



**HAL**  
open science

# Implication de la lysophosphatidylcholine et des canaux ASIC3 dans le développement de douleurs articulaires chroniques

Bonnie Labrum

► **To cite this version:**

Bonnie Labrum. Implication de la lysophosphatidylcholine et des canaux ASIC3 dans le développement de douleurs articulaires chroniques. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6008 . tel-03669054

**HAL Id: tel-03669054**

**<https://theses.hal.science/tel-03669054>**

Submitted on 16 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 DE DOCTORAT

Implication de la lysophosphatidylcholine et  
des canaux ASIC3 dans le développement de  
douleurs articulaires chroniques

**Bonnie LABRUM**

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR7275

**Présentée en vue de l'obtention du grade de :**

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
**d'Université Côte d'Azur**

*Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires*

**Dirigée par le** Dr Emmanuel Deval

**Soutenu le** vendredi 11 février 2022

**Devant le jury, composé de :**

Ingrid BETHUS  
MCU - *Université Côte d'Azur*

Patrick BOIS  
PU - *Université de Poitiers*

Emmanuel BOURINET  
DR CNRS - *Université de Montpellier*

Emmanuel DEVAL  
DR CNRS, *Université Côte d'Azur*

Examinatrice

Rapporteur

Rapporteur/Président  
du jury

Directeur de thèse



## RESUME

La douleur est l'une des premières causes de consultation médicale. Une partie importante de la population souffre de douleurs articulaires chroniques et sollicite des soins médicaux afin de soulager leurs douleurs. La problématique est que ces douleurs sont particulièrement réfractaires aux traitements antalgiques actuellement disponibles. Il y a donc un réel besoin de mieux comprendre la physiopathologie de ces douleurs et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients, de surcroît dans un contexte où l'abus d'opioïdes est devenu un fléau mondial.

Parmi les cibles prometteuses, les canaux ioniques sont particulièrement intéressants, car ils sont directement impliqués dans la détection et la transduction des signaux douloureux à la périphérie, dans leur transmission et leur modulation/intégration par le système nerveux central (moelle épinière et centres supraspinaux). Les canaux ioniques sensibles à l'acide (ASIC) sont apparus comme des candidats importants dans les mécanismes de la nociception. Ils sont exprimés tout au long du neuraxe de la douleur, dans le système nerveux périphérique et central, et sont connus pour être activés par l'acidification extracellulaire. Ils ont été impliqués dans différents types de douleur chez le rongeur, et semblent particulièrement importants pour le développement des douleurs chroniques d'origines musculaires et articulaires. Cependant, leurs rôles dans le(s) mécanisme(s) physiopathologique(s) des douleurs chroniques restent encore mal connus. De manière intéressante, un lipide (la lysophosphatidylcholine, LPC) présent dans les fluides synoviaux (FS) humains de patients souffrant de douleurs articulaires chroniques, a été identifié comme potentialisant fortement l'activité du canal ASIC3, entraînant un courant dépolarisant constitutif au pH physiologique de 7,4.

Au cours de mon doctorat, des analyses lipidomiques ont été réalisées en collaboration dans des FS de patients issus de deux cohortes indépendantes : 35 patients atteints d'ostéoarthrose (OA) et 50 patients atteints de différentes maladies rhumatismales, dont l'OA. Nos données montrent que les concentrations de LPC dans les FS des patients sont significativement plus élevées que chez des témoins (post-mortem). De plus, il existe une corrélation significative entre les scores de douleurs et la teneur en LPC des patients de la



première cohorte (OA). Les effets de la LPC sur le développement de douleurs chroniques a ensuite été étudié *in vivo* chez les rongeurs.

J'ai montré que deux injections intra-articulaires de LPC induisent des comportements douloureux persistants/chroniques chez les souris sauvages, sans dimorphisme sexuel. De manière intéressante, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> sont protégées de cet état de douleur chronique. De plus, la co-injection d'un inhibiteur d'ASIC3 (APETx2) avec la LPC atténue les comportements douloureux des souris sauvages. Pour conclure, mon travail de thèse établit un nouveau modèle animal de douleur articulaire chronique basé sur des observations cliniques. Il identifie la LPC comme un facteur déclenchant de la douleur articulaire chronique par le biais d'ASIC3 chez la souris, et possiblement chez l'humain.

Mots Clefs : Douleur; Lysophosphatidylcholine; ASIC3

## ABSTRACT

Pain is a main trigger for a patient to visit a physician. Those with chronic joint pain represent a large population seeking medical care and pain relief. The problematic is that analgesic treatments prescribed today are disappointing, mainly because the pathophysiology remains poorly understood. Improving patient care by discovering new triggering factors and/or therapeutical targets is a major health concern, all the more knowing today's scourge of painkiller misuses and abuses.

Among promising targets, ion channels are of particular interest, since they are directly involved in the detection and transduction of painful stimuli at the periphery, and in their transmission and modulation/integration by the central nervous system (spinal cord and supraspinal centres). Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) have emerged as important candidates in nociception mechanisms. They are expressed all along the pain neuraxis, both in the central and peripheral nervous systems, and are known to be activated by extracellular acidosis. They have been involved in different types of pain in rodent, and seem particularly important in the development of chronic pain originating from muscles and joints. However, their pathophysiological role in chronic pain mechanisms remain poorly understood. Interestingly, a lipid (i.e. lysophosphatidylcholine, LPC) found in human synovial fluids (SF) from patients suffering from chronic joint pain, has been shown to strongly potentiate ASIC3 channel activity, leading to constitutive depolarizing current at the physiological pH of 7,4.

During my PhD, lipidomic analyses have been performed in collaboration in the SF of patients from two independent cohorts: 35 patients with osteoarthritis (OA) and 50 patients with different rheumatic diseases, including OA. Our data show that the SF concentrations of LPC were significantly elevated in patients compared to postmortem controls. Moreover, there were a significant correlation between patient pain scores and the LPC content of patients from the first OA cohort. The effects of LPC on chronic pain development was then investigated *in vivo* in rodents.

I have shown that two intra-articular LPC injections produces persistent/chronic pain-like behaviours in wild-type mice, without sexual dimorphism. Interestingly, ASIC3<sup>-/-</sup> mice are protected from this LPC-induced chronic pain state. Moreover, co-injections of an ASIC3 inhibitory peptide (APETx2), together with LPC, alleviates pain-like behaviours in mice. To

conclude, my thesis work establishes a new rodent model of chronic joint pain, based on clinical observations. It identifies LPC as a triggering factor of chronic joint pain through ASIC3, at least in mice, and possibly in humans.

Keywords : *Pain; Lysophosphatidylcholine; ASIC3*

*A la mémoire de ma Marraine Florence,*

*De mon Papy,*

*Et de Grand-Nanie,*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les **Dr Emmanuel Deval** et **Éric Lingueglia** de m'avoir accueilli dans leur équipe à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, tout d'abord en stage de Master, puis en tant que thésarde.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury. Merci au **Pr Patrick Bois** et au **Dr Emmanuel Bourinet** d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs, et au **Dr Ingrid Bethus** d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je remercie aussi le **Dr Cyril Goudet** et le **Dr Olivier Soriani** d'avoir participé au déroulement de ces travaux en participant à mes comités de suivi de thèse chaque année.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le **Dr Emmanuel Deval**, d'avoir accepté de m'encadrer durant mon stage de Master 2 et mes années de doctorat. Merci de m'avoir guidé dans ce projet, pour tes idées, ta disponibilité et ta patience. Merci pour tes conseils et tes critiques qui m'ont beaucoup aidés dans la rédaction de ce manuscrit, ainsi que de m'avoir prêté main forte durant la préparation de ma soutenance.

Merci aux membres et anciens membres de l'équipe pour leur gentillesse, pour les petits moments de partages gourmands autour de la table au coin café quand il y avait encore une, les discussions aux pauses déjeuner... et d'avoir toujours eu le sourire. Merci **Anne Baron**, **Sylvie Diochot**, **Valérie Friend**, et **Miguel Salinas** pour vos conseils scientifiques et votre bienveillance. Merci **Anne** pour ces nombreuses conversations avec toi dans le bureau. Merci **Ludivine Pidoux** et **Magda Chafai** d'avoir été mes colocataires de chambre pendant les congrès, à **Ludivine** de m'avoir tenu compagnie pendant les pauses café, et à **Magda** pour ces retours à Nice dans ta Twingo par le bord de mer que tu apprécies tant. Merci aux anciens et actuels thésards **Sébastien**, **Ahmed**, **Clément** et **Kévin**. Merci aux animaliers, et plus particulièrement merci Véro de t'être si bien occupée de mes souris.

Merci à toutes les équipes pédagogiques du département Sciences de la Vie et de la Santé à Valrose avec qui j'ai travaillé de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de goûter à l'enseignement universitaire. J'ai adoré encadrer les étudiants durant ces nombreux TP et TD. Merci à **René Garcia**, **Eric Boncompagni**, **Pierre Frendo**, **Michael Quentin**, **Laurence**

**Dupont, Marc Cougnon, Isabelle Garcia, Aline Grechez, Dominique Colinet, Marc Bailly-Bechet, et Pierre Lezowski.**

Merci à **Olivier Soriani** et à **Raphaël Rapetti-Maus** de m'avoir permis de faire mon premier pas dans la recherche en m'accueillant dans leur équipe pour mon premier stage de Master. Merci pour votre encadrement, votre gentillesse et votre sens de l'humour.

Merci **Béatrice Bussinger** pour ton aide remarquable pour toutes mes démarches administratives depuis le Master, en passant par mes services d'enseignement.

Enfin je souhaite remercier mes proches. Tout d'abord mes amis. Merci **Nico**, ami et compagnon de thèse, sans toi ma thèse à l'IPMC n'aurait pas été la même. Toutes ces pauses café, pauses déjeuner, confidences et discussions engagées, mots-fléchés en anglais, m'ont illuminé mes années passées à Sophia, tu m'as manqué quand tu es parti.

Merci à tous mes amis de longue (ou moins longue) date de faire ou d'avoir fait partie de ma vie, d'avoir grandi avec moi, et de m'avoir fait grandir. Merci **Raphaël** (Kiki !), **Flora** et **Julien** (aka les Doudies), **Matthieu, Victor, Zac, Guitou, Laurent et Laurent, Baltha, Fab, David, Marilou, Martin, Marie, Vivien, Gwennaëlle, Romain et Louis.**

Merci aux parents de Raphaël, **Nathalie** et **Jean-François**, pour leur soutien, leur bienveillance et leurs encouragements.

Enfin je remercie ma famille. En premier lieu un énorme merci à ma **Maman**. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours soutenue et épaulée, de m'avoir supportée durant mes errances scolaires, et de t'être toujours démenée pour ta fille. Merci de m'avoir encouragée et d'avoir cru à mon retour sur les bancs de la fac, si je suis arrivée jusque-là c'est en grande partie grâce à toi. Merci Mamoushka.

Merci **ma petite Nanie** d'être la meilleure Nanie qu'il soit ! Je ne te remercierai jamais assez pour tes délicieux petits-plats préparés et déposés avec soin dans la boîte aux lettres, ils m'ont été d'une aide précieuse tout au long de mes années universitaires vécues dans ce petit studio. Merci pour ton soutien, ta confiance et ta gentillesse, d'avoir organisé tant de dîners de famille, et de tant donner de ta personne pour le bien de tes proches.

A big thank you **Dad** for being the legendary Dad that you are. I'll come see you as soon as I'm done, not long now! Thank you **Gemma** for your kindness and all that cooking. Thank

you to my little sisters **Rose** and **Kim**, and my soon-to-be brother-in-law **Matt**, for all the Normandy adventures.

Merci **Tonton**, cela m'a fait grandement plaisir que tu sois venu assister à ma soutenance.

Un merci tout particulier à **Raphaël**, mon p'tit Raphy. Une aventure doctorale vécue à deux, main dans la main. Un soutien sans faille, une épaule solide, tu m'as tant ramassée à la petite cuillère... Sans toi je ne sais pas si je serais arrivée au bout. Merci d'avoir été là et de partager ma vie, de m'avoir supportée (ça n'a pas dû être facile !), merci pour ton calme et ta sérénité, ton pragmatisme, ta patience sans limites (ou presque !), tu as été une pièce maitresse dans ce parcours, merci pour tout.

C'est la gorge serrée que j'entame ce paragraphe. Je remercie ma douce **Marraine** chérie et tante qui me manque tant. Depuis que tu m'as observée m'épanouir à la fac, tu m'as toujours encouragée à viser le doctorat. Malheureusement tu t'en es allée, beaucoup trop tôt pour voir la concrétisation de mon parcours, avant même la fin de ma première année de Master. J'aurais tellement aimé que tu sois présente pour ma soutenance. Tu seras à mes côtés d'une certaine façon, je tâcherai d'embrasser ta force et détermination.

Je remercie également mon **Papy** et ma **Grand-Nanie** pour leur affection et leur présence pendant ces longues années d'études, mais qui n'ont malheureusement pas pu m'accompagner jusqu'au bout.

# TABLES DES MATIERES

RESUME.....	1
ABSTRACT .....	3
REMERCIEMENTS.....	6
TABLES DES MATIERES .....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS .....	15
INTRODUCTION.....	18
<b>I. La douleur</b> .....	<b>19</b>
A. Anatomie, physiologie et physiopathologie de la douleur .....	19
1. Anatomie générale, voies centripètes de la douleur.....	19
2. Généralités et classifications des fibres afférentes primaires .....	24
a. Vitesses de conduction, modalités de stimulation et marqueurs moléculaires : vers une classification ?.....	24
i. Classifications d’Erlanger et Gasser, et de Lloyd et Hunt.....	24
ii. Découverte de fibres spécifiques nociceptives .....	27
iii. Fibres nociceptives et modalités de stimulation.....	30
iv. Marqueurs moléculaires .....	31
b. Classifications à l’ère des technologies omics .....	34
3. Canaux ioniques, perception sensorielle et nociception : détection et transduction des stimuli aux terminaison périphériques.....	38
a. Mécanotransduction .....	40
i. Canaux Piezo.....	41
ii. Canaux K2P.....	42
iii. Canaux DEG/ENaC/ASIC .....	43
iv. Autres .....	44
b. Thermotransduction.....	44
i. Canaux TRP (Transient Receptor Potential) .....	45
ii. Autres .....	47
c. Chemotransduction .....	47
i. Canaux ASIC.....	47
ii. Canaux TRP .....	47



iii. Autres .....	47
4. Douleur aiguë et douleurs chroniques .....	48
a. La douleur physiologique .....	48
b. Physiopathologie : douleurs chroniques .....	48
c. Les différents types de douleur chronique.....	51
i. Douleurs chroniques primaires ou nociplastiques.....	51
ii. Douleurs chroniques secondaires .....	51
B. Traitements pharmacologiques de la douleur .....	54
1. Antalgiques non morphiniques : palier 1.....	55
a. Le paracétamol (acétaminophène) .....	55
b. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	56
2. Antalgiques morphiniques faibles et forts : palier 2 et palier 3 .....	57
a. Généralités des antalgiques morphiniques .....	57
b. Les antalgiques morphiniques faibles : palier 2 .....	58
c. Les antalgiques morphiniques forts : palier 3 .....	58
3. Antalgiques locaux/topiques .....	59
4. Adjuvants et antalgiques adjuvants.....	59
<b>II. Les canaux « Acid Sensing Ion Channels » (ASIC).....</b>	<b>60</b>
A. Découverte et clonage des récepteurs à protons.....	61
1. ASIC2 .....	62
2. ASIC1a .....	62
3. ASIC3 .....	62
4. ASIC1b.....	63
5. ASIC4 .....	63
B. Propriétés.....	64
1. Diversité et propriétés structurales .....	64
2. Propriétés biophysiques .....	67
3. Expression tissulaire dans le système nociceptif.....	72
a. Système nociceptif périphérique.....	72
b. Système nociceptif central .....	73
C. Pharmacologie des canaux ASIC .....	75
1. Modulateurs exogènes .....	75

a. Toxines animales .....	75
i. La psalmotoxine 1 (PcTx1).....	75
ii. La MitTx .....	76
iii. L'APETx2 .....	76
iv. Les Mambalgines .....	77
b. Molécules synthétiques.....	77
i. L'amiloride.....	77
ii. AINS .....	78
iii. GMQ .....	78
2. Modulateurs endogènes.....	80
a. Les ions .....	80
b. Les neuropeptides .....	80
c. Les lipides .....	81
D. Canal ASIC3 et douleurs musculosquelettiques.....	83
1. Allodynies/hyperalgies primaires et secondaires .....	83
2. Modèles animaux de douleurs musculosquelettiques et canaux ASIC3 .....	84
a. Modèles de douleurs musculosquelettiques non inflammatoires et canaux ASIC3 .....	84
i. Douleur musculaire non inflammatoire et ASIC3.....	84
ii. Douleur articulaire non inflammatoire et ASIC3 .....	89
b. Modèles de douleurs musculosquelettiques inflammatoires et canaux ASIC3 .....	91
i. Douleur musculaire inflammatoire et ASIC3.....	91
ii. Douleur articulaire inflammatoire et ASIC3 .....	92
3. Canaux ASIC3, lipides et douleurs musculosquelettiques .....	96
<b>RESULTATS .....</b>	<b>100</b>
<b>I. Contexte de l'étude .....</b>	<b>101</b>
<b>II. Article .....</b>	<b>102</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>131</b>
<b>I. Taux élevés de LPC16:0 dans les liquides synoviaux de patients souffrants de différentes arthropathies .....</b>	<b>133</b>
<b>II. Origine de l'augmentation de LPC16:0 synovial : un contexte inflammatoire ?.....</b>	<b>134</b>
<b>III. Un nouveau modèle de douleur articulaire chronique induit par injections de LPC16:0 et dépendant d'ASIC3 .....</b>	<b>135</b>

A. ASIC3 est impliqué dans le développement d'une allodynie mécanique secondaire et de troubles anxieux dans ce modèle .....	135
B. ASIC3 est impliqué dans le développement d'une hyperalgie thermique dans ce modèle ....	136
C. Absence de dimorphisme sexuel dans ce modèle et dans sa dépendance à ASIC3 .....	137
D. Les injections de LPC16:0 induisent une sensibilisation centrale .....	139
E. Absence de bilatéralisation de l'allodynie et de la sensibilisation centrale .....	140
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>144</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>180</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Le système nociceptif .....	22
Figure 2 : Voies ascendantes de la douleur.....	23
Figure 3 : Mise en évidence de l'existence de fibres spécifiques de la nociception.....	28
Figure 4 : Mise en évidence de fibres spécifiques responsables de différentes sensations douloureuses : notion de douleurs <i>rapide</i> et <i>lente</i> .....	29
Figure 5 : Classification des neurones sensoriels en fonction de leur profil transcriptomique par analyse single-cell RNA-seq de neurones de DRG lombaires de souris.....	36
Figure 6 : Profil d'expression d'ASIC3 des différents types de neurones sensoriels et diamètre cellulaire moyen de chaque sous-cluster .....	37
Figure 7 : Détection et transduction des stimuli grâce à des canaux ioniques exprimés par une terminaison sensorielle périphérique .....	39
Figure 8 : Intensité de la douleur subjective en conditions physiologiques et pathologiques	50
Figure 9 : Arbre phylogénétique de la superfamille des canaux ENac/DEG/ASIC .....	60
Figure 10 : Structure des canaux ASIC.....	66
Figure 11 : Cinétiques des courants ASIC .....	70
Figure 12 : Courant de fenêtre d'ASIC3.....	71
Figure 13 : Surexpression d'ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b et ASIC3 dans des neurones DRG de rat en condition inflammatoire, inhibée par l'administration d'AINS.....	74
Figure 14 : Modèle de douleur musculaire non inflammatoire dépendant d'ASIC3 .....	85
Figure 15 : ASIC3 est nécessaire à la mise en place de l'hyperalgie mécanique secondaire bilatérale dans un modèle de douleur musculaire non inflammatoire .....	86
Figure 16 : Sensibilisation centrale dans un modèle de douleur musculaire avec hyperalgie mécanique secondaire bilatérale .....	88
Figure 17 : Modèle de douleur articulaire non inflammatoire .....	90

Figure 18 : ASIC3 est nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique secondaire dans un modèle de douleur articulaire inflammatoire .....	95
Figure 19 : Les comportements douloureux induits par injections sous-cutanées de LPC16:0+AA sont dépendants d'ASIC3 .....	97
Figure 20 : ASIC3 est nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique secondaire dans un modèle de douleur musculaire induit par injection de LPC16:0 .....	99
Tableau 1 : Classification et rôles physiologiques des fibres afférentes primaires .....	26
Tableau 2 : Marqueurs de classes de fibres somesthésiques associées .....	33
Tableau 3 : Propriétés électrophysiologiques des canaux ASIC.....	69
Tableau 4 : Pharmacologie des canaux ASIC : modulateurs exogènes .....	79
Tableau 5 : Pharmacologie des canaux ASIC : modulateurs endogènes.....	82

## LISTE DES ABREVIATIONS

AINS :	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
ACCN :	Amiloride-sensitive Cation Channel, Neuronal
AM404 :	<i>N</i> -arachidonoylphénolamine
APETx2 :	<i>Anthopleura elegantissima</i> toxine 2
ASIC :	Acid-Sensing Ion Channel
BCN :	Brain Na <sup>+</sup> Channel
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium
Ca <sub>v</sub> :	Canaux Ca <sup>2+</sup> voltage-dépendants
CB :	Cannabinoid
CFA :	Complement Freund's Adjuvant
CGRP :	Calcitonin Gene-Related Peptide
COX :	Cyclo-Oxygénases
DEG :	Dégénérines
DRASIC :	Dorsal Root ASIC
DRG :	Dorsal Root Ganglion
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ENaC :	Epithelial Na <sup>+</sup> Channel
FAAH :	Fatty Acid Amide Hydrolase
Fibres AM :	A $\delta$ -Mechano fibres
Fibres AMC :	A $\delta$ -Mechano-cold fibres
Fibres AMH :	A $\delta$ -Mechano-heat fibres
Fibres AMHC :	A $\delta$ -Mechano-heat+cold fibres
Fibres CH :	C-Heat fibres
Fibres CM :	C-Mechano fibres
Fibres CMC :	C-Mechano-cold fibres
Fibres CMH :	C-Mechano-heat fibres
Fibres CMHC :	C-Mechano-heat+cold fibres
Fibres CM <sub>i</sub> H <sub>i</sub> :	C-Mechano-heat insensitive fibres

FaNaC :	FMRF-amide-activated Na <sup>+</sup> Channel
FMRF :	Phénylalanine-Méthionine-Arginine-Phénylalanine
FS	Fluides synoviaux
GMQ :	2-Guanidine-4-Methylquinazoline
H <sup>+</sup> :	Hydrogène
IAPS :	International Association for the Study of Pain
IB4 :	Isolectine B4
ICD :	International Classification of Diseases
IL-6 :	Interleukine-6
IMC :	Indice de Masse Corporel
IPMC	Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
K <sup>+</sup> :	Potassium
K2P	Two-Pore K <sup>+</sup> channel
KO :	Knock-out
KOOS :	Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score
Li <sup>+</sup> :	Lithium
LPA :	Acide Lysophosphatidique
LPC :	Lysophosphatidycholine
Lp-PLA <sub>2</sub> :	Lipoprotein-associated PLA <sub>2</sub>
LTMR :	Low-threshold mechanoreceptors
MDEG :	Mammalian Degenerin
MEC :	Mechanosensory abnormality protein
Mg <sup>2+</sup> :	Magnésium
MitTx :	<i>Micrurus tener</i> toxine
MS :	Mécano-sensible
Msc :	Mechano-sensitive channels
Na <sup>+</sup> :	Sodium
Na <sub>v</sub> :	Canaux Na <sup>+</sup> voltage-dépendants
NF200 :	Neurofilament 200
NMDA :	N-Méthyl-D-Aspartate

OA :	Ostéoarthrose
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PAF-AH :	Plasma Platelet-activating-Factor-acetylhydrolase
Pb <sup>2+</sup> :	Plomb
PC :	Phosphatidylcholine
PcTx1 :	Psalmotoxine-1
pH :	Potentiel Hydrogène
PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A <sub>2</sub>
RISS :	Repeated and Intermittent Sound Stress
ROS :	Reactive Oxygen Species
SCN9A :	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9
scRNA-seq	Single-cell RNA-seq
sPLA <sub>2</sub> :	Secreted Phospholipase A <sub>2</sub>
SPASIC :	Spinal Chord ASIC
TG :	Ganglions Trigéminaux
TH :	Tyrosine Hydroxylase
TM :	Transmembrane domain
TNF- $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRAAK :	TWIK-Related Arachidonic Acid K <sup>+</sup> channel
TREK :	TWIK-Related K <sup>+</sup> channel
TRPA :	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC :	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM :	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPV :	Transient Receptor Potential Vanilloid
TWIK :	Tandem of P-domains in a Weak Inward rectifying K <sup>+</sup> channel
VAS :	Visual Analog Scores
Zn <sup>2+</sup> :	Zinc



# INTRODUCTION

# I. La douleur

---

« J'ai mal docteur ». Ce sont des mots que l'on a tous prononcés en allant voir notre médecin. En effet, la douleur est une des premières causes de consultation médicale. Mais la prise en charge de la douleur n'a pas toujours été imputable à la médecine actuelle. En analysant les indices que nous laisse l'Histoire, il est évident que l'Homme a toujours cherché à comprendre, expliquer et soulager les souffrances des êtres humains, qu'elles soient physiques ou psychiques. D'après l'« International Association for the Study of Pain » (IASP), la douleur est aujourd'hui définie comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ». Or à travers les époques, d'une civilisation et d'une culture à l'autre, la douleur n'a pas toujours été considérée et interprétée de la même manière. Sa compréhension et donc sa prise en charge vont évoluer au fil de l'Histoire, de manière étroitement liée aux différents contextes religieux, sociaux, philosophiques et scientifiques. Autrefois perçues comme un phénomène mystique ou magique, une intervention divine ou une intrusion démoniaque, les douleurs et souffrances des êtres humains étaient prises en charge par des guérisseurs, tels que des chamans, des druides, des sorciers (Hyson, 2001; Sabatowski et al., 2004). Bien que certains de ces « soins » soient encore pratiqués de nos jours par certains peuples, la notion de douleur et la prise en charge des « maux » deviennent de plus en plus concrètes et scientifiques au fil des siècles, grâce à l'accumulation des connaissances et avancées de la médecine moderne.

