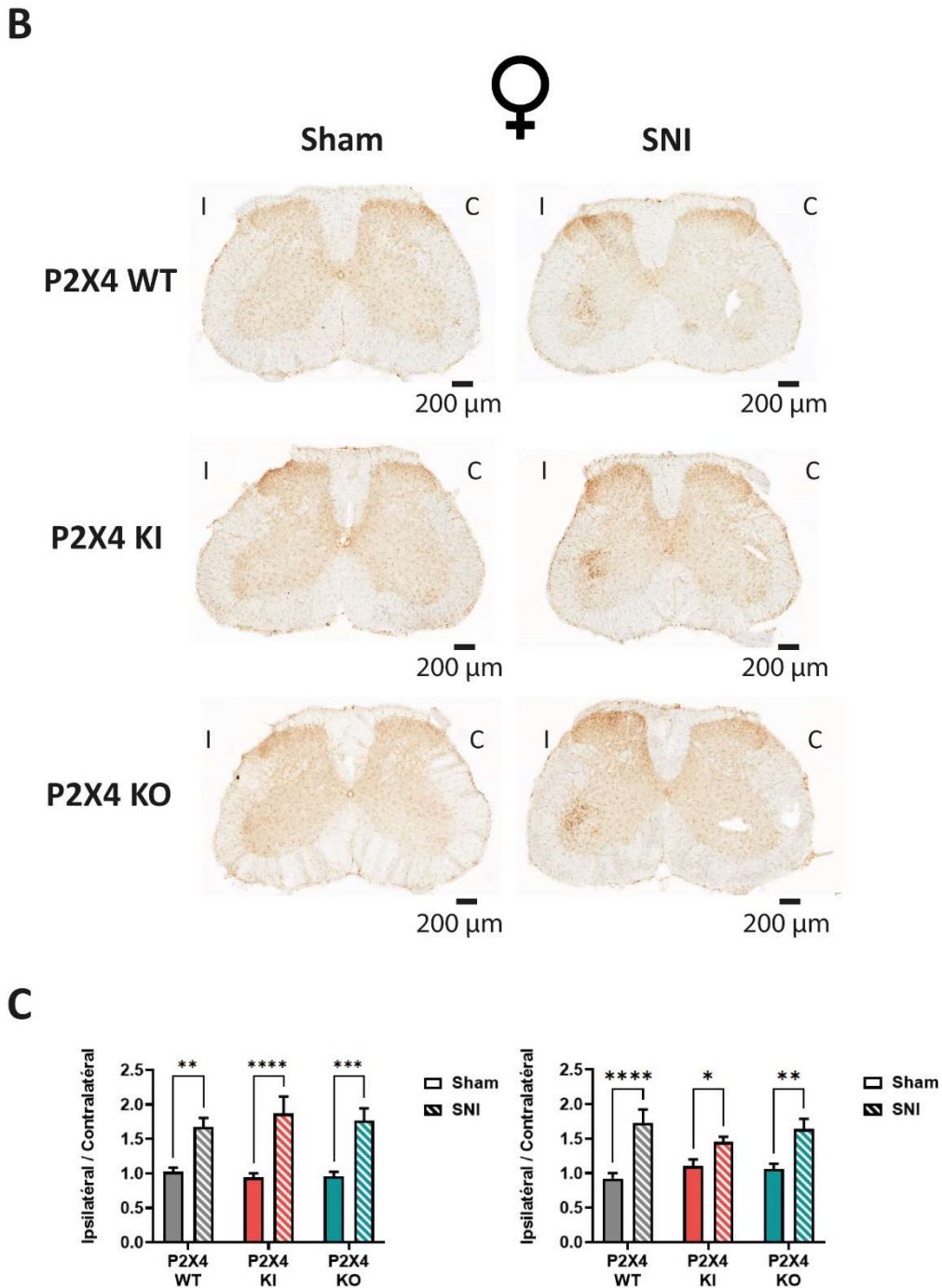
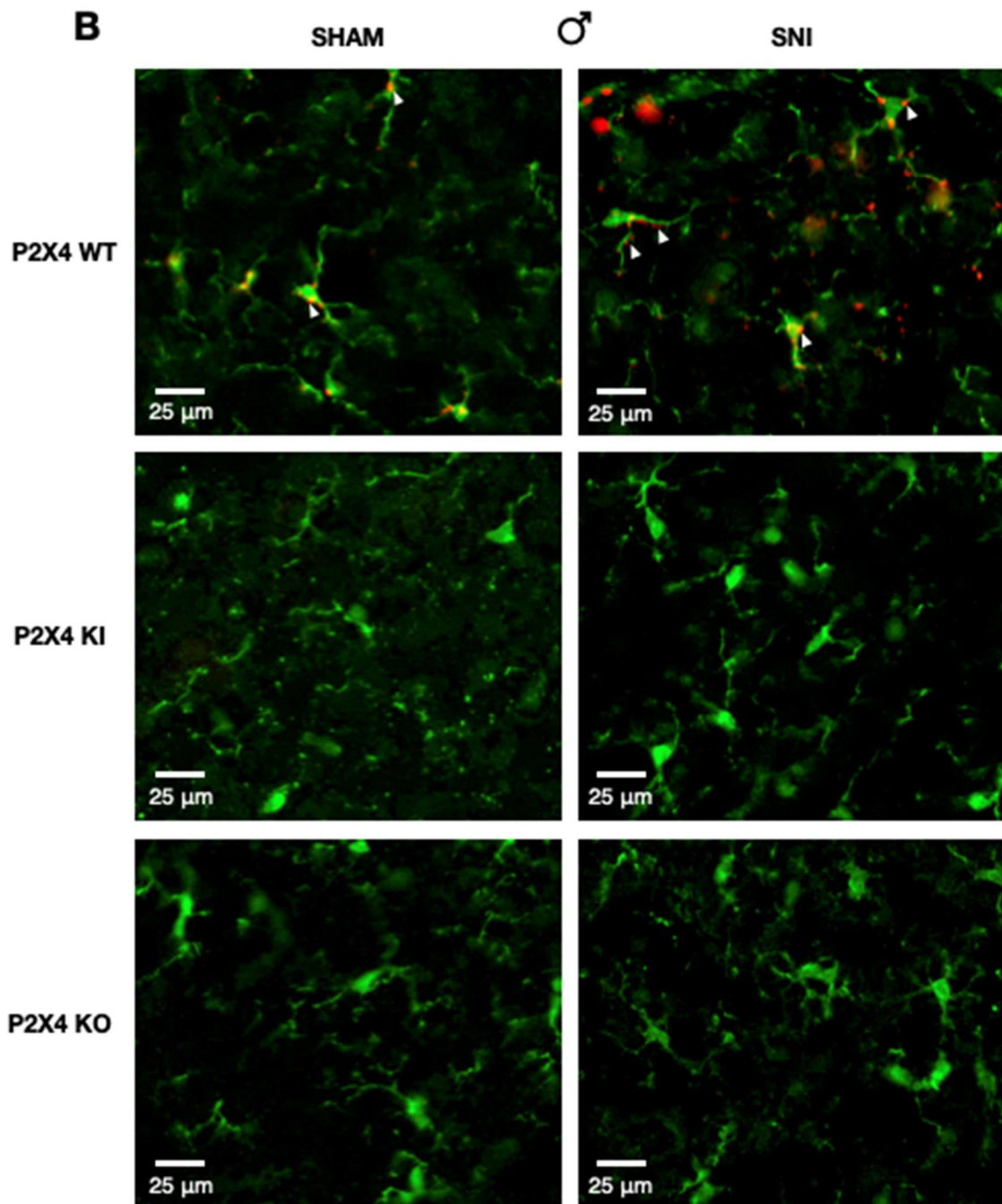
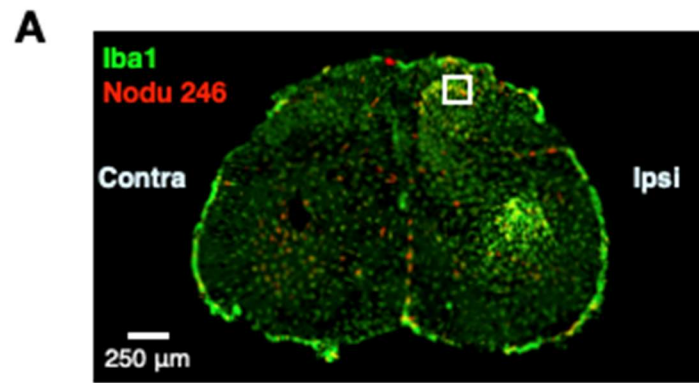


Figure 43: La neuropathie induit une activation et une prolifération microgliale.

(A-B) Marquage immunohistochimique Iba1 (microglie) sur des moelles épinières de souris neuropathiques (SNI) et son contrôle (Sham). (C) Quantification de la surface occupée par le marquage révélé par la DAB dans le côté ipsilatéral à la lésion par rapport au côté contralatéral. Les valeurs correspondent au ratio I/C \pm S.E.M ; n=2-3 souris. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$. (I : Côté ipsilatéral à la lésion ; C : côté contralatéral à la lésion).

Ces résultats confirment que la présence de P2X4 à la surface n'est ni suffisante, ni nécessaire pour induire l'activation microgliale causée par la neuropathie.

Nous avons ensuite voulu identifier si les cellules microgliales exprimaient P2X4 et si cette expression était modulée en condition neuropathique. Pour cela, nous avons marqué par marquages immunohistochimiques le récepteur P2X4 avec l'anticorps Nodu 246 (en rouge) et la microglie avec un anticorps anti-Iba1 (en vert) (Figure 44).



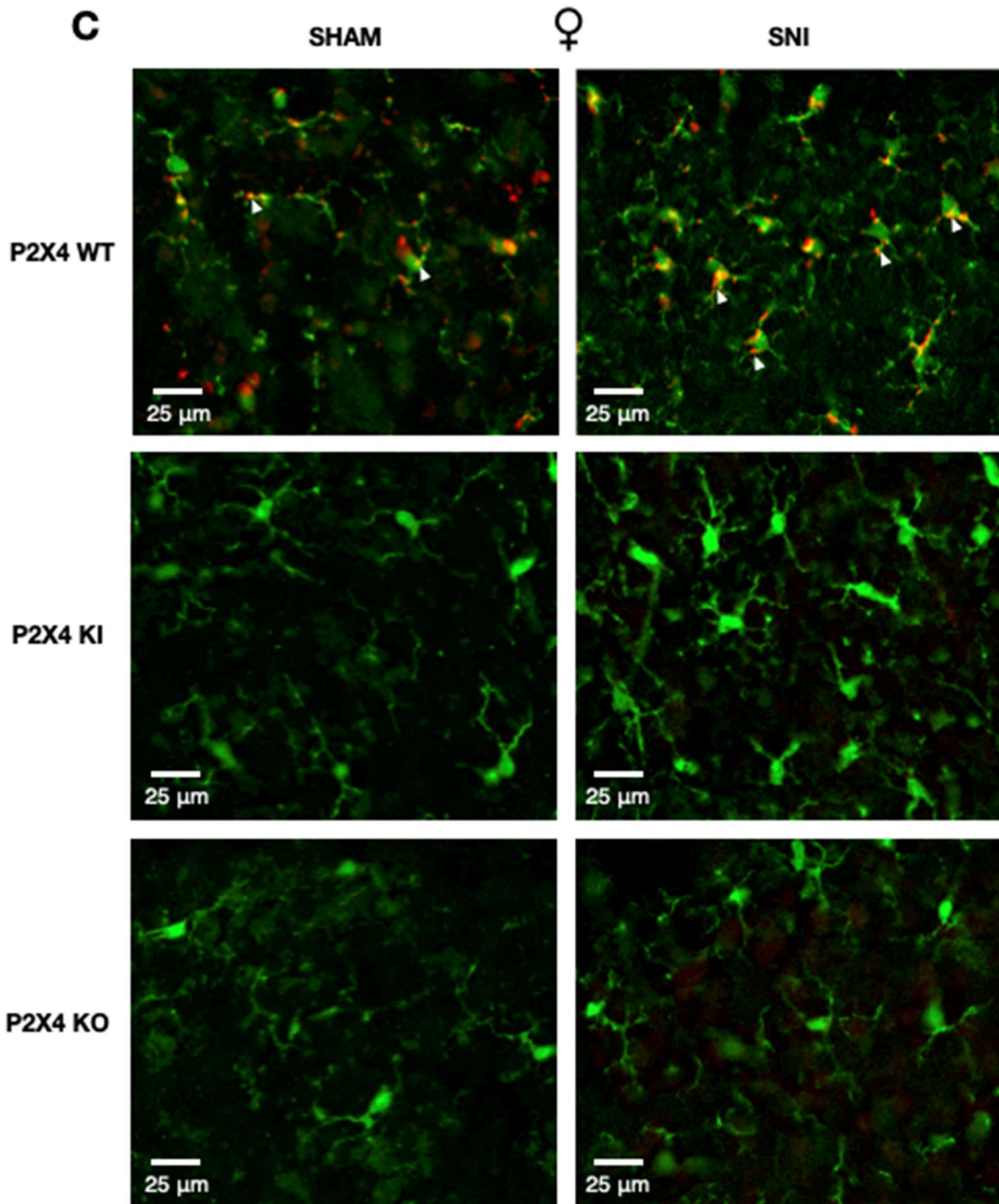


Figure 44: P2X4 exprimé dans les microglies de la CDME chez les souris P2X4 WT mâles et femelles.

Co-marquage immunohistochimique de Iba1 (microglie, vert) et Nodu 246 (P2X4, rouge) dans la CDME chez des souris neuropathiques (SNI) et leur contrôle (Sham). (A) Représentation d'une moelle épinière entière montrant l'activation microgliale ventrale et dorsale du côté ipsilatéral à la lésion caractéristique de la zone lombaire L4-L5 après neuropathie. Le carré blanc représente la zone zoomée. (B) Expression de P2X4 à la surface des microglies de la CDME ipsilatérale chez les souris mâles. (C) Expression de P2X4 à la surface des microglies de la CDME ipsilatérale chez les souris femelles. (Ipsi: Côté ipsilatéral à la lésion; Contra: côté contralatéral à la lésion)

Nous remarquons premièrement que P2X4 est exprimé en faible quantité dans certaines microglies chez les souris P2X4 WT Sham mâles et femelles. De plus, la neuropathie semble induire une augmentation de l'expression des récepteurs P2X4 microgliaux aussi bien chez les souris P2X4 WT mâles que chez les femelles.

Nous confirmons ensuite que le marquage de P2X4 par l'anticorps Nodu 246 est bien spécifique de P2X4 car il n'est pas présent chez les souris P2X4 KO (Bergmann *et al.*, 2019).

En revanche, nous n'arrivons pas à marquer les récepteurs P2X4 présents à la surface chez les souris P2X4 KI. Cela ne veut pas forcément dire que le récepteur n'est pas présent. Nous pensons que l'excision faite en C-term du récepteur P2X4 aurait modifié la conformation du récepteur et ainsi l'accessibilité au site de liaison de l'anticorps. Il n'existe malheureusement pas d'autres anticorps spécifiques de P2X4 efficaces sur des tissus de moelle épinière. L'une des possibilités était alors de marquer non pas le récepteur mais la mCherry exprimée par le gène *p2rx4* chez les souris P2X4 KI. Cependant, les techniques d'imagerie utilisées (microscopie à fluorescence) ne nous ont pas permis de visualiser la mCherry endogène ni la mCherry amplifiée à l'aide de différents anticorps (anti-RFP, anti-DS Red, anti-mCherry).

Cela ne remet pas en cause notre modèle P2X4 KI pour autant car il a été caractérisé dans d'autres tissus tels que le cerveau ou les macrophages (Bertin *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces résultats nous montrent qu'en condition neuropathique, l'expression du récepteur P2X4 semble augmentée dans les microglies mais n'est pas responsable de l'activation et la prolifération microgliale.

PARTIE 3 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 NEURONAL ET GLIAL DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION BASALE

En condition neuropathique, l'augmentation de récepteurs P2X4 à la surface est en partie responsable de l'hyperalgésie observée en modulant la transmission nociceptive. De plus nos précédents résultats ont montré que le récepteur était augmenté à la surface des microglies en condition neuropathique et ce chez les mâles et les femelles. Afin de déterminer si les modifications de nociception observées sont dues à la présence de P2X4 spécifiquement à la surface des microglies ou des neurones, nous avons généré au sein de notre équipe de recherche des souris doubles transgéniques Cd11b-Cre P2X4 KI, afin d'augmenter la densité des récepteurs P2X4 uniquement à la surface des microglies et des macrophages, et des souris Synapsin-Cre P2X4 KI, qui présentent une augmentation de P2X4 à la surface des neurones. De la même manière, nous avons également prévu de générer des souris doubles transgéniques P2X4 KO (Cd11b-Cre P2X4 KO et Synapsin-Cre P2X4 KO), mais des aléas indépendants de notre volonté ont retardé la production de ces souris. Elles n'ont donc pas pu être utilisées au cours de cette thèse.

Nous avons tout d'abord voulu observer les effets de cette augmentation, cellules spécifiques, de P2X4 à la surface sur les sensibilités mécanique et thermique, en condition basale, par rapport à celle observée chez les souris P2X4 KI (Figure 45).

Nos résultats montrent, comme nous l'avons observé chez les souris P2X4 KI générale, une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI mâles et femelles, respectivement représentées par une diminution du seuil et du temps de retrait de la patte de l'animal. Au contraire, chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI, les sensibilités mécanique et thermique ne sont pas modifiées et sont similaires aux valeurs obtenues chez les souris P2X4 WT (Figure 32).

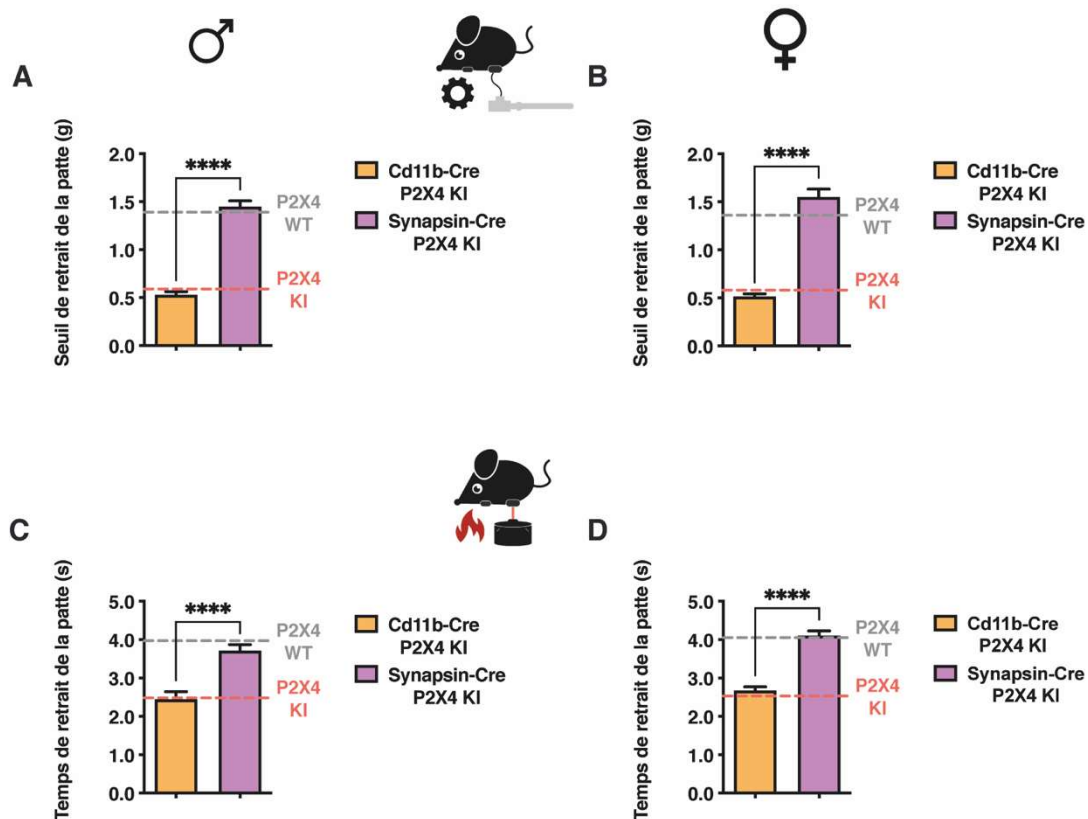


Figure 45: Diminution des seuils mécaniques et thermiques chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI mâles et femelles.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (Cd11b-Cre P2X4 KI : orange ; Synapsin-Cre P2X4 KI : orange) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition basale. (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. Les traits pointillés gris et rouge correspondent aux seuils de sensibilité mécanique basale respectivement des souris P2X4 WT et P2X4 KI (C-D) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les traits pointillés gris et rouge correspondent aux seuils de sensibilité thermique basale respectivement des souris P2X4 WT et P2X4 KI Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=7-10. Test de Student non paramétrique et non apparié (Mann-Whitney). ****= $p < 0,0001$.

De plus nous n'observons pas de différence statistique des sensibilités mécaniques et thermiques (Figure 46) entre les souris mâles et femelles des souris Cd11b-Cre P2X4 KI montrant que l'augmentation de P2X4 à la surface des cellules myéloïdes provoque une augmentation des seuils de sensibilités chez les animaux des deux sexes en conditions basales.

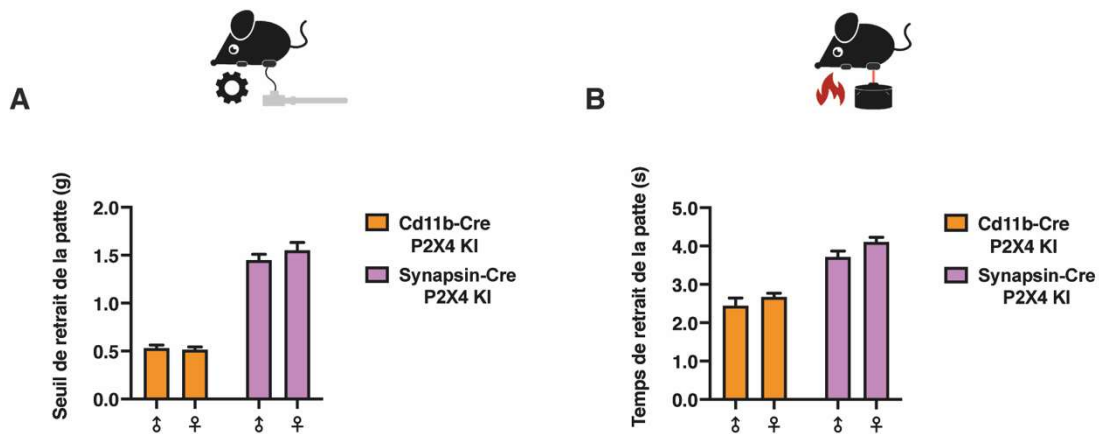


Figure 46: Seuils mécanique et thermique identiques chez les souris mâles et les femelles Cd11b-Cre et Synapsin-Cre P2X4 KI.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (Cd11b-Cre P2X4 KI : orange ; Synapsin-Cre P2X4 KI : orange), comparant les mâles et les femelles en condition basale. (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=7-10. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Ces résultats nous indiquent que l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique observées chez les souris P2X4 KI en condition basale sont dues à une augmentation de P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages.

Afin de voir si comme pour les souris P2X4 KI, l'hyperalgésie des souris Cd11b-Cre P2X4 KI est corrélée à une augmentation de la transmission nociceptive, nous voulions mesurer l'activité des neurones WDR de ces souris comme précédemment. Malheureusement, par manque de temps nous n'avons pas pu effectuer cette étude. Cependant grâce à une collaboration avec l'équipe de F. Rassendren à l'institut de génomique fonctionnelle de Montpellier, nous avons pu obtenir des souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, qui n'exprime plus P2X4 dans les microglies. Des résultats préliminaires de leur équipe ont montré que le récepteur P2X4 microglial était nécessaire au développement d'une allodynie mécanique en condition neuropathique car les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO n'exprimaient pas cette dernière. L'utilisation de ce modèle de souris transgénique nous a alors permis de voir dans quelle mesure la suppression du récepteur P2X4 dans les microglies modulait la transmission nociceptive au niveau des neurones WDR.