## A. Anatomie, physiologie et physiopathologie de la douleur

### 1. Anatomie générale, voies centripètes de la douleur

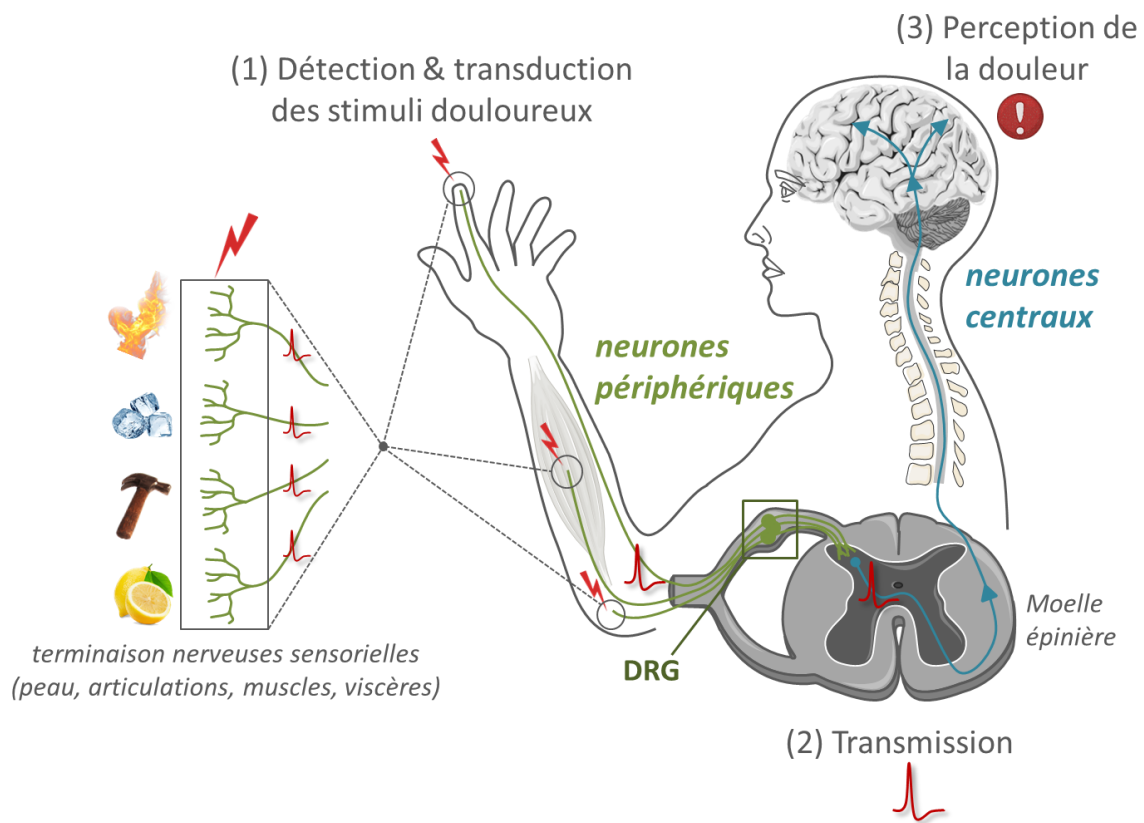
La somesthésie, du grec *sôma*, corps et *aïsthêsis*, sensibilité, est la sensibilité du corps (somatique et viscérale), à l'exception des sensibilités olfactives, visuelles, auditives et gustatives. Au sein du système somesthésique, et notamment du système nociceptif, le relai des informations sensorielles de la périphérie aux structures supraspinales de l'encéphale est permis par une succession de neurones connectés en synapses : les neurones de premier, de second et de troisième ordre ; toutefois, d'une modalité somesthésique à l'autre, ce relai de neurones emprunte des voies centripètes différentes :

- Les voies centripètes de la sensibilité proprioceptive : voie spinocérébelleuse dorsale
- Les voies centripètes de la sensibilité tactile non douloureuse :
  - du corps : voie des colonnes dorsales (ou voie lemniscale)
  - de la face : voie trigémino-thalamique (ou lemnisque trigéminal)
- **Les voies centripètes de la douleur :**
  - **du corps : voie antérolatérale (ou extra-lemniscale)**
  - de la face : voie trigémino-thalamique (ou lemnisque trigéminal)

La douleur est perçue par le cerveau grâce à un mécanisme qui relaie l'information nocive du système nerveux périphérique (SNP) vers le système nerveux central (SNC) : c'est la nociception. Les neurones de premier ordre des fibres afférentes primaires nociceptives-sont des neurones pseudo-unipolaires dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (ganglions spinaux ou rachidiens), ou dans les ganglions trigéminaux pour les neurones innervant la face. L'axone de ces neurones projette d'une part vers la périphérie où ses terminaisons dendritiques libres, aussi appelées nocicepteurs, innervent la peau, les viscères, les os, les tendons, les muscles et les articulations ; et d'autre part vers le système nerveux central où il forme des synapses avec des neurones centraux de second ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière (**Figure 1**).

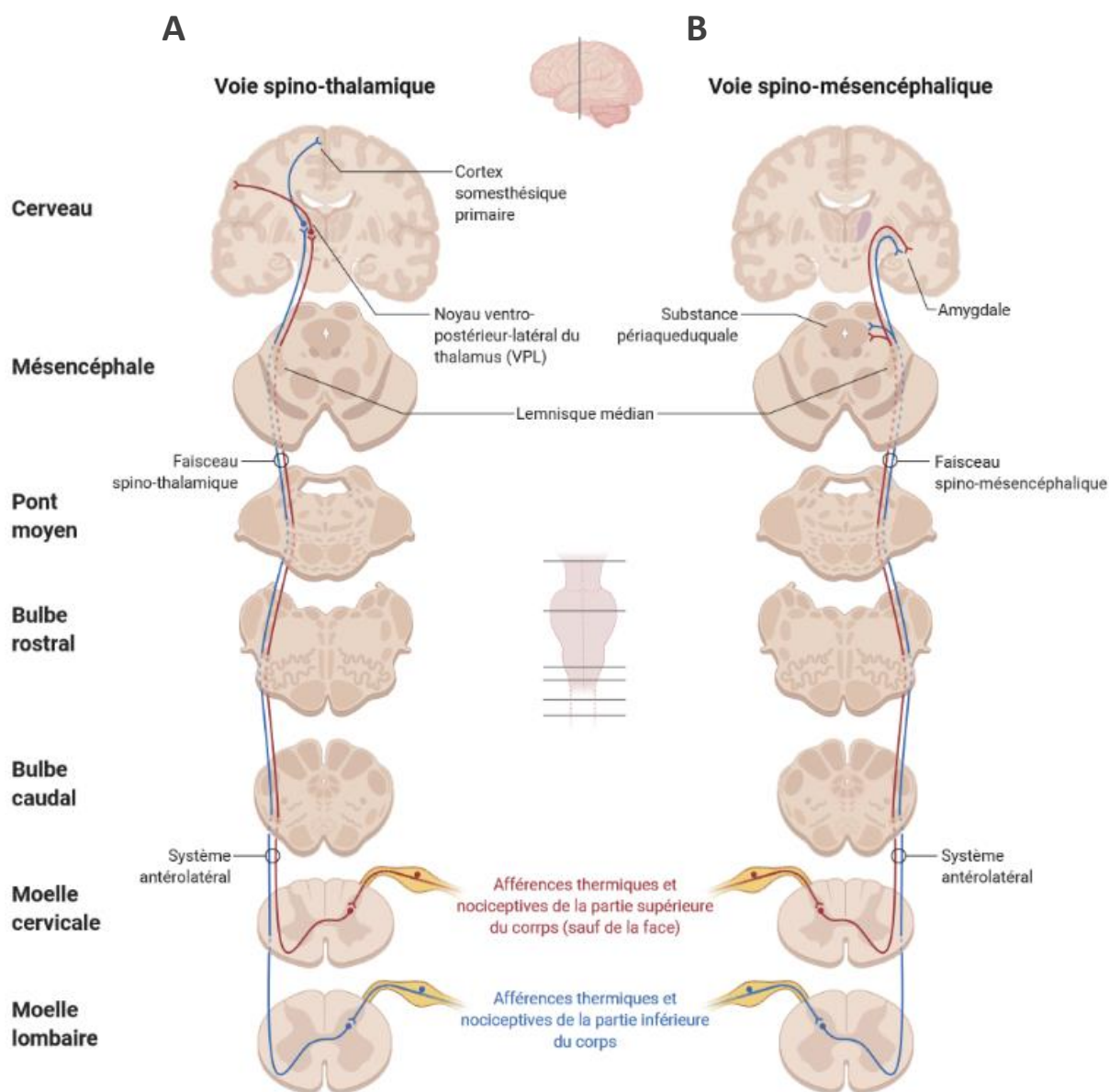
La première étape de la nociception est la détection et la transduction d'un stimulus nocif, qu'il soit mécanique, thermique ou chimique, en signal électrique au niveau des terminaisons nerveuses périphériques des fibres sensorielles nociceptives (**Figure 1**). Si l'intensité du stimulus est capable de générer une dépolarisation suffisante pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action, alors le signal se propage le long des fibres afférentes qui pénètrent la moelle épinière par la racine dorsale (**Figure 1**). Dans la corne dorsale, les branches centripètes des neurones nociceptifs font synapse avec des neurones de second ordre dont les axones croisent ensuite la ligne médiane de la moelle épinière (décussation), et projettent via la voie du système antérolatéral vers leurs cibles du tronc cérébral (faisceau spino-mésencéphalique) ou du thalamus (faisceau spino-thalamique) où ils font synapse avec des neurones de troisième ordre (**Figure 2**) (**Le Bars and Willer, 2004; Dinakar and Stillman, 2016**). Les différentes cibles supraspinales des fibres des neurones de second ordre jouent des rôles particuliers dans les réponses physiologiques à un stimulus nociceptif (**Le Bars et Willer, 2004**) :

- La voie spino-thalamique traite les aspects discriminatifs des stimuli nociceptifs (emplacement, intensité et nature de la stimulation) : les axones des neurones de second ordre font synapse dans le noyau ventro-postéro-latéral (VPL) du thalamus (noyau ventro-postéro-médian VPM pour la face) avec des neurones de troisième ordre qui projettent vers les aires corticales somesthésiques primaire et secondaire (**Figure 2A**).
- La voie spino-mésencéphalique prend en charge les aspects affectifs et motivationnels de la douleur : les axones des neurones de second ordre font synapse dans différentes structures du tronc cérébral dont la substance grise périaqueducale, d'où des neurones de troisième ordre projettent vers des cibles du système limbique telles que l'amygdale et l'hypothalamus (**Figure 2B**).



**Figure 1 : Le système nociceptif**

Un stimulus nocif, qu'il soit thermique, chimique, ou mécanique, est détecté et transduit en signal électrique par les terminaisons périphériques des neurones de premier ordre (périphériques, en vert) innervant la peau, les viscères, les os, les tendons, les muscles ou les articulations, et dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions rachidiens (DRG). Si l'intensité du stimulus est suffisante pour le déclenchement de potentiels d'action, alors le signal se propage le long des fibres afférentes qui rejoignent la moelle épinière par la racine dorsale. Dans la corne dorsale, les prolongements centraux des neurones de premier ordre font synapse avec des neurones de second ordre (centraux, en bleu), et le signal est alors transmis le long de voies spécifiques de la moelle épinière (Figure 2) vers les cibles supraspinales.



**Figure 2 : Voies ascendantes de la douleur**

Dans la corne dorsale, les branches centripètes des neurones de premier ordre font synapse avec des neurones de second ordre dont les axones croisent ensuite la ligne médiane de la moelle épinière (décussation), et projettent par la voie du système antérolatéral vers leurs cibles :

- A. Voie spino-thalamique : projection via le faisceau spino-thalamique vers le thalamus où les neurones de second ordre font synapse avec des neurones de troisième ordre qui projettent vers les aires corticales somesthésiques.
- B. Voie spino-mésencéphalique : projection vers le tronc cérébral via le faisceau spino-mésencéphalique où les neurones de second ordre font synapse dans différentes structures dont la substance grise périaqueducale, d'où des neurones de troisième ordre projettent vers des structures du système limbique telles que l'amygdale et l'hypothalamus.

## 2. Généralités et classifications des fibres afférentes primaires

De façon intuitive, on pourrait penser que la perception d'un message douloureux est permise par une activation excessive des fibres sensorielles périphériques normalement responsables de la sensibilité tactile non douloureuse. Au sein du système somesthésique, il existe en réalité différents types de fibres somesthésiques afférentes et de voies centripètes qui ont des propriétés et des fonctions spécifiques distinctes. On distingue trois sous-systèmes permettant de discriminer différents types de sensibilité :

- **Les stimuli proprioceptifs** renseignent sur la position spatiale des membres ou autres parties du corps via deux principaux récepteurs proprioceptifs : le fuseau neuromusculaire innervé par les fibres A $\alpha$  (Ia) et A $\beta$  (II) renseigne sur l'étirement du muscle strié, et l'organe tendineux de Golgi innervé par les fibres A $\alpha$  (Ib) renseigne sur la position articulaire.
- **Les stimuli tactiles non douloureux** (toucher léger, vibrations et pression) sont détectés par des mécanorécepteurs cutanés (disques de Merkel, corpuscules de Meissner, de Pacini et de Ruffini), structures encapsulées périphériques des fibres A $\beta$ .
- **Les stimuli douloureux d'origine mécanique, thermique et chimique (nociception), les changements de température, ainsi que le toucher grossier**, activent les fibres A $\delta$  et/ou C.

Historiquement, les fibres somesthésiques ont été classées par une multitude de critères différents, ainsi il en existe de nombreuses classifications et cela ne cesse d'évoluer avec le temps. Il en existe par exemple en fonction de leur taille et vitesse de conduction, de leurs modalités sensorielles, et à l'ère des technologies omics et notamment du single-cell RNA-seq (scRNA-seq), de nouvelles classifications en fonction de l'expression de certains marqueurs et de leur profil transcriptomique ne cessent d'évoluer. Dans cette partie je m'intéresserai de façon non exhaustive à l'évolution de ces classifications.

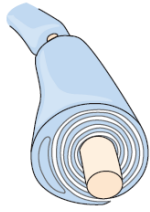



### a. Vitesses de conduction, modalités de stimulation et marqueurs moléculaires : vers une classification ?

#### i. Classifications d'Erlanger et Gasser, et de Lloyd et Hunt

Les premières classifications chez les mammifères furent proposées dans les années 1940, l'une ordonne les fibres en fonction de leur vitesse de conduction, c'est la classification

d'Erlanger et Gasser :  $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$ , C, et l'autre en fonction de leur diamètre axonal, c'est la classification de Lloyd et Hunt : Ia, Ib, II, III, et IV. Ces deux classifications sont superposables, car plus le diamètre axonal des fibres est important, plus leur vitesse de conduction est haute (**Tableau 1**). La classification d'Erlanger et Gasser est de nos jours la classification la plus employée pour les fibres sensibles. Les fibres afférentes primaires de large diamètre axonal et fortement myélinisées ont une vitesse de conduction rapide (fibres  $A\alpha$  :  $72-120 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  ; et  $A\beta$  :  $36-72 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), et les fibres avec un diamètre axonal plus fin, et faiblement (fibres  $A\delta$ ) ou non (fibres C) myélinisées ont une vitesse de conduction plus faible (fibres  $A\delta$  :  $4-36 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , et fibres C :  $0,4-2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (**Tableau 1**) (**Gasser, 1941; Gardner et Johnson, 2014**).



Classification d'Erlanger et Gasser	A $\alpha$		A $\beta$	A $\delta$	C
Classification de Lloyd et Hunt	Ia	Ib	II	III	IV
<b>Myéline</b> <b>Diamètre axone</b> <b>Vitesse de conduction</b>	 Myélinisées +++ 12-20 $\mu\text{m}$ 72-120 $\text{m.s}^{-1}$		 Myélinisées ++ 6-12 $\mu\text{m}$ 36-72 $\text{m.s}^{-1}$	 Myélinisées + 1-6 $\mu\text{m}$ 4-36 $\text{m.s}^{-1}$	 Non myélinisées 0,2-1,5 $\mu\text{m}$ 0,4-2 $\text{m.s}^{-1}$
<b>Rôle</b>	<b>Proprioception</b>		<b>Mécanoréception</b> <b>Proprioception</b>	<b>Nociception</b> (thermique, mécanique, chimique) <b>Thermoception</b>	<b>Nociception</b> (thermique, mécanique, chimique) <b>Thermoception</b> <b>Toucher agréable</b>
<b>Trajet</b>	<b>Voie spinocérébelleuse</b> <b>Voie des colonnes dorsales</b> <b>Voie trigémino-thalamique</b>			<b>Voie antérolatérale</b> <b>Voie trigémino-thalamique</b>	

**Tableau 1 : Classification et rôles physiologiques des fibres afférentes primaires**

(D'après Gardner and Johnson, 2014)

## **ii. Découverte de fibres spécifiques nociceptives**

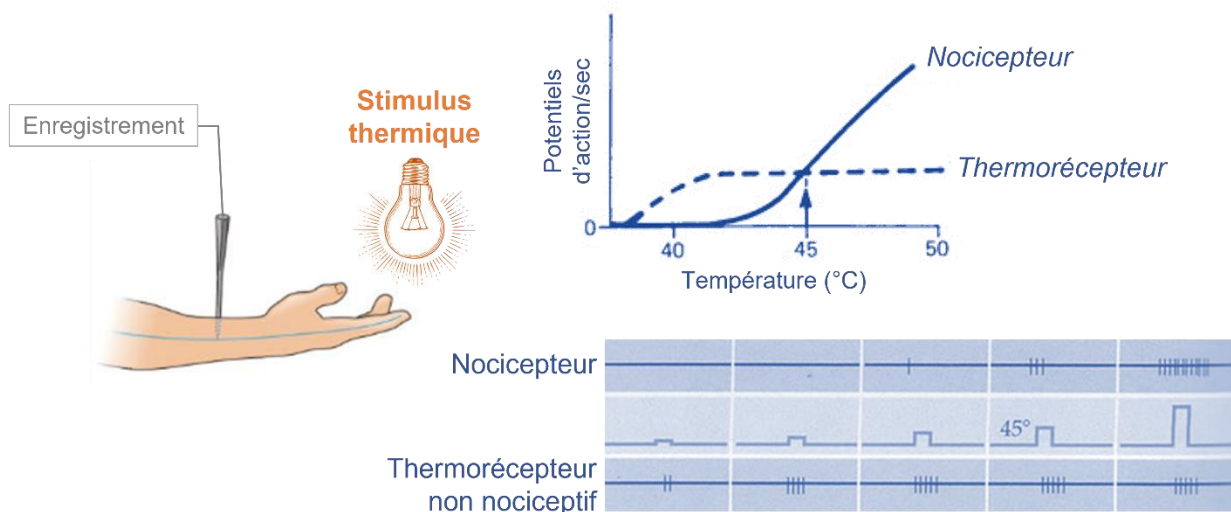
Des expériences ont montré que la perception d'un stimulus douloureux n'était pas dû à une augmentation de la fréquence de décharge des fibres périphériques à conduction rapide responsables de la sensibilité non douloureuse, mais à l'activation de fibres spécifiques de la nociception, lorsque l'intensité du stimulus augmente et devient nocif. C'est ce qu'illustre la **figure 3** en prenant pour exemple l'application d'un stimulus thermique sur la peau, avec enregistrement transcutané de fibres nerveuses afférentes ayant pour champ récepteur la zone exposée au stimulus :

On considère qu'à partir de 45°C un stimulus thermique devient nocif et donc douloureux. Dans des gammes de températures non douloureuses, seules les fibres thermosensibles non nociceptives s'activent. Lorsque l'intensité du stimulus se rapproche de ce seuil puis entre dans des gammes de températures douloureuses, ces fibres n'augmentent plus leur fréquence de décharge de potentiels d'action. Ce sont les fibres nociceptives qui prennent le relais et qui commencent à décharger, et plus le stimulus est intense, plus la fréquence de décharge de potentiels d'action de ces fibres nociceptives est haute (**Figure 3**) (**Fields, 1987**).