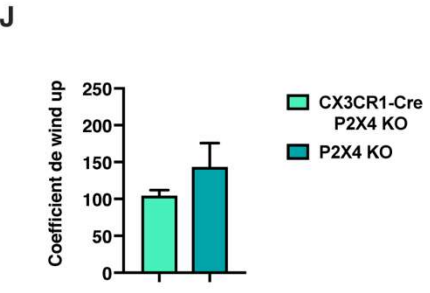
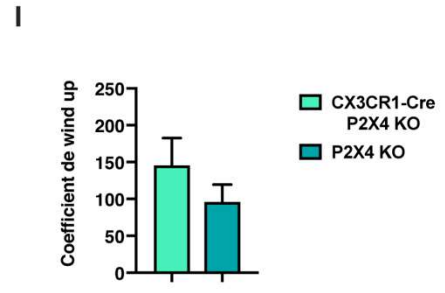
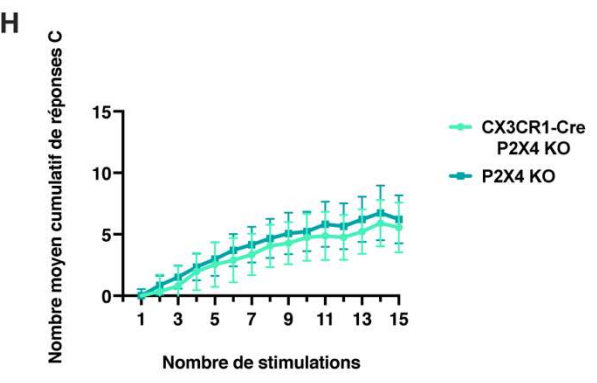
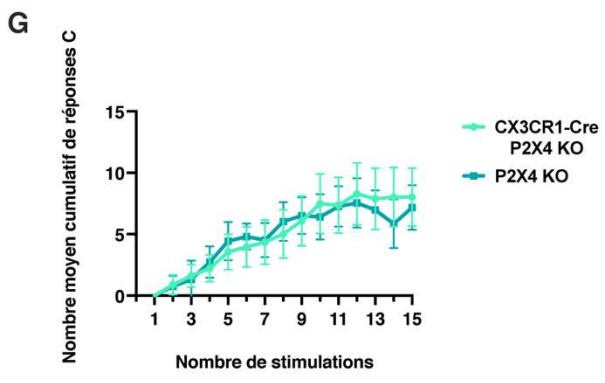
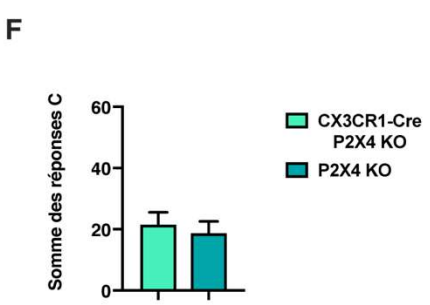
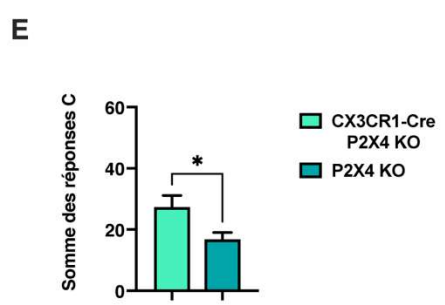
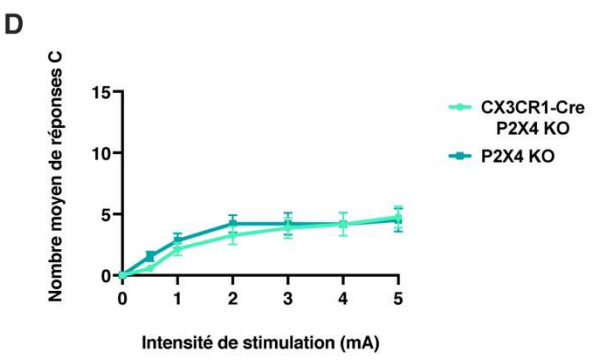
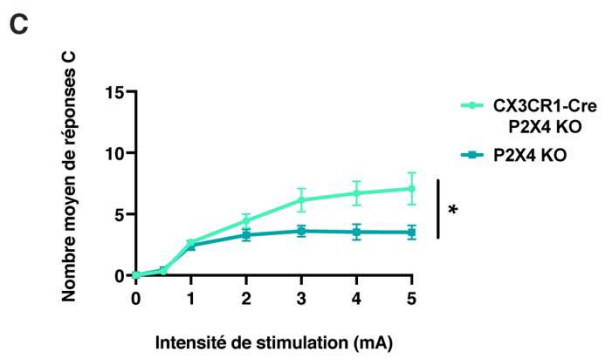
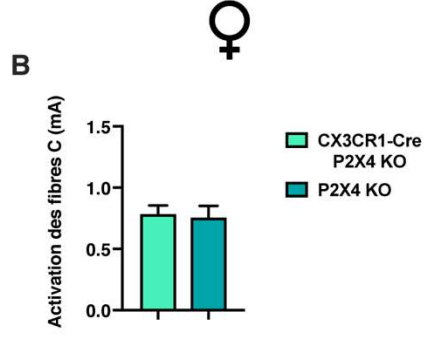
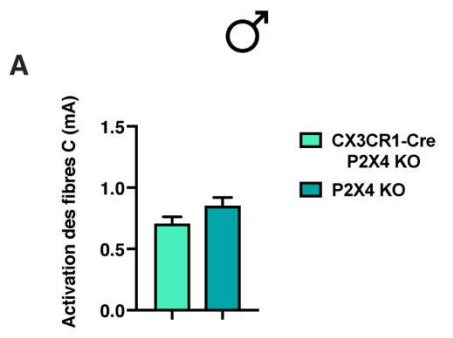


Figure 47: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projections WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques cellules spécifiques (CX3CR1-Cre P2X4 KO : turquoise ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition basale. (A-B) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (C-D) Courbe intensité-réponse (IR) représentant le nombre de réponses C des neurones WDR en fonction de l'intensité de la stimulation (0-5 mA). (E-F) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (G-H) Wind up montrant la réponse C cumulative des neurones WDR suite à 15 stimulations (1Hz) de même intensité. (I-J) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-20 neurones sur n=4-5 souris. (A) Test de Student non paramétrique non apparié (Mann-Whitney). (B, E, F, I-J) Test de Student paramétrique non apparié. (C-D, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. * $p < 0,05$.

Nos résultats précédents ont montré en condition basale que la suppression globale de P2X4, chez les souris P2X4 KO, n'induisait pas de changements des propriétés électrophysiologiques des neurones WDR comparé aux souris P2X4 WT. Ainsi, nous avons comparé les effets d'une délétion microglie-spécifique chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO par rapport à une délétion globale de P2X4 chez les souris P2X4 KO.

Nous n'observons pas de modifications du seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C nociceptives chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO par rapport aux souris P2X4 KO mâles ($0,71 \pm 0,06$ mA vs $0,85 \pm 0,07$ mA) et femelles ($0,78 \pm 0,07$ mA vs $0,76 \pm 0,10$ mA) (Figure 47A, 47B). Le récepteur P2X4 dans la microglie n'est donc pas nécessaire dans la sensibilisation périphérique des fibres C activant les neurones WDR, en condition basale.

De plus, nous constatons que pour une même intensité de stimulation, la réponse C des neurones WDR est augmentée chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles par rapport aux souris P2X4 KO (Figure 47C, 47D). De même, la somme des réponses C générées par les neurones WDR à la suite de stimulations électriques d'intensités croissantes est également augmentée chez ces souris ($27,31 \pm 3,83$ vs $16,79 \pm 2,26$) (Figure 47E, 47F). Cependant, chez les femelles, les réponses C générées sont équivalentes chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO et P2X4 KO. Ces résultats montrent que la suppression de P2X4 spécifiquement dans les

microglies induit une hyperexcitabilité des neurones WDR et donc une augmentation de la transmission synaptique, uniquement chez les mâles.

L'étude de la capacité de sensibilisation centrale des neurones WDR ne montre pas de différences en termes d'amplitude du wind up ou de valeur du coefficient de wind up entre les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO et P2X4 KO aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Cela indique que, en condition basale, le récepteur P2X4 microglial ne joue pas un rôle clé dans les propriétés de potentialisation à court terme des neurones WDR.

L'analyse statistique de ces propriétés comparant les souris mâles et femelles ne montre pas de différence significative entre les deux sexes (Figure 48).

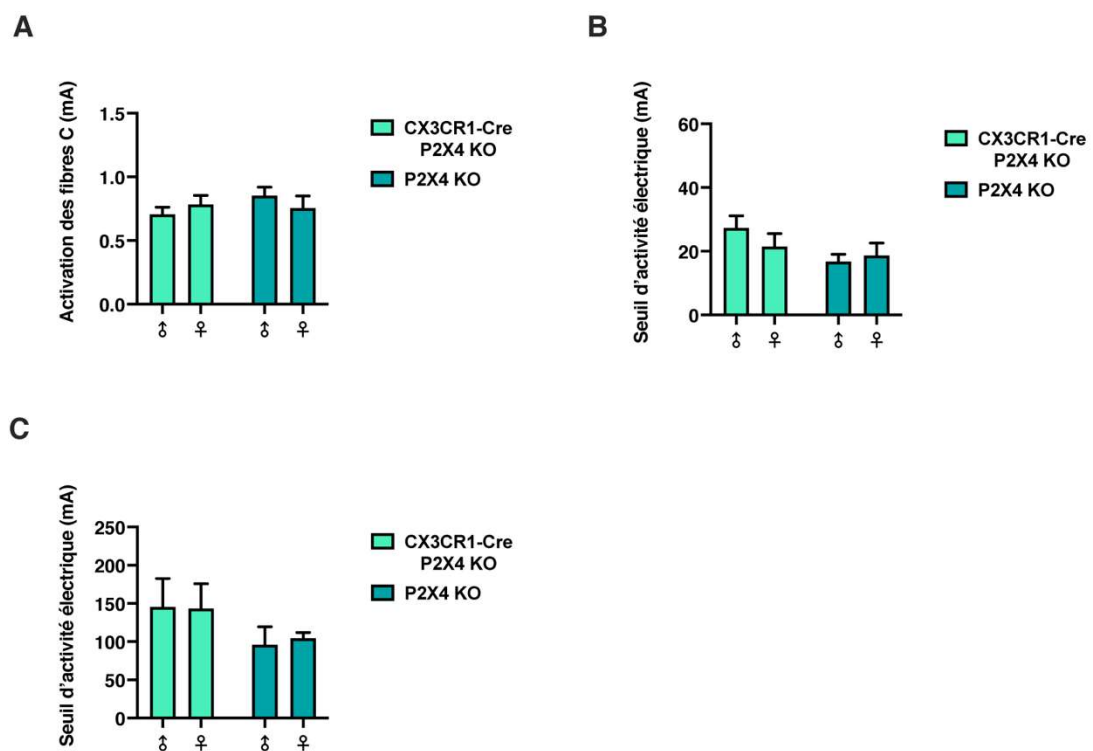


Figure 48: Pas de différences d'excitabilité et de sensibilisation neuronale entre les mâles et les femelles.

*Enregistrements in vivo extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques cellules spécifiques (CX3XR1-Cre P2X4 KO : turquoise ; P2X4 KO : bleu) comparant les mâles et les femelles en condition basale. (A) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (B) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (D) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-20 neurones sur n=4-5 souris. (A-C) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.*

L'ensemble de ces résultats indiquent que le récepteur P2X4 dans les microglies est capable de moduler l'excitabilité des neurones WDR, en condition basale, différemment entre les mâles et les femelles.

PARTIE 4 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 NEURONAL ET GLIAL DANS LA NOCICEPTION EN CONDITION NEUROPATHIQUE

Nous avons précédemment montré que le récepteur P2X4 microglial était capable de moduler la nociception en condition basale chez les souris mâles et femelles. En effet, sur le plan comportemental, une augmentation spécifique de P2X4 dans les microglies et les macrophages, chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI, induit une hyperalgésie. En condition neuropathique, le rôle précis de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages reste encore à confirmer. Bien que nous ayons montré sa présence chez les souris mâles et femelles neuropathiques, plusieurs études ont émis l'hypothèse que le récepteur P2X4 microglial était nécessaire pour induire une allodynie mécanique en condition neuropathique uniquement chez les mâles et pas chez les femelles (Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015).

Nous avons donc étudié les effets de l'augmentation spécifique de P2X4 à la surface des neurones ou des microglies ou macrophages sur les sensibilités mécanique et thermique en condition neuropathique (Figure 49).

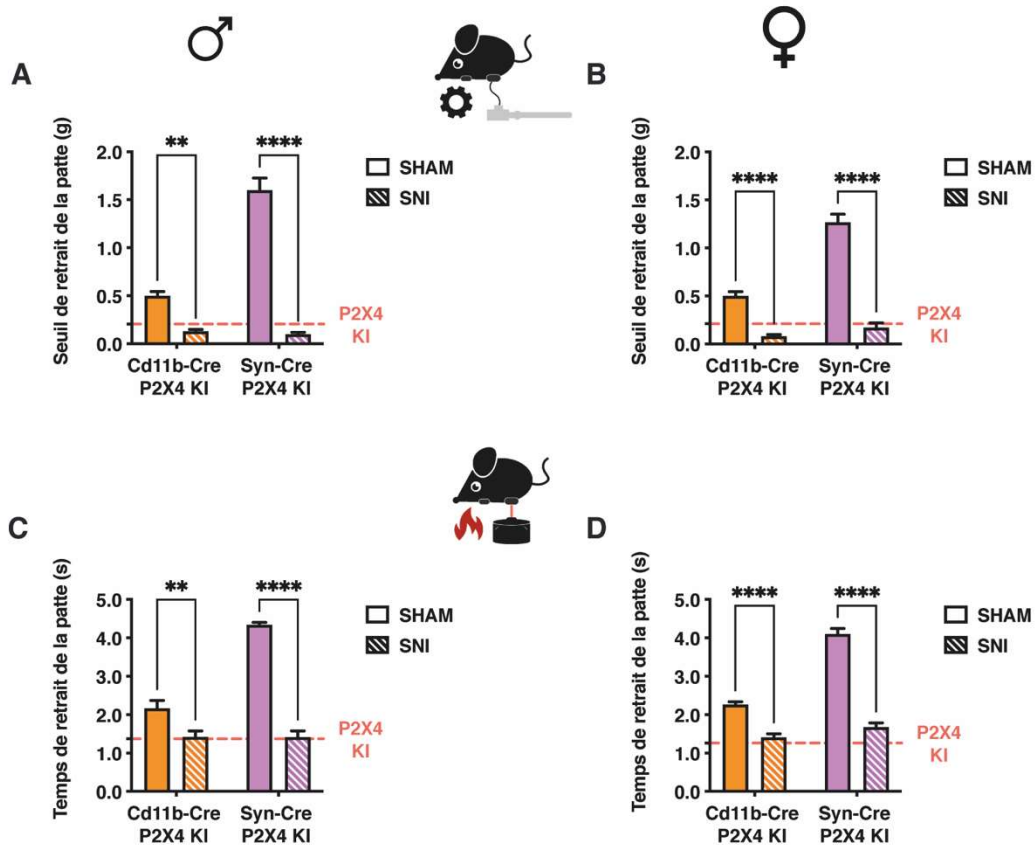


Figure 49: Hyperalgésie mécanique et thermique chez les souris *Cd11b-Cre P2X4 KI* et *Syn-Cre P2X4 KI* en condition neuropathique.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (*Cd11b-Cre P2X4 KI*: orange ; *Synapsin-Cre P2X4 KI*: orange) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition neuropathique (SNI) et son contrôle (Sham). La ligne pointillée correspond à la valeur moyenne obtenue chez les souris *P2X4 KI* en condition neuropathique. (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué 14 jours après une lésion de nerf sciatique (SNI) par le test de von Frey. (C-D) Latence de retrait thermique (s) mesurée 14 jours après la lésion par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6. (A-B, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (C-F, I-L) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$.

Nous observons tout d'abord que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages, chez les souris *Cd11b-Cre P2X4 KI*, et des neurones chez les souris *Synapsin-Cre P2X4 KI*, ne modifie pas l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique observées en condition neuropathique chez les souris mâles et les femelles. De plus, nous observons chez les souris *Cd11b-Cre P2X4 KI* que les seuils de sensibilités mécanique et thermique déjà abaissés en condition basale sont également diminués par la neuropathie, comme observée chez les souris *P2X4 KI*.

Aussi, l'analyse statistique comparant les mâles et les femelles nous montre que la neuropathie augmente de manière équivalente les sensibilités mécanique et thermique chez les souris mâles et les femelles (Figure 50).

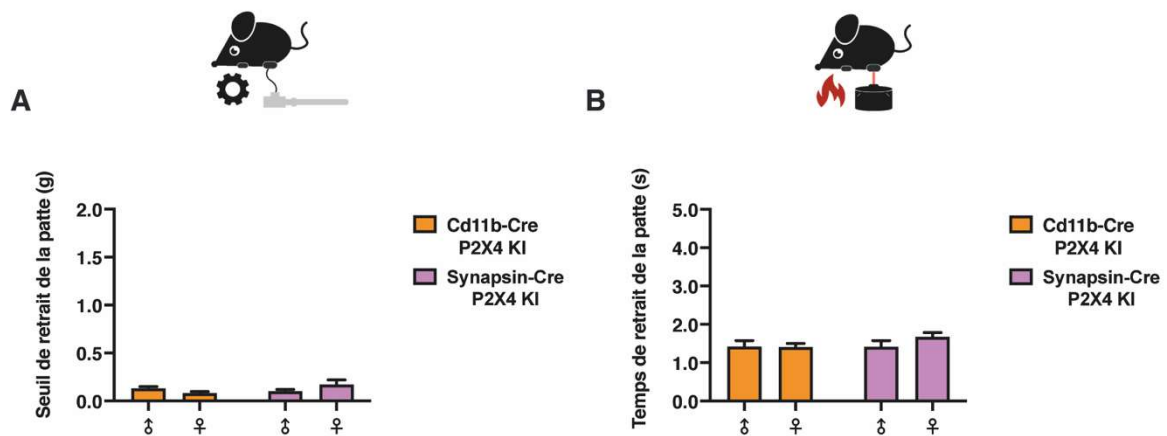


Figure 50: Pas de différences de seuil mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition neuropathique.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (Cd11b-Cre P2X4 KI : orange ; Synapsin-Cre P2X4 KI : orange), comparant les mâles et les femelles en condition neuropathique (SNI). (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Ces résultats nous indiquent que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages, et pas à la surface des neurones, est partiellement responsable de l'hyperalgésie neuropathique. Cela semble indiquer que d'autres phénomènes sont mis en place.

Similairement à l'étude de la nociception en condition basale, nous n'avons pas pu étudier l'importance de l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages et/ou des neurones sur la transmission nociceptive en condition neuropathique. Néanmoins, nous avons pu étudier la nécessité du récepteur P2X4 microglial dans cette transmission grâce à l'utilisation de souris CX3CR1-Cre P2X4 KO.

Pour cela, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques des neurones WDR des couches profondes de la CDME chez des souris CX3CR1-Cre P2X4 KO neuropathique (SNI) et leurs contrôles (Sham). Nous les avons également comparés aux souris P2X4 KO globale neuropathique (Figure 51).

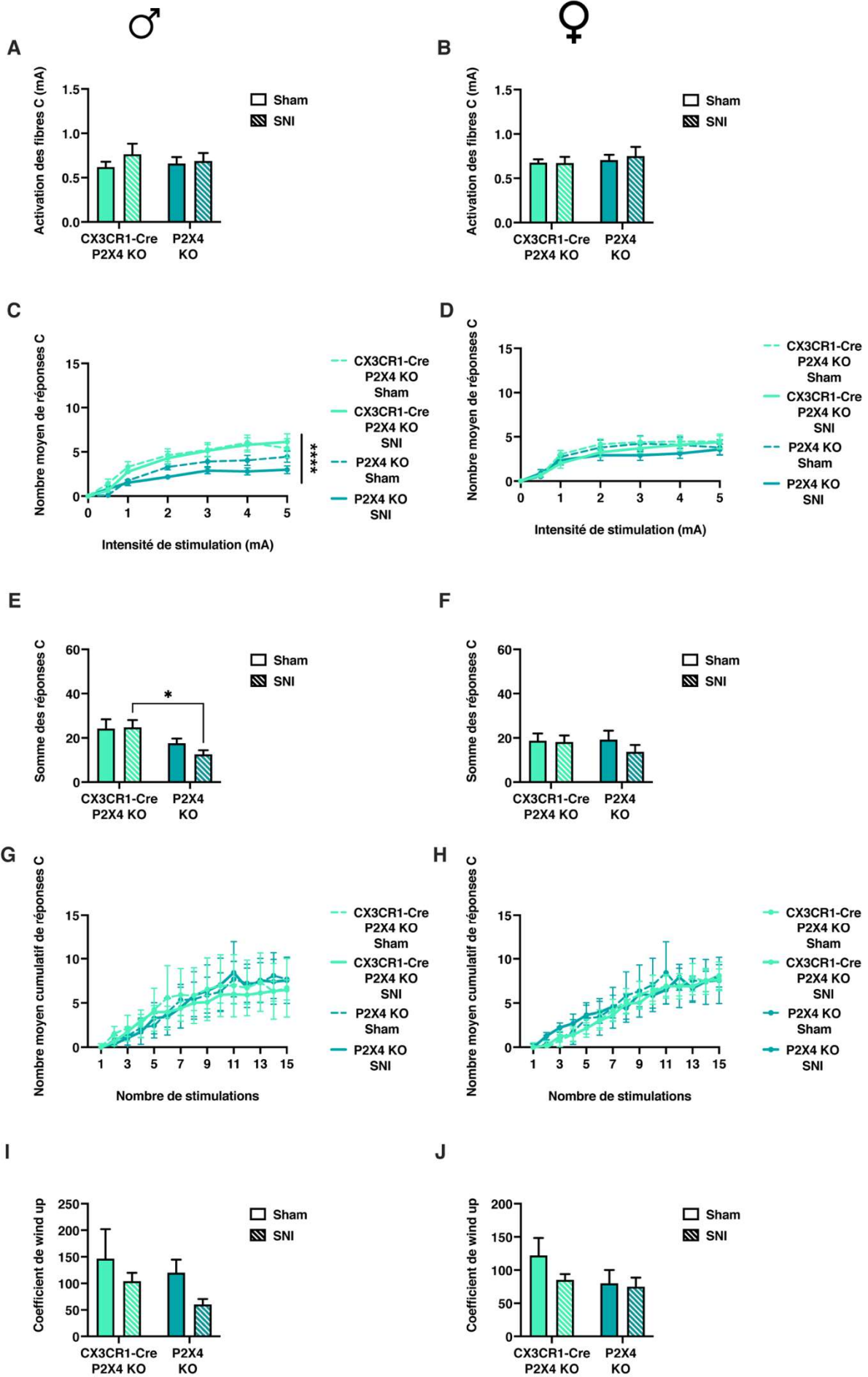


Figure 51: Augmentation de l'excitabilité des neurones WDR chez les CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles neuropathique.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques cellules spécifiques (CX3CR1-Cre P2X4 KO : turquoise ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition neuropathique (SNI) et son contrôle (Sham). (A-B) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (C-D) Courbe intensité-réponse (IR) représentant le nombre de réponses C des neurones WDR en fonction de l'intensité de la stimulation (0-5 mA). (E-F) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (G-H) Wind up montrant la réponse C cumulative des neurones WDR suite à 15 stimulations (1Hz) de même intensité. (I-J) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-25 neurones sur n=3-6 souris. (A-B) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (C-D, G-H) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (E-F, I-J) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$. (mA : milli ampères)

Nous observons que la suppression de P2X4 spécifiquement dans la microglie, chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, tout comme la suppression globale de P2X4, chez les souris P2X4 KO, supprime la diminution du seuil d'activation des neurones WDR par les fibres nociceptives C observée chez les souris P2X4 WT mâles et femelles en condition neuropathique (Figure 51A, 51B). Ces résultats indiquent que le récepteur P2X4 microglial est nécessaire pour induire l'hypersensibilité des neurones WDR, suite à leur activation par les fibres nociceptives C, induite par la neuropathie.

L'étude de l'excitabilité des neurones WDR révèle que pour une même intensité de stimulation, la réponse C des neurones WDR est augmentée chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO neuropathique mâles (Figure 51C, 51D). Cette augmentation, déjà observée en condition basale, se révèle être du même ordre que celle observée chez les souris P2X4 WT neuropathique. De la même manière, nous remarquons que la somme des réponses C générées par les neurones WDR à la suite de stimulations d'intensités croissante est également augmentée chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles par rapport aux souris P2X4 KO mâles neuropathiques ($24,73 \pm 3,32$ vs $12,55 \pm 1,84$) (Figure 51E, 51F). Chez les souris femelles, nous ne constatons pas de modulation des réponses C générées par les neurones WDR chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO par rapport aux souris P2X4 KO neuropathiques ($18,10 \pm 2,99$ vs $13,70 \pm 3,06$).

Ces résultats indiquent que le récepteur P2X4 microglial n'est pas nécessaire au développement de l'hyperexcitabilité des neurones WDR en condition neuropathique, mais contribue à sa régulation chez les souris mâles, mais pas chez les souris femelles.

En condition neuropathique, nous avons précédemment montré que le récepteur P2X4 semblait nécessaire au maintien des propriétés de sensibilisation centrale des neurones WDR chez les souris mâles. En effet, la suppression globale de P2X4, chez les souris P2X4 KO induisait une diminution de l'amplitude du wind up et du coefficient de wind up par rapport aux souris P2X4 WT neuropathiques. Ici, nous observons qu'en condition neuropathique, la délétion spécifique de P2X4 dans les microglies, chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, n'induit pas de modifications de l'amplitude du wind up (Figure 51G, 51H), ni de modifications du coefficient de wind up (Figure 51I, 51J) ni chez les souris mâles, ni chez les souris femelles. Ces résultats montrent que le récepteur P2X4 microglial jouerait un rôle dans la sensibilisation centrale des neurones WDR chez les souris mâles.

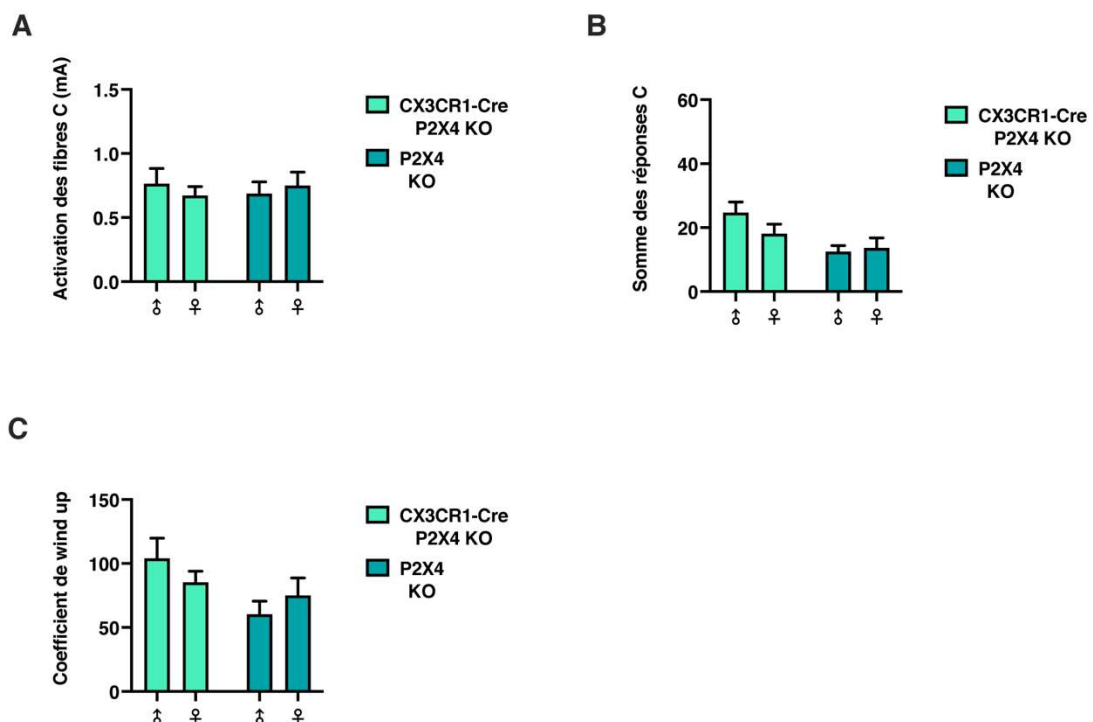


Figure 52: Pas de différence d'excitabilité et de sensibilisation neuronale entre les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO mâles et femelles neuropathiques.

Enregistrements *in vivo* extracellulaires des neurones de projection WDR dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) chez des souris transgéniques cellules spécifiques (CX3CR1-Cre P2X4 KO : turquoise ; P2X4 KO : bleu) comparant les mâles et les femelles en condition neuropathique (SNI). (A) Intensité minimale d'activation des fibres C (mA) projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. (B) Histogramme de la somme des réponses C des neurones WDR au cours de l'IR. (D) Facilitation centrale de la réponse C des neurones WDR caractérisée par le coefficient de wind up (CWU= somme réponses C - (15*réponse C 1^e stimulation)). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-25 neurones sur n=3-6 souris. (A-C) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

L'analyse statistique des différentes propriétés électrophysiologiques des neurones WDR, comparant les souris mâles et femelles ne montre aucune différences (Figure 52).

L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur P2X4 microglial participe à la modulation de la transmission nociceptive, en condition neuropathique en agissant sur la sensibilité des neurones WDR face à une stimulation des fibres nociceptives C chez les souris mâles et femelles. En revanche le récepteur P2X4 microglial perturbe l'excitabilité des neurones WDR et ses capacités de produire de la plasticité à court terme uniquement chez les mâles et pas chez les femelles.

	Nociception basale						Nociception neuropathique					
	P2X4 WT	P2X4 KI	Cd11b-Cre P2X4 KI	Synapsin-Cre P2X4 KI	P2X4 KO	CX3CR1-Cre P2X4 KO	P2X4 WT	P2X4 KI	Cd11b-Cre P2X4 KI	Synapsin-Cre P2X4 KI	P2X4 KO	CX3CR1-Cre P2X4 KO
Sensibilité mécanique	=	↗	↗	=	=	AC	↗↗	↗↗	↗↗	↗↗	=	AC
Sensibilité thermique	=	↗	↗	=	=	AC	↗↗	↗↗	↗↗	=	=	AC
Sensibilisation périphérique des neurones WDR par les fibres C	=	↗	AC	AC	=	=	↗	AC	AC	=	=	=
Excitabilité des neurones WDR par les fibres C	=	↗↗	AC	AC	=	↗ (♂) = (♀)	↗ (♂) = (♀)	AC	AC	=	↗ (♂) = (♀)	=
Sensibilisation centrale des neurones WDR par les fibres C	=	=	AC	AC	=	=	=	AC	AC	↘*	↘*	=

Figure 53: Table récapitulative des précédents résultats

*résultats non significatifs

AC : Acquisition des résultats en cours

PARTIE 5 : IMPLICATION DU RÉCEPTEUR P2X4 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

Nos résultats précédents ont révélé que le récepteur P2X4 à la surface des microglies était important dans le développement et le maintien de la nociception neuropathique et pouvait moduler l'algésie mécanique et thermique ainsi que la transmission de l'information nociceptive dans la moelle épinière. Outre la douleur neuropathique, le récepteur P2X4 est également nécessaire à l'établissement de la douleur inflammatoire (Tsuda *et al.*, 2009b). Cependant, les mécanismes impliqués seraient différents de ceux impliqués dans les douleurs neuropathiques. En effet, il a été révélé que le récepteur P2X4 dans les microglies de la CDME ne participait pas à la douleur inflammatoire (Tsuda *et al.*, 2003). Ce serait alors le récepteur P2X4 présent dans les macrophages périphériques (Ulmann *et al.*, 2010) et dans les neurones (Lalisse *et al.*, 2018) et cellules gliales (Zhao *et al.*, 2019) des DRG qui serait responsable de l'allodynie mécanique observée en condition inflammatoire. Cependant, très peu d'études ont été faites à ce sujet et une seule étude a observé le rôle de P2X4 dans l'inflammation chronique chez les femelles (Lalisse *et al.*, 2018). De plus, le rôle de l'augmentation de P2X4 à la surface n'a jamais été étudié en condition inflammatoire.

Ainsi, afin de comprendre le rôle de l'augmentation à la surface de P2X4 et de confirmer l'effet de P2X4 dans la douleur inflammatoire chronique, nous avons étudié ces changements d'expression et de localisation subcellulaire sur l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique au cours du temps (Figure 54). Pour cela, nous avons induit une inflammation périphérique par injection intra-plantaire de CFA (30 μ L). De plus nous avons contrôlé que les effets observés n'étaient pas dus à l'injection en elle-même en injectant du NaCl 0,9% (30 μ L). Nous confirmons tout d'abord que l'inflammation périphérique induit une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique 4 jours après l'inflammation chez les souris P2X4 WT mâles et femelles (Figure 54A, 54B, 54E, 54F). Nous observons que cette hyperalgésie se maintient jusqu'à 8 jours après l'inflammation (Figure 54C, 54D, 54G, 54H) mais diminue 12 jours après l'inflammation. A partir de 16 jours après l'inflammation, il n'y a plus d'hyperalgésie. En effet, les sensibilités mécanique et thermique retrouvent un niveau basal. Malgré cette perte de sensibilité, nous remarquons que l'œdème inflammatoire est toujours

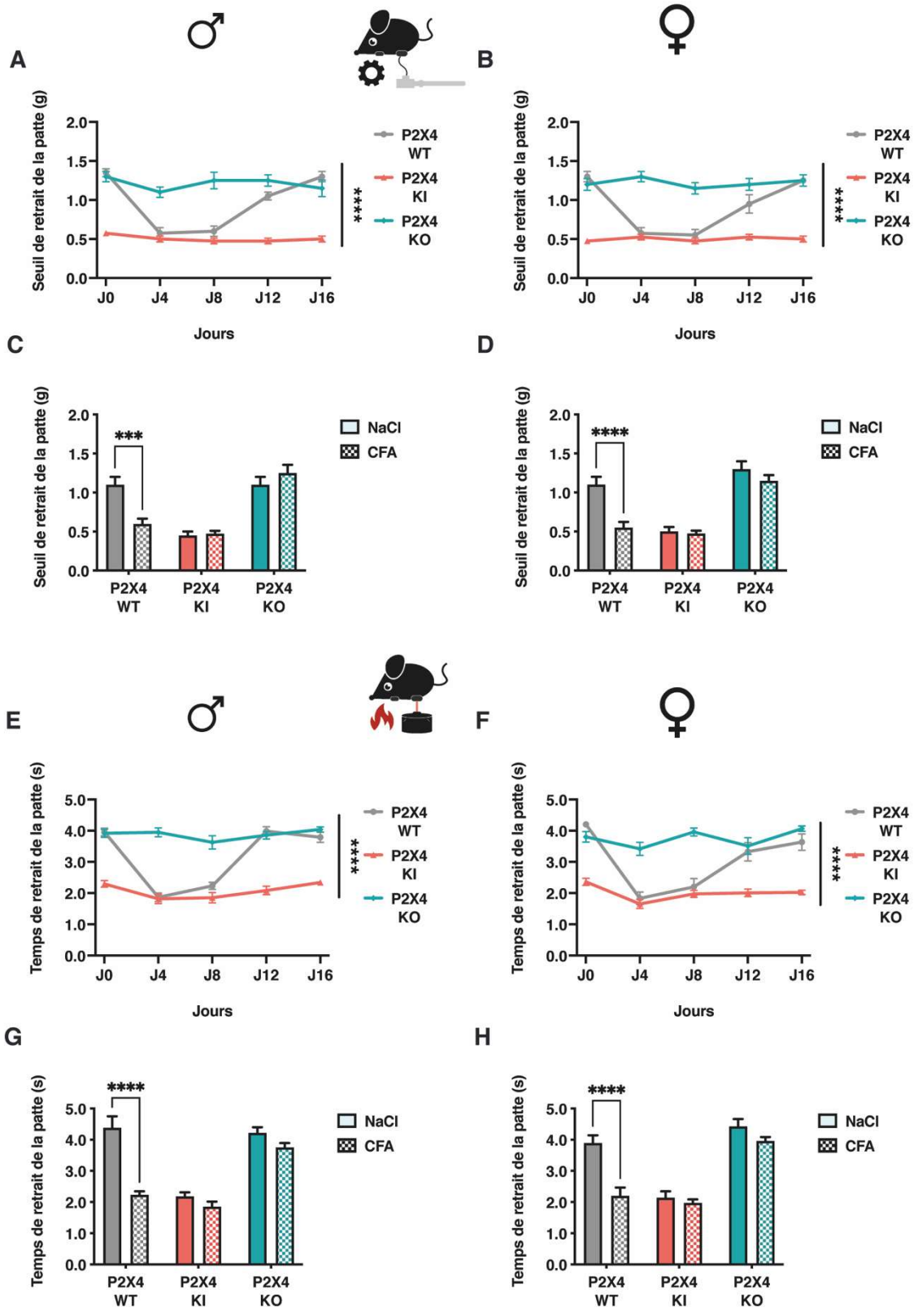


Figure 54: Suppression de la diminution des seuils mécaniques et thermiques en condition inflammatoire chez les souris P2X4 KO.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition inflammatoire (CFA) et son contrôle (NaCl). (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué au cours du temps (0 à 16 jours) après l'inflammation (CFA) par le test de von Frey. (C-D) Histogramme du seuil de retrait mécanique (g) 8 jours après l'inflammation. (E-F) Latence de retrait thermique (s) mesurée au cours du temps (0 à 16 jours après l'inflammation) par le test plantaire. (G-H) Histogramme de la latence de retrait thermique (s) 8 jours après l'inflammation. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=11-13 pour les SNI et n=6 pour les Sham. (A-B, E-F) 2-way ANOVA avec correction Geisser-Greenhouse, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. (C-D, G-H) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. ***=p<0,0001, ****=p<0,0001.

présent au niveau de la patte injectée avec du CFA (résultats non montrés). Ceci indique que la présence de l'œdème et l'hyperalgésie ne sont pas corrélées. De plus, nous constatons que la suppression globale de P2X4, chez les souris P2X4 KO injectées avec du CFA, supprime l'allodynie mécanique et l'hyper sensibilité thermique observées chez les souris P2X4 WT mâles et femelles. Ainsi, ceci confirme la nécessité de P2X4 dans le développement de l'allodynie mécanique chez les mâles et les femelles et nous montre également la nécessité de P2X4 dans l'établissement d'une hypersensibilité thermique dans le cas d'une inflammation chronique. Cependant, P2X4 ne semble pas nécessaire au maintien de l'hyperalgésie inflammatoire.

Aussi, nous observons que l'augmentation de P2X4 à la surface, chez les souris P2X4 KI mâles et femelles, n'induit pas d'augmentation supplémentaire des sensibilités mécanique et thermique déjà abaissées en condition basale. Ceci suggère que l'augmentation du récepteur P2X4 à la surface, chez les souris P2X4 KI, serait suffisante pour entraîner une hyperalgésie mécanique et thermique en condition inflammatoire.

Nos résultats montrent que l'hyperalgésie mécanique et thermique maximale est atteinte 8 jours après l'injection de CFA, nous avons alors décidé d'effectuer nos futures expériences 8 jours après l'induction de l'inflammation.

L'analyse statistique de ces résultats comportementaux ne montre aucune différence de sensibilité mécanique et thermique entre les mâles et les femelles (Figure 55).

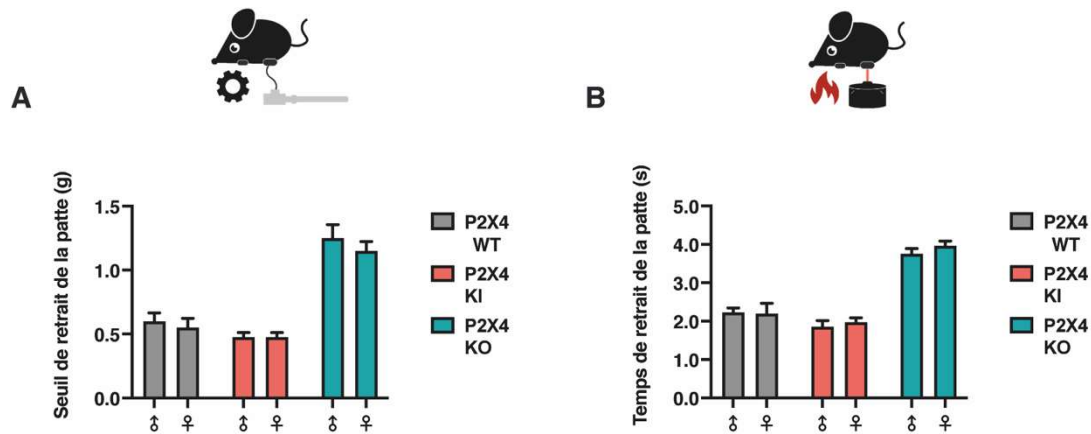


Figure 55: Pas de différences de sensibilités mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition inflammatoire.

Analyses comportementales de sensibilités réalisées chez différentes souris transgéniques (P2X4 WT : gris ; P2X4 KI : rouge ; P2X4 KO : bleu), comparant les mâles (gauche) et les femelles (droite) 8 jours après l'induction d'une inflammation. (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=29-31. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Ainsi, nos résultats montrent que le récepteur P2X4 est nécessaire au développement mais pas au maintien de l'hyperalgésie mécanique et thermique en condition inflammatoire et que son augmentation à la surface serait responsable de cette dernière.

Cependant, le type cellulaire impliqué reste à déterminer. Nous avons donc étudié les effets de l'augmentation de P2X4 à la surface des neurones, chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI, et des microglies et macrophages, chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI sur les sensibilités mécaniques et thermiques en condition inflammatoire (Figure 56).

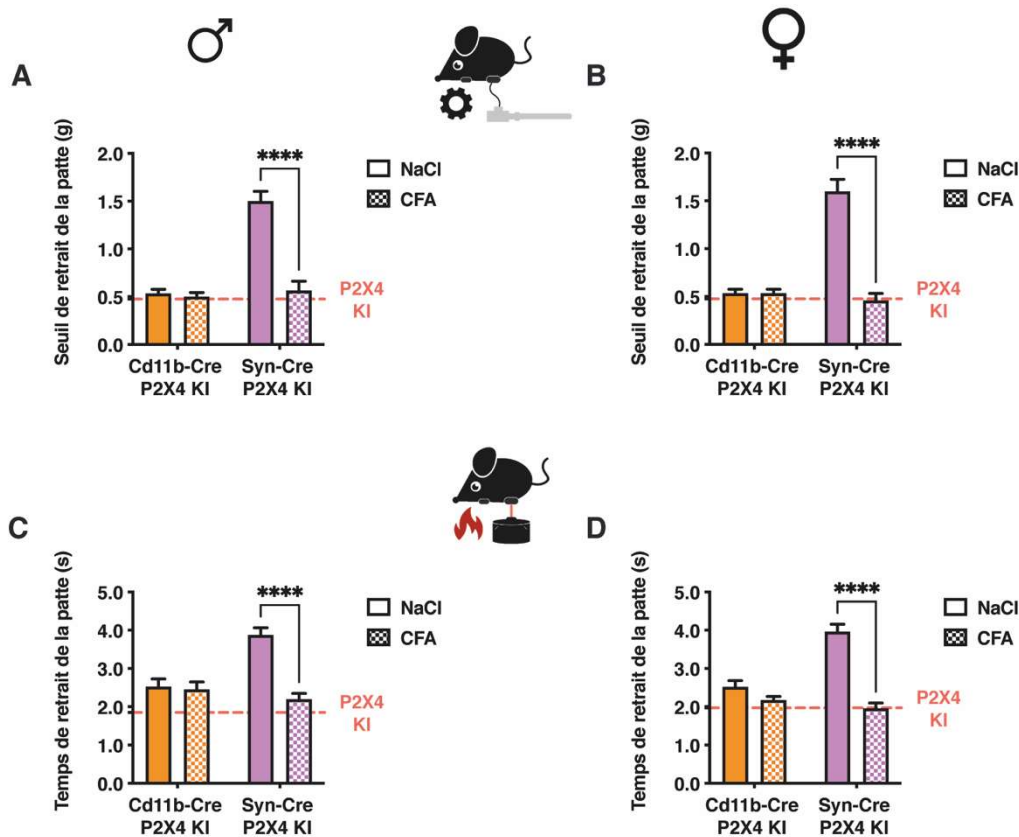


Figure 56: Hyperalgésie mécanique et thermique chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI et Syn-Cre P2X4 KI en condition inflammatoire.

Analyses comportementales de sensibilité réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (Cd11b-Cre P2X4 KI : orange ; Synapsin-Cre P2X4 KI : orange) mâles (gauche) et femelles (droite) en condition inflammatoire (CFA) et son contrôle (NaCl). (A-B) Seuil de retrait mécanique (g) évalué 8 jours après l'inflammation par le test de von Frey. La ligne pointillée rouge correspond au seuil de sensibilité mécanique des souris P2X4 KI en condition inflammatoire. (C-D) Latence de retrait thermique (s) mesurée 8 jours après l'inflammation par le test plantaire. La ligne pointillée rouge correspond au seuil de sensibilité thermique des souris P2X4 KI en condition inflammatoire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6. (A-D) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. ****= $p < 0,0001$.

Nous observons que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI et des neurones chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI n'altère pas l'allodynie mécanique et l'hypersensibilité thermique observées chez les souris P2X4 WT en condition inflammatoire. De plus, nous remarquons que l'inflammation ne diminue pas les seuils et temps de retrait de la patte déjà abaissés chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI, alors que ces derniers diminuent chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI.

Aussi, la comparaison statistique des sensibilités mécaniques et thermiques entre les mâles et les femelles indiquent qu'il n'y a pas de différences entre les deux sexes (Figure 57).

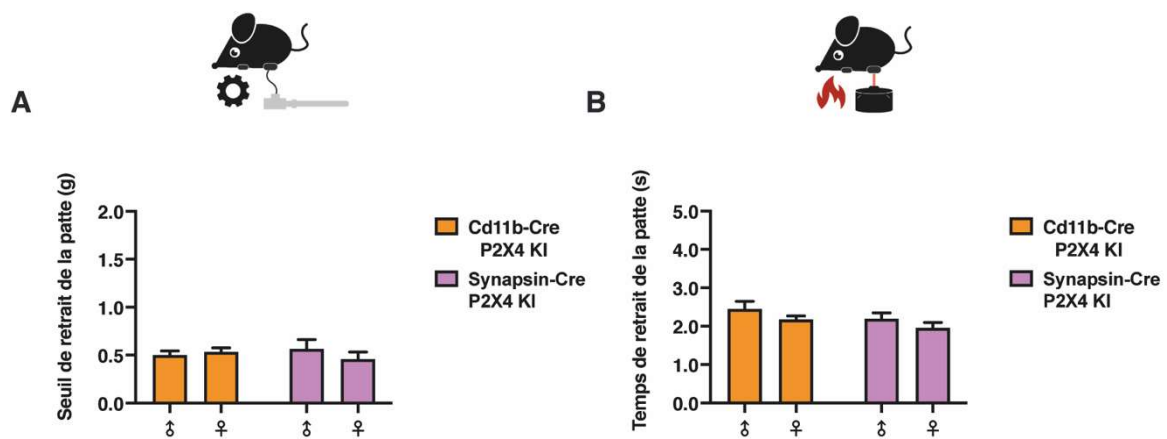


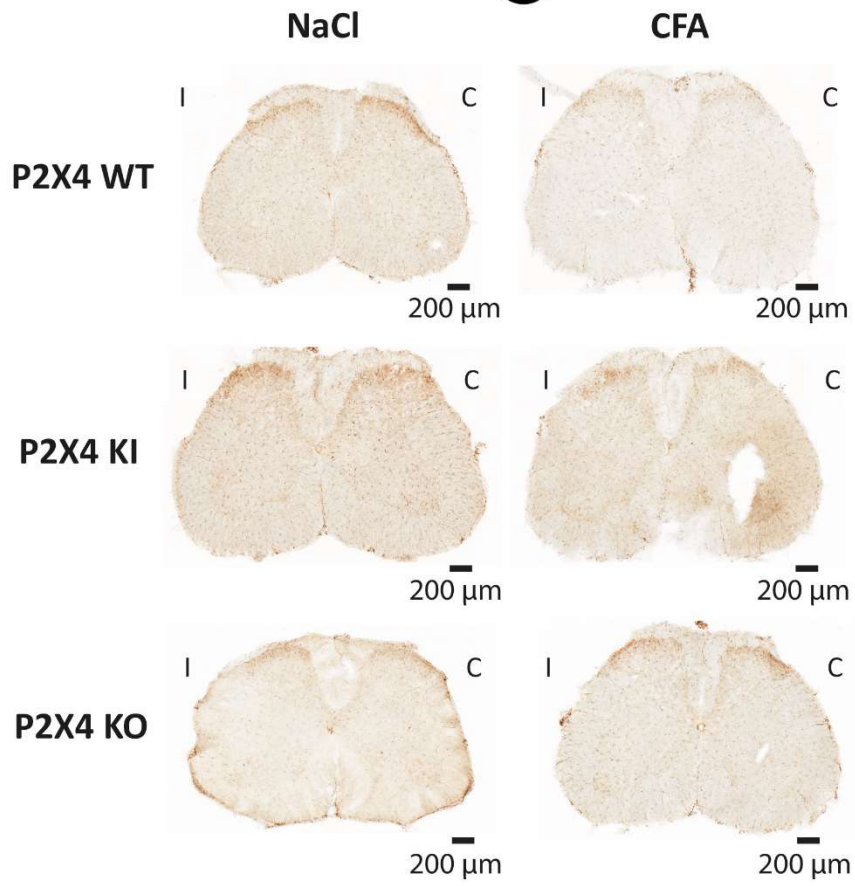
Figure 57: Pas de différences de sensibilités mécanique et thermique entre les souris mâles et femelles en condition inflammatoire.

Analyses comportementales de sensibilité réalisées chez différentes souris transgéniques cellules spécifiques (Cd11b-Cre P2X4 KI : orange ; Synapsin-Cre P2X4 KI : orange), comparant les mâles et les femelles en condition inflammatoire (CFA). (A) Seuil de retrait mécanique (g) évalué par le test de von Frey. (B) Latence de retrait thermique (s) mesurée par le test plantaire. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm S.E.M ; n=6. (A-B) 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Ces résultats suggèrent que seule l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages, chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI, et pas à la surface des neurones suffit à induire une hyperalgésie semblable à celle observée en condition inflammatoire, chez les mâles et les femelles.

Cependant, de précédentes études ont montré que le récepteur P2X4 microglial n'était pas impliqué dans le développement de la douleur inflammatoire chez les mâles (Tsuda *et al.*, 2003). Aussi, le rôle de P2X4 dans la microglie n'a jamais été étudié chez les femelles dans un contexte d'inflammation chronique. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons tout d'abord regardé par marquage immunohistochimique (Iba1) si l'inflammation induisait une activation et une prolifération microgliale chez les mâles et chez les femelles (Figure 58).

A



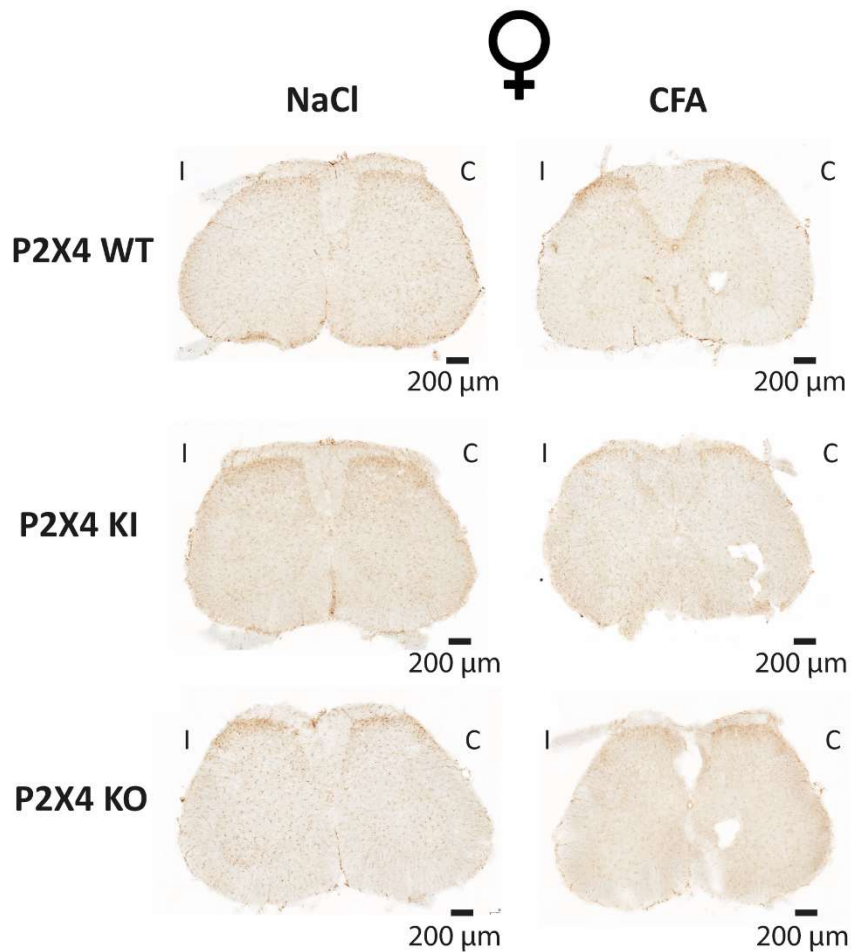
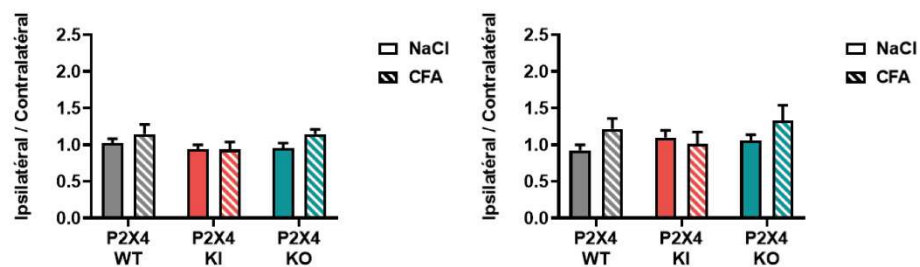
B**C**