Également, lorsque les fibres afférentes primaires somesthésiques de gros calibre (fibres A $\alpha$  et A $\beta$ ) sont stimulées directement électriquement, qu'importe la fréquence et l'intensité de stimulation, cela n'évoque pas de sensation de douleur, mais une sensation tactile (neurones à bas seuil d'activation). En revanche, lorsque l'intensité de stimulation augmente suffisamment pour activer une partie des fibres à plus haut seuil d'activation, les fibres A $\delta$ , cela produit une sensation de picotement, jusqu'à provoquer une douleur aiguë si la stimulation est suffisamment importante. En intensifiant encore plus la stimulation jusqu'à recruter les fibres C à haut seuil d'activation, fibres non myélinisées à conduction lente, une douleur plus sourde et qui dure un peu plus dans le temps est ressentie. Le blocage spécifique des fibres A $\delta$  ou C confirme que ces fibres sont responsables de douleurs et qu'elles sont associées respectivement à la notion de douleur *rapide* (aigüe) et de douleur *lente* (sourde) (**Figure 4**). En effet, une étude montre chez l'humain que l'application externe d'une pression sur le nerf du bras bloque l'activité des fibres A $\delta$  alors que les fibres C continuent d'émettre des potentiels d'action. Les sujets volontaires décrivent la disparition de la douleur dite *rapide* et aiguë, avec la persistance de la douleur *lente*, diffuse et plus sourde (**Figure 4B**). À l'inverse, dans cette même étude, les auteurs montrent que l'infiltration de lidocaïne (anesthésique

local) à faible concentration au niveau des nerfs périphériques anesthésie les fibres C avant de bloquer les fibres myélinisées A $\delta$ . Les sensations décrites par les sujets sont la disparition de la douleur *lente*, avec la douleur dite *rapide* qui persiste (**Figure 4C**) (Torebjörk et Hallin, 1973).

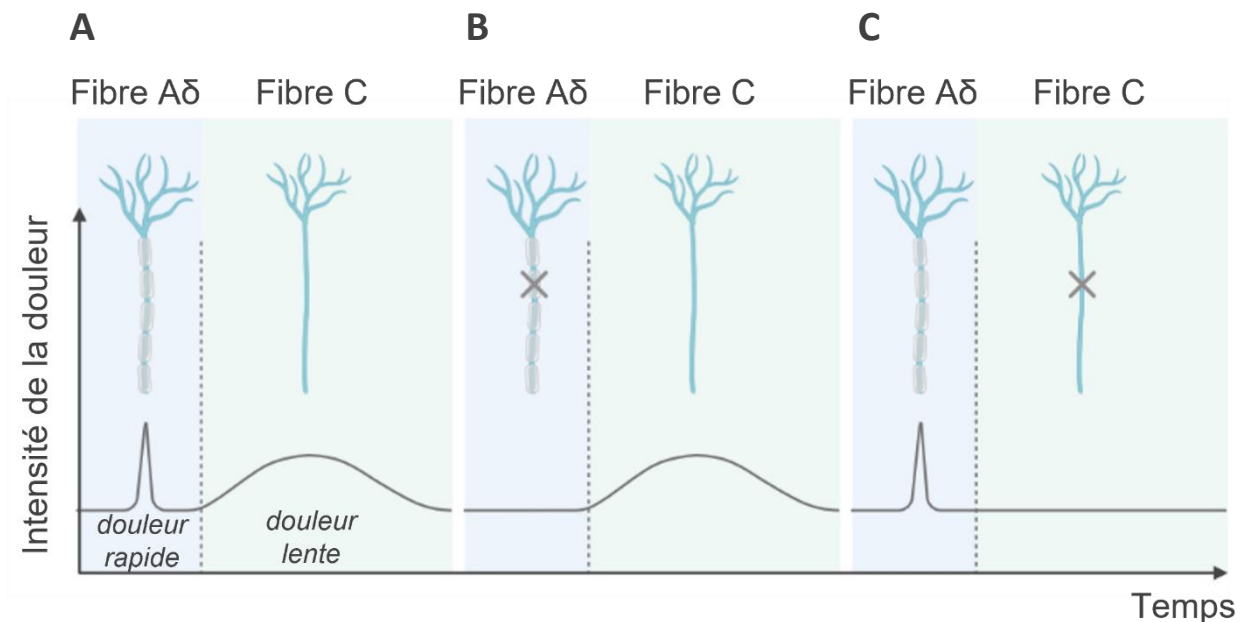
Ces observations indiquent qu'il existe des fibres afférentes spécialisées dans la détection des différentes modalités somesthésiques, et notamment de différents types de douleur au sein même du système nociceptif (Torebjörk et Hallin, 1973; Fields, 1987; Besson et Chaouch, 1987; Fields, 1990; Le Bars et Willer, 2004).



**Figure 3 : Mise en évidence de l'existence de fibres spécifiques de la nociception**

Dans cette expérience, un stimulus thermique est appliqué sur la peau, et l'activité de fibres afférentes spécifiques innervant la zone exposée au stimulus est enregistrée de manière transcutanée. Dans des gammes de températures (ici chaudes) non douloureuses (jusqu'à 45°C), seules les fibres thermosensibles non nociceptives émettent des potentiels d'action. Lorsque la température se rapproche de 45°C, ces fibres n'augmentent plus leur fréquence de décharge, et ce sont des fibres spécifiques nociceptives qui prennent le relais, et plus l'intensité du stimulus augmente, plus leur fréquence de potentiels d'action émis s'intensifie.

(D'après Fields, 1987)



**Figure 4 : Mise en évidence de fibres spécifiques responsables de différentes sensations douloureuses : notion de douleurs *rapide* et *lente***

- A. En réponse à une intensité de stimulus suffisante pour activer les fibres nociceptives, deux sensations douloureuses successives sont ressenties, une douleur brève et aiguë dite *rapide*, suivie d'une douleur tardive plus sourde et prolongée dite *lente*.
- B. La douleur *rapide* disparaît lorsque les fibres myélinisées A $\delta$  sont sélectivement bloquée par l'application d'une pression sur le nerf.
- C. La douleur *lente* est abolie lorsque les fibres amyélinisées C sont sélectivement bloquées par l'application de faibles concentrations d'un anesthésique local (lidocaïne).

(D'après Torebjörk and Hallin, 1973 ; et Fields, 1990)

### **iii. Fibres nociceptives et modalités de stimulation**

Les fibres faiblement myélinisées A $\delta$  nociceptives sont des fibres à haut seuil d'activation qui sont responsables de la première douleur aiguë et localisée. Ces fibres répondent à des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques (chauds et/ou froids), et un certain nombre de sous-types ont été décrites : les fibres AM (A $\delta$ -Mechano fibres) sensibles aux stimuli mécaniques, mais ne répondant à aucun stimulus thermique (froid ou chaud), les fibres AMC (A $\delta$ -Mechano-cold fibres) insensibles au chaud mais répondant à des stimuli mécaniques et froids nocifs, les fibres AMHC (A $\delta$ -Mechano-heat+cold fibres) sensibles à la fois aux stimuli chauds, froids et mécaniques, et les fibres AMH (A $\delta$ -Mechano-heat fibres) insensibles aux stimuli thermiques froids et répondant à des stimuli mécaniques et thermiques chauds. Ces dernières peuvent être séparées en deux sous-types (**Raja et al., 1988; Treede et al., 1995, 1998; Cain et al., 2001; Basbaum et al., 2009**) :

- Les fibres A $\delta$  AMH de type I ont un seuil d'activation thermique (chaud) relativement élevée (<53°C), et un seuil d'activation mécanique modéré. D'abord insensibles au chaud, si un stimulus thermique élevé est appliqué de façon maintenue/répétée, ces fibres se sensibilisent tel que leur seuil d'activation thermique s'abaisse. Ainsi elles joueraient un rôle à la fois dans l'hyperalgie à la chaleur générée par l'application prolongée d'un stimulus thermique chaud nocif, ainsi que dans la douleur *rapide* ressentie en réponse à un stimulus nocif mécanique.
- Les fibres A $\delta$  AMH de type II ont à l'inverse un seuil d'activation thermique (chaud) inférieur aux fibres A $\delta$  AMH de type I, ainsi qu'un seuil d'activation mécanique très élevé (voire une insensibilité aux stimuli mécaniques). Ainsi elles joueraient un rôle majoritairement dans la douleur *rapide* ressentie en réponse à un stimulus nocif chaud.

Les fibres non myélinisées C nociceptives sont des fibres à conduction plus lente qui sont responsables de la douleur dite *lente* et diffuse ressentie secondairement à la douleur vive. La plupart de ces fibres sont polymodales, c'est-à-dire répondant à des stimuli nociceptifs chimiques, thermiques (froids et chauds) et mécaniques. Un certain nombre de sous-types de fibres C ont été identifiés, les fibres CM (C-Mechano fibres) répondant à des stimuli mécaniques uniquement, des fibres répondant à la fois à des stimuli mécaniques et

thermiques (chauds : CMH, C-Mechano-heat fibres; froids : CMC, C-Mechano-cold fibres; chauds et froids : CMHC, C-Mechano-heat+cold fibres), les fibres CH (C-Heat fibres) répondant uniquement à des stimuli thermiques chauds, ainsi que des fibres dites silencieuses (CMIHi, C-Mechano-heat insensitive fibres) (Raja et al., 1988; Schmidt et al., 1995; Weidner et al., 1999; Basbaum et al., 2009; Lawson et al., 2019).

Bien que souvent la littérature qualifie les fibres à gros diamètre fortement myélinisées (fibres A $\alpha$  et A $\beta$ ) de fibres non nociceptives et à bas seuil, et les fibres plus fines faiblement (fibres A $\delta$ ) ou non myélinisées (fibres C) de fibres nociceptives et à haut seuil, la réalité est en fait un peu plus complexe que cela. Il existe en effet des fibres A $\beta$  nociceptives possédant des réponses similaires aux fibres A $\delta$  AMH de type I (Djoughri et Lawson, 2004), ainsi que des fibres C et A $\delta$  à bas seuil non nociceptives, les fibres A $\delta$ -LTMR et C-LTMR (« Low Threshold Mechano Receptor »). Les fibres C-LTMR sont insensibles aux stimuli thermiques chauds et aux composés potentiellement nocifs tels que la capsaïcine ou le menthol, mais peuvent s'activer brièvement en réponse à un refroidissement lent de la peau (Delfini et al., 2013). Ce sont des fibres sensibles aux stimuli tactiles légers et sont impliquées dans le toucher agréable/affectif (Löken et al., 2009; Liljencrantz et Olausson, 2014), mais auraient aussi une fonction modulatrice dans la transmission des informations nociceptives (Krämer et al., 2007; Liljencrantz et Olausson, 2014; Kambrun et al., 2018).

Ainsi, au vu de l'hétérogénéité de réponses des fibres aux différentes modalités et intensités de stimulation, à la fois au sein d'une même classe, ou d'une classe à l'autre ce genre de classification ne suffit pas à déterminer leurs propriétés et fonctions. Il est essentiel d'aller vers une meilleure classification de ces fibres, notamment pour identifier certains types de neurones sensoriels et mieux comprendre leur implication dans la physiologie et la physiopathologie des douleurs.

#### *iv. Marqueurs moléculaires*

Au cours de ces dernières décennies, la communauté scientifique s'est largement intéressée à l'identification de marqueurs moléculaires de neurones sensoriels afin de corrélérer des types neuronaux à leurs propriétés fonctionnelles. La liste de ces marqueurs est longue et ne cesse de s'allonger, notamment à l'ère du séquençage à haut débit à l'échelle unicellulaire

(scRNA-seq, voir partie suivante), par conséquent je n'évoquerai que quelques types neuronaux identifiés par l'expression de certains marqueurs (**Tableau 2**).

Initialement, deux principales catégories de neurones sensoriels de DRG avaient été décrites : les neurones clairs de gros diamètre et les neurones sombres de petit diamètre (**Lawson, 1979**). Les neurones clairs de gros diamètre expriment le NF200 (neurofilament 200), et sont des neurones associés aux fibres myélinisées A, tandis que les neurones sombres de petit diamètre n'expriment pas le NF200 et sont des neurones associés aux fibres amyélinisées C (**Lawson et Waddell, 1991**).

D'autres marqueurs permettent de classer les fibres en deux autres catégories majeures, les fibres peptidergiques, et les fibres non peptidergiques. Ces classes se distinguent par l'expression de neuropeptides tels que la substance P, le CGRP (Calcitonin-Related Peptide) : fibres peptidergiques ; ou à l'inverse par la liaison à un marqueur, l'isolectine IB4 : fibres non peptidergiques (**Hökfelt et al., 1975, 1976; Wiesenfeld-Hallin et al., 1984; Averill et al., 1995**). Cependant, il existe des chevauchements entre ces marqueurs. En effet, il existe une sous-population de fibres C non-peptidergiques qui ne lient pas l'IB4, les fibres C-LTMR, qui se distinguent par l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), de Vglut3 ou encore de Ca<sub>v</sub>3.2 (**Brumovsky et al., 2006; Seal et al., 2009; François et al., 2015**).

Il est également possible de distinguer les fibres par l'expression de canaux ioniques leur conférant une sensibilité vis-à-vis de modalités de stimulation, tels que les canaux TRPV1 (chaud, capsaïcine), TRPM8 (froid, menthol), ASIC (acidité), ou encore TRPA1 (froid, huile de moutarde) (**Caterina et al., 1997; Peier et al., 2002a; Waldmann et al., 1997a, 1997b; Bautista et al., 2006; Story et al., 2003**). Certaines sous-populations de fibres semblent se détacher et former une classe bien définie, telles que les fibres exprimant TRPM8, n'exprimant ni TRPA1, ni TRPV1, constituant ainsi une classe de fibre spécifiquement sensible au froid (**Peier et al., 2002a; Dhaka et al., 2008**). Mais la polymodalité de certains canaux ioniques, tels que TRPV1 qui présente également une sensibilité aux protons (**Tominaga et al., 1998**), et encore une fois des chevauchements d'expression entre ces marqueurs, ne fait qu'ajouter à la complexité d'établir une classification précise de sous-types de neurones sensoriels.

Marqueur	Type de fibre sensorielle
CGRP	Peptidergic C fibres, sub-population of A $\delta$ fibres
Substance P	Peptidergic C fibres
NF200	Myelinated fibres
IB4	Non-peptidergic C fibres
Trpv1	Small diameter C fibres (heat and pain)
Trpm8	Small diameter C fibres (cold and pain)
MrgprD	Small diameter C fibres (noxious mechanical, pain)
MrgprA3	Small diameter C fibres (itch)
MrgprB4	Small diameter C fibres (innocuous mechanical)
VGlut3	Non-peptidergic C fibres (innocuous mechanical, cooling)
TH	Non-peptidergic C fibres (innocuous mechanical, cooling)
TrkB	A $\delta$ fibres (innocuous mechanical, cooling)
Npy2r	A $\beta$ fibres (innocuous mechanical)
Chondrolectine	A $\beta$ fibres (innocuous mechanical)

**Tableau 2 : Marqueurs de classes de fibres somesthésiques associées**

*(D'après Le Pichon and Chesler, 2014)*



## b. Classifications à l'ère des technologies omics

L'émergence des études des profils génomiques et transcriptomiques a récemment permis la réévaluation à grande échelle de ces classifications des fibres afférentes primaires. Le scRNA-seq permet d'établir un profil d'expression à l'échelle unicellulaire, permettant ainsi d'identifier de façon non biaisée des types cellulaires par analyses *in silico*.

Une étude de scRNA-seq mesurant l'expression d'une multitude de gènes dans les neurones issus des ganglions sensitifs lombaires de souris a permis d'établir une classification des neurones sensoriels par marqueurs moléculaires, et d'associer à chaque classe des fonctions biologiques grâce à une analyse sur Gene Ontology (**Figure 5**) (**Usoskin et al., 2015**). Cette étude distingue 5 grands clusters cellulaires dans ces DRG (**Figure 5A** : non neuronaux, myélinisés : NF cluster, peptidergiques : PEP cluster, non peptidergiques : NP cluster, ainsi qu'une sous classe de non myélinisés : TH cluster), et a permis de les subdiviser en 11 sous-types de neurones sensoriels associés aux types de fibres déjà connues (**Figure 5B**) (**Usoskin et al., 2015**):

- PEP1 : neurones de fibres C amyélinisées peptidergiques
- PEP2 : neurones de fibres A $\delta$  faiblement myélinisées peptidergiques
- NF1, NF2, NF3 : neurones de fibres myélinisées A-LTMR
- NF4, NF5 : neurones de fibres myélinisées proprioceptives
- NP1, NP2, NP3 : neurones de fibres non peptidergiques amyélinisées, bien que NP2 et NP3 expriment à la fois des marqueurs de neurones peptidergiques et non peptidergiques.
- TH : neurones de fibres amyélinisées C-LTMR

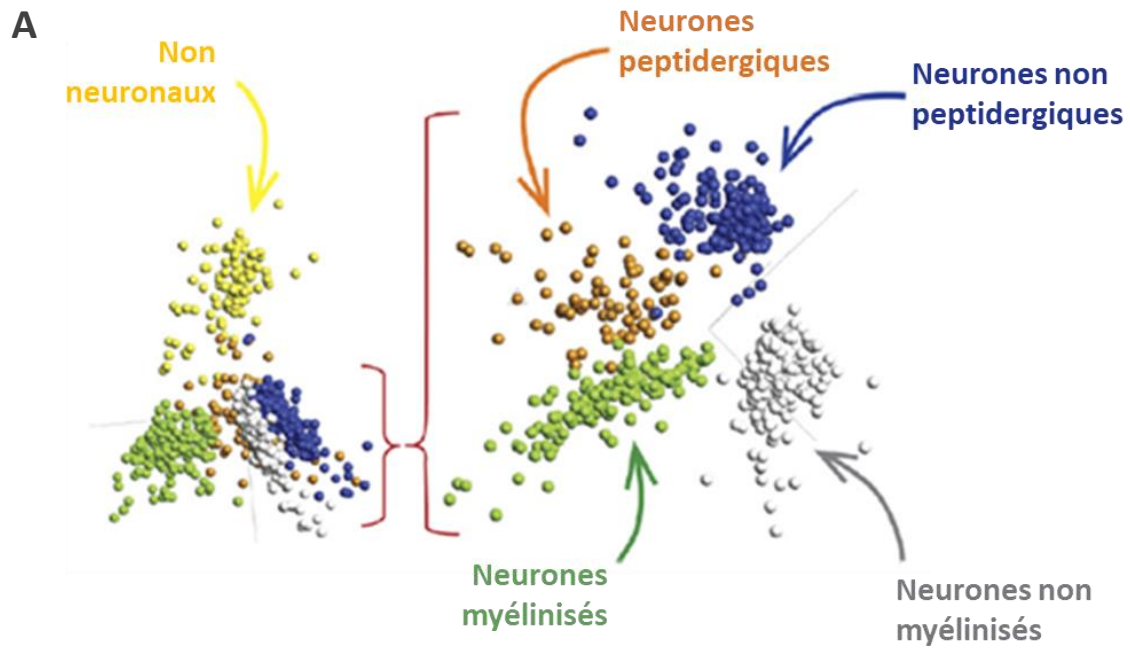
Une étude plus récente qui a réalisé du scRNA-seq sur l'intégralité du système nerveux chez la souris adulte a permis de confirmer la quasi-totalité des types neuronaux identifiés par Usoskin et al., en mettant en évidence des sous-types de certaines de ces classes, ainsi qu'une classe supplémentaire, les neurones exprimant TRPM8 sensibles au froid, certains associés à des fibres C et d'autres à des fibres A $\delta$  (**Zeisel et al., 2018**). Cette étude a mis en ligne un atlas regroupant toutes les données mises en évidence, qui donne accès en faisant des recherches par gène, type cellulaire ou tissulaire, à une « carte d'identité » pour chaque type neuronal

identifié, avec des informations sur les gènes et les marqueurs exprimés, la région anatomique du type cellulaire concerné, etc (<http://mousebrain.org>) (<http://mousebrain.org>, Mouse Brain Atlas, **Linnarsson Lab.**).

Les neurones PEP seraient impliqués dans la détection des stimuli chauds nocifs et mécaniques, les neurones NF seraient essentiellement des fibres A-LTMR et proprioceptives, les neurones NP semblent être impliqués dans le prurit et la détection des stimuli mécaniques et thermiques chauds, et les neurones TH constitueraient les fibres C-LTMR impliquées dans le toucher agréable/affectif et l'hyperalgie mécanique (**Usoskin et al., 2015**; pour revue, voir **Emery et Ernfors, 2018**).

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au canal ASIC3, qui d'après cet atlas, est abondamment exprimé dans les neurones de type PEP2, mais également retrouvé dans les neurones de type PEP1, les neurones de type NF, et ne semble que très faiblement exprimé dans les neurones de types NP (**Figure 6A**). Ainsi, ASIC3 ne semble pas exprimé majoritairement dans les neurones sensoriels de petits diamètres (**Figure 6B**).

La classification des neurones sensoriels primaires à l'échelle unicellulaire par analyse de données scRNA-seq permet d'attribuer à des profils transcriptomiques plus précis des fonctions spécifiques somesthésiques vis-à-vis de divers types de stimuli, mais la quantité de données et les classifications obtenues en complexifient leur interprétation, avec par exemple des fibres myélinisées PEP2 tombant dans la catégorie des neurones PEP et non NF, ou encore des fibres NP exprimant à la fois des marqueurs non peptidergiques et peptidergiques.