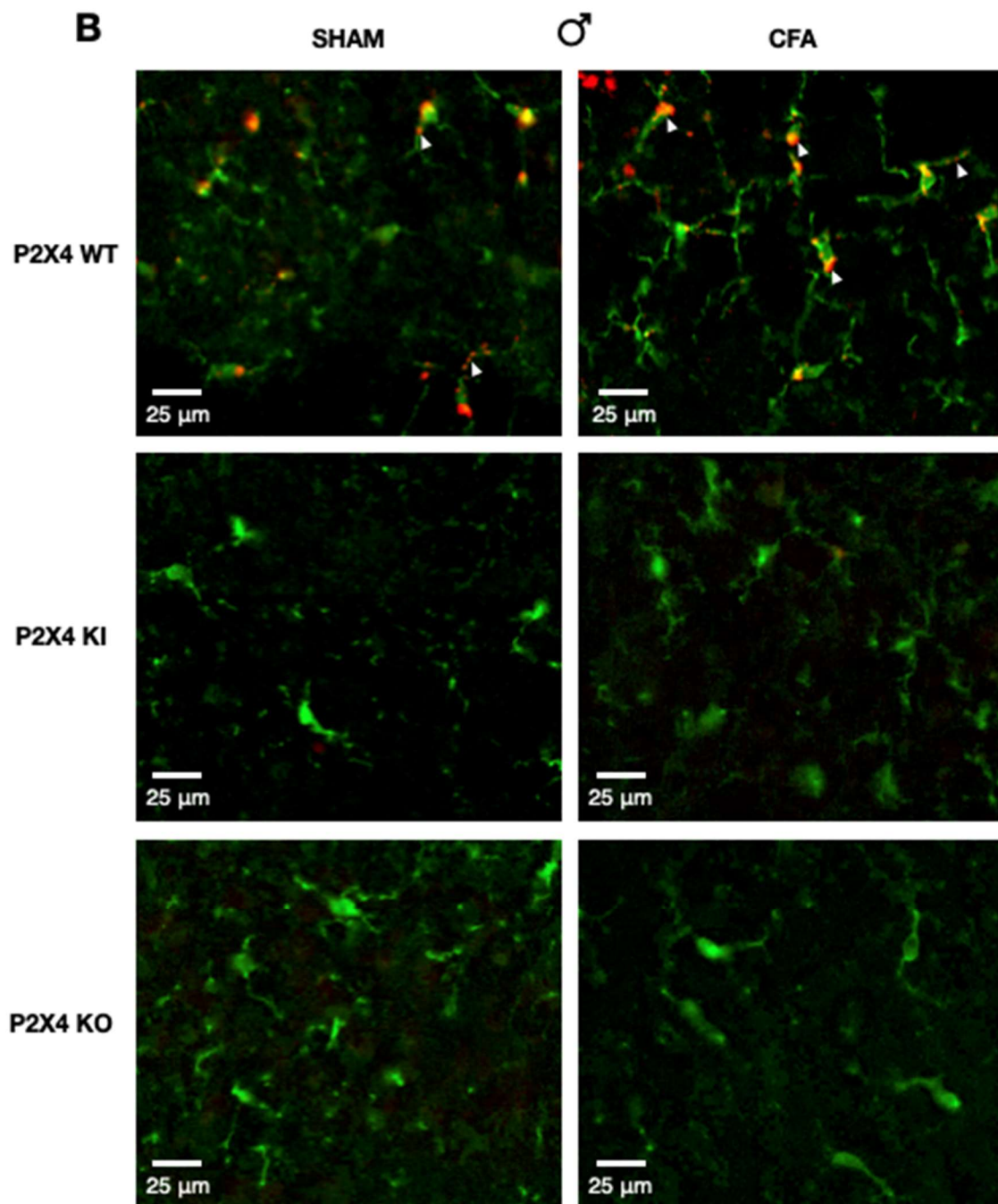
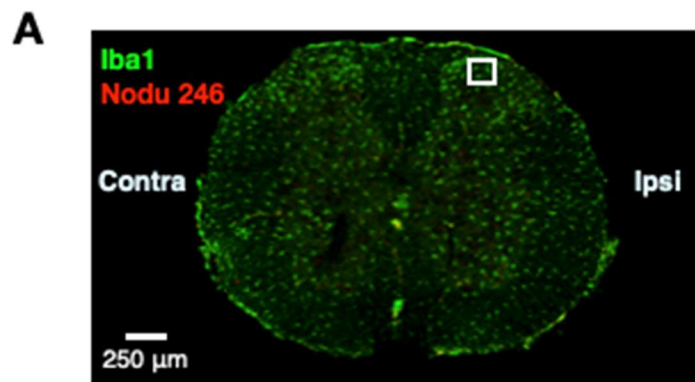
Figure 58: L'inflammation chronique n'induit pas d'activation et de prolifération microgliale.

(A-B) Marquage immunohistochimique Iba1 (microglie) sur des moelles épinières de souris en conditions inflammatoires (CFA) et son contrôle (NaCl). (C) Quantification de la surface occupée par le marquage révélé par la DAB dans la CDME ipsilatérale à la lésion par rapport à la CDME contralatérale. Les valeurs correspondent au ratio I/C \pm S.E.M ; n=2-3 souris. 2-way ANOVA, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak.

(I : Côté ipsilatéral à la lésion ; C : côté contralatéral à la lésion)

Bien que la microglie ne soit pas activée par l'inflammation périphérique, nous avons toutefois regardé par marquage immunohistochimique de la microglie (Iba1) et du récepteur P2X4 (Nodu 246) si l'inflammation induisait une augmentation de P2X4 dans les microglies de la CDME (Figure 59).

Nous observons que P2X4 est présent dans les microglies chez les souris P2X4 WT, cependant, son expression ne semble pas augmentée en condition inflammatoire. Ces résultats suggèrent que l'inflammation n'induit pas d'augmentation de l'expression de P2X4 dans les microglies. Or, nos résultats comportementaux ont suggéré que l'hyperalgésie causée par l'inflammation serait due à une augmentation de P2X4 à la surface des microglies et des macrophages. On peut donc supposer que l'hyperalgésie serait due uniquement à une augmentation de P2X4 à la surface des macrophages et pas des microglies. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de confirmer cette hypothèse.



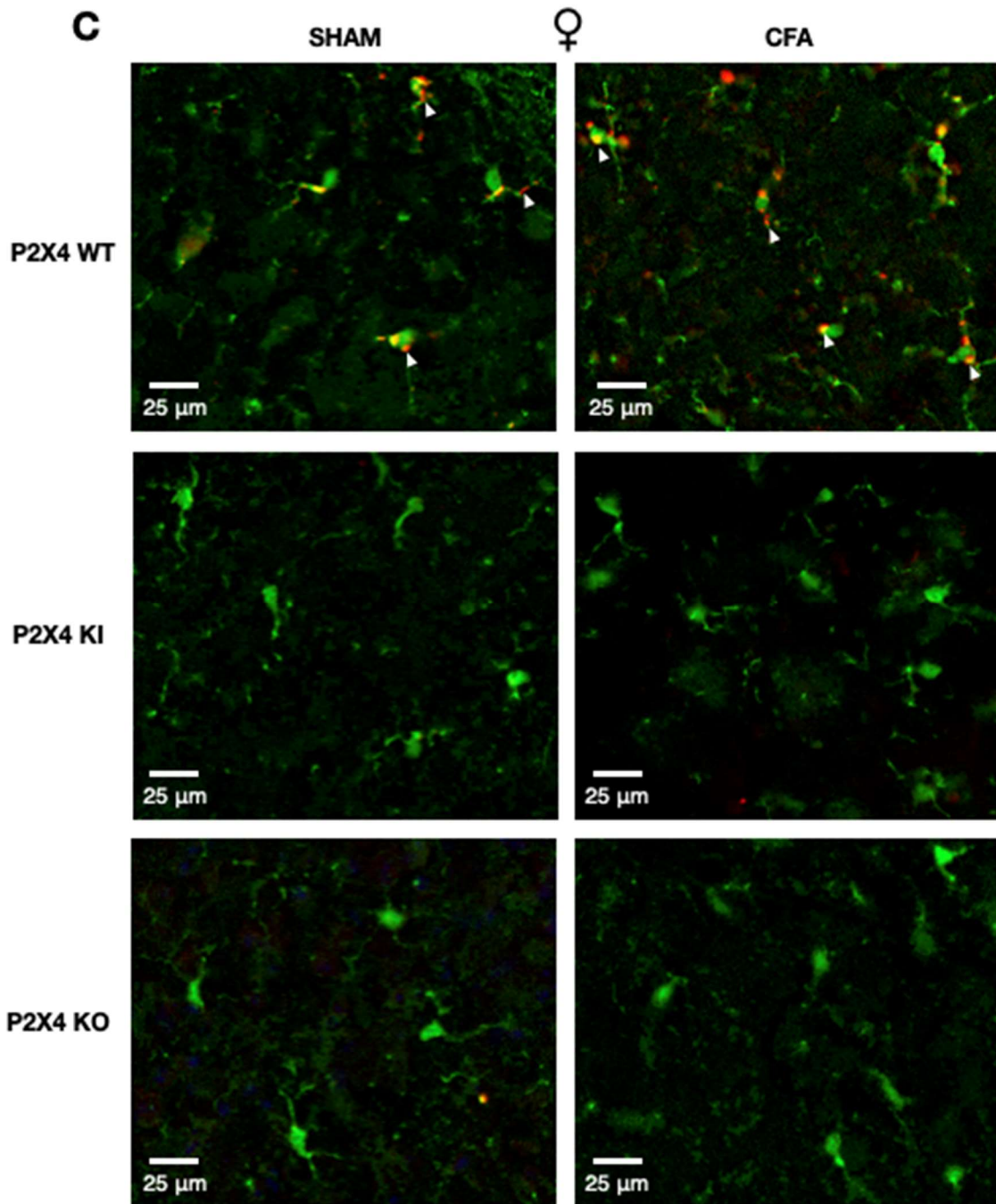
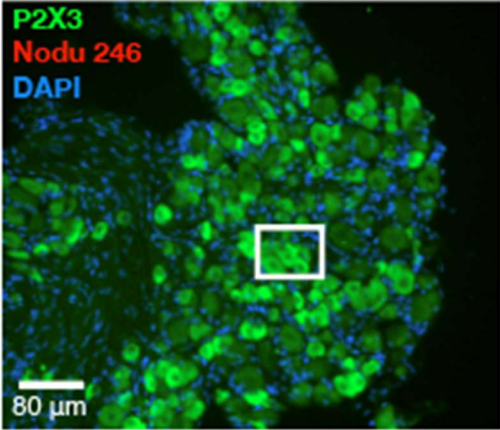


Figure 59: L'inflammation n'augmente pas l'expression de P2X4 dans les microglies.

Co-marquage immunohistochimique de Iba1 (microglie, vert) et Nodu 246 (P2X4, rouge) dans la CDME chez des souris en condition inflammatoire (CFA) et son contrôle (NaCl). (A) Représentation d'une moelle épinière entière de la zone lombaire L4-L5 après inflammation. Le carré blanc représente la zone zoomée. (B) Expression de P2X4 à la surface des microglies de la CDME ipsilatérale chez les souris mâles. (C) Expression de P2X4 à la surface des microglies de la CDME ipsilatérale chez les souris femelles. (Ipsi : Côté ipsilatéral à la lésion ; Contra : côté contralatéral à la lésion)

Une autre hypothèse émise par la littérature est que la présence de P2X4 à la surface des neurones des DRG participerait à l'allodynie mécanique chez les mâles en condition inflammatoire (Lalisse *et al.*, 2018).

A



B

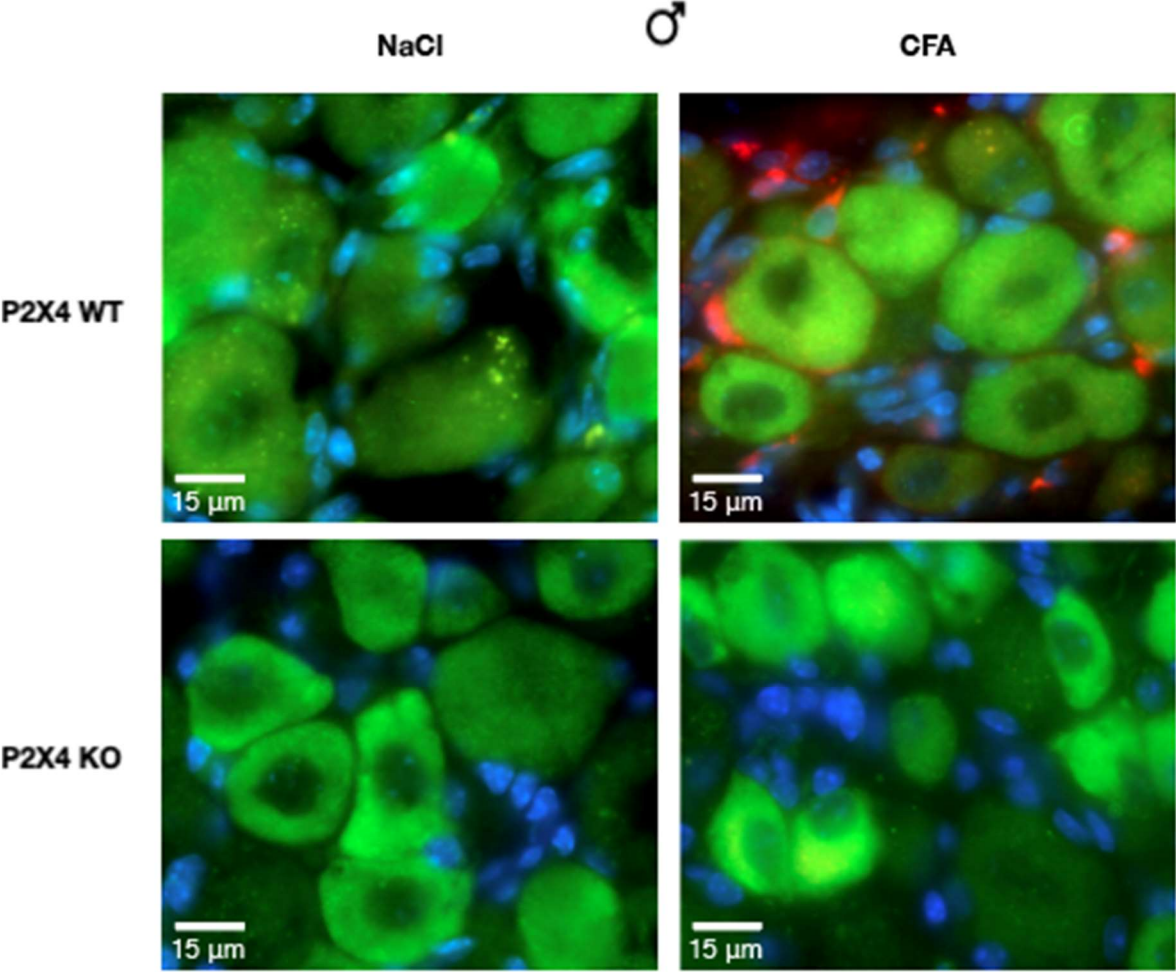


Figure 60: L'Inflammation augmente l'expression de P2X4 dans les DRG.

Co-marquage immunohistochimique de P2X3 (neurones nociceptifs non peptidergiques, vert), Nodu 246 (P2X4, rouge) et du DAPI (noyau cellulaire, bleu) dans les DRG ipsilatéraux chez des souris inflammées (CFA) et leurs contrôle (NaCl) mâles. (A) Représentation d'une coupe entière de DRG lombaire (L4-L5) après inflammation. Le carré blanc représente la zone zoomée. (B) Expression de P2X4 à la surface des neurones nociceptifs non peptidergiques.

Nous avons donc étudié par marquage immunohistochimique si d'une part, le récepteur P2X4 était bien présent dans les DRG et d'autre part, s'il était présent à la surface des neurones nociceptifs et si son expression était modifiée par l'inflammation 4 jours après l'injection de CFA. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps anti-P2X3 pour marquer les neurones nociceptifs non peptidergiques des DRG et l'anticorps Nodu 246 pour marquer le récepteur P2X4 (Figure 60).

Nous observons que le récepteur P2X4 n'est pas présent à la surface des neurones des DRG en condition contrôle, après injection de NaCl, chez les souris P2X4 WT. Cependant, en condition inflammatoire, après injection de CFA, nous remarquons une augmentation de P2X4 chez les souris P2X4 WT. Nous ne pouvons pas affirmer que le récepteur P2X4 est augmenté à la surface des neurones car la distance séparant la membrane plasmique des cellules gliales satellites (CGS) de la membrane plasmique des neurones qu'elles entourent est très faible (de l'ordre du nanomètre).

Ces résultats nous indiquent que le récepteur P2X4 est augmenté dans les DRG en condition inflammatoire, chez les souris P2X4 WT mâles mais le type cellulaire reste à préciser.

DISCUSSION

Au cours de ma thèse, mes travaux avaient pour but de mieux comprendre l'implication des récepteurs P2X4 neuronaux et microgliaux dans la nociception basale et dans le contexte de douleurs neuropathiques et inflammatoires. L'ensemble de nos résultats ont montré que des modifications d'expression ou de localisation subcellulaire du récepteur P2X4 microglial pouvaient moduler l'algésie mécanique et thermique et la transmission nociceptive en condition basale. De plus, nous avons confirmé que le récepteur P2X4 était nécessaire au développement et au maintien de l'hyperalgésie neuropathique et nous avons révélé que son augmentation à la surface des microglies participait partiellement à la nociception neuropathique. De même, nous avons également montré que le récepteur P2X4 était nécessaire au développement de l'hyperalgésie mécanique et thermique inflammatoire. Cependant nous avons démontré que cette hyperalgésie ne dépendait pas d'une augmentation de P2X4 à la surface des microglies de la CDME.

I. L'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages induit une hypersensibilité mécanique et thermique, en condition basale

En condition basale, le rôle du récepteur P2X4 dans la nociception est mineur car le récepteur est internalisé constitutivement dans les lysosomes et de ce fait est très peu exprimé à la surface des membranes plasmiques (Robinson and Murrell-Lagnado, 2013). Dans de nombreuses pathologies, telles que la douleur neuropathique, des études ont observé une augmentation de son expression et de son trafic à la surface qui était corrélée à une allodynie mécanique (Toyomitsu *et al.*, 2012). Cependant, le lien direct entre cette augmentation et l'hyperalgésie n'a jamais été démontré.

Nous avons montré que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI mâles et femelles pouvait induire une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique. De plus, nous avons révélé, par blocage pharmacologique du récepteur à l'aide de 5-BDBD (antagoniste spécifique de P2X4) que cette hyperalgésie dépendait bien de l'activation des récepteurs P2X4 présents à la surface.

En condition neuropathique, il a été démontré *in vitro* que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies de la CDME dépendait de l'activation microgliale, tout du moins chez les mâles, et que cette dernière était nécessaire au développement d'une allodynie mécanique (Toyomitsu *et al.*, 2012). Or, les souris P2X4 KI ne présentent pas d'activation microgliale. Ainsi, nous pouvons supposer que cette activation n'est pas directement nécessaire pour induire une hyperalgésie mais qu'elle permet d'initier le trafic à la surface de P2X4, qui lui est nécessaire au développement de cette hyperalgésie.

De plus, en condition de douleurs neuropathique et inflammatoire, des études ont montré que chez les mâles, l'allodynie mécanique dépendait de la libération de BDNF de manière P2X4-dépendante qui agit par la suite en activant le récepteur TrkB (Liu *et al.*, 2018; Trang *et al.*, 2009; Ulmann *et al.*, 2008). Nous suggérons que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI, en condition basale permettrait, sans activer la microglie, la libération de BDNF et ainsi l'activation de la voie P2X4/p38MAPK/BDNF/TrkB qui serait responsable de l'hyperalgésie. Nous pourrions quantifier la présence de BDNF dans la CDME par IHC par exemple. Nous pourrions également montrer l'importance de l'activation du récepteur TrkB chez les souris P2X4 KI en injectant à ces dernières un antagoniste spécifique de TrkB.

Outre le développement d'une allodynie mécanique, nous avons également observé une hypersensibilité thermique chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI. De plus, nous observons cette hyperalgésie à la fois chez les souris mâles et femelles. Bien que les précédentes études s'intéressant au dimorphisme sexuel en condition neuropathique aient révélé que le récepteur P2X4 microglial chez les femelles n'était pas impliqué dans les douleurs neuropathiques (Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015), nos résultats montrent que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies chez les souris Cd11b-Cre P2X4 KI peut déclencher une hyperalgésie mécanique et thermique de la même manière chez les deux sexes. Ceci suggère que la voie P2X4/BDNF/TrkB pourrait également être induite chez les femelles.

II. P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages est nécessaire pour induire une hyperalgésie en condition neuropathique

Tout comme certaines études l'ont déjà suggéré, nous confirmons que le récepteur P2X4 est nécessaire au développement et au maintien de l'allodynie mécanique chez les mâles et les femelles (Tsuda *et al.*, 2009a; Tsuda *et al.*, 2009b; Ulmann *et al.*, 2008). De plus, nos résultats ont montré que le récepteur P2X4 était également nécessaire au développement et au maintien de l'hypersensibilité thermique en condition neuropathique. Nous avons constaté que cette hyperalgésie causée par la neuropathie était en partie due à l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages. En effet nous avons observé que les seuils de sensibilités mécaniques et thermiques déjà abaissés chez les souris Cd11b P2X4 KI diminuaient de nouveau à la suite d'une neuropathie. Nous pouvons présumer que la neuropathie induirait certes une augmentation de P2X4 à la surface des microglies, mais qu'elle serait couplée à une augmentation de la synthèse *de novo* de P2X4. Aussi, la substitution du motif responsable de l'internalisation de P2X4, par la protéine mCherry, devrait également permettre aux récepteurs P2X4 nouvellement synthétisés de se maintenir à la surface des microglies, permettant alors une augmentation du nombre de récepteurs à la surface.

Certaines études ont évoqué que le récepteur P2X4 microglial n'avait pas d'effet sur l'hyperalgésie en condition neuropathique chez les femelles (Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015). Cependant, nos résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différences mâles/femelles au niveau comportemental. En effet, chez les femelles nous avons observé, de la même manière que chez les mâles, que le récepteur P2X4 était nécessaire à l'induction de l'hyperalgésie aussi bien mécanique que thermique en condition neuropathique et que son augmentation à la surface des microglies, bien que pas suffisante, participait à cette hyperalgésie neuropathique. Les précédentes études comparant l'implication de P2X4 chez les mâles et les femelles en condition neuropathique, sont néanmoins peu nombreuses et aucune n'a démontré par immunohistochimie la présence, ou non, de P2X4 à la surface des microglies activées. Elles ont également révélé que les femelles, au contraire des mâles, ne

présentaient pas d'augmentation de la phosphorylation de p38-MAPK ni de synthèse et libération de BDNF dans les microglies, deux acteurs clés de la voie P2X4/BDNF/TrkB (Luo *et al.*, 2018; Mapplebeck *et al.*, 2018; Sorge *et al.*, 2015; Taves *et al.*, 2016). Cependant, le lien direct entre l'augmentation de P2X4 dans les microglies et l'hyperalgésie en condition neuropathique n'avait jamais été démontré chez les femelles. Or, nous avons montré par marquages immunohistochimiques qu'en condition neuropathique, l'expression du récepteur P2X4 semblait être augmentée dans les microglies chez les souris P2X4 WT, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. De plus, même si certaines études ont montré que le récepteur P2X4 était moins exprimé dans les microglies femelles comparés aux mâles (Crain *et al.*, 2009; Guneykaya *et al.*, 2018), l'expression de P2X4 dans les microglies ne semble pas être diminuée chez les femelles lors de nos expériences. Cependant, nous n'avons pas encore quantifié les niveaux d'expression dans les différentes conditions.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que, bien qu'il pourrait être exprimé dans de plus faibles proportions, le récepteur P2X4 augmenté dans les microglies chez les femelles est également responsable de l'hyperalgésie mécanique et thermique constatée en neuropathie. Cependant, l'activation de ce récepteur n'induirait peut-être pas la libération de BDNF, mais serait responsable d'autres mécanismes engendrant la même hyperalgésie observée chez les mâles, en condition neuropathique.

III. L'hyperexcitabilité des neurones WDR est modulée de manière P2X4-dépendante, en condition basale

En plus des analyses comportementales, les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* des neurones WDR des couches profondes de la CDME, nous donnent quelques indications concernant l'implication du récepteur P2X4 dans la transmission et l'intégration de l'information nociceptive à la suite d'un stimulus périphérique. Nous observons en condition basale, que l'augmentation du trafic à la surface de P2X4, chez les souris P2X4 KI diminue le seuil d'activation des neurones WDR après stimulation des fibres C et augmente leur excitabilité, sans changer leur sensibilisation centrale. De plus, sa suppression ne modifie pas les propriétés intrinsèques de ces neurones. Ceci, chez les mâles et les femelles. Cependant,

la délétion spécifique de P2X4 uniquement dans les microglies, chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, induit une augmentation de l'excitabilité des neurones WDR, sans changement de leur seuil d'activation, ni de leur sensibilisation, uniquement chez les mâles. Ces résultats nous indiquent premièrement que le récepteur P2X4 est suffisant, lorsqu'il se trouve à la surface des cellules, pour induire une hyperexcitabilité neuronale et une diminution du seuil d'activation des fibres C projetant sur les neurones WDR des couches profondes de la CDME. Nous n'avons pas eu le temps d'effectuer les enregistrements sur des modèles transgéniques augmentant la densité de surface de P2X4 de manière cellules spécifiques. Nous ne pouvons donc pas affirmer que nos observations sont directement liées au récepteurs P2X4 exprimés dans la microglie, les neurones ou présents sur d'autres cellules. Cependant, si l'on met en parallèle ces résultats avec nos résultats comportementaux, cela laisse à penser que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies instaure une hypersensibilité mécanique et thermique en condition basale, en provoquant l'augmentation de l'excitabilité des neurones WDR et ainsi de la transmission nociceptive. Partant de ce principe cela suggère que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies, augmenterait la libération de BDNF dans la CDME ce qui induirait une hyperexcitabilité des neurones WDR via l'activation du récepteur TrkB qui permettrait la potentialisation des récepteurs NMDA et la désinhibition des récepteurs GABA. En effet, il a déjà été démontré qu'en condition neuropathique, l'activation de TrkB par le BDNF, augmentait l'excitabilité des neurones WDR en augmentant le nombre de réponses C à la suite d'une stimulation (Xue et al., 2020). Bien que cela soit démontré dans des conditions de douleurs neuropathiques, on peut supposer que la libération de BDNF qui serait induite par l'augmentation à la surface de P2X4, jouerait un rôle également en condition basale.