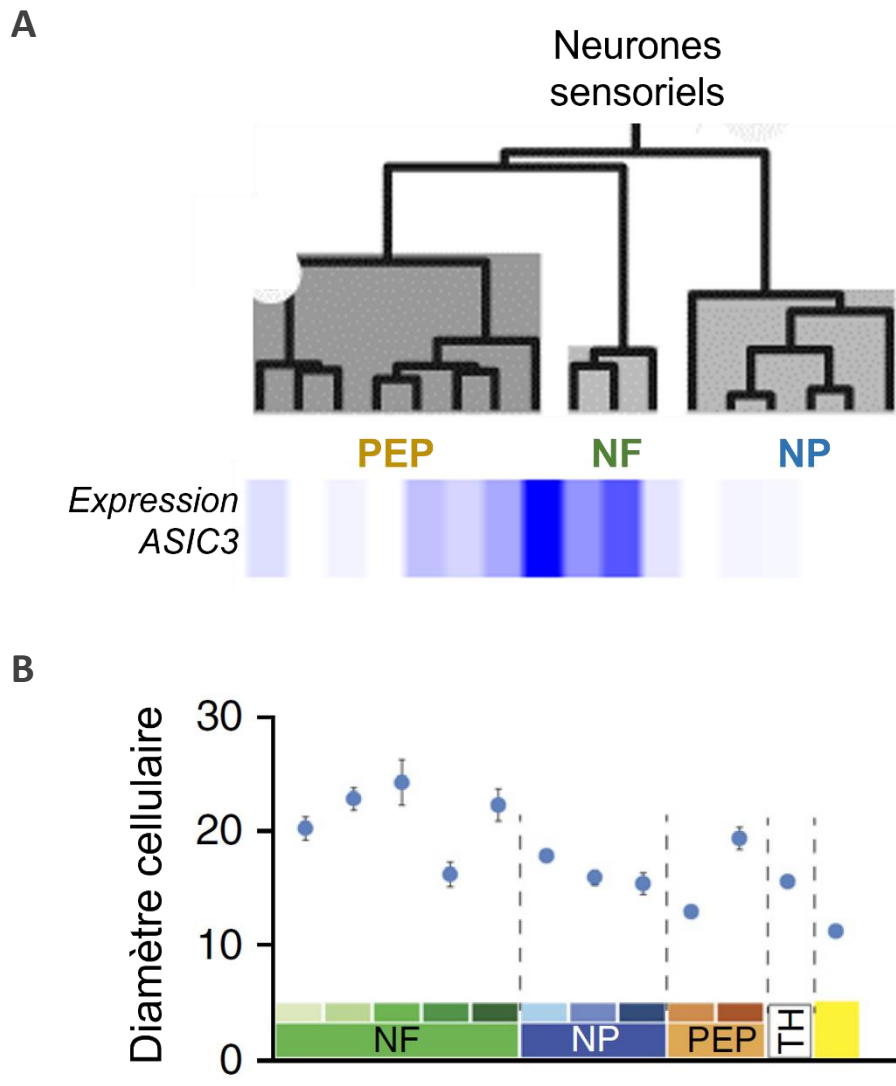
**B**

NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	NP1	NP2	NP3	PEP1	PEP2	TH
LDHB CACNA1H TRKB <sup>high</sup> NECAB2	LDHB CACNA1H TRKB <sup>low</sup> CALB1 RET	LDHB TRKC <sup>high</sup> FAM19A1 RET	LDHB TRKC <sup>low</sup> PV SPP1 CNTNAP2	LDHB TRKC <sup>low</sup> PV SPP1 CNTNAP2	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 GFRA2 MRGPRD	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 TRKA CGRP MRGPRA3	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 SST	TRKA CGRP KIT TAC1 PLXNC1 <sup>low</sup>	TRKA CGRP KIT CNTNAP2 FAM19A1	PIEZO2 <sup>high</sup> VGLUT3 GFRA2
	LTMRs	Proprioceptors				Nonpeptidergic		Peptidergic		C-LTMRs
NEFH	NEFH RET	Myelinated NEFH RET	NEFH ASIC1 RUNX3	NEFH ASIC1 RUNX3	RET TRPA1 TRPC3 NAV1.8/9	Unmyelinated RET TRPV1 TRPA1 TRPC3 NAV1.8/9		RET TRPV1	Myel. NEFH NAV1.8/9	Unmyel. RET TRPA1 NAV1.8/9

**Figure 5 : Classification des neurones sensoriels en fonction de leur profil transcriptomique par analyse single-cell RNA-seq de neurones de DRG lombaires de souris**

- A. Identification de 5 grands clusters cellulaires présents dans ces DRG : non neuronaux, myélinisés : NF cluster, peptidergiques : PEP cluster, non peptidergiques : NP cluster, ainsi qu'une sous classe de non myélinisés : TH cluster.
- B. Classification proposée : 11 sous-clusters identifiés constituant des classes de fibres sensorielles spécifiques. Les gènes au-dessus sont les marqueurs proposés pour cette classification, et les gènes au-dessous sont des exemples de gènes exprimés par ces neurones et couramment étudiés.

(D'après Usoskin et al., 2015)



**Figure 6 : Profil d'expression d'ASIC3 des différents types de neurones sensoriels et diamètre cellulaire moyen de chaque sous-cluster**

A. Profil d'expression d'ASIC3 par classe de neurones sensoriels obtenu par l'atlas en ligne du laboratoire Linnarsson. D'après les analyses scRNA-seq ASIC3 est exprimé dans les neurones peptidergiques (notamment de façon abondante dans les PEP2) et dans les neurones myélinisés. Il est en revanche très peu exprimé dans les neurones non peptidergiques amyélinisés.

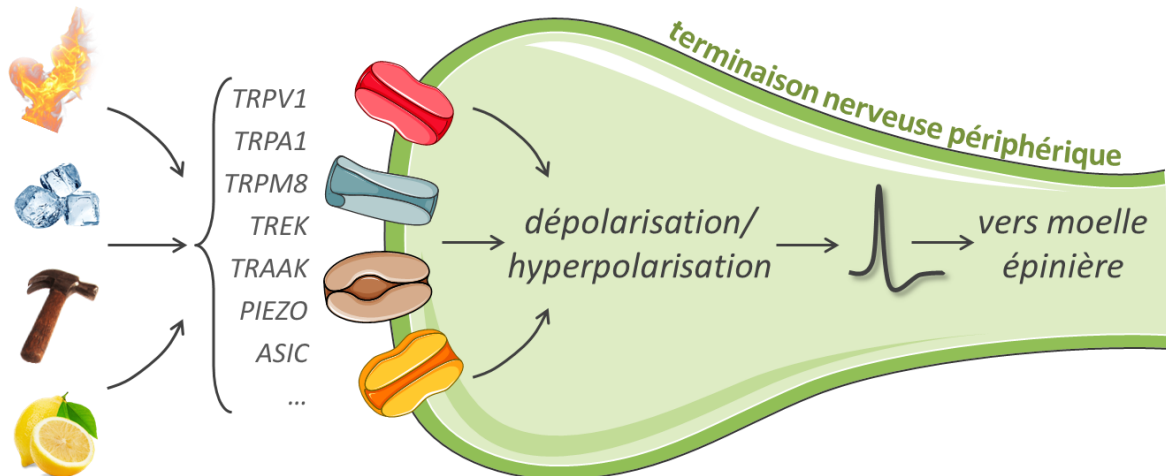
B. Diamètre moyen de chaque classe de neurones sensoriels identifiés par analyse scRNA-seq

(D'après Usoskin et al., 2015 ; et Zeisel et al., 2018)

### 3. Canaux ioniques, perception sensorielle et nociception : détection et transduction des stimuli aux terminaisons périphériques

Le relai des informations nociceptives des terminaisons périphériques jusqu'aux structures thalamo-corticales et cortico-limbiques, est permis grâce à des récepteurs et canaux ioniques membranaires exprimés par les neurones des fibres des voies centripètes de la douleur. À chaque niveau d'intégration des informations nociceptives, des canaux ioniques et des récepteurs sont activés ou inhibés et permettent la détection, la transduction, la transmission et l'intégration de ces signaux nociceptifs en message douloureux pour l'organisme.

Au niveau des terminaisons libres périphériques des nocicepteurs, les acteurs moléculaires de la détection et transduction des stimuli nocifs sont essentiellement des canaux ioniques (**Figure 7**), dont certains peuvent être activés spécifiquement par une modalité de stimulation (chaud, froid, mécanique, ou chimique), et d'autres peuvent être sensibles à diverses modalités de stimulation (polymodaux : canaux TRP, K2P...). La diversité de sensibilité des nocicepteurs aux différentes modalités de stimulation s'explique par un panel/répertoire d'expression hétérogène de canaux ioniques d'une classe de fibre à l'autre (**Dubin et Patapoutian, 2010**). Dans cette partie je ne dresserai pas de liste exhaustive de tous les canaux ioniques impliqués dans la transduction des différents stimuli, je m'intéresserai à quelques-uns d'entre eux afin d'illustrer les principales modalités de la transduction : mécanotransduction, thermotransduction, chemotransduction, et notamment à la découverte des canaux TRPV1 (**Caterina et al., 1997**) et des canaux Piezo (**Coste et al., 2010**) par les équipes de David Julius et Ardem Patapoutian respectivement, dont les travaux furent récompensés par le prix Nobel de médecine 2021 (**Ledford et Callaway, 2021**).



**Figure 7 : Détection et transduction des stimuli grâce à des canaux ioniques exprimés par une terminaison sensorielle périphérique**

Un panel d'expression de canaux ioniques membranaires dans les terminaisons sensorielles périphériques permet la détection et la transduction des stimuli. Si la somme des signaux électriques dépolarisants et hyperpolarisants est suffisante pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action, alors le message est transmis vers la moelle épinière.

### a. Mécanotransduction

Tous les êtres vivants sont dotés de perceptions mécaniques : les cellules procaryotes détectent des variations de pression osmotique, les plantes évoluent dans leur environnement par gravitropisme, les vers ou encore certains cnidaires se rétractent au toucher, et la plupart des eumétazoaires bilatériens sont dotés de perceptions sensorielles telles que l'ouïe et le toucher. Un certain nombre de protéines, telles que des constituants du cytosquelette, de la matrice extracellulaire, de récepteurs couplés aux protéines G, ainsi des canaux ioniques, sont impliquées dans des mécanismes conférant une sensibilité mécanique **(Chalfie, 2009; Scholz et al., 2016; Martino et al., 2018; Xu et al., 2018)**.

La mécanotransduction est la conversion de pressions mécaniques en signaux électriques, et l'étude des canaux mécano-sensibles (MS), exprimés notamment dans les terminaisons périphériques des fibres nociceptives est d'un grand intérêt afin de mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie de la sensibilité mécanique. Une question centrale dans ce domaine est comment un stimulus mécanique provenant de l'environnement extérieur provoque un changement d'état d'un canal MS en le faisant passer d'une conformation fermée à ouverte. Deux principaux modèles de transduction des stimuli mécaniques sont aujourd'hui proposés. Le modèle « tethering » (échafaudage) est basé sur le concept que les canaux MS sont ancrés à des complexes extracellulaires (matrice extracellulaire) et/ou intracellulaires (cytosquelette) formant des échafaudages moléculaires (tethers) via des molécules d'adhésion. Il propose que les forces mécaniques appliquées à la matrice extracellulaire ou au cytosquelette sont transmises aux canaux MS via ces échafaudages moléculaires, induisant leur changement conformationnel et leur ouverture. Le modèle de tension membranaire propose que des forces de tension appliquées à la bicouche lipidique activent directement des canaux MS en induisant un changement conformationnel et leur ouverture, ne faisant intervenir aucun autre composant. **(Arnadóttir et Chalfie, 2010; Ranade et al., 2015)**. Ce modèle fut suggéré à la suite de l'identification des premiers canaux MS, les canaux Msc (« Mecano-sensitive channels »), découverts chez *Escherichia coli*. Les canaux Msc sont directement activés par l'application de pressions mécaniques sur la membrane cytoplasmique (patch-clamp réalisé sur des sphéroplastes géants d'*E. coli*) et conservent leur mécano-sensibilité dans des liposomes artificiels, excluant ainsi toute participation d'échafaudage moléculaire auxiliaire **(Martinac et al., 1987; Häse et al., 1995; Sukharev et al.,**

**1994, 1997; Kung, 2005; Booth et al., 2007).**

Chez les métazoaires un certain nombre de canaux ioniques MS ont été identifiés, tels que les canaux Piezo, K2P ou encore certains canaux appartenant à la superfamille des canaux DEG/ENaC/ASIC.

### ***i. Canaux Piezo***

La découverte de la famille des canaux Piezo fut d'un grand intérêt afin de mieux comprendre la mécanotransduction (**Coste et al., 2010**). Ce sont les plus grands canaux ioniques identifiés à ce jour, dont chaque sous-unité est composée de plus de 2000 acides aminés formant 30 à 40 domaines transmembranaires et s'assemblant en homotrimères (**Coste et al., 2015; Wang et Xiao, 2018**). Ce sont des canaux cationiques non sélectifs activés par des stimuli mécaniques tels que l'étirement de la membrane plasmique, dont la famille ne contient que deux membres : Piezo1 et Piezo2. La première description du rôle physiologique des canaux Piezo fut réalisé chez le poisson zèbre et la drosophile. Chez la drosophile, DmPiezo, homologue des Piezo retrouvés chez les mammifères, joue un rôle dans la détection des stimuli mécaniques nociceptifs *in vivo* (**Kim et al., 2012**). Chez le poisson zèbre, la délétion génétique de Piezo2b abolit les réponses normalement évoquées par le toucher léger (**Faucherre et al., 2013**). Chez les mammifères, Piezo2 est exprimé dans des neurones nociceptifs et non nociceptifs de DRG et de TG (ganglions trigéminaux) (**Bron et al., 2014; Coste et al., 2010; Lou et al., 2013**), et des études montrent que Piezo2 pourrait jouer un rôle dans l'hyperalgie mécanique et l'allodynie (**Dubin et al., 2012; Eijkelkamp et al., 2013**), ainsi que dans le toucher léger (**Ikeda et al., 2014; Maksimovic et al., 2014; Woo et al., 2014**).

La fonction des canaux Piezo n'est pas restreinte au toucher et la nociception. En effet, des transcrits des Piezo ont été retrouvés dans plusieurs tissus tels que les reins (tubule proximal), la vessie, les poumons, les cellules endothéliales vasculaires ou encore le tissu adipeux (**Coste et al., 2010; Miyamoto et al., 2014; Ranade et al., 2014; Wang et al., 2020**). Dans le système urinaire, Piezo1 pourrait contribuer à la détection des changements de pression intraluminaire, du flux urinaire ainsi que des variations d'extension de la vessie (**Peyronnet et al., 2013; Miyamoto et al., 2014**), et serait également impliqué dans le développement et l'homéostasie du système cardiovasculaire (**Ranade et al., 2014; Li et al., 2014**). Dans le tissu adipeux, Piezo1 est impliqué dans la différenciation adipocytaire lors du



processus d'adipogenèse induit par un régime riche en lipides (Wang et al., 2020). Des mutations gain de fonction de Piezo1 sont associées à une forme d'anémie congénitale considérée rare, la xérocytose héréditaire, qui se caractérisent par une déshydratation des érythrocytes (Zarychanski et al., 2012; Albuissou et al., 2013; Bae et al., 2013). De manière intéressante, un allèle commun gain de fonction de Piezo1 a été identifié dans des populations africaines vivant dans des régions fortement touchées par la malaria, et des analyses in vitro montrent que les érythrocytes des porteurs de cet allèle présentent une réduction de l'infection par *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable de la malaria (Ma et al., 2018). Comme pour la drépanocytose, également associée à une certaine forme de résistance à *Plasmodium falciparum*, l'hypothèse d'une pression de sélection exercée par ce parasite sur le génome humain est privilégiée afin d'expliquer les forts taux de prévalence de ces pathologies dans les populations africaines (Feng et al., 2004; Hedrick, 2004; Ma et al., 2018).

## ***ii. Canaux K2P***

Les canaux potassium à 2 domaines pore constituent la superfamille la plus grande et plus diversifiée de tous les canaux ioniques connus, avec 15 gènes codant pour ces derniers chez l'humain. Ils jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de repos membranaire, et ainsi dans l'excitabilité neuronale. Ce sont des canaux qui ont un courant dit de fuite (ou de fond), dont l'activité basale entraîne la sortie d'ion  $K^+$  et ainsi une hyperpolarisation « tirant » le potentiel membranaire vers le potentiel d'équilibre du potassium (-80/-90mV), ce qui diminue l'excitabilité neuronale. Le premier canal de cette famille qui fut cloné est le canal TWIK1, cloné en 1996 à Nice par l'équipe du Dr Michel Lazdunski (Lesage et al., 1996). Depuis, de nombreux canaux K2P ont été identifiés, et quelques études ont montré que les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK (sous-famille TREK) sont mécano-thermo- et chemo-sensibles (Fink et al., 1998; Patel et al., 1998, 1999; Maingret et al., 1999a, 1999b, 2000a; Bang et al., 2000; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014). Ces derniers sont exprimés dans le système nerveux central et périphérique, notamment dans les neurones sensoriels de DRG (Enyedi et Czirják, 2010), et peuvent être activés par des forces mécaniques via des déformations de la membrane plasmique (Patel et al., 1998; Maingret et al., 1999b; Bang et al., 2000; Brohawn et al., 2012, 2014). Les souris délétées génétiquement pour ces canaux présentent une allodynie mécanique (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014), et en

conditions inflammatoires (injection de carraghénine), les souris TREK-1<sup>-/-</sup> développent une hyperalgie mécanique plus importante que les souris TREK-1<sup>+/+</sup> (Alloui et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'hyperpolarisation engendrée par les canaux TREK compense la dépolarisation neuronale induite par l'activation de canaux excitateurs en réponse à un stimulus mécanique de relativement faible intensité dans les neurones de DRG (Alloui et al., 2006).

### ***iii. Canaux DEG/ENaC/ASIC***

Les canaux DEG/ENaC/ASIC sont des canaux sodium insensibles au voltage et inhibés par l'amiloride. L'idée que les canaux appartenant à cette superfamille pourraient être mécano-sensibles émergea lorsque les premiers canaux ioniques mécano-sensibles eucaryotes furent identifiés dans des neurones sensoriels chez le nématode *Caenorhabditis elegans* : les canaux dégénérines (DEG), notamment MEC-4 et MEC-10, impliquant des complexes d'échafaudages moléculaires (Ernstrom et Chalfie, 2002; O'Hagan et al., 2005; Shi et al., 2016). Des mutations induisant une activation constitutive des canaux DEG provoquent la dégénération de neurones mécano-sensibles (ce qui leur doit leur nom), rendant les nématodes mutants incapables de répondre normalement à l'application d'un stimulus mécanique, tel que "prendre la fuite" ou rétracter leur corps (Chalfie et Sulston, 1981). Ainsi, chez la drosophile et les mammifères, les canaux ioniques codés par les gènes orthologues aux DEG furent proposés comme de potentiels candidats mécano-sensibles, notamment les canaux ASIC qui sont exprimés dans les neurones sensoriels DRG (Waldmann et al., 1997a, 1997b; Lingueglia et al., 1997; Chen et al., 1998; Bässler et al., 2001), mais les preuves de leur activation par des stimuli mécaniques sont moins évidentes.

La délétion génétique d'ASIC3 induit à la fois une diminution de sensibilité mécanique des fibres mécano-nociceptives en réponse à stimulus nocif et une augmentation de la sensibilité des fibres impliquées dans la détection du toucher léger (Price et al., 2001). D'autre part, il a été montré que les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ont une sensibilité exacerbée vis-à-vis de stimuli mécaniques de haute intensité par rapport au souris ASIC3<sup>+/+</sup>, supposant qu'ASIC3 jouerait un rôle modulateur de la perception des stimuli douloureux de haute intensité (Chen et al., 2002). En effet, cette étude montre une réponse exacerbée des souris ASIC3<sup>-/-</sup> lorsqu'une forte pression est appliquée sur la queue (tail pressure test), et aucune différence n'est observée entre les

souris ASIC3<sup>-/-</sup> et ASIC3<sup>+/+</sup> pour des stimuli mécaniques de plus faible intensité (test de von Frey), que ce soit dans un contexte inflammatoire (injection intra-plantaire de carraghénine) ou non (**Chen et al., 2002**).

Certaines études suggèrent qu'ASIC3 joueraient un rôle dans la mécanotransduction des fibres proprioceptives (**Lin et al., 2016; Lee et Chen, 2018**), et d'autres qu'il n'est pas impliqué dans la mécanotransduction des neurones sensoriels (**Drew et al., 2004**).

L'interprétation de l'ensemble de ces données n'est pas évidente, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la participation d'ASIC3 dans la mécanotransduction.

#### ***iv. Autres***

Il existe d'autres canaux qui ont été impliqués dans la mécanotransduction, comme les canaux TRP (pour revue, voir **Christensen et Corey, 2007**), ainsi que certains canaux de la famille des TMEM16 (pour revue, voir **Jin et al., 2020**). Récemment, il a été montré chez la souris que TRPC5 est impliqué dans le développement de d'hypersensibilités mécaniques (**Sadler et al., 2021**).

#### **b. Thermotransduction**

Hautement conservée parmi les organismes (bactéries, plantes, métazoaires), la perception des températures est une faculté indispensable pour la survie d'un organisme et son adaptation à l'environnement. En effet, la température joue un rôle crucial dans les réactions chimiques, la structure et fonction des molécules, et ainsi dans la physiologie et l'intégrité des cellules, tissus et organismes (**Tattersall et al., 2012**). Chez les mammifères, une perception altérée des températures peut entraîner un défaut de thermorégulation pouvant rapidement mettre la santé, voir la vie d'un organisme en péril (hyperthermie, hypothermie) (**Bouchama et Knochel, 2002; Brown et al., 2012**). À l'échelle moléculaire, des canaux ioniques ont été identifiés comme thermo-senseurs, notamment des canaux appartenant à la famille des canaux TRP (Transient Receptor Potential), capables de s'activer en réponse à différents panels de température, et qui exprimés dans les terminaisons périphériques des neurones sensoriels sont impliqués dans la transduction de stimuli thermiques en information électrique.

### ***i. Canaux TRP (Transient Receptor Potential)***

Les canaux TRP sont une grande famille de canaux cationiques non sélectifs regroupés en 7 sous-familles, dont 6 sont retrouvées chez l'humain. Leurs modalités de stimulation sont très diverses d'un canal à l'autre, et beaucoup d'entre eux sont connus pour être activés par des stimuli thermiques froids ou chauds. Ces canaux détectent quasiment la totalité de la gamme de températures perçues par les mammifères.

Parmi les canaux TRP senseurs au chaud, le canal TRPV1 appartenant à la sous-famille des TRPV (Vanilloïde) fut le premier identifié. Il est activé par des températures chaudes nocives (>43°C), ainsi que par un composé irritant du piment, la capsaïcine (**Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998**). Les souris TRPV1<sup>-/-</sup> ont un défaut de perception des températures chaudes nocives, et ne développent quasiment pas l'hyperalgie thermique induite par l'injection d'un composé inflammatoire (huile de moutarde ou carraghénine) observée chez les souris sauvages (**Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000**). Malgré ces déficits de perception thermique, les souris TRPV1<sup>-/-</sup> conservent tout de même une sensibilité à la chaleur, suggérant l'existence d'autres senseurs du chaud. TRPV2, canal le plus proche de TRPV1, est activé par des températures dépassant les 52°C en système hétérologue (**Caterina et al., 1999**) et se présentait ainsi comme un candidat intéressant dans la perception du chaud douloureux (**Caterina et al., 1999**). Mais une étude a montré *in vivo* que les souris TRPV2<sup>-/-</sup> n'étaient pas altérées dans leur perception du chaud nocif et, contrairement aux souris TRPV1<sup>-/-</sup>, elles développent une hyperalgie thermique dans un contexte inflammatoire de la même manière que les souris sauvages (**Park et al., 2011**). Les seuils d'activation en système hétérologue des canaux TRPV3 et TRPV4 se situent dans des gammes de températures entre 25 et 39°C (**Peier et al., 2002b; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002; Güler et al., 2002; Watanabe et al., 2002**). Initialement, des expériences de comportement sur des souris TRPV3<sup>-/-</sup> ainsi que sur des souris TRPV4<sup>-/-</sup> suggéraient que ces canaux étaient impliqués *in vivo* dans la détection des stimuli chauds non nocifs (**Moqrich et al., 2005; Lee et al., 2005**). Mais quelques années plus tard, des études remettent en questions ces résultats en démontrant qu'ils étaient dépendants du fond génétique et du sexe des souris utilisées (**Miyamoto et al., 2011; Huang et al., 2011**). Dans la sous-famille des canaux TRPM (Mélastatine), les canaux TRPM3 sont impliqués dans la détection des températures chaudes nocives ainsi que dans l'hyperalgie thermique inflammatoire (**Vriens et al., 2011**). Les canaux TRPM2, TRPM4 et TRPM5 participent à la

détection des températures chaudes non nocives (**Tan et McNaughton, 2016; Togashi et al., 2006; Talavera et al., 2005**).