Dans un second temps, nous avons observé que la délétion globale de P2X4 n'induisait pas de changements de seuil, d'excitabilité ou de sensibilisation des neurones WDR. Cependant, la délétion spécifique de P2X4 dans les microglies, induisait une augmentation de l'excitabilité des neurones WDR, uniquement chez les mâles, sans pour autant changer leur seuil d'activation, ni leur capacité de sensibilisation. Cela laisse supposer qu'une potentielle compensation se produit en ce qui concerne l'excitabilité. En effet, la délétion de P2X4 dans les microglies pourrait induire son augmentation dans d'autres types cellulaires tels que les neurones qui serait alors responsable de cette augmentation d'excitabilité. De plus, nous

avons remarqué que bien que l'excitabilité des neurones WDR était modifiée, le seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C ne l'était pas. L'augmentation de P2X4 à la surface de la microglie serait alors uniquement responsable de l'abaissement du seuil d'activation des neurones WDR. Ceci est alors corrélé par le fait qu'en comportement nous observons uniquement des seuils de douleur, qui sont alors abaissés lorsque le récepteur est à la surface de la microglie. Nous pouvons suggérer que le récepteur P2X4 à la surface des microglies est responsable des changements de seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C et que l'augmentation de P2X4 à la surface des neurones est responsable de l'augmentation de l'excitabilité des neurones WDR. Ceci concorde avec l'augmentation de l'excitabilité et du seuil chez les souris P2X4 KI. L'activation du récepteur P2X4 microglial contrôlerait l'excitabilité neuronale suite à des stimuli proches du seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C et le récepteur P2X4 neuronal serait responsable de la modulation de l'excitabilité des neurones WDR provoquée par des stimuli de forte intensité. En outre, chez les mâles, la suppression microgliale de P2X4 serait compensée par une augmentation de P2X4 à la surface des neurones. Ceci pourrait se confirmer par l'utilisation de modèles transgéniques présentant une délétion de P2X4 uniquement dans les neurones, que nous sommes actuellement en train de produire.

De plus, cette augmentation d'excitabilité des neurones WDR, en condition basale, lors de la délétion de P2X4 spécifiquement dans les microglies, chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, n'est présente que chez les mâles et pas chez les femelles. Nous pensons que chez les femelles, le P2X4 microglial pourrait être impliqué à la fois dans l'établissement des seuils d'activation des neurones WDR par les fibres C, mais aussi dans les processus d'excitabilité de ces neurones.

Il ne faut néanmoins pas oublier que la lignée de souris transgénique CX3CR1-Cre P2X4 KO est un modèle inductible. En effet, dans ce modèle, nous supprimons l'expression de P2X4 à l'âge adulte (environ 8 semaines), alors que nos souris P2X4 KO présentent une délétion de P2X4 dès la naissance. On peut alors supposer à l'inverse que c'est la délétion précoce de P2X4, chez les souris P2X4 KO, qui pourrait présenter des phénomènes compensatoires et non pas les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO inductibles ou la délétion de P2X4 est effectuée quelques semaines avant les expériences.

IV. La neuropathie induit une hyperexcitabilité P2X4-dépendante des neurones WDR, uniquement chez les mâles

En condition neuropathique, nous avons observé que la neuropathie induisait une diminution du seuil d'activation des neurones WDR stimulés par les fibres C, chez les mâles et les femelles. L'excitabilité des neurones WDR est également augmentée en condition neuropathique, mais uniquement chez les mâles et pas chez les femelles. De plus, aucun changement de sensibilisation centrale des neurones WDR n'a été remarqué à la suite d'une neuropathie. On peut d'ores et déjà voir par nos résultats que, de manière générale, une lésion de nerf périphérique n'induit pas les mêmes changements des propriétés intrinsèques chez les mâles et les femelles. Il paraît donc important de disséquer les changements potentiels entre les deux sexes et potentiellement les différentes implications de P2X4 dans ces dernières.

Nous savons qu'une neuropathie induit une augmentation de P2X4 à la surface des microglies. Lorsque P2X4 est d'ores et déjà à la surface des microglies, mais aussi d'autres cellules, nous observons que la neuropathie n'induit pas de diminution supplémentaire des seuils d'activation des neurones WDR par les fibres C qui étaient déjà abaissés. De plus, chez les femelles, nous n'observons pas de changements d'excitabilité, ni des capacités de sensibilisation centrale des neurones WDR. Au contraire, chez les mâles, nous avons remarqué que l'augmentation de P2X4 suivi d'une neuropathie diminue l'excitabilité des neurones WDR.

Tout d'abord, le fait que le seuil ne diminue pas pourrait s'expliquer par le fait qu'il est déjà abaissé en condition basale. Cependant, la perte d'excitabilité en condition neuropathique est assez surprenante. Nous supposons que la trop grande augmentation de P2X4 à la surface causée par la délétion du motif d'internalisation et la neuropathie pourrait déclencher des mécanismes de rétrocontrôles permettant d'abaisser une trop grande excitabilité. De plus, si nous repartons du principe que les changements de seuil d'activation des neurones WDR par les fibres C dépendent du P2X4 microglial et que l'excitabilité des neurones WDR dépend du P2X4 neuronal, nous pouvons penser qu'une potentielle mort neuronale peut se produire.

La différence d'excitabilité des neurones WDR entre les mâles et les femelles à la suite de l'augmentation à la surface de P2X4, chez les souris P2X4 KI, et de la neuropathie, pourrait

s'expliquer par le fait que le récepteur P2X4 microglial n'agirait pas de la même manière entre les deux sexes.

Aussi, la délétion globale de P2X4 supprime la baisse du seuil d'activation des neurones WDR ainsi que l'augmentation de leur excitabilité chez les mâles. Cependant nous avons observé que la délétion spécifique de P2X4 dans les microglies, chez les souris CX3CR1-Cre P2X4 KO, supprime également l'abaissement des seuils d'activation des fibres C, mais pas l'excitabilité neuronale chez les mâles. Cela est en adéquation avec notre suggestion que le récepteur P2X4 présent à la surface des microglies participerait seulement à la modification des seuils d'activations chez les mâles. Afin de confirmer nos hypothèses, sur l'implication différentielle du récepteur P2X4, selon sa localisation à la surface des neurones ou de la microglie, il serait intéressant de voir quels types de neurones sont impliqués et surtout si ce sont des neurones appartenant au système nerveux central ou périphérique. Par exemple quelle serait l'implication de P2X4 au niveau des neurones sensoriels des DRG.

Aussi, nous ne devons pas oublier que nous avons regardé, dans ces expériences, que les propriétés électrophysiologiques des neurones WDR des couches profondes de la moelle épinière. En effet, d'autres neurones sont également impliqués dans la transmission nociceptive tels que les neurones WDR des couches superficielles de la CDME, mais aussi les neurones de projections nociceptifs spécifiques.

V. P2X4 est nécessaire et suffisant au développement de la douleur inflammatoire

La douleur inflammatoire est un autre type de douleur chronique, mais est plutôt considérée comme une douleur persistante. Le rôle du récepteur P2X4 dans la douleur neuropathique a été très étudié et ce par de nombreuses équipes de recherche différentes, cependant, seulement quelques articles ont montré l'implication de P2X4 dans la douleur inflammatoire. Ces études ont ainsi révélé que le récepteur P2X4 était nécessaire au développement de l'allodynie tactile en condition d'inflammation dites plutôt persistante, après injection de CFA

(Tsuda *et al.*, 2009b). Aussi, il a été révélé que chez les mâles, contrairement à la douleur neuropathique, la douleur inflammatoire n'entraînait pas d'augmentation de P2X4 dans la CDME (Tsuda *et al.*, 2003). De plus, les microglies de la CDME ne semblent pas présenter une augmentation de BDNF ni induire sa libération. Bien que le BDNF microglial ne soit pas impliqué dans la douleur inflammatoire, les mécanismes sous-jacents semblent communs avec la douleur neuropathique. En effet, les récepteurs TrkB sont pareillement activés et provoqueraient de la même manière une potentialisation glutamatergique et une désinhibition GABAergique (Brenner *et al.*, 2004; Lalisse *et al.*, 2018; Renn *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008).

Après l'injection unilatérale de CFA, nos résultats ont confirmé la nécessité de P2X4 dans le développement mais pas dans le maintien de cette dernière. De même, nous avons montré que le récepteur P2X4 était également nécessaire au développement de l'hypersensibilité thermique en condition inflammatoire. Nos résultats ont également révélé que l'augmentation de P2X4 à la surface des microglies et/ou des macrophages était suffisante au développement et au maintien de l'hyperalgésie inflammatoire. Ceci, de manière identique chez les mâles et les femelles. Lors de l'étude par immunohistochimie de l'expression de P2X4 dans la moelle épinière, nous avons montré que l'inflammation n'engendrait ni une activation et une prolifération microgliale, ni une augmentation de l'expression de P2X4 à la surface des microglies. Nos résultats confirment que le récepteur P2X4 microglial n'est pas impliqué dans l'hyperalgésie inflammatoire.

Notre modèle transgénique Cd11b-Cre P2X4 KI permet certes une augmentation de P2X4 à la surface des microglies mais également à la surface des macrophages. Or, nous savons que la présence de P2X4 dans les macrophages résidants dans la peau contribue à la sensibilisation des terminaisons nerveuses sensorielles périphériques et induit une allodynie mécanique, en condition inflammatoire (Ulmann *et al.*, 2010). On peut alors supposer que, pour la douleur inflammatoire, P2X4 aurait un rôle principalement périphérique au niveau des macrophages.

Aussi, nos résultats ont montré que l'inflammation induisait une augmentation de l'expression de P2X4 dans les DRG, chez les souris P2X4 WT. Or, la localisation cellulaire du récepteur dans les DRG reste imprécise, de par le faible espace intercellulaire (quelques nm) qui sépare les neurones des DRG et les cellules gliales satellites (CGS) qui les entourent. Cependant, nos

résultats comportementaux ont montré que l'augmentation de P2X4 spécifiquement à la surface des neurones, chez les souris Synapsin-Cre P2X4 KI n'était pas nécessaire pour induire une hyperalgésie en condition inflammatoire. On peut donc supposer que dans les DRG, le récepteur P2X4 serait augmenté à la surface des CGS où il participerait au développement de la douleur inflammatoire.

Nous nous devons également d'être critique vis à vis de notre modèle de souris P2X4 KI et les modèles cellules spécifiques qui en découlent. En effet, les souris P2X4 KI et Cd11b-Cre P2X4 KI présentent une déficience d'internalisation du récepteur P2X4 qui pourrait, par l'augmentation du récepteur à la surface des microglies, provoquer l'activation de la voie P2X4/BDNF/TrkB impliquée dans la douleur neuropathique et ainsi induire l'hyperalgésie observée en condition inflammatoire.

Afin de comprendre l'implication périphérique ou centrale de P2X4 dans la douleur inflammatoire, nous pouvons envisager d'utiliser des modèles de souris transgéniques supprimant uniquement P2X4 dans la microglie (CX3CR1-Cre P2X4 KO) ou d'inhiber pharmacologiquement P2X4 à la périphérie ou directement dans la ME par injection intrathécale d'antagoniste spécifique. De plus, nous n'avons observé aucune différence de sensibilité entre les mâles et les femelles. Nous confirmons donc l'étude de Lalisse, qui observait également qu'il n'y avait pas de différences intersexuelles, et ce dépendamment de P2X4.

En conclusion, nos études ont permis d'approfondir nos connaissances de sur l'implication de P2X4 dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires. Nous avons pu confirmer que le récepteur P2X4 était nécessaire pour le développement de ces deux types de douleurs et que son augmentation à la surface des microglies et/ou des macrophages suffisait pour induire une allodynie mécanique et une hypersensibilité thermique partielles ou totales. De plus, en ce qui concerne la douleur neuropathique, ces résultats comportementaux sont étroitement liés à une augmentation de la transmission nociceptive. En effet, le récepteur P2X4 est également nécessaire à l'augmentation de la sensibilité et l'excitabilité des neurones WDR des couches profondes de la moelle épinière en condition neuropathique. Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes et devront être approfondies par la suite. Malgré ces nombreuses incertitudes, P2X4 reste une cible thérapeutique très intéressante afin de traiter les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires. Le manque de traitements actuels, efficaces à long terme n'engendrant pas de grave dépendance est un problème dans notre système de santé actuel. Il est donc nécessaire de continuer la recherche sur le récepteur P2X4 qui pourrait se révéler être une cible thérapeutique potentielle et ainsi aider à soigner les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires.

ARTICLES ASSOCIÉS

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbadie, C., Bhangoo, S., De Koninck, Y., Malcangio, M., Melik-Parsadaniantz, S., and White, F.A. (2009). Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev* 60, 125-134. 10.1016/j.brainresrev.2008.12.002.

Abbadie, C., Lindia, J.A., Cumiskey, A.M., Peterson, L.B., Mudgett, J.S., Bayne, E.K., DeMartino, J.A., MacIntyre, D.E., and Forrest, M.J. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7947-7952. 10.1073/pnas.1331358100.

Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., and Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24, 52-55. 10.1016/S0165-6147(02)00038-X.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32, 19-29. 10.1016/j.tins.2008.10.001.

Abdelrahman, A., Namasivayam, V., Hinz, S., Schiedel, A.C., Kose, M., Burton, M., El-Tayeb, A., Gillard, M., Bajorath, J., de Ryck, M., and Muller, C.E. (2017). Characterization of P2X4 receptor agonists and antagonists by calcium influx and radioligand binding studies. *Biochem Pharmacol* 125, 41-54. 10.1016/j.bcp.2016.11.016.

Abdulqawi, R., Dockry, R., Holt, K., Layton, G., McCarthy, B.G., Ford, A.P., and Smith, J.A. (2015). P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* 385, 1198-1205. 10.1016/S0140-6736(14)61255-1.

Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., et al. (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 22, 1445-1454. 10.1111/j.1460-9568.2005.04340.x.

Abraira, V.E., Kuehn, E.D., Chirila, A.M., Springel, M.W., Toliver, A.A., Zimmerman, A.L., Orefice, L.L., Boyle, K.A., Bai, L., Song, B.J., et al. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168, 295-310 e219. 10.1016/j.cell.2016.12.010.

Aby, F., Whitestone, S., Landry, M., Ulmann, L., and Fossat, P. (2018). Inflammatory-induced spinal dorsal horn neurons hyperexcitability is mediated by P2X4 receptors. *Pain Rep* 3, e660. 10.1097/PR9.0000000000000660.

- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Volonte, C., Aloisi, F., and Visentin, S. (2005). ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 157-165. 10.1016/j.brainresrev.2004.12.005.
- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W.L., and Zeilhofer, H.U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5, 34-40. 10.1038/nn778.
- Alba-Delgado, C., El Khoueiry, C., Peirs, C., Dallel, R., Artola, A., and Antri, M. (2015). Subpopulations of PKCgamma interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 156, 1714-1728. 10.1097/j.pain.0000000000000221.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25, 2368-2376. 10.1038/sj.emboj.7601116.
- Almeida, T.F., Roizenblatt, S., and Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000, 40-56. 10.1016/j.brainres.2003.10.073.
- Alvarez, F.J., Villalba, R.M., Carr, P.A., Grandes, P., and Somohano, P.M. (2000). Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 422, 464-487. 10.1002/1096-9861(20000703)422:3<464::aid-cne11>3.0.co;2-#.
- Amadio, S., Montilli, C., Picconi, B., Calabresi, P., and Volonte, C. (2007). Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal* 3, 389-398. 10.1007/s11302-007-9069-8.
- Andries, M., Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2007). Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 25, 8-16. 10.1016/j.nbd.2006.08.018.
- Antonio, L.S., Stewart, A.P., Varanda, W.A., and Edwardson, J.M. (2014). Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett* 588, 2125-2128. 10.1016/j.febslet.2014.04.048.
- Apolloni, S., Amadio, S., Montilli, C., Volonte, C., and D'Ambrosi, N. (2013). Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22, 4102-4116. 10.1093/hmg/ddt259.
- Asatryan, L., Nam, H.W., Lee, M.R., Thakkar, M.M., Saeed Dar, M., Davies, D.L., and Choi, D.S. (2011). Implication of the purinergic system in alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 35, 584-594. 10.1111/j.1530-0277.2010.01379.x.
- Asatryan, L., Popova, M., Perkins, D., Trudell, J.R., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2010). Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 720-728. 10.1124/jpet.110.167908.

Ase, A.R., Bernier, L.P., Blais, D., Pankratov, Y., and Seguela, P. (2010). Modulation of heteromeric P2X1/5 receptors by phosphoinositides in astrocytes depends on the P2X1 subunit. *J Neurochem* 113, 1676-1684. 10.1111/j.1471-4159.2010.06734.x.



Baba, H., Ji, R.R., Kohno, T., Moore, K.A., Ataka, T., Wakai, A., Okamoto, M., and Woolf, C.J. (2003). Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 24, 818-830. 10.1016/s1044-7431(03)00236-7.

Bae, J.Y., Kim, J.H., Cho, Y.S., Mah, W., and Bae, Y.C. (2015). Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol* 523, 126-138. 10.1002/cne.23672.

Bair, M.J., Robinson, R.L., Katon, W., and Kroenke, K. (2003). Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* 163, 2433-2445. 10.1001/archinte.163.20.2433.

Barragan-Iglesias, P., Pineda-Farias, J.B., Cervantes-Duran, C., Bravo-Hernandez, M., Rocha-Gonzalez, H.I., Murbartian, J., and Granados-Soto, V. (2014). Role of spinal P2Y6 and P2Y11 receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells. *Mol Pain* 10, 29. 10.1186/1744-8069-10-29.

Barrera, N.P., Ormond, S.J., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., and Edwardson, J.M. (2005). Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280, 10759-10765. 10.1074/jbc.M412265200.

Bartlett, R., Stokes, L., and Sluyter, R. (2014). The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev* 66, 638-675. 10.1124/pr.113.008003.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284. 10.1016/j.cell.2009.09.028.

Batti, L., Sundukova, M., Murana, E., Pimpinella, S., De Castro Reis, F., Pagani, F., Wang, H., Pellegrino, E., Perlas, E., Di Angelantonio, S., et al. (2016). TMEM16F Regulates Spinal Microglial Function in Neuropathic Pain States. *Cell Rep* 15, 2608-2615. 10.1016/j.celrep.2016.05.039.

Baxter, A.W., Choi, S.J., Sim, J.A., and North, R.A. (2011). Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 34, 213-220. 10.1111/j.1460-9568.2011.07763.x.

Beenhakker, M.P., Kirby, M.S., and Nusbaum, M.P. (2007). Mechanosensory gating of proprioceptor input to modulatory projection neurons. *J Neurosci* 27, 14308-14316. 10.1523/JNEUROSCI.4404-07.2007.

- Benarroch, E.E. (2016). Dorsal horn circuitry: Complexity and implications for mechanisms of neuropathic pain. *Neurology* 86, 1060-1069. 10.1212/WNL.0000000000002478.
- Bennett, G.J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., and Dubner, R. (1980). Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194, 809-827. 10.1002/cne.901940407.
- Bergmann, P., Garcia de Paco, E., Rissiek, B., Menzel, S., Dubberke, G., Hua, J., Rassendren, F., Ulmann, L., and Koch-Nolte, F. (2019). Generation and Characterization of Specific Monoclonal Antibodies and Nanobodies Directed Against the ATP-Gated Channel P2X4. *Front Cell Neurosci* 13, 498. 10.3389/fncel.2019.00498.
- Bernard, J.F., and Besson, J.M. (1990). The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol* 63, 473-490. 10.1152/jn.1990.63.3.473.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., Chevallier, S., Blais, D., Zhao, Q., Boue-Grabot, E., Logothetis, D., and Seguela, P. (2008a). Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *J Neurosci* 28, 12938-12945. 10.1523/JNEUROSCI.3038-08.2008.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., and Seguela, P. (2013). Post-translational regulation of P2X receptor channels: modulation by phospholipids. *Front Cell Neurosci* 7, 226. 10.3389/fncel.2013.00226.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., and Seguela, P. (2018). P2X receptor channels in chronic pain pathways. *Br J Pharmacol* 175, 2219-2230. 10.1111/bph.13957.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., Tong, X., Hamel, E., Blais, D., Zhao, Q., Logothetis, D.E., and Seguela, P. (2008b). Direct modulation of P2X1 receptor-channels by the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Mol Pharmacol* 74, 785-792. 10.1124/mol.108.047019.
- Bernier, L.P., Blais, D., Boue-Grabot, E., and Seguela, P. (2012). A dual polybasic motif determines phosphoinositide binding and regulation in the P2X channel family. *PLoS One* 7, e40595. 10.1371/journal.pone.0040595.
- Bertin, E. (2019). Etude de l'augmentation du trafic en surface des récepteurs P2X4 de l'ATP à l'aide de nouveaux modèles murins transgéniques : implications dans les processus mnésiques et la sclérose latérale amyotrophique.
- Bertin, E., Deluc, T., Pilch, K.S., Martinez, A., Pougnet, J.T., Doudnikoff, E., Allain, A.E., Bergmann, P., Rousseau, M., Toulme, E., et al. (2020). Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Mol Psychiatry*. 10.1038/s41380-019-0641-8.
- Besnard, A., Gautherot, J., Julien, B., Tebbi, A., Garcin, I., Doignon, I., Pean, N., Gonzales, E., Cassio, D., Grosse, B., et al. (2016). The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatology* 64, 941-953. 10.1002/hep.28675.

- Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32, 1025-1043. 10.1152/jn.1969.32.6.1025.
- Bhattacharya, A., and Ceusters, M. (2020). Targeting neuroinflammation with brain penetrant P2X7 antagonists as novel therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 45, 234-235. 10.1038/s41386-019-0502-9.
- Bhattacharya, A., Wang, Q., Ao, H., Shoblock, J.R., Lord, B., Aluisio, L., Fraser, I., Nepomuceno, D., Neff, R.A., Welty, N., et al. (2013). Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol* 170, 624-640. 10.1111/bph.12314.
- Biber, K., Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., Tsukamoto, K., Toyomitsu, E., Masuda, T., Boddeke, H., and Inoue, K. (2011). Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. *EMBO J* 30, 1864-1873. 10.1038/emboj.2011.89.
- Bicknell, H.R., Jr., and Beal, J.A. (1984). Axonal and dendritic development of substantia gelatinosa neurons in the lumbosacral spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 226, 508-522. 10.1002/cne.902260406.
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A., and Burnstock, G. (1999). Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 10, 1107-1111. 10.1097/00001756-199904060-00037.
- Bo, X., Jiang, L.H., Wilson, H.L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A., and North, R.A. (2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol* 63, 1407-1416. 10.1124/mol.63.6.1407.
- Bobanovic, L.K., Royle, S.J., and Murrell-Lagnado, R.D. (2002). P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22, 4814-4824.
- Bortolato, M., Yardley, M.M., Khoja, S., Godar, S.C., Asatryan, L., Finn, D.A., Alkana, R.L., Louie, S.G., and Davies, D.L. (2013). Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1059-1070. 10.1017/S1461145712000909.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V., and Seguela, P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275, 10190-10195. 10.1074/jbc.275.14.10190.
- Boue-Grabot, E., and Pankratov, Y. (2017). Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast* 2017, 9454275. 10.1155/2017/9454275.
- Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., and Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136, 380-387. 10.1016/j.pain.2007.08.013.

- Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J.M., Gorecki, D.C., and Murrell-Lagnado, R. (2009). Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J Biol Chem* *284*, 13446-13454. 10.1074/jbc.M901255200.
- Boyle, K.A., Gradwell, M.A., Yasaka, T., Dickie, A.C., Polgar, E., Ganley, R.P., Orr, D.P.H., Watanabe, M., Abraira, V.E., Kuehn, E.D., et al. (2019). Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia. *Cell Rep* *28*, 526-540 e526. 10.1016/j.celrep.2019.06.040.
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* *371*, 519-523. 10.1038/371519a0.
- Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., and Basbaum, A.I. (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* *82*, 522-536. 10.1016/j.neuron.2014.01.018.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* *10*, 287-333. 10.1016/j.ejpain.2005.06.009.
- Breivik, H., Eisenberg, E., O'Brien, T., and Openminds (2013). 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* *13*, 1229. 10.1186/1471-2458-13-1229.
- Brenner, G.J., Ji, R.R., Shaffer, S., and Woolf, C.J. (2004). Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* *20*, 375-384. 10.1111/j.1460-9568.2004.03506.x.
- Burgess, P.R., and Perl, E.R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* *190*, 541-562. 10.1113/jphysiol.1967.sp008227.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* *24*, 509-581.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. Straub, RW, Bolis L (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press 107-118.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* *16*, 433-440. 10.1016/0306-3623(85)90001-1.
- Burnstock, G., and Knight, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* *240*, 31-304. 10.1016/S0074-7696(04)40002-3.



Cao, Q., Zhao, K., Zhong, X.Z., Zou, Y., Yu, H., Huang, P., Xu, T.L., and Dong, X.P. (2014). SLC17A9 protein functions as a lysosomal ATP transporter and regulates cell viability. *J Biol Chem* 289, 23189-23199. 10.1074/jbc.M114.567107.

Cao, Q., Zhong, X.Z., Zou, Y., Murrell-Lagnado, R., Zhu, M.X., and Dong, X.P. (2015). Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol* 209, 879-894. 10.1083/jcb.201409071.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313. 10.1126/science.288.5464.306.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441. 10.1038/18906.

Cavaliere, F., Florenzano, F., Amadio, S., Fusco, F.R., Viscomi, M.T., D'Ambrosi, N., Vacca, F., Sancesario, G., Bernardi, G., Molinari, M., and Volonte, C. (2003). Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120, 85-98. 10.1016/s0306-4522(03)00228-8.

Chaumont, S., Jiang, L.H., Penna, A., North, R.A., and Rassendren, F. (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279, 29628-29638. 10.1074/jbc.M403940200.

Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., and Wood, J.N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428-431. 10.1038/377428a0.

Chen, G., Zhang, Z., Wei, Z., Cheng, Q., Li, X., Li, W., Duan, S., and Gu, X. (2012). Lysosomal exocytosis in Schwann cells contributes to axon remyelination. *Glia* 60, 295-305. 10.1002/glia.21263.

Cheng, R.D., Ren, J.J., Zhang, Y.Y., and Ye, X.M. (2014). P2X4 receptors expressed on microglial cells in post-ischemic inflammation of brain ischemic injury. *Neurochem Int* 67, 9-13. 10.1016/j.neuint.2014.01.011.

Cho, H.J., Kim, S.Y., Park, M.J., Kim, D.S., Kim, J.K., and Chu, M.Y. (1997). Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res* 749, 358-362. 10.1016/S0006-8993(97)00048-6.

Chrovian, C.C., Rech, J.C., Bhattacharya, A., and Letavic, M.A. (2014). P2X7 antagonists as potential therapeutic agents for the treatment of CNS disorders. *Prog Med Chem* 53, 65-100. 10.1016/B978-0-444-63380-4.00002-0.