Les premiers canaux TRP activés par des températures froides identifiés furent les canaux TRPM8, avec un seuil d'activation entre 25 et 23°C. Ces derniers sont également activés par des composés connus pour produire une sensation de froid, tels que le menthol et l'eucalyptol (**Peier et al., 2002a; McKemy et al., 2002**). Les fibres exprimant TRPM8 n'expriment aucun autre marqueur de classe de fibre particulier, et constituent ainsi une classe de fibre à part entière (**Peier et al., 2002a**). Les souris TRPM8<sup>-/-</sup> ont un défaut de perception thermique froide non nocive (30 à 18°C), mais semblent conserver une aversion en réponse à des températures froides nocives (<15°C) (**Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007**). Cependant, des études ont montré que l'ablation sélective des neurones exprimant TRPM8 engendre chez la souris un léger défaut d'aversion envers le froid nocif (**Pogorzala et al., 2013; Knowlton et al., 2013**). Ces résultats suggèrent qu'il existe des neurones exprimant d'autres senseurs du froid nocif.

Les canaux TRPA1, seul membre de la sous-famille TRPA (Ankyrine) retrouvé chez les mammifères, est activé par des températures froides nocives (≤17°C), et est sensible à énormément de composés, et notamment de nombreux composés irritants (**Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Sawada et al., 2007; Talavera et al., 2020**). Mais *in vivo* son implication dans la détection du froid nocif est moins évidente. Alors que certains auteurs affirment que les souris TRPA1<sup>-/-</sup> n'ont pas de comportement aversif envers des températures froides nocives (**Kwan et al., 2006; Karashima et al., 2009; Gentry et al., 2010**), d'autres études n'observent aucune différence entre les souris sauvages et TRPA1<sup>-/-</sup> (**Bautista et al., 2006; Knowlton et al., 2010**).

Dans la famille des TRPC (Canonique), le canal TRPC5 est activé en système hétérologue des températures entre 37 et 25°C, et bien qu'exprimé dans les neurones sensoriels, les souris TRPC5<sup>-/-</sup> n'ont pas de différence de perception du froid, mais cela serait peut-être dû à une compensation d'autres senseurs du froid tels que TRPM8 (**Zimmermann et al., 2011**).

## ***ii. Autres***

D'autres canaux pourraient jouer un rôle dans la thermoperception. C'est le cas notamment des canaux K2P (Maingret et al., 2000a; Kang et al., 2005; Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009), TMEM16 (Cho et al., 2012; Lee et al., 2014) et Na<sub>v</sub>1.8 (Zimmermann et al., 2007).

## **c. Chemotransduction**

De nombreux canaux ioniques possèdent une sensibilité chimique, c'est-à-dire qu'ils peuvent être modulés par certaines molécules, exogènes ou endogènes, dont certaines participent à l'induction de perceptions douloureuses. Dans cette partie j'évoquerai essentiellement les canaux ASIC ainsi que les canaux TRP.

### ***i. Canaux ASIC***

Les canaux ASIC (Acid-Sensing Ion Channels) doivent leur nom à leur sensibilité aux protons. En effet, ils sont les principaux détecteurs d'acidose tissulaire, c'est-à-dire qu'ils sont activés par une augmentation extracellulaire de la concentration en protons (Waldmann et al., 1997a, 1997b; Lingueglia et al., 1997; Chen et al., 1998; Bässler et al., 2001). Il a été montré chez l'humain qu'une acidification sous-cutanée produisait une sensation douloureuse (Steen et Reeh, 1993) dépendante d'ASIC3 (Ugawa et al., 2002; Jones et al., 2004). Les canaux ASIC seront plus en détail décrits dans la partie « II. Les canaux ASIC ».

### ***ii. Canaux TRP***

Comme énoncé plus précédemment, certains canaux TRP sont sensibles à des composés tels que le menthol et l'eucalyptol (TRPM8) (Peier et al., 2002a; McKemy et al., 2002) ou encore la capsaïcine et l'acidité (TRPV1) (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). TRPA1 est probablement à ce jour le canal connu pour être sensible au plus grand nombre de composés, tels que l'iciline (composé procurant une sensation de froid), ou encore des composés contenus dans la moutarde, le gingembre, la cannelle, l'ail, l'oignon, etc. (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Talavera et al., 2020).

### ***iii. Autres***

De nombreux autres canaux sont chemosensibles, tels que les récepteurs purinergiques P2X qui sont sensibles à l'ATP (Sarikaya, 2019), ou encore certains canaux

K2P. Ces derniers sont sensibles au pH intra- et extracellulaire (**Maingret et al., 1999b; Kim et al., 2001; Cohen et al., 2008; Sandoz et al., 2009**), et sont également activés par certains lipides, tels que l'acide arachidonique (effet direct) et la LPC (effet de membrane) (**Maingret et al., 2000b**).

#### 4. Douleur aiguë et douleurs chroniques

##### a. La douleur physiologique

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable qui joue un rôle fondamental dans la vie d'un organisme. Il est difficilement concevable qu'un système aussi complexe que la nociception ait pu évoluer et être conservé chez la plupart des animaux, sans que ces derniers n'en tirent un bénéfice. La capacité d'un organisme de percevoir les stimuli nocifs et douloureux lui permet d'être alerté d'un potentiel danger menaçant son intégrité, et de s'en protéger (réponses réflexes et comportementales), et participe ainsi à une forme d'apprentissage de son environnement : c'est un signal d'alarme essentiel à sa survie. La douleur permet également de rappeler la présence de plaies et blessures afin de les préserver de perturbations nocives externes néfastes à leur guérison. Chez un individu, l'impossibilité de ressentir la douleur compromet grandement ses chances de survie. C'est le cas de certaines familles, notamment au Pakistan et en Italie, atteintes d'insensibilité congénitale à la douleur, pathologie le plus fréquemment due à une mutation autosomale récessive perte de fonction du gène SCN9A codant pour le canal ionique  $Na_v1.7$  (plusieurs autres gènes et mutations ont également été décrits), normalement exprimé dans les neurones sensoriels de la nociception (**Cox et al., 2006; Goldberg et al., 2007; Ahmad et al., 2007; Young, 2008**).

##### b. Physiopathologie : douleurs chroniques

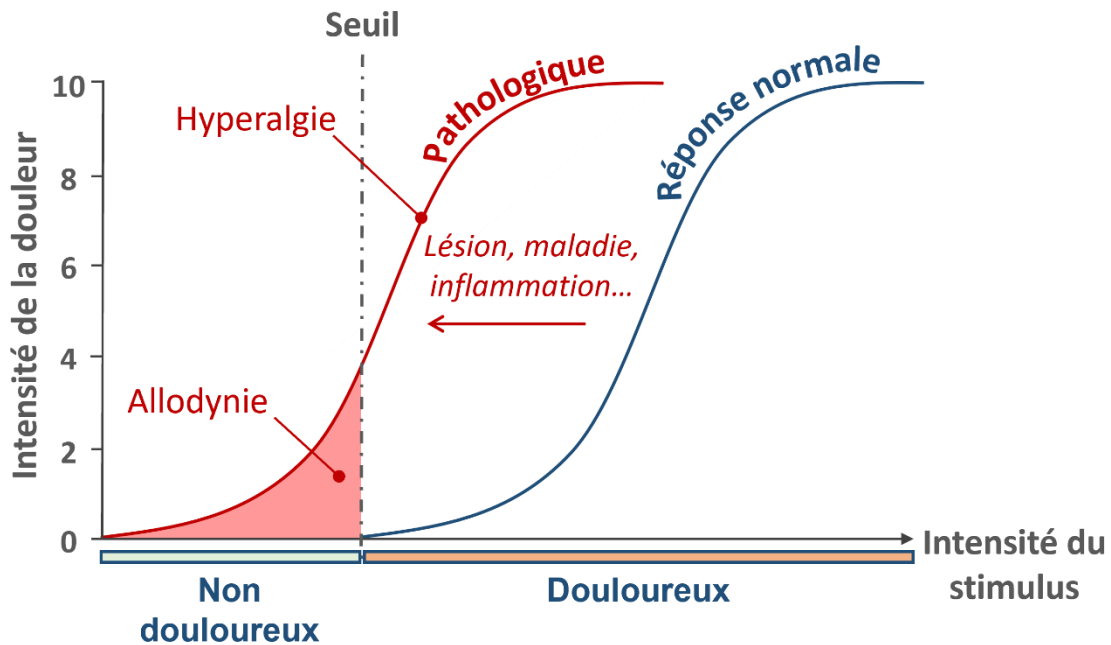
Bien que la perception de la douleur, par son rôle protecteur, soit une réponse physiologique essentielle à la survie d'un organisme, elle constitue une des causes majeures de consultation médicale. En effet, des douleurs persistantes peuvent se développer suite à une dérégulation du système nociceptif. La sensation de douleur perd sa fonction protectrice et n'a plus d'intérêt physiologique.

La nature et l'intensité des stimuli conditionnent le type de fibres afférentes activées et donc la nature des réponses sensorielles générées. En condition physiologique et en-dessous

d'un certain seuil d'intensité, un stimulus (non nocif) n'activera pas les fibres des voies du système nociceptif (fibres C et A $\delta$ ), mais uniquement les fibres ayant un seuil d'activation bas, c.-à.-d. les fibres de la proprioception et du toucher léger (fibres A $\alpha$  et A $\beta$ ). À partir d'un certain seuil d'intensité, la stimulation active les fibres nociceptives, et l'intensité de la douleur générée dépend de l'intensité du stimulus nocif. Ce seuil est quasi identique pour tous les individus, mais peut être affecté en cas de lésion, d'inflammation ou de pathologie, et être décalé vers des intensités de stimulation plus faibles : il y a sensibilisation des voies nociceptives. Ceci peut entraîner deux phénomènes : l'allodynie et l'hyperalgie. L'allodynie est une perception douloureuse en réponse à un stimulus normalement non douloureux, comme après un coup de soleil par exemple, et l'hyperalgie est une perception douloureuse exacerbée en réponse à un stimulus ordinairement nettement moins douloureux (**Figure 8**) (**Gottschalk et Smith, 2001**).

Chez l'humain, lorsque ces réponses douloureuses exacerbées persistent au-delà de trois mois, ou en tout cas au-delà d'un temps normal de guérison, on parle alors de douleurs chroniques, qui sont des pathologies du système nociceptif en elles-mêmes. Les douleurs ainsi générées deviennent délétères pour les patients, elles sont handicapantes et présentent une forte comorbidité avec des symptômes anxieux et dépressifs, ce qui impacte fortement leur quotidien, sommeil, vie personnelle et professionnelle, loisirs, humeur, etc. Les douleurs chroniques sont un fardeau clinique, économique et social qu'il devient urgent de traiter, les traitements antalgiques actuels étant décevants.





**Figure 8 : Intensité de la douleur subjective en conditions physiologiques et pathologiques**

En conditions physiologiques, il faut que l'intensité du stimulus atteigne un certain seuil pour qu'il soit perçu comme douloureux, et passé ce seuil, plus l'intensité du stimulus augmente, plus l'intensité de la douleur décrite augmente (courbe bleue). En conditions pathologiques (lésion, traumatisme, maladie, etc.), la courbe est décalée vers des intensités de stimulation plus basses, deux phénomènes physiopathologiques peuvent apparaître : l'allodynie et l'hyperalgie. L'allodynie est la perception douloureuse d'un stimulus normalement indolore, et l'hyperalgie est la perception d'une douleur exacerbée en réponse à une stimulation normalement moins douloureuse.

*(D'après Gottschalk and Smith, 2001)*

### **c. Les différents types de douleur chronique**

La problématique est qu'il n'existe pas qu'un seul type de douleur, mais plutôt plusieurs pathologies de douleurs chroniques qui diffèrent entre elles selon leurs origines et leurs causes. On distingue par exemple les douleurs post-opératoires des douleurs neuropathiques ou inflammatoires, ou encore les douleurs oro-faciales des musculosquelettiques, qui sont particulièrement réfractaires aux médicaments antalgiques actuellement disponibles sur le marché (Sheather-Reid et Cohen, 1998; Gatchel et Okifuji, 2006; O'Brien et Breivik, 2012; Dinakar et Stillman, 2016; Paladini et Varrassi, 2020).

En 2019, l'IASP, en collaboration avec l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) adopte une classification des douleurs chroniques, qui pour la première fois sera incluse dans la nouvelle édition de l'« International Classification of Diseases » (ICD-11). Bien qu'il existe différentes classifications possibles des douleurs chroniques, j'ai choisi de brièvement présenter cette classification qui répertorie ces douleurs en sept catégories (Treede et al., 2015). Notons que certains diagnostics peuvent être classés dans plusieurs catégories.

#### ***i. Douleurs chroniques primaires ou nociplastiques***

Les douleurs chroniques primaires sont considérées comme une maladie en soi, et se distinguent des douleurs chroniques secondaires qui sont la conséquence symptomatique d'une pathologie préexistante. Cette catégorie a été créée afin de classer certaines formes idiopathiques de douleurs chroniques connues mais dont l'étiologie n'est pas ou peu clairement définie. Elle regroupe notamment de nombreux syndromes douloureux tels que la fibromyalgie, le syndrome du côlon irritable, des douleurs oro-faciales, migraineuses ou encore musculosquelettiques dites *primaires*, c.-à.-d. qui ne peuvent être attribuées à un autre diagnostic (Nicholas et al., 2019).

#### ***ii. Douleurs chroniques secondaires***

##### ***Douleurs chroniques neuropathiques***

Des lésions ou maladies du système nerveux somatosensoriel peuvent conduire à une perte d'activité des nerfs touchés, mais également à une sensibilité exacerbée (hyperalgies et allodynies), ainsi qu'à des douleurs spontanées. Ces douleurs neuropathiques évoluent souvent en douleurs chroniques et la majorité des patients ne sont pas soulagés par les

traitements antalgiques disponibles. Les causes des neuropathies peuvent être multiples (trauma du système nerveux, zona, diabète, AVC, cancer...), peuvent toucher le système nerveux central comme le système nerveux périphérique, et selon les nerfs touchés induisent des symptômes douloureux différents. Cette classification distingue les douleurs neuropathiques chroniques du système nerveux périphérique et du système nerveux central (Scholz et al., 2019).

#### *Douleurs chroniques cancéreuses*

Les douleurs cancéreuses peuvent être causées par la présence de la tumeur primaire en elle-même (ou des métastases), mais également par les traitements anticancéreux (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie...). Les douleurs peuvent être viscérales, osseuses, neuropathiques, ou encore post-chirurgicales, et peuvent ainsi être croisées avec d'autres catégories de cette classification. Dans cette sous-catégorie, une attention particulière est portée à la distinction entre les douleurs liées aux traitements anticancéreux et les douleurs liées directement à la présence du cancer, car ces dernières peuvent être indicatrices d'évolution de la malignité tumorale et de rechute, notamment chez les patients en rémission (Bennett et al., 2019).

#### *Douleurs chroniques post-opératoires et post-traumatiques*

Les douleurs chroniques post-opératoires et post-traumatiques sont définies par des douleurs anormalement persistantes à la suite d'une intervention chirurgicale ou d'un traumatisme tissulaire lié à une blessure. Ces douleurs chroniques sont fréquentes, et bien que dans les deux cas l'origine de ces douleurs soit un trauma tissulaire, soit lié à une intervention intentionnelle (incision, etc.) dans le but de soigner (post-opératoire), soit causé par un accident (post-traumatique), cette catégorie fait tout de même la distinction entre les deux (Schug et al., 2019). Afin d'établir le bon diagnostic, il est important de vérifier plusieurs points : la douleur est localisée dans la zone de la chirurgie ou de la blessure, ou dans un territoire innervé par ce champ, elle n'était pas présente avant et n'est pas due à la pathologie initiale qui avait amené à l'intervention chirurgicale et ni à une complication chirurgicale autre, telle qu'une infection post-opératoire. Même si ces types de douleurs sont souvent neuropathiques, cette nouvelle classification en font une catégorie à part. Les chirurgies du sein, thoraciques et herniaires, ainsi que les amputations (douleurs fantômes), sont les cas les

plus connus associés au développement de douleurs chroniques post-opératoires. Les causes de douleurs chroniques post-traumatiques sont multiples : brûlures (chaud, froid, chimique, électrique, etc.), coup du lapin, trauma musculosquelettique (fractures, etc.) (**Viel et al., 2013; Schug et al., 2019**).

#### *Céphalées et douleurs oro-faciales chroniques*

Cette catégorie se distingue des maux de tête primaires (idiopathiques), et n'inclue que les formes symptomatiques secondaires de céphalées et de douleurs oro-faciales chroniques, lorsque celles-ci sont ressenties au moins deux heures par jour, *a minima* sur 50% des journées sur une période supérieure à trois mois. Les causes à l'origine de ces douleurs peuvent être multiples, comme des atteintes neuropathiques trigéminales, des troubles temporo-mandibulaires, neurovasculaires, ou dentaires, des abus médicamenteux, ou encore une origine infectieuse (**Benoliel et al., 2019**)

#### *Douleurs chroniques viscérales*

Les douleurs chroniques viscérales sont la conséquence d'affections d'organes internes localisées au niveau thoracique, abdominal ou pelvien, et se distinguent des douleurs chroniques viscérales primaires. Elles peuvent être d'origine vasculaire, inflammatoire ou encore mécanique, et persister au-delà de la guérison de l'affection initialement à l'origine de ces douleurs. Les patients souffrant de douleurs chroniques viscérales présentent souvent d'autres types de douleurs chroniques, viscérales ou non. Par exemple des dysménorrhées associées à des gastrites chroniques, ou encore la fibromyalgie qui présente une forte comorbidité avec des douleurs viscérales. Cette classification répertorie une multitude d'affections et pathologies pouvant conduire à des douleurs viscérales chroniques, telles que la maladie de Crohn, l'endométriose, une pancréatite chronique, une prostatite chronique, une ischémie chronique, des caillots rénaux ou biliaires, etc. (**Aziz et al., 2019**).

#### *Douleurs chroniques musculosquelettiques*

Les douleurs chroniques musculosquelettiques représentent la catégorie à la plus forte prévalence. Elle regroupe les douleurs chroniques associées à des troubles musculosquelettiques (TMS) qui ont pour origine une affection des tissus musculosquelettiques (os, cartilage, muscles, articulations, tissus mous avoisinants). Les douleurs musculosquelettiques peuvent être la conséquence de pathologies inflammatoires

liés à des infections, des dépôts de cristaux, et des maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite). Elles peuvent également être associées à des dommages structurels n'ayant pas d'origine inflammatoire tels que l'ostéoarthrose (OA), ou encore à des maladies du système nerveux telles que la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaque, bien que certaines douleurs associées à cette dernière puissent être classées dans la catégorie des douleurs neuropathiques (**Perrot et al., 2019**). Les douleurs associées aux TMS sont souvent réfractaires aux traitements, et non soignées, elles évoluent vers des pathologies douloureuses chroniques. Selon une étude de l'Inserm, douze à treize millions de Français souffrent de rhumatismes, dont 600 000 de troubles musculosquelettiques inflammatoires chroniques. Les douleurs ostéoarticulaires ne touchent pas uniquement les seniors, un tiers des patients ont entre 18 et 24 ans, et 4000 enfants souffrent d'arthrite juvénile idiopathique (**Dossier de presse, Inserm, 2016**).

L'amélioration des traitements passe par une meilleure compréhension de la physiopathologie des différents types de douleurs et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Aujourd'hui, les médecins constatent le manque d'innovation qui existe depuis des années en termes de nouvelles molécules antalgiques mises sur le marché.

## **B. Traitements pharmacologiques de la douleur**

Afin d'améliorer la prise en charge palliative des patients cancéreux et soulager leurs douleurs associées, l'Organisation Mondiale de la Santé met en place dans les années 1980 une échelle graduelle de prescription des différents traitements antalgiques disponibles. L'utilisation de cette échelle est aujourd'hui étendue à la prise en charge de tout type de douleurs, aiguës comme chroniques, et suivant leur intensité, leurs prises en charge est effectuée selon trois stades pharmacologiques :

- les antalgiques non morphiniques (paracétamol, anti-inflammatoires non stéroïdiens)
- les antalgiques morphiniques faibles (tramadol, codéine...)
- les antalgiques morphiniques forts (morphine, fentanyl, oxycodone...)

## 1. Antalgiques non morphiniques : palier 1

### a. Le paracétamol (acétaminophène)

Le paracétamol, ou acétaminophène, est l'un des médicaments le plus utilisé dans le monde, un standard des traitements antipyrétiques et antalgiques pour soulager des douleurs faibles à modérées. Ses effets sont comparables aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), à l'exception qu'il ne semble pas posséder d'action anti-inflammatoire. Le paracétamol peut être utilisé en association avec des antalgiques morphiniques faibles ou forts appartenant respectivement au second et troisième palier afin de soulager des douleurs plus intenses. (**Jóźwiak-Bebenista et Nowak, 2014**). Découvert il y a plus de 100 ans, son mécanisme d'action n'est toujours pas clairement établi, et il semblerait intervenir dans différents mécanismes principalement au niveau du système nerveux central (**Piletta et al., 1991; Bannwarth et al., 1992; Anderson, 2008; Sharma et Mehta, 2014; Mallet et al., 2017**). Il a été montré qu'après sa déacétylation hépatique en *p*-aminophénol, le paracétamol est ensuite métabolisé dans le cerveau par l'enzyme FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) pour former un métabolite, l'AM404 (*N*-arachidonoylphénolamine) (**Högestätt et al., 2005; Muramatsu et al., 2016**). L'implication du paracétamol dans différents mécanismes (voir plus bas) est principalement expliqué par l'intermédiaire AM404 (**Zygmunt et al., 2000; Högestätt et al., 2005; Mallet et al., 2008, 2010; Dalmann et al., 2015; Kerckhove et al., 2014**). Ce métabolite du paracétamol est majoritairement retrouvé dans le cerveau (**Högestätt et al., 2005; Muramatsu et al., 2016**), et l'inhibition spécifique de la FAAH dans cette région abolit l'effet antalgique du paracétamol (**Dalmann et al., 2015**), appuyant l'hypothèse d'un effet central du paracétamol. Voici une synthèse des différents mécanismes dans lesquels a été impliqué le paracétamol :

→ Inhibition de la production de prostaglandines via inhibition des enzymes de conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Cependant, il semble majoritairement inhiber les COX du système nerveux central, avec un effet négligeable en périphérie, ce qui expliquerait l'absence significative d'effet anti-inflammatoire malgré un effet inhibiteur des COX (**Flower et Vane, 1972; Ouellet et Percival, 2001; Bonnefont et al., 2003; Boutaud et al., 2002; Warner et al., 2004; Bertolini et al., 2006**). Certaines études suggèrent que le

paracétamol posséderait tout de même une légère action antiinflammatoire, qu'il possède des effets cliniques comparables à certains AINS sélectifs des COX-2, et une meilleure affinité pour les COX-2 que pour les COX-1, ce qui expliquerait le peu d'effets secondaires typiquement observés pour les inhibiteurs sélectifs des COX-2 (voir partie suivante : b. Les AINS) (**Graham et Scott, 2005; Bertolini et al., 2006; Hinz et al., 2008**).