- Chu, K.L., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., and McGaraughty, S. (2004). Increased WDR spontaneous activity and receptive field size in rats following a neuropathic or inflammatory injury: implications for mechanical sensitivity. *Neurosci Lett* 372, 123-126. 10.1016/j.neulet.2004.09.025.
- Chung, J.M., Surmeier, D.J., Lee, K.H., Sorkin, L.S., Honda, C.N., Tsong, Y., and Willis, W.D. (1986). Classification of primate spinothalamic and somatosensory thalamic neurons based on cluster analysis. *J Neurophysiol* 56, 308-327. 10.1152/jn.1986.56.2.308.
- Ciaramella, A. (2019). Psychopharmacology of chronic pain. *Handb Clin Neurol* 165, 317-337. 10.1016/B978-0-444-64012-3.00019-8.
- Cieslak, M., Roszek, K., and Wujak, M. (2019). Purinergic implication in amyotrophic lateral sclerosis-from pathological mechanisms to therapeutic perspectives. *Purinergic Signal* 15, 1-15. 10.1007/s11302-018-9633-4.
- Clark, A.K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K.J., Malcangio, M., and Sandkuhler, J. (2015). Selective activation of microglia facilitates synaptic strength. *J Neurosci* 35, 4552-4570. 10.1523/JNEUROSCI.2061-14.2015.
- Clarke, C.E., Benham, C.D., Bridges, A., George, A.R., and Meadows, H.J. (2000). Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J Physiol* 523 Pt 3, 697-703. 10.1111/j.1469-7793.2000.00697.x.
- Clyne, J.D., LaPointe, L.D., and Hume, R.I. (2002). The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 539, 347-359. 10.1113/jphysiol.2001.013244.
- Cobos, E.J., Nickerson, C.A., Gao, F., Chandran, V., Bravo-Caparros, I., Gonzalez-Cano, R., Riva, P., Andrews, N.A., Latremoliere, A., Seehus, C.R., et al. (2018). Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling. *Cell Rep* 22, 1301-1312. 10.1016/j.celrep.2018.01.006.
- Cockayne, D.A., Dunn, P.M., Zhong, Y., Rong, W., Hamilton, S.G., Knight, G.E., Ruan, H.Z., Ma, B., Yip, P., Nunn, P., et al. (2005). P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567, 621-639. 10.1113/jphysiol.2005.088435.
- Coddou, C., Lorca, R.A., Acuna-Castillo, C., Grauso, M., Rassendren, F., and Huidobro-Toro, J.P. (2005). Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 202, 121-131. 10.1016/j.taap.2004.06.015.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63, 641-683. 10.1124/pr.110.003129.
- Collden, G., Mangano, C., and Meister, B. (2010). P2X2 purinoreceptor protein in hypothalamic neurons associated with the regulation of food intake. *Neuroscience* 171, 62-78. 10.1016/j.neuroscience.2010.08.036.

Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., and Buell, G. (1996). Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16, 2495-2507.

Compan, V., Ulmann, L., Stelmashenko, O., Chemin, J., Chaumont, S., and Rassendren, F. (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32, 4284-4296. 10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012.

Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C.J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32, 1-32. 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.

Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021. 10.1038/nature04223.

Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-942. 10.1038/nature01868.

Crain, J.M., Nikodemova, M., and Watters, J.J. (2009). Expression of P2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. *J Neuroinflammation* 6, 24. 10.1186/1742-2094-6-24.

Cunha, R.A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J Neurochem* 139, 1019-1055. 10.1111/jnc.13724.

Custer, E.E., Knott, T.K., Cuadra, A.E., Ortiz-Miranda, S., and Lemos, J.R. (2012). P2X purinergic receptor knockout mice reveal endogenous ATP modulation of both vasopressin and oxytocin release from the intact neurohypophysis. *J Neuroendocrinol* 24, 674-680. 10.1111/j.1365-2826.2012.02299.x.

Czamara, D., Muller-Myhsok, B., and Lucae, S. (2018). The P2RX7 polymorphism rs2230912 is associated with depression: A meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 82, 272-277. 10.1016/j.pnpbp.2017.11.003.



D'Ambrosi, N., Finocchi, P., Apolloni, S., Cozzolino, M., Ferri, A., Padovano, V., Pietrini, G., Carri, M.T., and Volonte, C. (2009). The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol* 183, 4648-4656. 10.4049/jimmunol.0901212.

Darbousset, R., Delierneux, C., Mezouar, S., Hego, A., Lecut, C., Guillaumat, I., Riederer, M.A., Evans, R.J., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L., et al. (2014). P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* 124, 2575-2585. 10.1182/blood-2014-04-571679.

- Dare, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., and Fredholm, B.B. (2007). Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* 92, 15-20. 10.1016/j.physbeh.2007.05.031.
- Davies, D.L., Asatryan, L., Kuo, S.T., Woodward, J.J., King, B.F., Alkana, R.L., Xiao, C., Ye, J.H., Sun, H., Zhang, L., et al. (2006). Effects of ethanol on adenosine 5'-triphosphate-gated purinergic and 5-hydroxytryptamine receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 30, 349-358. 10.1111/j.1530-0277.2006.00023.x.
- Davies, D.L., Kuo, S.T., and Alkana, R.L. (2005). Differential effects of propofol and ethanol on P2X4 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Int Congr Ser* 1283, 285-287. 10.1016/j.ics.2005.07.090.
- Davis, K.D., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1993). Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. *J Neurophysiol* 69, 1071-1081. 10.1152/jn.1993.69.4.1071.
- De Broucker, T., Cesaro, P., Willer, J.C., and Le Bars, D. (1990). Diffuse noxious inhibitory controls in man. Involvement of the spinoreticular tract. *Brain* 113 (Pt 4), 1223-1234. 10.1093/brain/113.4.1223.
- de Resende, M.A., Silva, L.F., Sato, K., Arendt-Nielsen, L., and Sluka, K.A. (2011). Blockade of opioid receptors in the medullary reticularis nucleus dorsalis, but not the rostral ventromedial medulla, prevents analgesia produced by diffuse noxious inhibitory control in rats with muscle inflammation. *J Pain* 12, 687-697. 10.1016/j.jpain.2010.12.009.
- Decosterd, I., and Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158. 10.1016/S0304-3959(00)00276-1.
- Dedek, A., Xu, J., Kandegedara, C.M., Lorenzo, L.E., Godin, A.G., De Koninck, Y., Lombroso, P.J., Tsai, E.C., and Hildebrand, M.E. (2019). Loss of STEP61 couples disinhibition to N-methyl-d-aspartate receptor potentiation in rodent and human spinal pain processing. *Brain* 142, 1535-1546. 10.1093/brain/awz105.
- Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TFAA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep* 5, 378-388. 10.1016/j.celrep.2013.09.013.
- Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15, 545-558. 10.1038/nri3871.
- Deng, Z., Li, C., Du, E., Liu, C., Xia, B., Chen, H., He, Q., and Xu, C. (2018). Catestatin Enhances Neuropathic Pain Mediated by P2X4 Receptor of Dorsal Root Ganglia in a Rat Model of Chronic Constriction Injury. *Cell Physiol Biochem* 51, 812-826. 10.1159/000495334.
- Deuis, J.R., Dvorakova, L.S., and Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10, 284. 10.3389/fnmol.2017.00284.

Deussing, J.M., and Arzt, E. (2018). P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Depression? *Trends Mol Med* 24, 736-747. 10.1016/j.molmed.2018.07.005.

Di Virgilio, F., Sarti, A.C., Falzoni, S., De Marchi, E., and Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 18, 601-618. 10.1038/s41568-018-0037-0.

Dickie, A.C., Bell, A.M., Iwagaki, N., Polgar, E., Gutierrez-Mecinas, M., Kelly, R., Lyon, H., Turnbull, K., West, S.J., Etlin, A., et al. (2019). Morphological and functional properties distinguish the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn. *Pain* 160, 442-462. 10.1097/j.pain.0000000000001406.

Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46, 131-145. 10.1016/j.brainresrev.2004.07.015.

Donnelly, C.R., Andriessen, A.S., Chen, G., Wang, K., Jiang, C., Maixner, W., and Ji, R.R. (2020). Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain. *Neurotherapeutics* 17, 846-860. 10.1007/s13311-020-00905-7.

Doorn, K.J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W., Lucassen, P.J., and van Dam, A.M. (2014). Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun* 2, 90. 10.1186/s40478-014-0090-1.

Du, J., Dong, H., and Zhou, H.X. (2012). Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4140-4145. 10.1073/pnas.1119546109.

Dunwiddie, T.V., and Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24, 31-55. 10.1146/annurev.neuro.24.1.31.

Duraku, L.S., Hossaini, M., Hoendervangers, S., Falke, L.L., Kambiz, S., Mudera, V.C., Holstege, J.C., Walbeehm, E.T., and Ruigrok, T.J. (2012). Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. *Mol Pain* 8, 61. 10.1186/1744-8069-8-61.

Duveau, A., Bertin, E., and Boue-Grabot, E. (2020). Implication of Neuronal Versus Microglial P2X4 Receptors in Central Nervous System Disorders. *Neurosci Bull*. 10.1007/s12264-020-00570-y.

E

Eickhorst, A.N., Berson, A., Cockayne, D., Lester, H.A., and Khakh, B.S. (2002). Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120, 119-131. 10.1085/jgp.20028535.

Ellison, D.L. (2017). Physiology of Pain. *Crit Care Nurs Clin North Am* 29, 397-406. 10.1016/j.cnc.2017.08.001.

Emery, E.C., Luiz, A.P., Sikandar, S., Magnúsdóttir, R., Dong, X., and Wood, J.N. (2016). In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* 2, e1600990. 10.1126/sciadv.1600990.

Ennion, S., Hagan, S., and Evans, R.J. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* 275, 29361-29367. 10.1074/jbc.M003637200.

Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2002). P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 611-616. 10.1006/bbrc.2002.6488.

Erb, L., Woods, L.T., Khalafalla, M.G., and Weisman, G.A. (2019). Purinergic signaling in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 151, 25-37. 10.1016/j.brainresbull.2018.10.014.

F

Fabbretti, E. (2019). P2X3 receptors are transducers of sensory signals. *Brain Res Bull* 151, 119-124. 10.1016/j.brainresbull.2018.12.020.

Fabbrizio, P., Amadio, S., Apolloni, S., and Volonte, C. (2017). P2X7 Receptor Activation Modulates Autophagy in SOD1-G93A Mouse Microglia. *Front Cell Neurosci* 11, 249. 10.3389/fncel.2017.00249.

Feldmann, A., Amphornrat, J., Schonherr, M., Winterstein, C., Mobius, W., Ruhwedel, T., Danglot, L., Nave, K.A., Galli, T., Bruns, D., et al. (2011). Transport of the major myelin proteolipid protein is directed by VAMP3 and VAMP7. *J Neurosci* 31, 5659-5672. 10.1523/JNEUROSCI.6638-10.2011.

Fellin, T., Pascual, O., and Haydon, P.G. (2006). Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda)* 21, 208-215. 10.1152/physiol.00161.2005.

Feng, B., La, J.H., Schwartz, E.S., Tanaka, T., McMurray, T.P., and Gebhart, G.F. (2012). Long-term sensitization of mechanosensitive and -insensitive afferents in mice with persistent colorectal hypersensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G676-683. 10.1152/ajpgi.00490.2011.

Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M.K., and Schulze-Osthoff, K. (1997). Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* 139, 1635-1643. 10.1083/jcb.139.7.1635.

Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5, 565-575. 10.1038/nrn1431.

Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7, 423-436. 10.1038/nrn1928.

Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, S.C. (2005). ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499. 10.1126/science.1118435.

Fischer, W., Zadori, Z., Kullnick, Y., Groger-Arndt, H., Franke, H., Wirkner, K., Illes, P., and Mager, P.P. (2007). Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding. *Eur J Pharmacol* 576, 7-17. 10.1016/j.ejphar.2007.07.068.

Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1929). Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. *Science* 70, 381-382. 10.1126/science.70.1816.381-a.

Fois, G., Winkelmann, V.E., Bareis, L., Staudenmaier, L., Hecht, E., Ziller, C., Ehinger, K., Schymeinsky, J., Kranz, C., and Frick, M. (2018). ATP is stored in lamellar bodies to activate vesicular P2X4 in an autocrine fashion upon exocytosis. *J Gen Physiol* 150, 277-291. 10.1085/jgp.201711870.

Fossat, P., Sibon, I., Le Masson, G., Landry, M., and Nagy, F. (2007). L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *Eur J Neurosci* 25, 127-135. 10.1111/j.1460-9568.2006.05256.x.

Francois, A., Schuetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noel, J., Wood, J.N., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep* 10, 370-382. 10.1016/j.celrep.2014.12.042.

Franke, H., Grosche, J., Schadlich, H., Krugel, U., Allgaier, C., and Illes, P. (2001). P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108, 421-429. 10.1016/s0306-4522(01)00416-x.

Franklin, K.M., Asatryan, L., Jakowec, M.W., Trudell, J.R., Bell, R.L., and Davies, D.L. (2014). P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Front Neurosci* 8, 176. 10.3389/fnins.2014.00176.

Franklin, K.M., Hauser, S.R., Lasek, A.W., Bell, R.L., and McBride, W.J. (2015). Involvement of Purinergic P2X4 Receptors in Alcohol Intake of High-Alcohol-Drinking (HAD) Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 2022-2031. 10.1111/acer.12836.

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.M. (2005). Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 63, 191-270. 10.1016/S0074-7742(05)63007-3.



- Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., et al. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat Med* *19*, 1524-1528. 10.1038/nm.3356.
- Gao, C., Yu, Q., Xu, H., Zhang, L., Liu, J., Jie, Y., Ma, W., Samways, D.S., and Li, Z. (2015). Roles of the lateral fenestration residues of the P2X(4) receptor that contribute to the channel function and the deactivation effect of ivermectin. *Purinergic Signal* *11*, 229-238. 10.1007/s11302-015-9448-5.
- George, B., Swartz, K.J., and Li, M. (2019). Hearing loss mutations alter the functional properties of human P2X2 receptor channels through distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 22862-22871. 10.1073/pnas.1912156116.
- Gerevich, Z., and Illes, P. (2004). P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal* *1*, 3-10. 10.1007/s11302-004-4740-9.
- Gerevich, Z., Zadori, Z.S., Koles, L., Kopp, L., Milius, D., Wirkner, K., Gyires, K., and Illes, P. (2007). Dual effect of acid pH on purinergic P2X3 receptors depends on the histidine 206 residue. *J Biol Chem* *282*, 33949-33957. 10.1074/jbc.M705840200.
- Gilmore, S.A., and Skinner, R.D. (1979). Intraspinal non-neuronal cellular responses to peripheral nerve injury. *Anat Rec* *194*, 369-387. 10.1002/ar.1091940305.
- Gobel, S. (1975). Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* *162*(3), 397-415.
- Gobel, S., and Falls, W.M. (1979). Anatomical observations of horseradish peroxidase-filled terminal primary axonal arborizations in layer II of the substantia gelatinosa of Rolando. *Brain Res* *175*, 335-340. 10.1016/0006-8993(79)91012-6.
- Godoy, P.A., Ramirez-Molina, O., and Fuentealba, J. (2019). Exploring the Role of P2X Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* *10*, 1330. 10.3389/fphar.2019.01330.
- Gofman, L., Cenna, J.M., and Potula, R. (2014). P2X4 receptor regulates alcohol-induced responses in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* *9*, 668-678. 10.1007/s11481-014-9559-8.
- Graham, B.A., Brichta, A.M., and Callister, R.J. (2007). Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol* *98*, 1057-1063. 10.1152/jn.00581.2007.
- Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* *540*, 189-207. 10.1113/jphysiol.2001.012890.

Gu, N., Eyo, U.B., Murugan, M., Peng, J., Matta, S., Dong, H., and Wu, L.J. (2016). Microglial P2Y₁₂ receptors regulate microglial activation and surveillance during neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 55, 82-92. 10.1016/j.bbi.2015.11.007.

Guan, Z., Kuhn, J.A., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Guan, A.K., Evans-Reinsch, Z., Braz, J., Devor, M., et al. (2016). Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat Neurosci* 19, 94-101. 10.1038/nn.4189.

Guneykaya, D., Ivanov, A., Hernandez, D.P., Haage, V., Wojtas, B., Meyer, N., Maricos, M., Jordan, P., Buonfiglioli, A., Gielniewski, B., et al. (2018). Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep* 24, 2773-2783 e2776. 10.1016/j.celrep.2018.08.001.

Guzman, S.J., and Gerevich, Z. (2016). P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* 2016, 1207393. 10.1155/2016/1207393.

Gwak, Y.S., and Hulsebosch, C.E. (2011). GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* 60, 799-808. 10.1016/j.neuropharm.2010.12.030.

H

Haber, L.H., Moore, B.D., and Willis, W.D. (1982). Electrophysiological response properties of spinoreticular neurons in the monkey. *J Comp Neurol* 207, 75-84. 10.1002/cne.902070107.

Hachisuka, J., Omori, Y., Chiang, M.C., Gold, M.S., Koerber, H.R., and Ross, S.E. (2018). Wind-up in lamina I spinoparabrachial neurons: a role for reverberatory circuits. *Pain* 159, 1484-1493. 10.1097/j.pain.0000000000001229.

Hanani, M., Blum, E., Liu, S., Peng, L., and Liang, S. (2014). Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. *J Cell Mol Med* 18, 2367-2371. 10.1111/jcmm.12406.

Hanani, M., and Spray, D.C. (2020). Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 21, 485-498. 10.1038/s41583-020-0333-z.

Handwerker, H.O., and Kobal, G. (1993). Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 73, 639-671. 10.1152/physrev.1993.73.3.639.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., and Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88. 10.1016/0304-3959(88)90026-7.

Harvey, R.J., Depner, U.B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O.M., et al. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE₂-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887. 10.1126/science.1094925.

Hattori, M., and Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207-212. 10.1038/nature11010.

Heinke, B., Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Wunderbaldinger, G., and Sandkuhler, J. (2004). Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560, 249-266. 10.1113/jphysiol.2004.070540.

Hernandez, S., Casanovas, A., Piedrafita, L., Tarabal, O., and Esquerda, J.E. (2010). Neurotoxic species of misfolded SOD1G93A recognized by antibodies against the P2X4 subunit of the ATP receptor accumulate in damaged neurons of transgenic animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 176-187. 10.1097/NEN.0b013e3181cd3e33.

Hildebrand, M.E., Xu, J., Dedek, A., Li, Y., Sengar, A.S., Beggs, S., Lombroso, P.J., and Salter, M.W. (2016). Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing. *Cell Rep* 17, 2753-2765. 10.1016/j.celrep.2016.11.024.

Holtman, I.R., Skola, D., and Glass, C.K. (2017). Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J Clin Invest* 127, 3220-3229. 10.1172/JCI90604.

Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145, 494-504. 10.1113/jphysiol.1959.sp006157.

Housley, G.D., Luo, L., and Ryan, A.F. (1998). Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 393, 403-414.

Huang, Y.A., Stone, L.M., Pereira, E., Yang, R., Kinnamon, J.C., Dvoryanchikov, G., Chaudhari, N., Finger, T.E., Kinnamon, S.C., and Roper, S.D. (2011). Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds. *J Neurosci* 31, 13654-13661. 10.1523/JNEUROSCI.3356-11.2011.

Illes, P., Khan, T.M., and Rubini, P. (2017). Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J Neurosci* 37, 7049-7062. 10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017.

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 106, 518-526. 10.1007/s00401-003-0766-2.

Inoue, K. (2019). Role of the P2X4 receptor in neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 47, 33-39. 10.1016/j.coph.2019.02.001.

Inoue, K., and Tsuda, M. (2018). Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* 19, 138-152. 10.1038/nrn.2018.2.

Ito, K., Chihara, Y., Iwasaki, S., Komuta, Y., Sugawara, M., and Sahara, Y. (2010). Functional ligand-gated purinergic receptors (P2X) in rat vestibular ganglion neurons. *Hear Res* 267, 89-95. 10.1016/j.heares.2010.03.081.

J

Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H.W., Zemkova, H., and Stojilkovic, S.S. (2008). Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch* 456, 939-950. 10.1007/s00424-008-0450-4.

Ji, R.R., Xu, Z.Z., and Gao, Y.J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 13, 533-548. 10.1038/nrd4334.

Jiang, L.H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., and North, R.A. (2001). Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J Biol Chem* 276, 14902-14908. 10.1074/jbc.M011327200.

Jiang, L.H., Rassendren, F., Surprenant, A., and North, R.A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275, 34190-34196. 10.1074/jbc.M005481200.

Jiang, R., Taly, A., Lemoine, D., Martz, A., Cunrath, O., and Grutter, T. (2012). Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J* 31, 2134-2143. 10.1038/emboj.2012.75.

Jimenez-Mateos, E.M., Smith, J., Nicke, A., and Engel, T. (2019). Regulation of P2X7 receptor expression and function in the brain. *Brain Res Bull* 151, 153-163. 10.1016/j.brainresbull.2018.12.008.

Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., and Ji, R.R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 4017-4022.

Jo, Y.H., Donier, E., Martinez, A., Garret, M., Toulme, E., and Boue-Grabot, E. (2011). Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem* 286, 19993-20004. 10.1074/jbc.M111.231324.

Jo, Y.H., and Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2, 241-245. 10.1038/6344.

Joers, V., Tansey, M.G., Mulas, G., and Carta, A.R. (2017). Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol* 155, 57-75. 10.1016/j.pneurobio.2016.04.006.

Jones, N.G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., and McMahon, S.B. (2004). Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 24, 10974-10979. 10.1523/JNEUROSCI.2619-04.2004.

Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210. 10.1038/35093019.

K

Kaczmarek-Hajek, K., Lorinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 8, 375-417. 10.1007/s11302-012-9314-7.

Kandel, E.S., J; Jessell, T; Siegelbaum, S; Hudspeth, A. (2013). *Principles of neural science* (McGraw-Hill).

Kaneko, M., and Hammond, D.L. (1997). Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 928-938.

Kang, T.C., An, S.J., Park, S.K., Hwang, I.K., and Won, M.H. (2003). P2X2 and P2X4 receptor expression is regulated by a GABA(A) receptor-mediated mechanism in the gerbil hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 116, 168-175. 10.1016/s0169-328x(03)00260-2.

Kato, Y., Hiasa, M., Ichikawa, R., Hasuzawa, N., Kadowaki, A., Iwatsuki, K., Shima, K., Endo, Y., Kitahara, Y., Inoue, T., et al. (2017). Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6297-E6305. 10.1073/pnas.1704847114.

Kawano, A., Tsukimoto, M., Mori, D., Noguchi, T., Harada, H., Takenouchi, T., Kitani, H., and Kojima, S. (2012a). Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 420, 102-107. 10.1016/j.bbrc.2012.02.122.

Kawano, A., Tsukimoto, M., Noguchi, T., Hotta, N., Harada, H., Takenouchi, T., Kitani, H., and Kojima, S. (2012b). Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 374-380. 10.1016/j.bbrc.2012.01.156.

Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.K., and Ji, R.R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 28, 5189-5194. 10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008.

Kawate, T. (2017). P2X Receptor Activation. *Adv Exp Med Biol* 1051, 55-69. 10.1007/5584_2017_55.

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592-598. 10.1038/nature08198.

Kawate, T., Robertson, J.L., Li, M., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2011). Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J Gen Physiol* 137, 579-590. 10.1085/jgp.201010593.

- Keller, A.F., Beggs, S., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2007). Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 3, 27. 10.1186/1744-8069-3-27.
- Kennedy, C. (2015). ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 191, 2-15. 10.1016/j.autneu.2015.04.004.
- Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532. 10.1038/nature04886.
- Khakh, B.S., and North, R.A. (2012). Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76, 51-69. 10.1016/j.neuron.2012.09.024.
- Khakh, B.S., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci* 19, 7289-7299.
- Khasabov, S.G., Cain, D.M., Thong, D., Mantyh, P.W., and Simone, D.A. (2001). Enhanced responses of spinal dorsal horn neurons to heat and cold stimuli following mild freeze injury to the skin. *J Neurophysiol* 86, 986-996. 10.1152/jn.2001.86.2.986.
- Khoja, S., Asatryan, L., Jakowec, M.W., and Davies, D.L. (2019). Dopamine Receptor Blockade Attenuates Purinergic P2X4 Receptor-Mediated Prepulse Inhibition Deficits and Underlying Molecular Mechanisms. *Front Cell Neurosci* 13, 331. 10.3389/fncel.2019.00331.
- Khoja, S., Shah, V., Garcia, D., Asatryan, L., Jakowec, M.W., and Davies, D.L. (2016). Role of purinergic P2X4 receptors in regulating striatal dopamine homeostasis and dependent behaviors. *J Neurochem* 139, 134-148. 10.1111/jnc.13734.
- Kim, H., Kajikawa, T., Walsh, M.C., Takegahara, N., Jeong, Y.H., Hajishengallis, G., and Choi, Y. (2018). The purinergic receptor P2X5 contributes to bone loss in experimental periodontitis. *BMB Rep* 51, 468-473.
- Kim, H., Walsh, M.C., Takegahara, N., Middleton, S.A., Shin, H.I., Kim, J., and Choi, Y. (2017). The purinergic receptor P2X5 regulates inflammasome activity and hyper-multinucleation of murine osteoclasts. *Sci Rep* 7, 196. 10.1038/s41598-017-00139-2.
- Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20, 6347-6358. 10.1093/emboj/20.22.6347.
- Kim, Y.S., Anderson, M., Park, K., Zheng, Q., Agarwal, A., Gong, C., Saijilafu, Young, L., He, S., LaVinka, P.C., et al. (2016). Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain. *Neuron* 91, 1085-1096. 10.1016/j.neuron.2016.07.044.
- Kimpel, M.W., Strother, W.N., McClintick, J.N., Carr, L.G., Liang, T., Edenberg, H.J., and McBride, W.J. (2007). Functional gene expression differences between inbred alcohol-preferring and -non-preferring rats in five brain regions. *Alcohol* 41, 95-132. 10.1016/j.alcohol.2007.03.003.

Kobayashi, H., Yokoyama, M., Matsuoka, Y., Omori, M., Itano, Y., Kaku, R., Morita, K., and Ichikawa, H. (2008). Expression changes of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in selective spinal nerve ligation model and complete Freund's adjuvant model. *Brain Res* 1206, 13-19. 10.1016/j.brainres.2007.12.004.

Kobayashi, K., Yamanaka, H., and Noguchi, K. (2013). Expression of ATP receptors in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Anat Sci Int* 88, 10-16. 10.1007/s12565-012-0163-9.

Kohno, K., Kitano, J., Kohro, Y., Tozaki-Saitoh, H., Inoue, K., and Tsuda, M. (2018). Temporal Kinetics of Microgliosis in the Spinal Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury in Rodents. *Biol Pharm Bull* 41, 1096-1102. 10.1248/bpb.b18-00278.

Kowalski, M., Hausmann, R., Dopychai, A., Grohmann, M., Franke, H., Nieber, K., Schmalzing, G., Illes, P., and Riedel, T. (2014). Conformational flexibility of the agonist binding jaw of the human P2X3 receptor is a prerequisite for channel opening. *Br J Pharmacol* 171, 5093-5112. 10.1111/bph.12830.

Krajewski, J.L. (2020). P2X3-Containing Receptors as Targets for the Treatment of Chronic Pain. *Neurotherapeutics* 17, 826-838. 10.1007/s13311-020-00934-2.

Krause, R.M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P.J., Galzi, J.L., Changeux, J.P., and Bertrand, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 53, 283-294. 10.1124/mol.53.2.283.

Krugel, U., Kittner, H., Franke, H., and Illes, P. (2003). Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. *Synapse* 47, 134-142. 10.1002/syn.10162.

Kukley, M., Barden, J.A., Steinhauser, C., and Jabs, R. (2001). Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36, 11-21. 10.1002/glia.1091.

Kushnir, R., Cherkas, P.S., and Hanani, M. (2011). Peripheral inflammation upregulates P2X receptor expression in satellite glial cells of mouse trigeminal ganglia: a calcium imaging study. *Neuropharmacology* 61, 739-746. 10.1016/j.neuropharm.2011.05.019.

Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., and Stucky, C.L. (2009). TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29, 4808-4819. 10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009.

L

Lalisse, S., Hua, J., Lenoir, M., Linck, N., Rassendren, F., and Ulmann, L. (2018). Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. *Sci Rep* 8, 964. 10.1038/s41598-018-19301-5.

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G., and Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 12, e1001747. 10.1371/journal.pbio.1001747.

- Lalo, U., Palygin, O., Verkhatsky, A., Grant, S.G., and Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci Rep* 6, 33609. 10.1038/srep33609.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., and Verkhatsky, A. (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28, 5473-5480. 10.1523/JNEUROSCI.1149-08.2008.
- Lalo, U., Verkhatsky, A., and Pankratov, Y. (2007). Ivermectin potentiates ATP-induced ion currents in cortical neurones: evidence for functional expression of P2X4 receptors? *Neurosci Lett* 421, 158-162. 10.1016/j.neulet.2007.03.078.
- Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P., and Nagy, F. (2004). Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 468, 380-394. 10.1002/cne.10988.
- Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10, 895-926. 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- Lawson, S.N., Crepps, B.A., and Perl, E.R. (1997). Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J Physiol* 505 (Pt 1), 177-191. 10.1111/j.1469-7793.1997.00177.x.
- Le, K.T., Boue-Grabot, E., Archambault, V., and Seguela, P. (1999). Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem* 274, 15415-15419. 10.1074/jbc.274.22.15415.
- Le, K.T., Villeneuve, P., Ramjaun, A.R., McPherson, P.S., Beaudet, A., and Seguela, P. (1998). Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83, 177-190. 10.1016/s0306-4522(97)00365-5.
- Lee, K.Y., and Prescott, S.A. (2015). Chloride dysregulation and inhibitory receptor blockade yield equivalent disinhibition of spinal neurons yet are differentially reversed by carbonic anhydrase blockade. *Pain* 156, 2431-2437. 10.1097/j.pain.0000000000000301.
- Lever, I.J., Bradbury, E.J., Cunningham, J.R., Adelson, D.W., Jones, M.G., McMahon, S.B., Marvizon, J.C., and Malsangio, M. (2001). Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci* 21, 4469-4477.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435. 10.1038/377432a0.
- Li, F., Wang, L., Li, J.W., Gong, M., He, L., Feng, R., Dai, Z., and Li, S.Q. (2011). Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* 12, 111. 10.1186/1471-2202-12-111.
- Li, M., Chang, T.H., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2008). Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11, 883-887. 10.1038/nn.2151.

- Li, Z., Migita, K., Samways, D.S., Voigt, M.M., and Egan, T.M. (2004). Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci* 24, 7378-7386. 10.1523/JNEUROSCI.1423-04.2004.
- Lima, L.V., DeSantana, J.M., Rasmussen, L.A., and Sluka, K.A. (2017). Short-duration physical activity prevents the development of activity-induced hyperalgesia through opioid and serotonergic mechanisms. *Pain* 158, 1697-1710. 10.1097/j.pain.0000000000000967.
- Littlewood, N.K., Todd, A.J., Spike, R.C., Watt, C., and Shehab, S.A. (1995). The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience* 66, 597-608. 10.1016/0306-4522(95)00039-I.
- Liu, C., Zhang, Y., Liu, Q., Jiang, L., Li, M., Wang, S., Long, T., He, W., Kong, X., Qin, G., et al. (2018). P2X4-receptor participates in EAAT3 regulation via BDNF-TrkB signaling in a model of trigeminal allodynia. *Mol Pain* 14, 1744806918795930. 10.1177/1744806918795930.
- Liu, J., and Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol* 8, 1005. 10.3389/fimmu.2017.01005.
- Liu, X., Surprenant, A., Mao, H.J., Roger, S., Xia, R., Bradley, H., and Jiang, L.H. (2008). Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol* 73, 252-259. 10.1124/mol.107.039651.
- Liu, Y.J., Chen, J., Li, X., Zhou, X., Hu, Y.M., Chu, S.F., Peng, Y., and Chen, N.H. (2019). Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther* 25, 899-910. 10.1111/cns.13190.
- Lolignier, S., Eijkelkamp, N., and Wood, J.N. (2015). Mechanical allodynia. *Pflugers Arch* 467, 133-139. 10.1007/s00424-014-1532-0.
- Lorinczi, E., Bhargava, Y., Marino, S.F., Taly, A., Kaczmarek-Hajek, K., Barrantes-Freer, A., Dutertre, S., Grutter, T., Rettinger, J., and Nicke, A. (2012). Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11396-11401. 10.1073/pnas.1118759109.
- Lu, W.H., Wang, C.Y., Chen, P.S., Wang, J.W., Chuang, D.M., Yang, C.S., and Tzeng, S.F. (2013). Valproic acid attenuates microgliosis in injured spinal cord and purinergic P2X4 receptor expression in activated microglia. *J Neurosci Res* 91, 694-705. 10.1002/jnr.23200.
- Lu, W.Y., Xiong, Z.G., Lei, S., Orser, B.A., Dudek, E., Browning, M.D., and MacDonald, J.F. (1999). G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2, 331-338. 10.1038/7243.
- Lu, Y., and Perl, E.R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25, 3900-3907. 10.1523/JNEUROSCI.0102-05.2005.

Luo, J., Yin, G.F., Gu, Y.Z., Liu, Y., Dai, J.P., Li, C., and Li, Z.W. (2006). Characterization of three types of ATP-activated current in relation to P2X subunits in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* 1115, 9-15. 10.1016/j.brainres.2006.07.084.

Luo, X., Fitzsimmons, B., Mohan, A., Zhang, L., Terrando, N., Kordasiewicz, H., and Ji, R.R. (2018). Intrathecal administration of antisense oligonucleotide against p38alpha but not p38beta MAP kinase isoform reduces neuropathic and postoperative pain and TLR4-induced pain in male mice. *Brain Behav Immun* 72, 34-44. 10.1016/j.bbi.2017.11.007.



Mapplebeck, J.C.S., Dalgarno, R., Tu, Y., Moriarty, O., Beggs, S., Kwok, C.H.T., Haliievski, K., Assi, S., Mogil, J.S., Trang, T., and Salter, M.W. (2018). Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain* 159, 1752-1763. 10.1097/j.pain.0000000000001265.

Mapplebeck, J.C.S., Lorenzo, L.E., Lee, K.Y., Gauthier, C., Muley, M.M., De Koninck, Y., Prescott, S.A., and Salter, M.W. (2019). Chloride Dysregulation through Downregulation of KCC2 Mediates Neuropathic Pain in Both Sexes. *Cell Rep* 28, 590-596 e594. 10.1016/j.celrep.2019.06.059.

Marinelli, S., Vaughan, C.W., Schnell, S.A., Wessendorf, M.W., and Christie, M.J. (2002). Rostral ventromedial medulla neurons that project to the spinal cord express multiple opioid receptor phenotypes. *J Neurosci* 22, 10847-10855.

Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., and Nicke, A. (2009). Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *Eur Biophys J* 38, 329-338. 10.1007/s00249-008-0325-9.

Masuda, T., Iwamoto, S., Yoshinaga, R., Tozaki-Saitoh, H., Nishiyama, A., Mak, T.W., Tamura, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2014). Transcription factor IRF5 drives P2X4R+-reactive microglia gating neuropathic pain. *Nat Commun* 5, 3771. 10.1038/ncomms4771.

Masuda, T., Ozono, Y., Mikuriya, S., Kohro, Y., Tozaki-Saitoh, H., Iwatsuki, K., Uneyama, H., Ichikawa, R., Salter, M.W., Tsuda, M., and Inoue, K. (2016). Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun* 7, 12529. 10.1038/ncomms12529.

Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., and Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep* 30, 1271-1281. 10.1016/j.celrep.2020.01.010.

Masuda, T., Tsuda, M., Yoshinaga, R., Tozaki-Saitoh, H., Ozato, K., Tamura, T., and Inoue, K. (2012). IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. *Cell Rep* 1, 334-340. 10.1016/j.celrep.2012.02.014.

Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., Zelada Gonzalez, F., Perrin, P., et al. (2016). Microglia development

follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353, aad8670. 10.1126/science.aad8670.

Matsumura, Y., Yamashita, T., Sasaki, A., Nakata, E., Kohno, K., Masuda, T., Tozaki-Saitoh, H., Imai, T., Kuraishi, Y., Tsuda, M., and Inoue, K. (2016). A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep* 6, 32461. 10.1038/srep32461.

Maxwell, D.J., Belle, M.D., Cheunsuang, O., Stewart, A., and Morris, R. (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol* 584, 521-533. 10.1113/jphysiol.2007.140996.

McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58. 10.1038/nature719.

McLarnon, J.G., Ryu, J.K., Walker, D.G., and Choi, H.B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 1090-1097. 10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3.

Melnick, I. (2008). Morphophysiological properties of islet cells in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 446, 65-69. 10.1016/j.neulet.2008.09.027.

Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979. 10.1126/science.150.3699.971.

Mendell, L.M., and Wall, P.D. (1965). Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature* 206, 97-99. 10.1038/206097a0.

Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213, 1527-1529. 10.1126/science.7280675.

Millan, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1-164. 10.1016/s0301-0082(98)00048-3.

Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., and Sato, C. (2005). Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 998-1005. 10.1016/j.bbrc.2005.09.141.

Moehring, F., Cowie, A.M., Menzel, A.D., Weyer, A.D., Grzybowski, M., Arzua, T., Geurts, A.M., Palygin, O., and Stucky, C.L. (2018). Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *Elife* 7. 10.7554/eLife.31684.

Mogil, J.S., Breese, N.M., Witty, M.F., Ritchie, J., Rainville, M.L., Ase, A., Abbadì, N., Stucky, C.L., and Seguela, P. (2005). Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli. *J Neurosci* 25, 9893-9901. 10.1523/JNEUROSCI.2019-05.2005.

Mori, M., Heuss, C., Gahwiler, B.H., and Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 535, 115-123. 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00115.x.

Morice, A.H., Birring, S.S., Smith, J.A., McGarvey, L.P., Schelfhout, J., Martin Nguyen, A., Xu, Z.J., Wu, W.C., Muccino, D.R., and Sher, M.R. (2021). Characterization of Patients With Refractory or Unexplained Chronic Cough Participating in a Phase 2 Clinical Trial of the P2X3-Receptor Antagonist Gefapixant. *Lung* 199, 121-129. 10.1007/s00408-021-00437-7.

Morisset, V., and Nagy, F. (2000). Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 12, 3087-3095. 10.1046/j.1460-9568.2000.00188.x.

Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S., and Park, D.S. (2007). Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27, 3328-3337. 10.1523/JNEUROSCI.5321-06.2007.

Muller, C.E., and Namasivayam, V. (2021). Recommended tool compounds and drugs for blocking P2X and P2Y receptors. *Purinergic Signal* 17, 633-648. 10.1007/s11302-021-09813-7.

Mulryan, K., Gitterman, D.P., Lewis, C.J., Vial, C., Leckie, B.J., Cobb, A.L., Brown, J.E., Conley, E.C., Buell, G., Pritchard, C.A., and Evans, R.J. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403, 86-89. 10.1038/47495.

Murphy, M.P., and LeVine, H., 3rd (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 19, 311-323. 10.3233/JAD-2010-1221.

Murrell-Lagnado, R.D., and Frick, M. (2019). P2X4 and lysosome fusion. *Curr Opin Pharmacol* 47, 126-132. 10.1016/j.coph.2019.03.002.

Murthy, S.E., Loud, M.C., Daou, I., Marshall, K.L., Schwaller, F., Kuhnemund, J., Francisco, A.G., Keenan, W.T., Dubin, A.E., Lewin, G.R., and Patapoutian, A. (2018). The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci Transl Med* 10. 10.1126/scitranslmed.aat9897.

N

Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000). Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 143-151.

Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Tsuda, M., Kunifusa, E., and Inoue, K. (2006). Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53, 769-775. 10.1002/glia.20339.

Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R.A., Buell, G., and Rassendren, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273, 15177-15182. 10.1074/jbc.273.24.15177.

Ni, J., Wang, P., Zhang, J., Chen, W., and Gu, L. (2013). Silencing of the P2X(7) receptor enhances amyloid-beta phagocytosis by microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 363-369. 10.1016/j.bbrc.2013.03.079.

Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17, 3016-3028. 10.1093/emboj/17.11.3016.

Norenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plotz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., and Schaefer, M. (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167, 48-66. 10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x.

North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067. 10.1152/physrev.00015.2002.

North, R.A. (2016). P2X receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371. 10.1098/rstb.2015.0427.



Obata, K., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Mizushima, T., Katsura, H., Fukuoka, T., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2006). The effect of site and type of nerve injury on the expression of brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion and on neuropathic pain behavior. *Neuroscience* 137, 961-970. 10.1016/j.neuroscience.2005.10.015.

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55, 604-616. 10.1002/glia.20489.

Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Kanda, H., Yagi, H., and Noguchi, K. (2016). Macrophage-Colony Stimulating Factor Derived from Injured Primary Afferent Induces Proliferation of Spinal Microglia and Neuropathic Pain in Rats. *PLoS One* 11, e0153375. 10.1371/journal.pone.0153375.

Ormond, S.J., Barrera, N.P., Qureshi, O.S., Henderson, R.M., Edwardson, J.M., and Murrell-Lagnado, R.D. (2006). An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 69, 1692-1700. 10.1124/mol.105.020404.

Orr, P.M., Shank, B.C., and Black, A.C. (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Crit Care Nurs Clin North Am* 29, 407-418. 10.1016/j.cnc.2017.08.002.

Ostrovskaya, O., Asatryan, L., Wyatt, L., Popova, M., Li, K., Peoples, R.W., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2011). Ethanol is a fast channel inhibitor of P2X4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 171-179. 10.1124/jpet.110.176990.

Ozaki, T., Muramatsu, R., Sasai, M., Yamamoto, M., Kubota, Y., Fujinaka, T., Yoshimine, T., and Yamashita, T. (2016). The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep* 6, 25893. 10.1038/srep25893.



Paalme, V., Rump, A., Mado, K., Teras, M., Truumees, B., Aitai, H., Ratas, K., Bourge, M., Chiang, C.S., Ghalali, A., et al. (2019). Human Peripheral Blood Eosinophils Express High Levels of the Purinergic Receptor P2X4. *Front Immunol* 10, 2074. 10.3389/fimmu.2019.02074.

Paige, C., Maruthy, G.B., Mejia, G., Dussor, G., and Price, T. (2018). Spinal Inhibition of P2XR or p38 Signaling Disrupts Hyperalgesic Priming in Male, but not Female, Mice. *Neuroscience* 385, 133-142. 10.1016/j.neuroscience.2018.06.012.

Palygin, O., Lalo, U., Verkhatsky, A., and Pankratov, Y. (2010). Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* 48, 225-231. 10.1016/j.ceca.2010.09.004.

Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A., and Verkhatsky, A. (2009). P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 137-148. 10.1016/j.neuroscience.2008.03.076.

Peirs, C., and Seal, R.P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 354, 578-584. 10.1126/science.aaf8933.

Peng, J., Gu, N., Zhou, L., U, B.E., Murugan, M., Gan, W.B., and Wu, L.J. (2016). Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nat Commun* 7, 12029. 10.1038/ncomms12029.

Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gatekeepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep* 13, 1246-1257. 10.1016/j.celrep.2015.09.080.

Pezet, S., Cunningham, J., Patel, J., Grist, J., Gavazzi, I., Lever, I.J., and Malcangio, M. (2002a). BDNF modulates sensory neuron synaptic activity by a facilitation of GABA transmission in the dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 21, 51-62. 10.1006/mcne.2002.1166.

Pezet, S., Krzyzanowska, A., Wong, L.F., Grist, J., Mazarakis, N.D., Georgievska, B., and McMahon, S.B. (2006). Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. *Mol Ther* 13, 1101-1109. 10.1016/j.ymthe.2005.11.026.

Pezet, S., Malcangio, M., Lever, I.J., Perkinson, M.S., Thompson, S.W., Williams, R.J., and McMahon, S.B. (2002b). Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 21, 684-695. 10.1006/mcne.2002.1205.

- Pijacka, W., Moraes, D.J., Ratcliffe, L.E., Nightingale, A.K., Hart, E.C., da Silva, M.P., Machado, B.H., McBryde, F.D., Abdala, A.P., Ford, A.P., and Paton, J.F. (2016). Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* 22, 1151-1159. 10.1038/nm.4173.
- Polgar, E., Al-Khater, K.M., Shehab, S., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2008). Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci* 28, 13150-13160. 10.1523/JNEUROSCI.4053-08.2008.
- Polgar, E., Durrieux, C., Hughes, D.I., and Todd, A.J. (2013). A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One* 8, e78309. 10.1371/journal.pone.0078309.
- Polgar, E., Hughes, D.I., Riddell, J.S., Maxwell, D.J., Puskar, Z., and Todd, A.J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104, 229-239. 10.1016/s0304-3959(03)00011-3.
- Popova, M., Asatryan, L., Ostrovskaya, O., Wyatt, L.R., Li, K., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2010). A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors. *J Neurochem* 112, 307-317. 10.1111/j.1471-4159.2009.06460.x.
- Potula, R., Haorah, J., Knipe, B., Leibhart, J., Chrastil, J., Heilman, D., Dou, H., Reddy, R., Ghorpade, A., and Persidsky, Y. (2006). Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune responses in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* 168, 1335-1344. 10.2353/ajpath.2006.051181.
- Pougnnet, J.T., Compans, B., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boue-Grabot, E. (2016). P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci Rep* 6, 31836. 10.1038/srep31836.
- Pougnnet, J.T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boue-Grabot, E. (2014). ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 83, 417-430. 10.1016/j.neuron.2014.06.005.
- Prato, V., Taberner, F. J., Hockley, J. R. F., Callejo, G., Arcourt, A., Tazir, B., Hammer L., Schad, P., Heppenstall, P. A., St. John Smith, E., and Lechner, S. G. (2017). Genetic identification of mechanosensitive silent nociceptors. *Cell Rep* 21, 3102-3115. 10.1016/j.celrep.2017.11.066.
- Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32, 1071-1083. 10.1016/s0896-6273(01)00547-5.
- Priel, A., and Silberberg, S.D. (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123, 281-293. 10.1085/jgp.200308986.



- Qureshi, O.S., Paramasivam, A., Yu, J.C., and Murrell-Lagnado, R.D. (2007). Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* *120*, 3838-3849. 10.1242/jcs.010348.
- Radford, K.M., Virginio, C., Surprenant, A., North, R.A., and Kawashima, E. (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* *17*, 6529-6533.
- Radwani, H., Lopez-Gonzalez, M.J., Cattaert, D., Roca-Lapirot, O., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Eiriksdottir, E., Langel, U., Favereaux, A., Errami, M., et al. (2016). Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short- and long-term sensitization to pain. *J Physiol* *594*, 6607-6626. 10.1113/JP272725.
- Ralevic, V. (2021). History of Geoff Burnstock's research on P2 receptors. *Biochem Pharmacol* *187*, 114358. 10.1016/j.bcp.2020.114358.
- Ramon y Cajal, S. (1909-1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Cervelet, cerveau moyen, rétine, couche optique, corps strié, écorce cérébrale générale et régionale, grand sympathique.*
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., and Surprenant, A. (1997). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* *16*, 3446-3454. 10.1093/emboj/16.12.3446.
- Reddi, D., Curran, N., and Stephens, R. (2013). An introduction to pain pathways and mechanisms. *Br J Hosp Med (Lond)* *74 Suppl 12*, C188-191. 10.12968/hmed.2013.74.sup12.c188.
- Rees, H., and Roberts, M.H.T. (1993). The anterior pretectal nucleus: a proposed role in sensory processing. *Pain* *53*, 121-135. 10.1016/0304-3959(93)90072-W.
- Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., and Urban, L. (2000). Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* *4*, 247-257. 10.1053/eujp.2000.0177.
- Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U.B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., Pahl, A., Brune, K., Narumiya, S., Muller, U., and Zeilhofer, H.U. (2005). Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest* *115*, 673-679. 10.1172/JCI23618.
- Ren, W., Rubini, P., Tang, Y., Engel, T., and Illes, P. (2021). Inherent P2X7 Receptors Regulate Macrophage Functions during Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* *23*. 10.3390/ijms23010232.
- Renn, C.L., and Dorsey, S.G. (2005). The physiology and processing of pain: a review. *AACN Clin Issues* *16*, 277-290; quiz 413-275. 10.1097/00044067-200507000-00002.

Renn, C.L., Leitch, C.C., and Dorsey, S.G. (2009). In vivo evidence that truncated trkB.T1 participates in nociception. *Mol Pain* 5, 61. 10.1186/1744-8069-5-61.

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96, 414-495. 10.1002/cne.900960303.

Richler, E., Shigetomi, E., and Khakh, B.S. (2011). Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. *J Neurosci* 31, 16716-16730. 10.1523/JNEUROSCI.3362-11.2011.

Roberts, J.A., Allsopp, R.C., El Ajouz, S., Vial, C., Schmid, R., Young, M.T., and Evans, R.J. (2012). Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4663-4667. 10.1073/pnas.1201872109.

Roberts, J.A., Digby, H.R., Kara, M., El Ajouz, S., Sutcliffe, M.J., and Evans, R.J. (2008). Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J Biol Chem* 283, 20126-20136. 10.1074/jbc.M800294200.

Robinson, L.E., and Murrell-Lagnado, R.D. (2013). The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 7, 233. 10.3389/fncel.2013.00233.

Rodriguez, L., Yi, C., Chu, C., Duriez, Q., Watanabe, S., Ryu, M., Reyes, B., Asatryan, L., Boue-Grabot, E., and Davies, D. (2020). Cross-Talk between P2X and NMDA Receptors. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21197187.

Royle, S.J., Bobanovic, L.K., and Murrell-Lagnado, R.D. (2002). Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem* 277, 35378-35385. 10.1074/jbc.M204844200.

Royle, S.J., Qureshi, O.S., Bobanovic, L.K., Evans, P.R., Owen, D.J., and Murrell-Lagnado, R.D. (2005). Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci* 118, 3073-3080. 10.1242/jcs.02451.

Rubio, M.E., and Soto, F. (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21, 641-653.

Ryu, J.K., and McLarnon, J.G. (2008). Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 19, 1715-1719. 10.1097/WNR.0b013e3283179333.



Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., and Mahmoudi, J. (2015). Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract* 24, 1-10. 10.1159/000369101.

- Sadler, K.E., Moehring, F., and Stucky, C.L. (2020). Keratinocytes contribute to normal cold and heat sensation. *Elife* 9. 10.7554/eLife.58625.
- Saez-Orellana, F., Godoy, P.A., Bastidas, C.Y., Silva-Grecchi, T., Guzman, L., Aguayo, L.G., and Fuentealba, J. (2016). ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of beta-amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 100, 116-123. 10.1016/j.neuropharm.2015.04.005.
- Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11, 775-787. 10.1038/nri3086.
- Salio, C., Averill, S., Priestley, J.V., and Merighi, A. (2007). Costorage of BDNF and neuropeptides within individual dense-core vesicles in central and peripheral neurons. *Dev Neurobiol* 67, 326-338. 10.1002/dneu.20358.
- Samways, D.S., and Egan, T.M. (2007). Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol* 129, 245-256. 10.1085/jgp.200609677.
- Samways, D.S., Li, Z., and Egan, T.M. (2014). Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 6. 10.3389/fncel.2014.00006.
- Samways, D.S., Migita, K., Li, Z., and Egan, T.M. (2008). On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem* 283, 5110-5117. 10.1074/jbc.M708713200.
- Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89, 707-758. 10.1152/physrev.00025.2008.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5683-5686. 10.1073/pnas.0800141105.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E., and Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15, 333-341.
- Schneider, M., Prudic, K., Pippel, A., Klapperstuck, M., Braam, U., Muller, C.E., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2017). Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits. *Front Pharmacol* 8, 860. 10.3389/fphar.2017.00860.
- Schoenen, J. (1982). The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn. *Neuroscience* 7, 2057-2087. 10.1016/0306-4522(82)90120-8.
- Schoffnegger, D., Ruscheweyh, R., and Sandkuhler, J. (2008). Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135, 300-310. 10.1016/j.pain.2007.12.016.
- Scholz, J., and Woolf, C.J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1062-1067. 10.1038/nn942.

- Schwindt, T.T., Trujillo, C.A., Negraes, P.D., Lameu, C., and Ulrich, H. (2011). Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. *J Mol Neurosci* 44, 141-146. 10.1007/s12031-010-9417-y.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651-655. 10.1038/nature08505.
- Seguela, P., Haghghi, A., Soghomonian, J.J., and Cooper, E. (1996). A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* 16, 448-455.
- Serrie, A. (2015). [Chronic pain management: societal impact]. *Bull Acad Natl Med* 199, 555-565.
- Shepherd, A.J., Mickle, A.D., Golden, J.P., Mack, M.R., Halabi, C.M., de Kloet, A.D., Samineni, V.K., Kim, B.S., Krause, E.G., Gereau, R.W.t., and Mohapatra, D.P. (2018). Macrophage angiotensin II type 2 receptor triggers neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E8057-E8066. 10.1073/pnas.1721815115.
- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., and Torimitsu, K. (2009). Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol* 7, e1000103. 10.1371/journal.pbio.1000103.
- Shuba, M.F., and Vladimirova, I.A. (1980). Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to adenosine 5'-triphosphate and to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation. *Neuroscience* 5, 853-859. 10.1016/0306-4522(80)90154-2.
- Sikandar, S., Minett, M.S., Millet, Q., Santana-Varela, S., Lau, J., Wood, J.N., and Zhao, J. (2018). Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. *Brain* 141, 1028-1039. 10.1093/brain/awy009.
- Silberberg, M., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005). Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci* 77, 3156-3167. 10.1016/j.lfs.2005.03.033.
- Silberberg, S.D., Li, M., and Swartz, K.J. (2007). Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron* 54, 263-274. 10.1016/j.neuron.2007.03.020.
- Silva, G.D., Lopes, P.S., Fonoff, E.T., and Pagano, R.L. (2015). The spinal anti-inflammatory mechanism of motor cortex stimulation: cause of success and refractoriness in neuropathic pain? *J Neuroinflammation* 12, 10. 10.1186/s12974-014-0216-1.
- Sim, J.A., Chaumont, S., Jo, J., Ulmann, L., Young, M.T., Cho, K., Buell, G., North, R.A., and Rassendren, F. (2006). Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci* 26, 9006-9009. 10.1523/JNEUROSCI.2370-06.2006.