- Activation du système sérotoninergique descendant inhibant ainsi la transmission nociceptive au niveau spinal (**Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996; Alloui et al., 2002; Pickering et al., 2006, 2008**).
- Inhibition des voies de synthèse de l'oxyde nitrique (**Björkman et al., 1994; Bujalska, 2004**).
- Interaction avec le système endocannabinoïde via les récepteurs CB1 (**Ottani et al., 2006; Mallet et al., 2008; Barrière et al., 2013**).
- Activation des récepteurs TRPV1 dans le cerveau (**Zygmunt et al., 2000; Mallet et al., 2010; Barrière et al., 2013**) dépendante des canaux Ca<sub>v</sub>3.2 (**Kerckhove et al., 2014**).

Les effets antalgiques du paracétamol qui ont été associés aux récepteurs CB1, aux canaux TRPV1 et à l'enzyme FAAH semblent faire intervenir des mécanismes localisés dans plusieurs régions supraspinales impliquées dans la douleur (amygdale, cortex somesthésique, l'hypothalamus), et plus particulièrement dans la substance périaqueducule (**Barrière et al., 2020**).

### **b. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les AINS ont des effets antipyrétiques, antalgiques et antiinflammatoires, et sont prescrits pour soulager des douleurs faibles à modérées associées ou non à une inflammation. Il y a près de 200 ans, la salicine fut extraite et purifiée à partir d'écorce de saule blanc *Salix alba*, arbre dont l'utilisation pour ses propriétés antipyrétiques et antiinflammatoires remonte à il y a plus de 4000 ans (**Mahdi, 2010**). Le dérivé synthétique de la salicine est aujourd'hui connu et prescrit sous le nom d'acide acétylsalicylique (aspirine), et la liste des AINS disponibles sur le marché s'est depuis agrandie (ibuprofène, flurbiprofène, etc.).

Leur mécanisme d'action passe par l'inhibition des cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) bloquant ainsi la production des prostaglandines. Alors que COX-1 et COX-2 participent l'une et l'autre à la production de prostaglandines, l'activité constitutive de COX-1 a un effet

protecteur (gastrointestinal, rénal, agrégation plaquettaire), tandis que COX-2 participe à la réponse inflammatoire à la suite d'une lésion tissulaire par exemple (**Cashman, 1996; Hylands-White et al., 2017**). Ainsi, les effets indésirables (gastrointestinaux, cardiovasculaires, rénaux, etc.) des AINS inhibiteurs non sélectifs des COX seraient en partie dus à l'inhibition de COX-1. Toutefois, tous les AINS ne présentent pas la même affinité pour COX-1 et COX-2, et le ratio d'inhibition de COX-1/COX-2 des différents AINS est un point important à prendre en considération par les médecins pour le choix d'AINS à prescrire chez certains patients (**Cashman, 1996; Green, 2001**). Ainsi, il y a un grand intérêt à développer des AINS sélectifs de COX-2, ou en tout cas dont le ratio d'inhibition est nettement en faveur de COX-2. Parmi les premiers inhibiteurs sélectifs des COX-2 développés nous pouvons citer le célécoxib et le rofécoxib. En revanche l'ibuprofène, le flurbiprofène ou encore le naproxène ont une plus grande affinité pour COX-1 (**Alcaix, 2012**). L'ostéoarthrite (OA) représenterait la moitié des motifs de prescriptions d'AINS, et certains AINS majoritairement sélectifs des COX-2 sont préférentiellement prescrits pour certaines arthropathies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde (**Green, 2001**).

L'inhibition des COX dans les tissus enflammés expliquerait l'effet antiinflammatoire des AINS, et leurs effets antalgiques seraient dus à la réduction des facteurs inflammatoires libérés, bloquant ainsi la sensibilisation des neurones sensoriels (**Hylands-White et al., 2017**). Les effets antalgiques des AINS sont aussi attribués à des actions au niveau du système nerveux central : activation des voies sérotoninergiques descendantes (**McCormack, 1994; Björkman, 1995**), interaction avec le système opioïdérique (**Martini et al., 1984; Björkman, 1995**) et de l'oxyde nitrique (**Björkman, 1995; Cashman, 1996**).

## 2. Antalgiques morphiniques faibles et forts : palier 2 et palier 3

### a. Généralités des antalgiques morphiniques

Les antalgiques morphiniques, aussi appelés antalgiques opioïdes, sont des alcaloïdes (opiacés) ou dérivées synthétiques d'alcaloïdes (opioïdes) présents dans l'opium. L'opium est extrait des graines ou du latex du pavot *Papaver somniferum*, plante herbacée dont les utilisations à visée thérapeutique ou récréative remontent à l'Antiquité. De récentes datations réalisées sur des graines retrouvées sur des sites archéologiques en Europe, notamment dans les Alpes suisses, estiment que le pavot était déjà cultivé au Néolithique (**Salavert et al., 2020**).



Dans le système nerveux central, et en particulier dans les voies impliquées dans la transmission des messages nociceptifs, les antalgiques morphiniques se lient aux mêmes récepteurs que les opioïdes endogènes, mimant ainsi leurs effets antinociceptifs en inhibant la transmission neuronale.

L'activation des récepteurs opioïdiques mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) et kappa ( $\kappa$ ) par les opioïdes/opiacés entraîne l'ouverture des canaux potassium induisant ainsi une hyperpolarisation de la membrane plasmique des neurones pré- et postsynaptiques. L'hyperpolarisation d'un neurone postsynaptique a un effet inhibiteur sur la transmission synaptique. Au niveau présynaptique, une hyperpolarisation de la membrane inhibe l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendants normalement activée par l'arrivée d'un influx électrique, empêchant ou diminuant ainsi la libération calcium-dépendante de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (**Law et al., 2000; Zöllner et Stein, 2007; Maldonado, 2010; Ghelardini et al., 2015**).

La naloxone est un antagoniste compétitif des récepteurs opioïdiques, et est utilisé en clinique afin de reverser les surdosages d'antalgiques opioïdiques, mais c'est également un outil pharmacologique très utilisé en recherche dans le cadre d'études visant à mieux comprendre certains mécanismes d'action du système opioïdique (**Trescot et al., 2008; Ghelardini et al., 2015**).

#### **b. Les antalgiques morphiniques faibles : palier 2**

Les antalgiques morphiniques faibles sont prescrits pour soulager des douleurs généralement modérées à intenses, réfractaires aux traitements antalgiques non morphiniques seuls du premier palier, mais avec lesquels ils sont souvent co-administrés pour des effets antalgiques synergiques (**Dionne, 1999; Palangio et al., 2000; Raffa, 2001**). Parmi les plus connus nous pouvons citer la codéine (opiacé) et le tramadol (opioïde).

#### **c. Les antalgiques morphiniques forts : palier 3**

Lorsque aucun des précédents antalgiques de palier 1 et 2 prescrits n'ont été efficaces, les médecins se tournent alors vers une prescription d'opioïdes forts. L'antalgique morphinique fort de référence est la morphine, premier alcaloïde extrait à partir de l'opium en 1804 par un pharmacien allemand Freidrich Wilhelm Adam Sertürner (**Trescot et al., 2008; Devereaux et**

**al., 2018**). Au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle la morphine devient le traitement de référence des douleurs chroniques et intenses (**Devereaux et al., 2018**). Aujourd'hui de nombreux antalgiques morphiniques sont utilisés pour traiter ces douleurs, parmi lesquels nous pouvons citer le fentanyl, agoniste synthétique des récepteurs opioïdiques dont l'effet est environ 80 fois plus puissant que la morphine (**Trescot et al., 2008**), mais également l'oxycodone ou encore l'hydromorphone.

### 3. Antalgiques locaux/topiques

Les anesthésiques locaux de la famille des « -caïne » bloquent l'influx nerveux en inhibant les canaux sodium impliqués dans la transmission synaptique (lidocaïne, tétracaïne, novocaïne, etc.). La lidocaïne est le traitement antalgique topique (sous forme de patches) le plus couramment utilisé, notamment afin de réaliser de petits actes de chirurgie, et elle est également prescrite comme antalgique de première ligne afin de soulager les douleurs neuropathiques périphériques et localisées (**Dworkin et al., 2007**).

Certains AINS tels que le diclofénac, et certains opioïdes comme le fentanyl ou la buprenorphine, peuvent être administrés de manière topique, limitant ainsi de manière draconienne les effets secondaires (**Altman et Barthel, 2011; Grape et al., 2010; Pergolizzi et al., 2010**).

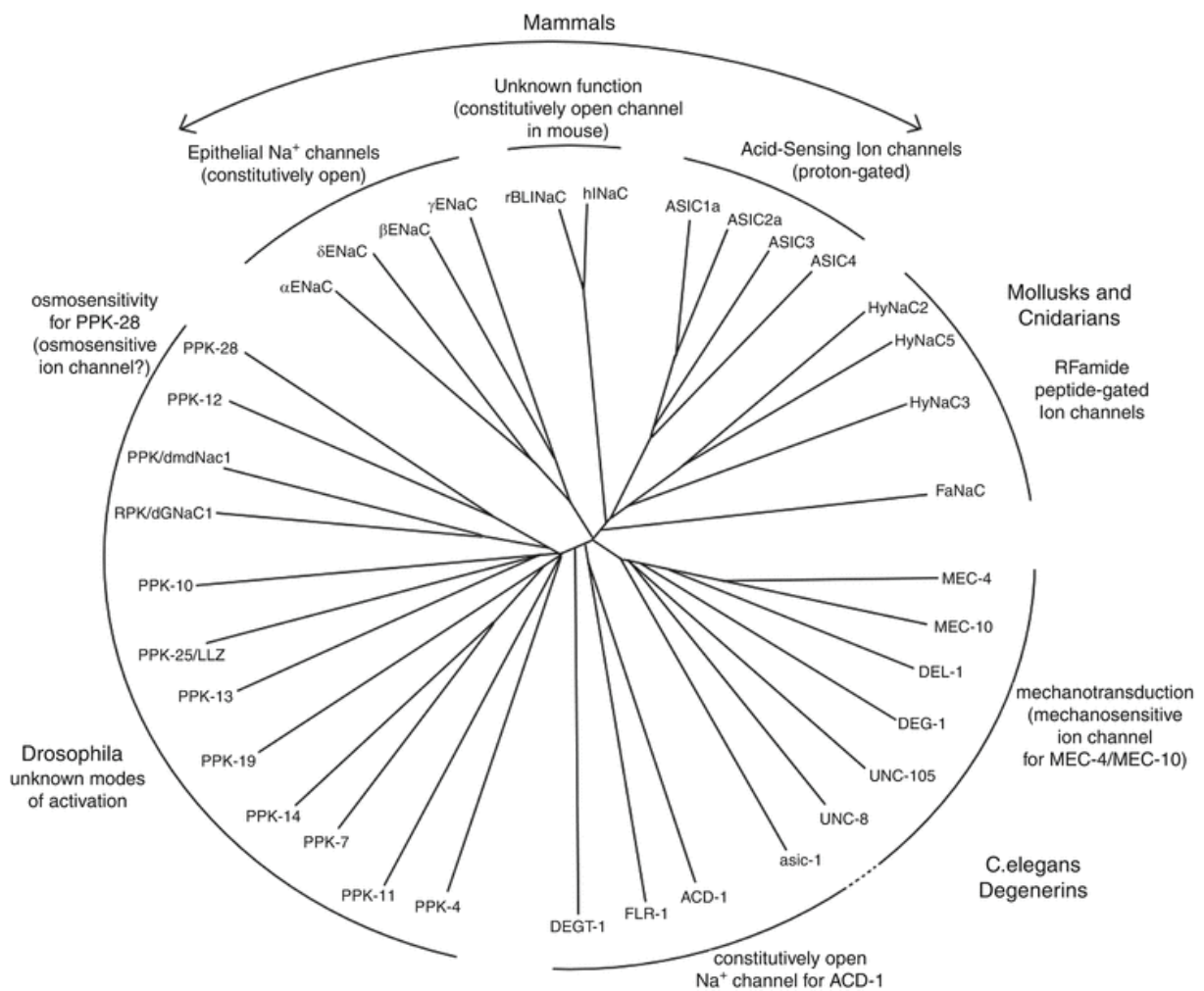
### 4. Adjuvants et antalgiques adjuvants

Certains médicaments peuvent être prescrits en parallèle d'un traitement antalgique à n'importe quelle étape de l'échelle établie par l'OMS afin de traiter les comorbidités souvent associées aux douleurs, tels que les anxiolytiques, les hypnotiques, ou encore les myorelaxants (**Hylands-White et al., 2017**).

D'autres médicaments qui n'étaient initialement pas développés pour traiter les douleurs, tels que les antidépresseurs ou encore les antiépileptiques (anticonvulsants), ont des propriétés antalgiques et sont utilisés comme antalgiques adjuvants afin de traiter certaines douleurs chroniques comme les douleurs neuropathiques ou la fibromyalgie (**Sawynok et al., 2001; Goldenberg et al., 2004; Mitra et Jones, 2012**).

## II. Les canaux « Acid Sensing Ion Channels » (ASIC)

Les canaux ioniques ASIC (« Acid Sensing Ionic Channels ») répondent spécifiquement à un stimulus chimique : l'acidité extracellulaire. Ce sont des canaux cationiques majoritairement sodium, qui appartiennent à la superfamille des canaux ENaC/DEG (Epithelial Sodium Channel/Degenerin) (**Figure 9**) (Lingueglia, 2013). Mis en évidence et clonés dans les années 1990 par l'équipe du Pr Michel Lazdunski, ils sont aujourd'hui décrits comme des acteurs importants de la nociception.



**Figure 9 : Arbre phylogénétique de la superfamille des canaux ENaC/DEG/ASIC**

(D'après Lingueglia, 2013)

## A. Découverte et clonage des récepteurs à protons

C'est à l'époque de l'invention de la technique du patch-clamp par Erwin Neher et Bert Sakmann, prix Nobel de médecine 1991, que les premières études suggérant l'existence d'un récepteur à protons furent publiées. La première description de courants entrants dépolarisants (majoritairement sodium) activés par une acidification extracellulaire dans des neurones sensoriels isolés de ganglions trigéminaux et spinaux de rat (ainsi que dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris) fut faite par l'équipe du Pr Oleg Krishtal en 1980 (**Krishtal et Pidoplichko, 1980, 1981a**). C'est en voulant réaliser une relation dose-réponse à la sérotonine dans des cellules de neuroblastome qu'un courant transitoire entrant s'activa en réponse à une des solutions préparées. Mais très vite ils réalisent que le tampon avait été oublié, que cette solution était acide, et que c'est cette acidité qui active ce courant. À l'époque déjà, ils émettent l'hypothèse du possible rôle de ce « récepteur à protons » dans la nociception, en établissant une corrélation entre les neurones sensoriels sensibles/insensibles à une acidification extracellulaire et leur taille. En effet, ils remarquent que la majorité des neurones sensoriels de petits diamètres sont sensibles aux protons (à l'inverse la majorité des neurones de plus gros diamètre y sont insensibles). Les influx nerveux évoqués par des stimuli nociceptifs étant principalement portés par des fibres de faible diamètre (les fibres A $\delta$  et C), et certaines acidoses tissulaires étant associées à des douleurs, cela conforte l'équipe du Pr Oleg Krishtal dans le rôle de ce canal, encore appelé « récepteur à protons » à l'époque, dans la nociception (**Krishtal et Pidoplichko, 1981b, 1981c**). Quelques années plus tard, ils montrent que ces courants induits par les protons sont inhibés par l'amiloride, une molécule prescrite comme diurétique (**Korkushko and Kryshstal, 1984**).

## 1. ASIC2

Au milieu des années 1990, deux équipes indépendantes clonèrent la même année le même canal cationique, inhibé par l'amiloride, et qui fut baptisé BNC1 (Brain Na<sup>+</sup> Channel 1) (**Price et al., 1996**), et MDEG (Mammalian Degenerin) (**Waldmann et al., 1996**). Son expression semble n'être spécifique qu'au système nerveux central. C'est un peu plus tard que l'équipe du Pr Michel Lazdunski montra que ce canal BNC1/MDEG est activé par une acidification extracellulaire, et fut renommé ASIC2 (aujourd'hui nommé ASIC2a) (**Lingueglia et al., 1997; Waldmann et Lazdunski, 1998**). Un variant d'épissage d'ASIC2a fut découvert, MDEG2, dont la forme homomérique est insensible au pH, et il sera renommé ASIC2b (**Lingueglia et al., 1997; Waldmann et Lazdunski, 1998**).

## 2. ASIC1a

C'est entre le clonage du canal BNC1/MDEG et son changement de nomenclature en ASIC2, que l'équipe du Pr Michel Lazdunski identifia pour la première fois le récepteur à protons. Ils n'ont alors aucune connaissance des précédents travaux de l'équipe du Pr Oleg Krishtal réalisées plus de 15 ans plus tôt, et ça n'est qu'en rédigeant l'article qu'ils découvrent leurs publications. Le récepteur à protons décrit dans les deux groupes partage beaucoup de propriétés, et tout laisse penser qu'il s'agit en réalité du même canal. Il est exprimé dans les neurones sensoriels ainsi que dans le système nerveux central, et est inhibé par l'amiloride. Le récepteur à protons nouvellement cloné fut alors nommé ASIC pour Acid-sensing Ion Channel (**Waldmann et al., 1997a**), il s'agit d'ASIC1a (anciennement nommé BNC2 $\alpha$  et ASIC $\alpha$ ), et bien que cloné après BNC1/MDEG (ASIC2), ce fut la première isoforme identifiée comme appartenant à la famille des récepteur à protons (**Waldmann et Lazdunski, 1998**).

## 3. ASIC3

Une autre isoforme appartenant à la famille des canaux ASIC a été identifiée et clonée : le canal DRASIC (Dorsal Root ASIC). En effet, le canal DRASIC semble être spécifiquement exprimé dans les neurones sensoriels, et sa conductance activée par les protons est inhibée par l'amiloride (**Waldmann et al., 1997b**). Le courant activé en réponse à une acidification extracellulaire rapide est biphasique, il présente une activation rapide (pic), suivi d'une inactivation incomplète avec un courant soutenu (plateau). Ce type de courant avait déjà été

décrit dans des neurones sensoriels de rat quelques années avant le clonage du canal DRASIC (**Bevan et Yeats, 1991**), mais aussi par l'équipe du Pr Oleg Krishtal (**Krishtal et Pidoplichko, 1981c**). DRASIC sera renommé l'année suivant son clonage : ASIC3 (**Waldmann et Lazdunski, 1998**).

#### 4. ASIC1b

Dans la continuité de l'identification des différentes isoformes ASIC, un variant d'épissage d'ASIC1a, ASIC1b (anciennement nommé BCN2 $\beta$  et ASIC $\beta$ ) fut cloné (**Chen et al., 1998**). Non exprimé dans le système nerveux central, ASIC1b est majoritairement exprimé dans des neurones sensoriels de petits et larges diamètres et est également sensible à l'amiloride. En système hétérologue sa forme homomérique partage des propriétés cinétiques proches de celle d'ASIC1a (**Chen et al., 1998; Bässler et al., 2001**).

#### 5. ASIC4

Les ASIC sont définis par leur homologie de séquence, ainsi certains canaux identifiés comme appartenant à la famille des ASIC sont insensibles aux protons. Un quatrième membre de la famille fut identifié dans les années 2000, ASIC4 (ou SPASIC pour « spinal cord ASIC »), qui comme ASIC2b homomérique, n'est pas activé par acidification extracellulaire. Retrouvé dans le SNC, ASIC4 est fortement exprimé dans la glande pituitaire, mais ses rôles physiologiques restent encore mal connus (**Akopian et al., 2000; Gründer et al., 2000; Du et al., 2014**). Tout récemment une étude a montré chez la souris que la régulation de l'expression d'ASIC4 par une protéine (la follistatine) dans l'hippocampe, pourrait jouer un rôle dans l'apprentissage et la potentialisation à long terme (**Chen et al., 2021**).

## B. Propriétés

### 1. Diversité et propriétés structurales

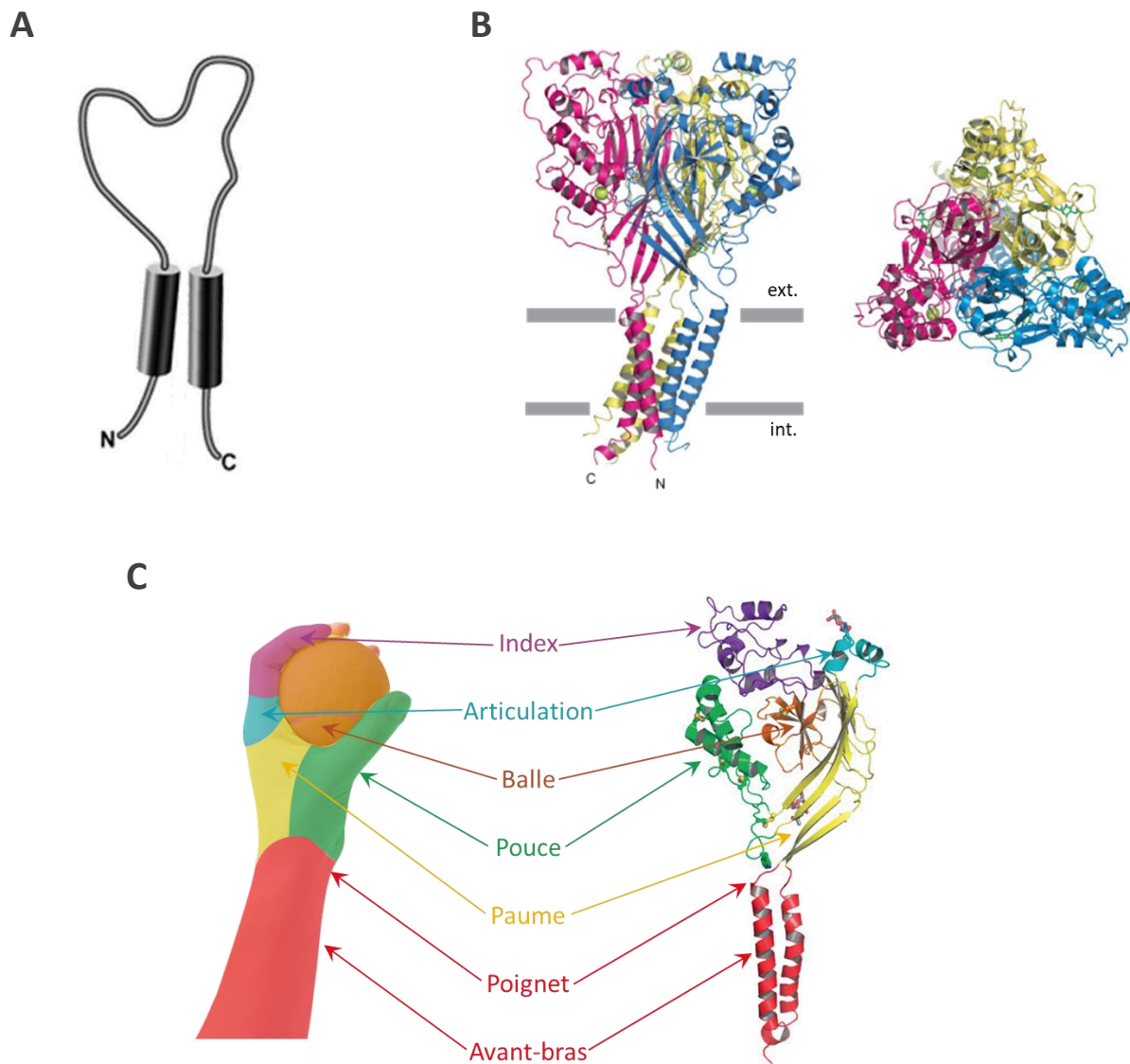
Quatre gènes, ACCN2, ACCN1, ACCN3 et ACCN4, codent respectivement pour les sous-unités ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4, dont il existe plusieurs variants d'épissage. Chez l'humain ainsi que chez les rongeurs il existe deux variants d'épissage d'ASIC1 et d'ASIC2 : ASIC1a (**Waldmann et al., 1997a**), ASIC1b (**Chen et al., 1998; Bässler et al., 2001**) et ASIC2a (**Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996; Lingueglia et al., 1997**), ASIC2b (**Lingueglia et al., 1997**). Une seule isoforme d'ASIC3 est retrouvée chez les rongeurs (**Waldmann et al., 1997b**), et trois isoformes issues d'épissage alternatif sont retrouvées chez l'humain : ASIC3a, ASIC3b, ASIC3c (NCBI database, accession numbers NM\_004769, NM\_020321 and NM\_020322) (pour revue, voir **Deval et al., 2010**). Les rongeurs présentent une seule isoforme d'ASIC4, tandis que deux variants d'épissage sont retrouvés chez l'humain (NCBI database, accession numbers NM\_018674 and NM\_182847) (pour revue, voir **Deval et al., 2010**).

Chaque sous-unité est constituée de deux segments transmembranaires (TM1 et TM2) encadrant une large boucle extracellulaire, chacun de ces segments transmembranaires se terminant par de courtes extrémités N- et C-terminales intracellulaires (**Figure 10A**). Initialement, il a longtemps été pensé qu'un canal fonctionnel était formé par un assemblage tétramérique de sous-unités ASIC (**Waldmann et al., 1999**). Grâce à la cristallographie aux rayons X du canal ASIC1a de poulet réalisée à haute résolution en 2007, ainsi qu'une seconde cristallographie réalisée en 2009, la structure protéique tridimensionnelle des sous-unités ASIC, ainsi que la façon dont elles s'assemblent, sont mieux décrites (**Jasti et al., 2007; Gonzales et al., 2009**). Elle a permis de montrer qu'un canal ASIC fonctionnel est composé de trois sous-unités ASIC (**Figure 10B**) (**Jasti et al., 2007; Gonzales et al., 2009**). Les sous-unités ASIC s'assemblent sous la forme d'homotrimères ou d'hétérotrimères, et s'activent en réponse à une baisse de pH extracellulaire (**Waldmann et al., 1997b; Lingueglia et al., 1997; Bassilana et al., 1997; Babinski et al., 2000; Baron et al., 2002; Benson et al., 2002; Askwith et al., 2004; Hesselager et al., 2004**), à l'exception des sous-unités ASIC2b (**Lingueglia et al., 1997**) et ASIC4 (**Akopian et al., 2000; Gründer et al., 2000**) qui ne forment pas de canal homomérique sensibles au pH. Les trois segments TM2 de chaque sous-unité s'associent pour former le pore du canal, qui est entouré des trois TM1 (**Gonzales et al., 2009**).

La façon dont les domaines d'une sous-unité sont agencés ressemble à un avant-bras, un poignet et une main levée se refermant et maintenant une balle (**Figure 10C**). Les deux segments transmembranaires en hélice- $\alpha$  représentent l'avant-bras (rouge), la jonction flexible entre les domaines transmembranaires et la partie extracellulaire représente le poignet, et la partie extracellulaire représente plusieurs domaines de la main : la paume (jaune) sur laquelle sont reliés d'une part le pouce (vert), et d'autre part l'articulation à la base de l'index (bleu) et l'index (violet), le tout refermé sur une balle (orange) posée dans le creux de la paume (**Figure 10C**) (**Jasti et al., 2007; Gonzales et al., 2009**).

Les possibilités d'assemblage des différentes sous-unités exprimées sont multiples, ainsi la variabilité de la composition en sous-unités d'un canal lui confère des propriétés biophysiques différentes et particulières qui reflètent la grande diversité fonctionnelle des canaux ASIC observés *in vivo* (**Deval et al., 2010; Sherwood et al., 2012**).





**Figure 10 : Structure des canaux ASIC**

- A. Schéma d'une sous-unité. Chaque sous-unité est composée de deux segments transmembranaires, d'une large boucle extracellulaire et de terminaisons N- et C-terminales intracellulaires.
- B. Modélisation de la structure trimérique tridimensionnelle du canal ASIC1a de poulet, chaque sous-unité est représentée par une couleur. Gauche, vue de profil. Droite, vue de dessus.
- C. Analogie entre la modélisation de la structure tridimensionnelle d'une sous-unité ASIC et une main maintenant une balle.

(D'après Jasti et al., 2007)

## 2. Propriétés biophysiques

Les canaux ASIC appartiennent à la classe des récepteurs ionotropes : ce sont des canaux activés par le plus simple des ligands : le proton. Ce sont des canaux cationiques excitateurs à conductance majoritairement sodium. Une acidification extracellulaire entraîne un changement conformationnel des sous-unités constituant le canal, l'ouverture du canal, et ainsi un influx majoritairement sodium dépolarisant la cellule. Parmi les ASIC, le canal homomérique ASIC1a présente également une conductance calcium (**Waldmann et al., 1997a; Sutherland et al., 2001; Gunthorpe et al., 2001; Yermolaieva et al., 2004**), cependant en condition physiologique celle-ci semble être négligeable (**Bässler et al., 2001; Samways et al., 2009**). Les canaux hétéromériques ASIC1a/2b possède une perméabilité calcium comparable aux homomères ASIC1a, tandis que la perméabilité calcium des hétéromères ASIC1a/2a est quasi nulle (**Sherwood et al., 2011**).

Des expériences de mutagenèse et d'électrophysiologie, ainsi que la cristallographie du canal, ont permis de montrer que dans le domaine extracellulaire l'interaction entre les domaines pouce, index et balle d'une sous-unité, avec le domaine paume de la sous-unité adjacente forme la poche acide qui serait le site senseur de pH primaire du canal. Au sein de cette poche acide, chargée négativement, se trouvent trois paires carboxyle-carboxylate de résidus aspartate et glutamate protonables proches (2,8 à 3,0 Å), qui mutés entraînent une diminution de la sensibilité du canal au pH. Des alignements de séquences ont permis de montrer que ces résidus sont conservés dans les ASIC, mais pas dans les autres membres de la famille des canaux ENaC, ce qui est en accord avec le fait que les ASIC sont les seuls senseurs de protons au sein de cette superfamille (**Jasti et al., 2007**). Il est suggéré que la liaison de protons dans la poche acide entraînerait un rapprochement de l'index et du pouce autour de la balle, et que ce mouvement déplacerait les domaines transmembranaires connectés au domaine extracellulaire via le poignet, et ainsi provoquerait l'ouverture du pore du canal (**Jasti et al., 2007; Yang et al., 2009**). Mais ce mécanisme ne serait pas le seul à l'origine de l'ouverture du canal en réponse à une acidification extracellulaire. En effet, il existe d'autres sites de fixation des protons, impliquant d'autres résidus situés dans différents domaines (**Baron et al., 2001; Paukert et al., 2008; Sherwood et al., 2009; Gründer et Chen, 2010; Bonifacio et al., 2014**).

L'activation des canaux ASIC en réponse à une baisse rapide du pH extracellulaire entraîne un courant entrant transitoire caractérisé par une phase d'activation rapide, suivie d'une phase d'inactivation totale ou partielle et plus ou moins rapide. D'un canal ASIC à un autre, les cinétiques de courants, ainsi que la sensibilité au pH sont différentes, et ces propriétés sont bien caractérisées concernant les homomères et permettent de les distinguer. Les multiples combinaisons possibles d'association des sous-unités ASIC *in vivo* augmentent encore la diversité des courants, et la difficulté à déterminer la stœchiométrie d'un canal hétérotrimérique natif fonctionnel ne fait qu'ajouter de la complexité dans la description des différents courants ASIC hétéromériques natifs fonctionnels (**Babinski et al., 2000; Baron et al., 2001; Benson et al., 2002; Hesselager et al., 2004**). En effet, par exemple, ASIC2b ne forme pas de canal homomérique sensible au pH, mais l'hétéromère ASIC1a/2b possède des cinétiques de courant comparables à l'homomère ASIC1a, tandis que l'hétéromère ASIC1b/2b est, lui aussi, insensible aux protons (**Lingueglia et al., 1997; Hesselager et al., 2004**).

Les canaux homomériques ASIC les plus sensibles aux protons sont les canaux ASIC3 et ASIC1a. En effet, à partir d'un pH physiologique (pH 7,4), de faibles baisses de pH suffisent à les activer, avec un seuil d'activation à pH 7,2 et pH 6,9-7,0 respectivement. Les canaux homomériques ASIC1b et ASIC2a sont moins sensibles aux protons qu'ASIC1a et ASIC3. En effet, ils ne s'activent que s'ils sont soumis à des variations de pH plus importantes, avec des seuils d'activation respectifs à pH 6,5 et pH 5,5-6,0 (**Tableau 3**) (**Yagi et al., 2006; Lingueglia, 2007; Diochot et al., 2007**).

Parmi les quatre homomères considérés (**Tableau 3**), ASIC3 est celui qui s'inactive le plus rapidement, mais son inactivation est incomplète. Les canaux homomériques ASIC1a et ASIC1b ont des cinétiques d'inactivation comparables, en revanche, les canaux homomériques ASIC2a ont une phase d'inactivation beaucoup plus lente (**Diochot et al., 2007**).

Les seuils d'activation, les pH de demi-activation ( $\text{pH}_{0,5}$ ), ainsi que les constantes d'inactivation des canaux homomériques sont reportés dans le **tableau 3**.

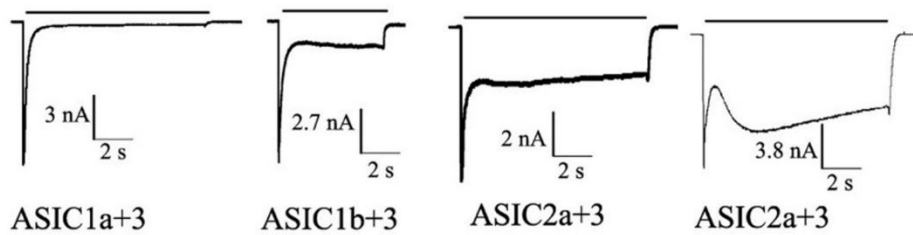
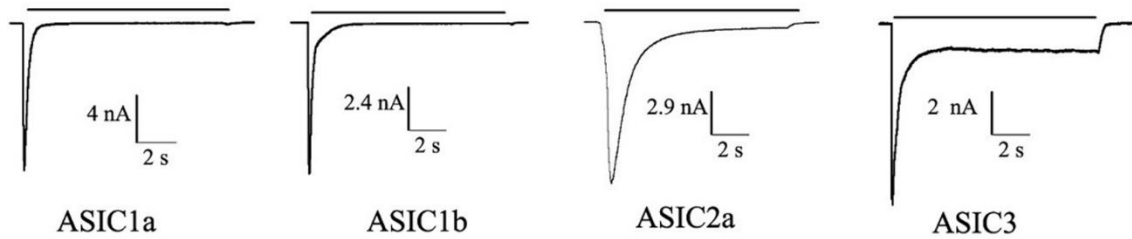
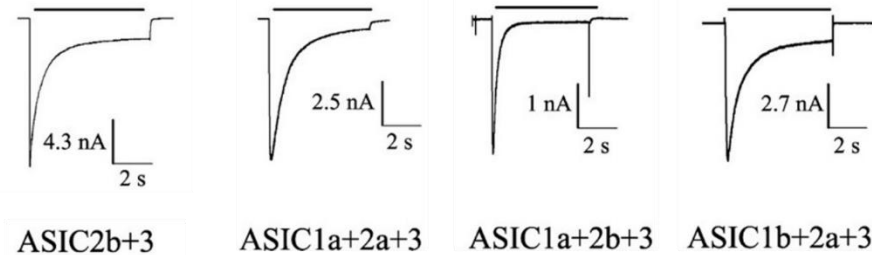
Canaux homomériques (rat)	ASIC1a	ASIC1b	ASIC2a	ASIC3
pH seuil d'activation	6,9 - 7,0	6,5	5,5 - 6,0	7,2
pH demi-activation	6,2 - 6,8	5,1 - 6,2	4,1 - 5,0	6,2 - 6,7
$\tau$ d'inactivation à pH 6.0	1,2 - 4 s	0,9 - 1,7 s	3,3 - 5,5 s	0,4 s

**Tableau 3 : Propriétés électrophysiologiques des canaux ASIC**

*(D'après Yagi et al., 2006; Diochot et al., 2007; et Lingueglia, 2007)*

Si tous les ASIC ont un courant rapide transitoire (pic), suivi d'une inactivation, cette dernière est complète pour tous les ASIC homomériques, sauf pour le canal ASIC3 (**Figure 11A**). En effet, le canal ASIC3 possède une cinétique de courant biphasique, son inactivation est incomplète et se traduit par un courant soutenu (plateau) qui perdure tant que l'acidité extracellulaire est maintenue (**Figures 11A et 12A**). Dans des neurones sensoriels, ce courant persistant ne provoque pas à lui seul le déclenchement de potentiels d'action, mais induit une dépolarisation constitutive sensibilisant les neurones sensoriels vis-à-vis d'autres stimuli dépolarisants (**Deval et al., 2003; Yagi et al., 2006; Deval et al., 2008**). Dans le cas d'acidifications modérées (entre pH 7,3 et 6,5), le courant soutenu, appelé courant de fenêtre, est dû à la superposition des courbes d'activation et d'inactivation du canal ASIC3 en fonction du pH (**Figure 12B**). Cela s'explique par une proportion de canaux qui s'activent mais ne s'inactivent pas complètement dans une certaine gamme d'acidification extracellulaire (**Yagi et al., 2006; Deval et al., 2008**). Lors d'acidifications plus intenses (pH < 6,5), le courant soutenu observé s'explique par un mécanisme différent, et l'utilisation de chimères ASIC3/ASIC1a a montré qu'il était dépendant des domaines TM1 et N-terminal du canal ASIC3 (**Salinas et al., 2009**).

L'étude de multiples combinaisons hétéromériques montrent que tous les canaux hétéromériques qui contiennent l'isoforme ASIC3 conservent un courant soutenu, et donc une inactivation incomplète (**Figure 11B**) (**Hesselager et al., 2004**). La sensibilité accrue aux protons d'ASIC3, ainsi que la présence d'un courant soutenu chez tous les canaux contenant l'isoforme ASIC3 font de ce dernier un acteur important de détection d'acidose tissulaire, mais aussi dans la sensibilisation des neurones sensoriels vis-à-vis de stimuli de toutes modalités.

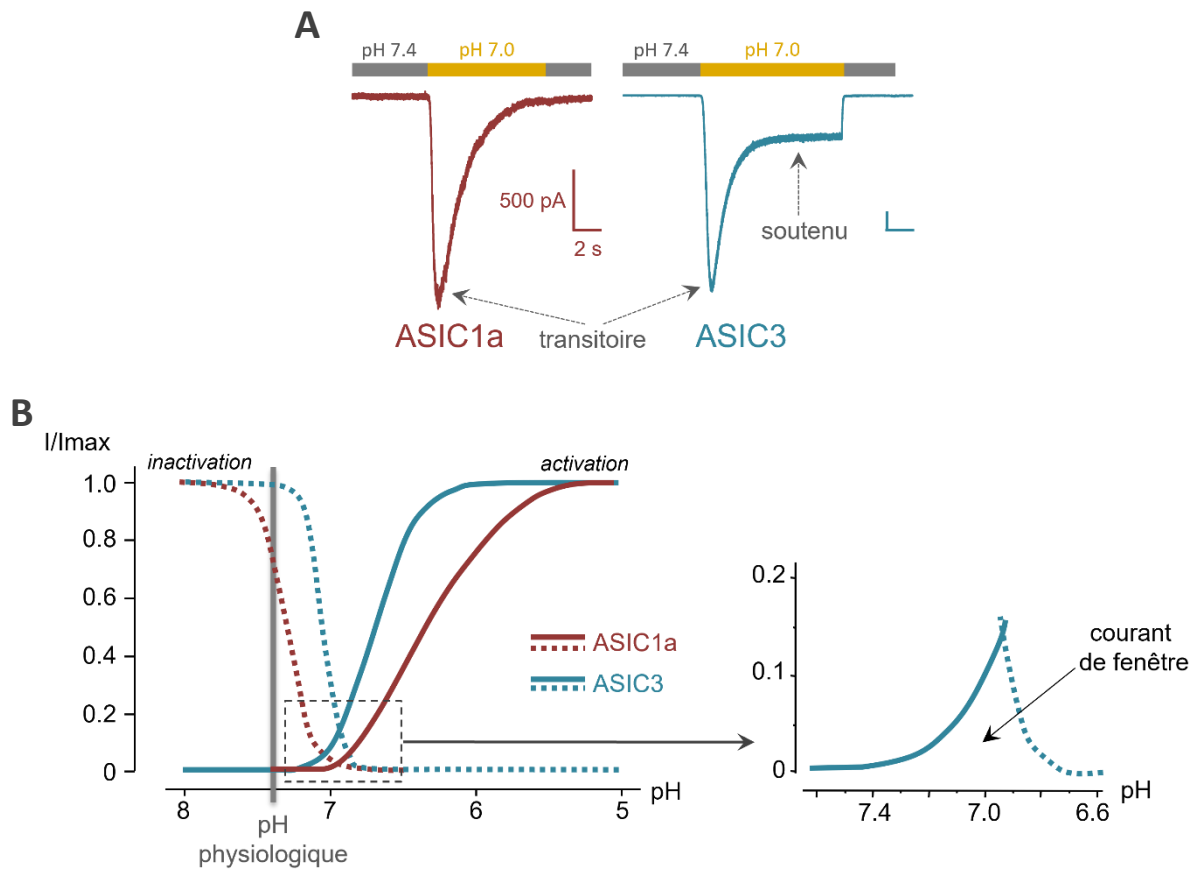
**A****B**

**Figure 11 : Cinétiques des courants ASIC**

A. Cinétiques de courant des canaux ASIC homomériques en réponse à l'application d'une solution à pH 4,0. Les canaux ASIC3 possède un courant soutenu qui perdure tant que l'acidification est maintenue.

B. Cinétiques de courant des canaux ASIC hétéromériques contenant la sous-unité ASIC3 en réponse à l'application d'une solution à pH 4,0. Les hétéromères contenant la sous-unité ASIC3 conservent un courant soutenu

(D'après Hesselager et al., 2004)



**Figure 12 : Courant de fenêtre d'ASIC3**

- A. Cinétiques de courants des canaux homomériques ASIC1a et ASIC3 en réponse à une acidification extracellulaire (pH 7,0). Les canaux ASIC1a ont uniquement un courant transitoire. Le courant transitoire des canaux ASIC3 est suivi d'un courant soutenu est appelé courant de fenêtre
- B. Courbe d'activation et d'inactivation des canaux ASIC1a et ASIC3. Le courant de fenêtre d'ASIC3 est dû au chevauchement de ses courbes d'activation et d'inactivation

(D'après Deval et al., 2010)

### 3. Expression tissulaire dans le système nociceptif

Dans les années 1980, l'équipe du Pr Oleg Krishtal décrit pour la première fois un courant ionique activé par acidification extracellulaire dans des neurones sensoriels isolés de ganglions trigéminaux et spinaux de rat (**Krishtal et Pidoplichko, 1980, 1981a**). L'expression de ce « récepteur à protons », encore non nommé ASIC à l'époque, préférentiellement dans les neurones sensoriels de petits diamètre, laisse déjà supposé son possible rôle dans la nociception (**Krishtal et Pidoplichko, 1981b, 1981c**).

Aujourd'hui, depuis le clonage des différentes isoformes ASIC, des études d'hybridation *in situ*, d'immunolocalisation et d'électrophysiologie ont permis de montrer que les ASIC sont exprimés dans divers organes, mais qu'ils sont essentiellement retrouvés dans le système nerveux, et notamment dans le neuraxe de la nociception au niveau périphérique et central.

#### a. Système nociceptif périphérique

La plupart des sous-unités ASIC (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC3) sont retrouvées dans les neurones périphériques sensoriels, où ASIC1b et ASIC3 y sont *quasi* exclusivement exprimés (**Waldmann et al., 1997b; Chen et al., 1998**). Les ASIC sont exprimés dans le soma et les terminaisons périphériques des DRG innervant la peau (**García-Añoveros et al., 2001; Price et al., 2001; Deval et al., 2008**), les muscles (**Sluka et al., 2003; Hoheisel et al., 2004; Gitterman et al., 2005; Molliver et al., 2005; Deval et al., 2011; Gautam et Benson, 2013**), les os (**Jahr et al., 2005; Kanaya et al., 2016; Lee et al., 2019**) et les articulations (**Ikeuchi et al., 2008, 2009; Kolker et al., 2010; Izumi et al., 2012**). Au sein des DRG, il avait été initialement montré que les ASIC étaient majoritairement exprimés dans les neurones de petit diamètre, neurones spécialisés dans la détection des stimuli nocifs (**Krishtal et Pidoplichko, 1981b, 1981c; Price et al., 2000; Voilley et al., 2001; Poirot et al., 2006**), bien que cette affirmation semble être remise en cause par les dernières données d'analyses transcriptomiques obtenues par scRNA-seq (**Usooskin et al., 2015; Zeisel et al., 2018**) (voir partie I. A. 2. b. « Classifications à l'ère des technologies omics »). De manière intéressante, il a été montré qu'en condition inflammatoire le niveau de transcription des isoformes ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b et ASIC3, est augmenté dans les neurones DRG de rat, et que cette augmentation est inhibée par l'administration d'AINS (**Figure 13**) (**Voilley et al., 2001**). Chez le rat, ASIC3 est exprimé par plus de 50% des afférences musculaires de petit diamètre (contre 28% dans les

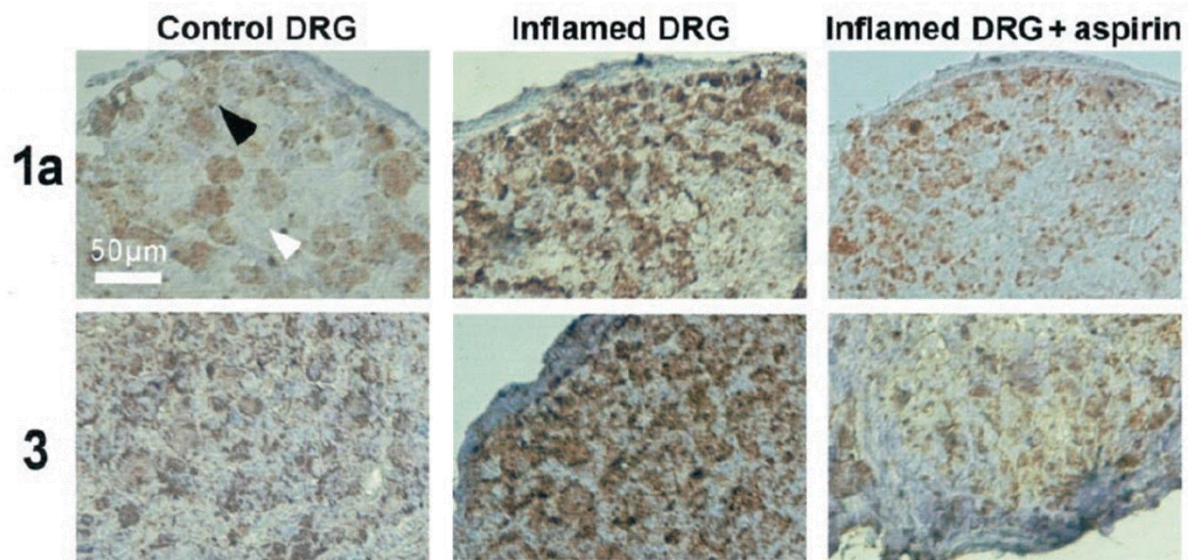
afférences cutanées) (**Molliver et al., 2005**) ; chez la souris ASIC3 est exprimé par plus de 30% des afférences articulaires innervant le genou (majoritairement de petit diamètre) en condition normale, et par près de 50% après induction d'une inflammation articulaire (**Ikeuchi et al., 2009**). ASIC3 semble être d'intérêt majeur dans la nociception au niveau musculosquelettique.