Sivilotti, L., and Woolf, C.J. (1994). The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72, 169-179. 10.1152/jn.1994.72.1.169.

Sluyter, R., Bartlett, R., Ly, D., and Yerbury, J.J. (2017). P2X7 receptor antagonism in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res* 12, 749-750. 10.4103/1673-5374.206643.

Smith, E.S., and Lewin, G.R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 1089-1106. 10.1007/s00359-009-0482-z.

Smith, K.M., Boyle, K.A., Madden, J.F., Dickinson, S.A., Jobling, P., Callister, R.J., Hughes, D.I., and Graham, B.A. (2015). Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J Physiol* 593, 4319-4339. 10.1113/JP270855.

Smith, K.M., Boyle, K.A., Mustapa, M., Jobling, P., Callister, R.J., Hughes, D.I., and Graham, B.A. (2016). Distinct forms of synaptic inhibition and neuromodulation regulate calretinin-positive neuron excitability in the spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 326, 10-21. 10.1016/j.neuroscience.2016.03.058.

Snider, W.D., and McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629-632. 10.1016/s0896-6273(00)81003-x.

Sorge, R.E., LaCroix-Fralish, M.L., Tuttle, A.H., Sotocinal, S.G., Austin, J.S., Ritchie, J., Chanda, M.L., Graham, A.C., Topham, L., Beggs, S., et al. (2011). Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *J Neurosci* 31, 15450-15454. 10.1523/JNEUROSCI.3859-11.2011.

Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 18, 1081-1083. 10.1038/nn.4053.

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C., and Stuhmer, W. (1996). Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 456-460. 10.1006/bbrc.1996.0915.

Spray, D.C., Iglesias, R., Shraer, N., Suadicani, S.O., Belzer, V., Hanstein, R., and Hanani, M. (2019). Gap junction mediated signaling between satellite glia and neurons in trigeminal ganglia. *Glia* 67, 791-801. 10.1002/glia.23554.

Stanchev, D., Flehmig, G., Gerevich, Z., Norenberg, W., Dihazi, H., Furst, S., Eschrich, K., Illes, P., and Wirkner, K. (2006). Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ecto-domains. *Neurosci Lett* 393, 78-83. 10.1016/j.neulet.2005.09.045.

Staniland, A.A., Clark, A.K., Wodarski, R., Sasso, O., Maione, F., D'Acquisto, F., and Malcangio, M. (2010). Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J Neurochem* 114, 1143-1157. 10.1111/j.1471-4159.2010.06837.x.

Stelmashenko, O., Compan, V., Browne, L.E., and North, R.A. (2014). Ectodomain movements of an ATP-gated ion channel (P2X2 receptor) probed by disulfide locking. *J Biol Chem* 289, 9909-9917. 10.1074/jbc.M113.542811.

Stojilkovic, S.S. (2009). Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions. *Trends Endocrinol Metab* 20, 460-468. 10.1016/j.tem.2009.05.005.

Stokes, L. (2013). Rab5 regulates internalisation of P2X4 receptors and potentiation by ivermectin. *Purinergic Signal* 9, 113-121. 10.1007/s11302-012-9336-1.

Stokes, L., Layhadi, J.A., Bibic, L., Dhuna, K., and Fountain, S.J. (2017). P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Front Pharmacol* 8, 291. 10.3389/fphar.2017.00291.

Su, C. (1981). Purinergic receptors in blood vessels. *Purinergic receptors*, 93-117.

Su, W.F., Wu, F., Jin, Z.H., Gu, Y., Chen, Y.T., Fei, Y., Chen, H., Wang, Y.X., Xing, L.Y., Zhao, Y.Y., et al. (2019). Overexpression of P2X4 receptor in Schwann cells promotes motor and sensory functional recovery and remyelination via BDNF secretion after nerve injury. *Glia* 67, 78-90. 10.1002/glia.23527.

Sufka, K.P., Donald (2002). Gate control theory reconsidered. *Brain and Mind* 3 (2):277-290.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738. 10.1126/science.272.5262.735.

Suurvali, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J., and Ruutel Boudinot, S. (2017). P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J* 40, 245-256. 10.1016/j.bj.2017.06.010.

Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278, 22664-22668. 10.1074/jbc.M302561200.



Tam, T.H., and Salter, M.W. (2021). Purinergic signalling in spinal pain processing. *Purinergic Signal* 17, 49-54. 10.1007/s11302-020-09748-5.

Tan, Y., Zhao, B., Zeng, Q.C., Shi, C.M., Zhao, F.B., and Li, Z.W. (2009). Characteristics of ATP-activated current in nodose ganglion neurons of rats. *Neurosci Lett* 459, 25-29. 10.1016/j.neulet.2009.04.054.

Taves, S., Berta, T., Liu, D.L., Gan, S., Chen, G., Kim, Y.H., Van de Ven, T., Laufer, S., and Ji, R.R. (2016). Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun* 55, 70-81. 10.1016/j.bbi.2015.10.006.

Teixeira, J.M., Dos Santos, G.G., Neves, A.F., Athie, M.C.P., Bonet, I.J.M., Nishijima, C.M., Farias, F.H., Figueiredo, J.G., Hernandez-Olmos, V., Alshaibani, S., et al. (2019). Diabetes-

induced Neuropathic Mechanical Hyperalgesia Depends on P2X4 Receptor Activation in Dorsal Root Ganglia. *Neuroscience* 398, 158-170. 10.1016/j.neuroscience.2018.12.003.

Telang, R.S., Paramanathasivam, V., Vlajkovic, S.M., Munoz, D.J., Housley, G.D., and Thorne, P.R. (2010). Reduced P2x(2) receptor-mediated regulation of endocochlear potential in the ageing mouse cochlea. *Purinergic Signal* 6, 263-272. 10.1007/s11302-010-9195-6.

Thorne, P.R., Munoz, D.J., and Housley, G.D. (2004). Purinergic modulation of cochlear partition resistance and its effect on the endocochlear potential in the Guinea pig. *J Assoc Res Otolaryngol* 5, 58-65. 10.1007/s10162-003-4003-4.

Todd, A.J. (1990). An electron microscope study of glycine-like immunoreactivity in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroscience* 39, 387-394. 10.1016/0306-4522(90)90275-9.

Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11, 823-836. 10.1038/nrn2947.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543. 10.1016/s0896-6273(00)80564-4.

Torebjork, H.E., and Hallin, R.G. (1973). Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves. *Exp Brain Res* 16, 321-332. 10.1007/BF00233334.

Torres, G.E., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274, 6653-6659. 10.1074/jbc.274.10.6653.

Torres, G.E., Haines, W.R., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1998). Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54, 989-993. 10.1124/mol.54.6.989.

Toulme, E., and Khakh, B.S. (2012). Imaging P2X4 receptor lateral mobility in microglia: regulation by calcium and p38 MAPK. *J Biol Chem* 287, 14734-14748. 10.1074/jbc.M111.329334.

Toulme, E., Soto, F., Garret, M., and Boue-Grabot, E. (2006). Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharmacol* 69, 576-587. 10.1124/mol.105.018812.

Toulme, E., Tsuda, M., Khakh, B.S., and Inoue, K. (2010). On the Role of ATP-Gated P2X Receptors in Acute, Inflammatory and Neuropathic Pain. In *Translational Pain Research: From Mouse to Man*, L. Kruger, and A.R. Light, eds.

Toyomitsu, E., Tsuda, M., Yamashita, T., Tozaki-Saitoh, H., Tanaka, Y., and Inoue, K. (2012). CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. *Purinergic Signal* 8, 301-310. 10.1007/s11302-011-9288-x.

Tozaki-Saitoh, H., Masuda, J., Kawada, R., Kojima, C., Yoneda, S., Masuda, T., Inoue, K., and Tsuda, M. (2019). Transcription factor MafB contributes to the activation of spinal microglia underlying neuropathic pain development. *Glia* 67, 729-740. 10.1002/glia.23570.

Trang, T., Beggs, S., Wan, X., and Salter, M.W. (2009). P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* 29, 3518-3528. 10.1523/JNEUROSCI.5714-08.2009.

Treede, R.D., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80, 1082-1093. 10.1152/jn.1998.80.3.1082.

Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38, 397-421. 10.1016/0301-0082(92)90027-c.

Treede, R.D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., et al. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 156, 1003-1007. 10.1097/j.pain.000000000000160.

Tsuda, M., Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009a). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain* 5, 28. 10.1186/1744-8069-5-28.

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783. 10.1038/nature01786.

Tsuda, M., Toyomitsu, E., Komatsu, T., Masuda, T., Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Yamamoto, K., Ando, J., and Inoue, K. (2008a). Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. *Glia* 56, 579-585. 10.1002/glia.20641.

Tsuda, M., Toyomitsu, E., Kometani, M., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009b). Mechanisms underlying fibronectin-induced up-regulation of P2X4R expression in microglia: distinct roles of PI3K-Akt and MEK-ERK signalling pathways. *J Cell Mol Med* 13, 3251-3259. 10.1111/j.1582-4934.2009.00719.x.

Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., Masuda, T., Toyomitsu, E., Tezuka, T., Yamamoto, T., and Inoue, K. (2008b). Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* 56, 50-58. 10.1002/glia.20591.



Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Nishigaki, M., Shibata, Y., and Shimada, S. (2002). Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110, 1185-1190. 10.1172/JCI15709.

Ulmann, L. (2014). Récepteurs purinergiques P2X et douleurs chroniques. *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement* 15, 168-173. 10.1016/j.douler.2014.07.001.

Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 11263-11268. 10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008.

Ulmann, L., Hirbec, H., and Rassendren, F. (2010). P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J* 29, 2290-2300. 10.1038/emboj.2010.126.

Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., and Rassendren, F. (2013). Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* 61, 1306-1319. 10.1002/glia.22516.



Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., and Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519. 10.1038/371516a0.

van Calker, D., Muller, M., and Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33, 999-1005. 10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x.

van Hecke, O., Torrance, N., and Smith, B.H. (2013). Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *Br J Anaesth* 111, 13-18. 10.1093/bja/aet123.

Vandenbeuch, A., Larson, E.D., Anderson, C.B., Smith, S.A., Ford, A.P., Finger, T.E., and Kinnamon, S.C. (2015). Postsynaptic P2X3-containing receptors in gustatory nerve fibres mediate responses to all taste qualities in mice. *J Physiol* 593, 1113-1125. 10.1113/jphysiol.2014.281014.

Vandewauw, I., De Clercq, K., Mulier, M., Held, K., Pinto, S., Van Ranst, N., Segal, A., Voet, T., Vennekens, R., Zimmermann, K., et al. (2018). A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 555, 662-666. 10.1038/nature26137.

Varma, R., Chai, Y., Troncoso, J., Gu, J., Xing, H., Stojilkovic, S.S., Mattson, M.P., and Haughey, N.J. (2009). Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med* 11, 63-75. 10.1007/s12017-009-8073-2.

Vazquez-Villoldo, N., Domercq, M., Martin, A., Llop, J., Gomez-Vallejo, V., and Matute, C. (2014). P2X4 receptors control the fate and survival of activated microglia. *Glia* 62, 171-184. 10.1002/glia.22596.

Verma, R., Cronin, C.G., Hudobenko, J., Venna, V.R., McCullough, L.D., and Liang, B.T. (2017). Deletion of the P2X4 receptor is neuroprotective acutely, but induces a depressive phenotype

during recovery from ischemic stroke. *Brain Behav Immun* 66, 302-312. 10.1016/j.bbi.2017.07.155.

Vial, C., and Evans, R.J. (2002). P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries. *Mol Pharmacol* 62, 1438-1445. 10.1124/mol.62.6.1438.

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C.L., and Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23, 8692-8700.

Volonte, C., Apolloni, S., Parisi, C., and Amadio, S. (2016). Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 104, 180-193. 10.1016/j.neuropharm.2015.10.026.

W

Wang, F., Belanger, E., Cote, S.L., Desrosiers, P., Prescott, S.A., Cote, D.C., and De Koninck, Y. (2018a). Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold. *Cell Rep* 23, 2001-2013. 10.1016/j.celrep.2018.04.065.

Wang, J., Kawamata, M., and Namiki, A. (2005). Changes in properties of spinal dorsal horn neurons and their sensitivity to morphine after spinal cord injury in the rat. *Anesthesiology* 102, 152-164. 10.1097/00000542-200501000-00024.

Wang, J.C., Raybould, N.P., Luo, L., Ryan, A.F., Cannell, M.B., Thorne, P.R., and Housley, G.D. (2003). Noise induces up-regulation of P2X2 receptor subunit of ATP-gated ion channels in the rat cochlea. *Neuroreport* 14, 817-823. 10.1097/00001756-200305060-00008.

Wang, L., Feng, X., Hu, B., Xia, Q., Ni, X., and Song, Y. (2018b). P2X4R promotes airway remodeling by acting on the phenotype switching of bronchial smooth muscle cells in rats. *Purinergic Signal* 14, 433-442. 10.1007/s11302-018-9625-4.

Werner, S., Mesch, S., Hillig, R.C., Ter Laak, A., Klint, J., Neagoe, I., Laux-Biehlmann, A., Dahllof, H., Brauer, N., Puetter, V., et al. (2019). Discovery and Characterization of the Potent and Selective P2X4 Inhibitor N-[4-(3-Chlorophenoxy)-3-sulfamoylphenyl]-2-phenylacetamide (BAY-1797) and Structure-Guided Amelioration of Its CYP3A4 Induction Profile. *J Med Chem* 62, 11194-11217. 10.1021/acs.jmedchem.9b01304.

Wheeler-Schilling, T.H., Marquardt, K., Kohler, K., Guenther, E., and Jabs, R. (2001). Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res* 92, 177-180. 10.1016/s0169-328x(01)00160-7.

White, F.A., Sun, J., Waters, S.M., Ma, C., Ren, D., Ripsch, M., Steflik, J., Cortright, D.N., Lamotte, R.H., and Miller, R.J. (2005). Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14092-14097. 10.1073/pnas.0503496102.

- Whitehorn, D., and Burgess, P.R. (1973). Changes in polarization of central branches of myelinated mechanoreceptor and nociceptor fibers during noxious and innocuous stimulation of the skin. *J Neurophysiol* *36*, 226-237. 10.1152/jn.1973.36.2.226.
- Wildman, S.S., Brown, S.G., Rahman, M., Noel, C.A., Churchill, L., Burnstock, G., Unwin, R.J., and King, B.F. (2002). Sensitization by extracellular Ca²⁺ of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol Pharmacol* *62*, 957-966. 10.1124/mol.62.4.957.
- Wildman, S.S., King, B.F., and Burnstock, G. (1998). Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol* *123*, 1214-1220. 10.1038/sj.bjp.0701717.
- Wildman, S.S., King, B.F., and Burnstock, G. (1999a). Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. *Br J Pharmacol* *126*, 762-768. 10.1038/sj.bjp.0702325.
- Wildman, S.S., King, B.F., and Burnstock, G. (1999b). Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. *Br J Pharmacol* *128*, 486-492. 10.1038/sj.bjp.0702802.
- Wilkinson, W.J., Jiang, L.H., Surprenant, A., and North, R.A. (2006). Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol* *70*, 1159-1163. 10.1124/mol.106.026658.
- Williams, L.S., Jones, W.J., Shen, J., Robinson, R.L., Weinberger, M., and Kroenke, K. (2003). Prevalence and impact of depression and pain in neurology outpatients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *74*, 1587-1589. 10.1136/jnnp.74.11.1587.
- Willis, W.D., and Westlund, K.N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* *14*, 2-31. 10.1097/00004691-199701000-00002.
- Woodbury, C.J., Kullmann, F.A., McIlwrath, S.L., and Koerber, H.R. (2008). Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* *508*, 500-509. 10.1002/cne.21693.
- Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* *288*, 1765-1769. 10.1126/science.288.5472.1765.
- Wyatt, L.R., Finn, D.A., Khoja, S., Yardley, M.M., Asatryan, L., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2014). Contribution of P2X4 receptors to ethanol intake in male C57BL/6 mice. *Neurochem Res* *39*, 1127-1139. 10.1007/s11064-014-1271-9.

X

Xiao, C., Zhou, C., Li, K., Davies, D.L., and Ye, J.H. (2008). Purinergic type 2 receptors at GABAergic synapses on ventral tegmental area dopamine neurons are targets for ethanol action. *J Pharmacol Exp Ther* 327, 196-205. 10.1124/jpet.108.139766.

Xie, R.G., Gao, Y.J., Park, C.K., Lu, N., Luo, C., Wang, W.T., Wu, S.X., and Ji, R.R. (2018). Spinal CCL2 Promotes Central Sensitization, Long-Term Potentiation, and Inflammatory Pain via CCR2: Further Insights into Molecular, Synaptic, and Cellular Mechanisms. *Neurosci Bull* 34, 13-21. 10.1007/s12264-017-0106-5.

Xiong, K., Stewart, R.R., Weight, F.F., and Li, C. (2004). Role of extracellular histidines in antagonist sensitivity of the rat P2X4 receptor. *Neurosci Lett* 367, 197-200. 10.1016/j.neulet.2004.06.008.

Xu, J., Bernstein, A.M., Wong, A., Lu, X.H., Khoja, S., Yang, X.W., Davies, D.L., Micevych, P., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2016). P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J Neurosci* 36, 8902-8920. 10.1523/JNEUROSCI.1496-16.2016.

Xu, J., Chai, H., Ehinger, K., Egan, T.M., Srinivasan, R., Frick, M., and Khakh, B.S. (2014). Imaging P2X4 receptor subcellular distribution, trafficking, and regulation using P2X4-pHluorin. *J Gen Physiol* 144, 81-104. 10.1085/jgp.201411169.

Xue, M., Sun, Y.L., Xia, Y.Y., Huang, Z.H., Huang, C., and Xing, G.G. (2020). Electroacupuncture Modulates Spinal BDNF/TrkappaB Signaling Pathway and Ameliorates the Sensitization of Dorsal Horn WDR Neurons in Spared Nerve Injury Rats. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21186524.

Y

Yam, M.F., Loh, Y.C., Tan, C.S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., and Basir, R. (2018). General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *Int J Mol Sci* 19. 10.3390/ijms19082164.

Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A.C., Loh, T.L., Du, L., et al. (2013). Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2228-2233. 10.1073/pnas.1222285110.

Yardley, M.M., Wyatt, L., Khoja, S., Asatryan, L., Ramaker, M.J., Finn, D.A., Alkana, R.L., Huynh, N., Louie, S.G., Petasis, N.A., et al. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology* 63, 190-201. 10.1016/j.neuropharm.2012.03.014.

Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed

by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475-488. 10.1016/j.pain.2010.08.008.

Ying, M., Liu, H., Zhang, T., Jiang, C., Gong, Y., Wu, B., Zou, L., Yi, Z., Rao, S., Li, G., et al. (2017). Effect of artemisinin on neuropathic pain mediated by P2X4 receptor in dorsal root ganglia. *Neurochem Int* 108, 27-33. 10.1016/j.neuint.2017.02.004.

Yu, X., Liu, H., Hamel, K.A., Morvan, M.G., Yu, S., Leff, J., Guan, Z., Braz, J.M., and Basbaum, A.I. (2020). Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun* 11, 264. 10.1038/s41467-019-13839-2.

Yuan, H., Ouyang, S., Yang, R., Li, S., Gong, Y., Zou, L., Jia, T., Zhao, S., Wu, B., Yi, Z., et al. (2018). Osthole alleviated diabetic neuropathic pain mediated by the P2X4 receptor in dorsal root ganglia. *Brain Res Bull* 142, 289-296. 10.1016/j.brainresbull.2018.08.008.

Z

Zabala, A., Vazquez-Villoldo, N., Rissiek, B., Gejo, J., Martin, A., Palomino, A., Perez-Samartin, A., Pulagam, K.R., Lukowiak, M., Capetillo-Zarate, E., et al. (2018). P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO Mol Med* 10. 10.15252/emmm.201708743.

Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yevenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92, 193-235. 10.1152/physrev.00043.2010.

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lonnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Haring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999-1014 e1022. 10.1016/j.cell.2018.06.021.

Zemkova, H., Balik, A., Jiang, Y., Kretschmannova, K., and Stojilkovic, S.S. (2006). Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol* 20, 1423-1436. 10.1210/me.2005-0508.

Zhang, J., and De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 97, 772-783. 10.1111/j.1471-4159.2006.03746.x.

Zhang, J., Shi, X.Q., Echeverry, S., Mogil, J.S., De Koninck, Y., and Rivest, S. (2007a). Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* 27, 12396-12406. 10.1523/JNEUROSCI.3016-07.2007.

Zhang, W., Liu, L.Y., and Xu, T.L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152, 502-510. 10.1016/j.neuroscience.2007.12.037.

Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X.S., and Duan, S. (2007b). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9, 945-953. 10.1038/ncb1620.

Zhao, J., Seereeram, A., Nassar, M.A., Levato, A., Pezet, S., Hathaway, G., Morenilla-Palao, C., Stirling, C., Fitzgerald, M., McMahon, S.B., et al. (2006). Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci* 31, 539-548. 10.1016/j.mcn.2005.11.008.

Zhao, Q., Yang, M., Ting, A.T., and Logothetis, D.E. (2007). PIP(2) regulates the ionic current of P2X receptors and P2X(7) receptor-mediated cell death. *Channels (Austin)* 1, 46-55.

Zhao, S., Zhou, Y., Fan, Y., Gong, Y., Yang, J., Yang, R., Li, L., Zou, L., Xu, X., Li, G., et al. (2019). Involvement of purinergic 2X4 receptor in glycoprotein 120-induced pyroptosis in dorsal root ganglia. *J Neurochem* 151, 584-594. 10.1111/jnc.14850.

Zimmermann, H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch* 452, 573-588. 10.1007/s00424-006-0067-4.

Titre : Implication du récepteur purinergique p2x4 microglial et neuronal dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires

Résumé : En condition physiologique, le récepteur P2X4 (P2X4) est constitutivement internalisé mais une augmentation de son trafic à la surface dans les neurones et/ou la glie a été observée dans diverses pathologies telle que la douleur chronique. Ceci suggère que les récepteurs P2X4 neuronaux et gliaux peuvent contribuer à des mécanismes distincts de pathogenèse. P2X4 joue un rôle clé dans la transduction sensorielle physiologique et pathologique. Il a été démontré que des altérations de la signalisation purinergique sont impliquées dans la douleur chronique avec un rôle clé pour les récepteurs P2X4 microgliaux dans la douleur neuropathique, mais pas dans la douleur inflammatoire. L'expression de P2X4 a également été rapportée dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale au cours de conditions inflammatoires et neuropathiques ainsi que dans les cellules gliales satellites qui peuvent contribuer aux deux types de douleur. Par conséquent, l'implication neuronale vs gliale de P2X4 dans les douleurs neuropathiques et inflammatoires reste à être élucidé et en particulier son rôle à la surface, ainsi que le dimorphisme sexuel. Dans ce contexte, nous avons développé et utilisé de nouveaux modèles de souris transgéniques dans lesquels P2X4 est augmenté à la surface soit dans toutes les cellules exprimant nativement P2X4 (souris P2X4 KI), soit dans des populations cellulaires spécifiques. Nous avons d'abord montré que P2X4 à la surface des microglies est suffisant pour augmenter les sensibilités mécaniques et thermiques et la transmission nociceptive à l'état basal, chez les souris mâles et femelles. Nous avons ensuite montré que P2X4 à la surface des microglies était nécessaire au développement et au maintien de la douleur neuropathique. Concernant la douleur inflammatoire, nos résultats indiquent que P2X4 à la surface des macrophages, mais pas des neurones et des microglies contribuent à son développement mais n'ont aucun effet sur son maintien. En conclusion, le développement de ces nouveaux modèles de souris transgéniques nous a permis de démêler l'implication complexe de P2X4 dans la douleur neuropathique et inflammatoire, chez les souris mâles et femelles.

Mots clés : douleur, purinergique, neuropathie, inflammation, microglie, macrophages

Title: Implication of neuronal versus glial purinergic receptor P2X4 in chronic neuropathic and inflammatory pain

Abstract: In physiological conditions, P2X4 receptor (P2X4) is constitutively internalized but upregulation of surface P2X4 in neurons and/or glia has been observed in various pathophysiological contexts such as chronic pain. This is suggesting that neuronal and glial P2X4 may contribute to distinct mechanisms of pathogenesis. P2X4 is playing a key role in the physiological and pathological sensory transduction. Alterations of the purinergic signaling have been shown to be involved in chronic pain syndromes with a pivotal role for microglial P2X4 in neuropathic pain models but not in inflammatory pain models. P2X4 expression was also reported in dorsal root ganglia sensory neurons during neuropathic and chronic inflammatory conditions as well as in satellite glial cells that may contribute to both types of pain. Therefore, the neuronal vs. glial implication of P2X4 in neuropathic and inflammatory pain still needs to be unraveled and especially its role at the cell-surface level, as well as sexual dimorphism. In this context, we developed and used novel transgenic mice model in which P2X4 is increased at the cell surface level either in all cells expressing natively P2X4 (P2X4 KI mice) or in specific cell populations. First, we showed that higher surface microglial P2X4 is sufficient to increase mechanical and thermal sensitivities and the nociceptive transmission in basal state, in both male and female. We then showed that microglial P2X4 was necessary for the development and the maintenance of the chronic neuropathic pain. Regarding inflammatory pain, our results indicated that macrophages P2X4 but not neuronal and microglial P2X4 contribute to its development but have no effect in its maintenance. In conclusion, the development of these novel cell-specific transgenic mouse models allowed us to unravel the complex implication of P2X4 in neuropathic and inflammatory pain, in both male and female.

Keywords : pain, purinergic, neuropathy, inflammation, microglia, macrophages

Unité de recherche

Institut des Maladies Neurodégénératives,
CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine,
146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France