#### **b. Système nociceptif central**

Tandis que la majorité des sous-unités ASIC sont exprimées au niveau périphérique, les neurones centraux de la moelle épinière du cerveau ne semblent exprimer que les sous-unités ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b (**Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996; García-Añoveros et al., 1997; Waldmann et al., 1997a; Lingueglia et al., 1997; Chen et al., 1998; Baron et al., 2002; Wemmie et al., 2003; Wu et al., 2004; Baron et al., 2008**). Ces dernières sont abondamment exprimées dans les neurones spinaux de second ordre qui reçoivent les signaux des afférences primaires sensorielles et qui participent à la transmission et la modulation des signaux nociceptifs. De façon intéressante, une inflammation périphérique induite par injection de CFA (« Complete Freund's Adjuvant ») entraîne une hausse de l'expression d'ASIC1a et ASIC2a dans les neurones de la moelle épinière chez le rat (**Wu et al., 2004; Duan et al., 2007**). ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont également exprimés par des structures supraspinales impliquées dans l'intégration du message douloureux, l'apprentissage et la mémoire, l'anxiété et la peur conditionnée, telles que le cortex somatosensoriel, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe ou encore le cervelet (**Price et al., 1996; Bassilana et al., 1997; Baron et al., 2002; Wemmie et al., 2002, 2003; Alvarez de la Rosa et al., 2003; Askwith et al., 2004; Price et al., 2014**).



A



B

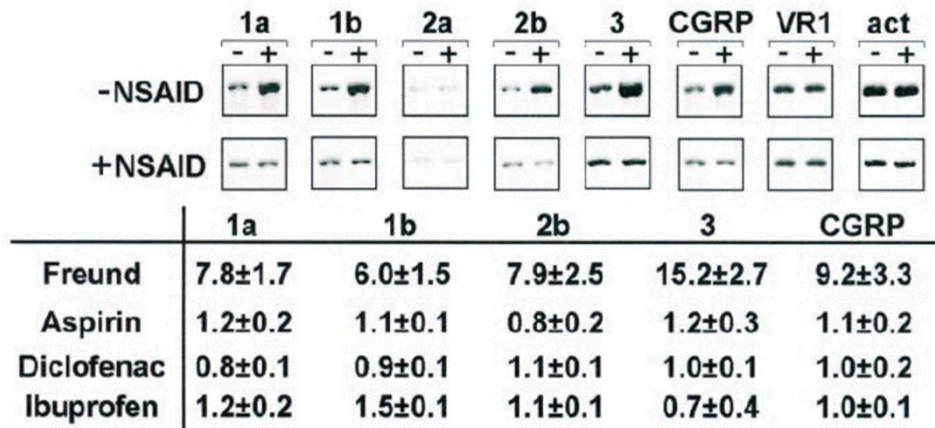


Figure 13 : Surexpression d'ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b et ASIC3 dans des neurones DRG de rat en condition inflammatoire, inhibée par l'administration d'AINS

A. Hybridation *in situ* (ASIC1a et ASIC3) en conditions normales et inflammatoires avec ou sans traitement AINS

B. *Haut*, Résultats représentatifs en RT-PCR en conditions normales (-) et inflammatoires (+), avec ou sans traitement AINS. *Bas*, Niveau d'expression en conditions inflammatoires, avant (Freund) et après traitements avec différents AINS.

(D'après Voilley et al., 2001)

## C. Pharmacologie des canaux ASIC

L'identification et l'étude de molécules modulatrices des canaux ASIC sont des étapes clef à plusieurs niveaux en recherche, apportant de nouveaux outils pour une meilleure compréhension de leur régulation endogène. En effet, le développement de molécules synthétiques et la découverte de composés exogènes naturels régulateurs de ces canaux constituent un outil de poids en recherche fondamentale, mais également en recherche clinique dans l'optique de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment dans la physiopathologie de la douleur. Aujourd'hui plus d'une 50<sup>aine</sup> de composés ont été identifiés, ils peuvent être endogènes (p. ex. ions, lipides, neuropeptides), exogènes naturels (p. ex. toxines issues de venins d'animaux), ou encore exogènes synthétiques (**Tableaux 4 et 5**) (pour revue, voir **Baron et Lingueglia, 2015**). Dans cette partie, je m'intéresserai de façon non exhaustive aux outils pharmacologiques spécifiques les plus utilisés, à certaines molécules médicament, ainsi qu'à quelques régulateurs endogènes impliqués dans le processus nociceptif.

### 1. Modulateurs exogènes

#### a. Toxines animales

Des peptides issus de venin d'animaux tels que des serpents, des araignées ou encore des anémones de mer, sont des modulateurs de l'activité des canaux ASIC, et font partis des outils moléculaires spécifiques les plus utilisés pour étudier les canaux ASIC.

##### *i. La psalmotoxine 1 (PcTx1)*

La PcTx1 est un peptide de 40 acides aminées issu du venin de la tarentule d'Amérique Centrale *Psalmopoeus cambridgei* et découvert et isolé au laboratoire par l'équipe du Pr Lazdunski (**Escoubas et al., 2000**). Cette toxine inhibe les canaux homomériques ASIC1a, ainsi que les hétéromères ASIC1a+2b et ASIC1a+2a (**Escoubas et al., 2000; Sherwood et al., 2011; Joeres et al., 2016**). Il a été montré que la PcTx1 est également capable de potentialiser les courants homomériques ASIC1a et hétéromériques ASIC1a/2a, et son effet potentialisateur/inhibiteur dépend en réalité du pH de conditionnement (**Chen et al., 2005; Liu et al., 2018**). À des concentrations plus élevées, la PcTx1 potentialise les courants ASIC1b induits par des pH acides (**Chen et al., 2006a**). Des effets antalgiques sont observés chez le

rongeur lorsque la PcTx1 est injectée dans le système nerveux central par voies intrathécale ou intracérébroventriculaire (**Duan et al., 2007; Mazzuca et al., 2007**).

### ***ii. La MitTx***

La MitTx est une toxine purifiée à partir du venin d'un serpent corail, *Micrurus tener tener*, dont la morsure provoque des douleurs persistantes intenses. La MitTx est activateur puissant des canaux homomériques ASIC1a sans nécessité qu'il y ait une acidification extracellulaire, et provoque une potentialisation massive des courants ASIC2a induits par acidification extracellulaire. À pH 7,4 elle est également capable d'activer les canaux homomériques ASIC1b, ASIC3 ainsi que les hétéromères ASIC1a/2a, mais avec une affinité beaucoup plus faible. Injectée en intra-plantaire, cette toxine génère un comportement douloureux chez la souris, sauf chez les souris invalidées pour les canaux ASIC1a, suggérant un rôle d'ASIC1a dans les mécanismes de détection des stimuli nociceptifs à la périphérie des afférences primaires (**Bohlen et al., 2011**).

### ***iii. L'APETx2***

L'APETx2 est une toxine peptidique de 42 acides aminés, isolée au laboratoire à partir du venin d'une anémone marine, *Anthopleura elegantissima*, qui a une action inhibitrice sur le courant transitoire des canaux homomériques ASIC3, de certains hétéromères contenant la sous-unité ASIC3, et des courants de type ASIC3 natifs des neurones sensoriels de DRG. (**Diochot et al., 2004**). Administrée en périphérie, cette toxine produit de puissants effets antalgiques, démontrant ainsi l'implication des canaux ASIC3 dans la détection de divers stimuli nociceptifs (**Deval et al., 2008, 2011; Sugimura et al., 2015**).

Également capable d'inhiber l'activité des canaux Na<sub>v</sub>1.8 impliqués dans la transmission des messages douloureux (**Blanchard et al., 2012; Peigneur et al., 2012**), l'APETx2 constitue une stratégie thérapeutique intéressante, mais il possède aussi une activité inhibitrice sur les canaux hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) impliqués dans l'activité cardiaque. Une inhibition des canaux hERG cardiaque conduit à un syndrome de QT long, il est alors indispensable de conduire les recherches afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, et de développer des analogues d'APETx2 dépourvus d'effets sur les canaux hERG (**Jensen et al., 2014**).

#### ***iv. Les Mambalgines***

Les mambalgines sont des toxines peptidiques de 57 acides aminés isolées à partir de venin de serpents mamba du genre *Dendroaspis*. Les mambalgines 1 et 2 furent découvertes chez le mamba noir *Dendroaspis polylepis* et la mambalgine 3 chez le mamba vert *Dendroaspis angusticeps* (Diochot et al., 2012; Baron et al., 2013). Les mambalgines sont des inhibiteurs des canaux ASIC exprimés aussi bien dans les neurones centraux que dans les neurones sensoriels à la périphérie, tels que les canaux homomériques ASIC1a et ASIC1b, ainsi que les hétéromères contenant la sous-unité ASIC1a ou ASIC1b (ASIC1a+2a, ASIC1a/2b, ASIC1a/1b) (Diochot et al., 2012; Baron et al., 2013). L'administration par voie centrale ou périphériques de mambalgines induit un effet antalgique aussi puissant que la morphine, mais ces effets étant résistants à la naloxone, c'est un mécanisme indépendant du système opioïdérique, ne causant ainsi pas d'effets de tolérance ou de détresse respiratoire (Diochot et al., 2012, 2016; Verkest et al., 2018).

#### **b. Molécules synthétiques**

##### ***i. L'amiloride***

L'amiloride est un médicament diurétique prescrit pour traiter l'hypertension chez l'humain : au niveau du tubule rénal, il inhibe les canaux sodium épithéliaux ENaC appartenant à la famille des ENaC/DEG, diminuant ainsi la réabsorption sodique et hydrique, tout en limitant les pertes de potassium chez les patients traités. Mais ce médicament possède également des effets non spécifiques, notamment sur les canaux ASIC. L'amiloride fut le premier inhibiteur identifié des canaux ASIC (Korkushko et Kryshnal, 1984; Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996, 1997a, 1997b; Chen et al., 1998), et semble avoir un double effet sur le canal ASIC3 : il inhibe le courant transitoire, sans affecter le courant soutenu qui de façon paradoxale peut être potentialisé dans certaines conditions d'acidification modérée (Waldmann et al., 1997b; Yagi et al., 2006).

C'est un inhibiteur de faible affinité et non discriminant des canaux ASIC, et ses effets sur d'autres canaux et échangeurs ioniques, rendent son utilisation comme outil pharmacologique critiquable (Frelin et al., 1988). En revanche, il a l'avantage d'être un médicament disposant déjà une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), et prescrit depuis de nombreuses années, il possède une certaine ancienneté de pharmacovigilance, ce qui

serait profitable dans une stratégie de repositionnement. Cela facilite également la mise en place d'études réalisées chez l'humain, ce qui a d'ailleurs déjà été effectué en Finlande dans un campus universitaire (**Ugawa et al., 2002; Jones et al., 2004**). Ces études ont montré l'implication des canaux ASIC dans la douleur cutanée induite par injection acide grâce à l'administration d'amiloride.

### ***ii. AINS***

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, outre leurs effets sur les cyclooxygénases (voir chapitre I-B Les traitements pharmacologiques de la douleur), ont à des concentrations proches des doses thérapeutiques des effets inhibiteurs sur les courants des canaux ASIC1a et ASIC3, et bloquent l'augmentation de leur expression normalement induite en conditions inflammatoires dans les neurones sensoriels (**Voilley et al., 2001**).

### ***iii. GMQ***

Le 2-guanidine-4-méthylquinazoline (GMQ) est une petite molécule synthétique dérivée de l'amiloride capable d'activer les canaux ASIC3 sans acidification extracellulaire, ainsi que de potentialiser les courants ASIC3 induits par des pH acides. Son application sur des neurones sensoriels DRG de rat génère un courant soutenu à pH 7.4 uniquement si ces neurones expriment des courants de type ASIC3 en réponse à une acidification extracellulaire. De plus, l'injection de GMQ en périphérie induit un comportement douloureux chez la souris de manière ASIC3-dépendante (**Yu et al., 2010**).

Modulateurs exogènes	Composés	Classe pharmacologique	ASIC impliqués
Modulateurs naturels	PcTx1	Toxine de la tarentule <i>Psalmopoeus cambridgei</i>	ASIC1a, ASIC1a/2a, ASIC1a/2b, ASIC1b
	MitTx	Toxine du serpent corail <i>Micrurus tener</i>	ASIC1a, ASIC2a, ASIC1b, ASIC3, ASIC1a/2a
	APETx2	Toxine de l'anémone de mer <i>Anthopleura elegantissima</i>	ASIC contenant ASIC3
	Mambalgines	Toxines des serpents mamba noir et vert du genre <i>Dendroaspis</i>	ASIC1a, ASIC1b, ASIC1a+2a, ASIC1a/2b, ASIC1a/1b
	Sévanol	Lignane du thym <i>Thymus armeniacus</i>	ASIC3, ASIC1a
	Gastrodine	Composé végétal de l'orchidée <i>Gastrodia elata</i>	Canaux natifs de neurones sensoriels
	Acide chlorogénique	Polyphénol végétal	Canaux natifs de neurones sensoriels
	Thallassionline B	Flavonoïde végétal de la plante marine <i>Thalassia testudinum</i>	Canaux natifs de neurones sensoriels
	Puérarine	Flavonoïde végétal de la racine de la plante <i>Pueraria lobata</i> (Kudzu)	Canaux natifs ASIC et ASIC1a de neurones hippocampaux
	Paéoniflorine	Composé végétal de la pivoine blanche <i>Paeonia lactiflora</i>	Courants natifs ASIC1a de la lignée cellulaire PC12
Modulateurs synthétiques	Amiloride	Diurétique	Tous
	GMQ	Dérivé de l'amiloride	ASIC3
	Flurbiprofène Ibuprofène	AINS	ASIC1a
	Acide salicylique Aspirine Diclofénac	AINS	ASIC3, ASIC2a
	CHF5074	Dérivé d'AINS	Canaux natifs ASIC et ASIC1a de neurones hippocampaux
	Tétraéthylammonium (TEA)	Inhibiteur des canaux K <sub>v</sub>	ASIC1a/2a, ASIC1a/2b
	4-aminopyridine (4-AP)	Inhibiteur des canaux K <sub>v</sub>	ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a
	Tétracaïne	Anesthésique local	ASIC1b, ASIC3
	Lidocaïne	Anesthésique local	ASIC1a
	Propofol	Anesthésique	ASIC1a, ASIC3
	A-317567	Amidine	Tous
	Benzotriophène méthyle amine		ASIC3, ASIC1a
	Streptomycine Néomycine	Antibiotiques	Canaux natifs de neurones sensoriels
	Mésylate de nafamostat	Anticoagulant	Tous
	Dyarilamidines	Parasiticide	Tous
Chloroquine	Antipaludique	ASIC1a	

**Tableau 4 : Pharmacologie des canaux ASIC : modulateurs exogènes**

(D'après Baron and Lingueglia, 2015, modifié)

## 2. Modulateurs endogènes

### a. Les ions

Les protons sont les premiers et principaux activateurs endogènes décrits des canaux ASIC (**Krishtal et Pidoplichko, 1980, 1981b, 1981a; Waldmann et al., 1997a, 1997b; Waldmann et Lazdunski, 1998**). Outre les protons, un certain nombre d'ions capable de moduler l'activité des canaux ASIC ont été décrits.

Des expériences d'électrophysiologie montrent qu'une forte concentration extracellulaire d'ions calcium entraîne une inhibition des courants ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a (**Waldmann et al., 1997a; de Weille et Bassilana, 2001; Paukert et al., 2004**) et ASIC3 (**Immke et McCleskey, 2003**), probablement dû à une compétition pour un site de fixation des ions H<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> (**Immke et McCleskey, 2003; Paukert et al., 2004; Jasti et al., 2007**).

Les ions magnésium ont des effets similaires aux ions calcium sur les canaux ASIC (**Babini et al., 2002; Immke et McCleskey, 2003**).

L'application de zinc extracellulaire à des concentrations de l'ordre du micromolaire potentialise l'amplitude des courants des canaux ASIC contenant la sous-unité ASIC2a (**Baron et al., 2001; Joeres et al., 2016**), ainsi que des courants ASIC natifs de neurones hippocampiques, modulant leur excitabilité neuronale (**Baron et al., 2002**). En revanche, à de telles concentration les ions Zn<sup>2+</sup> extracellulaires inhibent les canaux ASIC3 (**Poirot et al., 2006; Jiang et al., 2010**). Lorsque des concentrations d'ion Zn<sup>2+</sup> plus faibles sont appliquées, de l'ordre du nanomolaire, le zinc a un effet inhibiteur des canaux ASIC1a homomériques et des hétéromères ASIC1a+ASIC2a, ainsi que des canaux homomériques ASIC1b (sur ce dernier uniquement lorsqu'il est pré-appliqué) (**Chu et al., 2004**).

Les canaux ASIC sont également inhibés par différents cations métalliques issus de métaux lourds, tels que le plomb, de gadolinium, le cuivre, le cadmium et le nickel. (**Wang et al., 2006; Babinski et al., 2000; Allen et Attwell, 2002; Wang et al., 2007; Staruschenko et al., 2007**).

### b. Les neuropeptides

Le neuropeptide FMRFamide est un activateur direct des canaux FaNaC spécifiques des invertébrés, canaux appartenant à la superfamille des canaux ENaC/DEG (**Lingueglia et al., 1995**). Les canaux ASIC faisant également partis de cette superfamille, les effets du

FMRFamide et de neuropeptides analogues retrouvés chez les mammifères ont été testé sur les canaux ASIC. Ils ne sont pas des agonistes directs des canaux ASIC, en revanche ils potentialisent l'amplitude des courants induits par acidification extracellulaire des canaux ASIC1a, ASIC1b, ASIC3, ASIC2a+3, ASIC1a+3 et ASIC1b+3. Ces neuropeptides ralentissent l'inactivation de ces canaux, faisant ainsi apparaître ou potentialisant le courant soutenu (plateau) lors d'une acidification extracellulaire, et pourraient ainsi jouer un rôle dans la sensibilisation des neurones sensoriels nociceptifs, notamment en conditions inflammatoires où l'expression des canaux ASIC et du précurseur du neuropeptide FF (mammifères) est augmentée dans le système nerveux (**Askwith et al., 2000; Catarsi et al., 2001; Deval et al., 2003; Chen et al., 2006b; Sherwood et Askwith, 2009**).

### **c. Les lipides**

L'acide arachidonique (AA), lipide dont la production augmente au cours d'une inflammation, potentialise les courants induits par acidification extracellulaire des canaux ASIC1a, ASIC2a et ASIC3, ainsi que des courants ASIC natifs de neurones centraux et sensoriels (**Allen et Attwell, 2002; Smith et al., 2007; Deval et al., 2008**). Les effets de l'acide arachidonique sont plus importants sur ASIC3, décalant sa courbe d'activation vers des valeurs plus alcaline, augmentant ainsi le courant de fenêtre, et engendrant un petit courant constitutif à pH 7.4 (**Deval et al., 2008**).

Certains lysophospholipides retrouvés dans des liquides synoviaux inflammatoires de patients souffrant de différentes pathologies articulaires, tels que les lysophosphatidylcholines (LPC) LPC16:0, LPC18:1, LPC18:0, ont un effet potentialisateur des courants ASIC3 induit par acidification extracellulaire. Ces lysophosphocholines sont également capables d'activer directement un courant ASIC3 sans acidification extracellulaire, s'expliquant par un décalage de la courbe d'activation d'ASIC3 vers les pH plus alcalins, augmentant le courant de fenêtre (**Marra et al., 2016**).

Ces découvertes ne font plus du proton le seul activateur endogène connu des canaux ASIC3, la LPC et l'AA étant capables d'activer les courants ASIC3, sans aucune acidification extracellulaire. Ces courants dépolarisants constitutifs induits par ces lipides stimulent l'activité des fibres nociceptives induisant un comportement douloureux chez le rongeur, et



pourraient jouer un rôle dans la sensibilisation périphérique des neurones sensoriels, notamment dans la mise en place ou le maintien de douleurs chroniques (Marra et al., 2016).

Modulateurs endogènes	Composés	Classe pharmacologique	ASIC impliqués
Ions	H <sup>+</sup>	Cations	Tous sauf les homomères ASIC2b et ASIC4
	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Cations	ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3
	Zn <sup>2+</sup>	Cations	ASIC1a, ASIC1b, ASIC3, ASIC1a/2a, ASIC contenant ASIC2a,
	Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Gd <sup>3+</sup> , Cd <sup>2+</sup> ,	Cations	Tous
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ,	Cations	ASIC1a
Neuropeptides	Dynorphines	Neuropeptide opioïde	ASIC1a, ASIC1b
	Peptides de la famille du FMRFamide	Neuropeptide	ASIC1a, ASIC1b, ASIC3, ASIC1a/3, ASICb/3, ASIC2a/3
Lipides	Acide arachidonique	Acide gras	ASIC1a, ASIC2a, ASIC3
	LPC	Lysophospholipide	ASIC3
Polyamines	Spermine	Polyamine	ASIC1a, ASIC1b, ASIC1a/2a
	Agmatine, arcaïne	Polyamines proches du GMQ	ASIC3, ASIC1b/3
Autres	Sérotonine	Monoamine	ASIC3
	Oxyde nitrique	Gaz incolore	ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3

**Tableau 5 : Pharmacologie des canaux ASIC : modulateurs endogènes**

(D'après Baron and Lingueglia, 2015, modifié)

## D. Canal ASIC3 et douleurs musculosquelettiques

Depuis la découverte du « récepteur à protons » dans les neurones sensoriels de rat au début des années 1980, et le clonage des canaux ASIC à partir de neurones sensoriels et de cerveaux humains et murins dans les années 1990, il a été montré que les canaux ASIC sont impliqués dans divers aspects de la nociception, à la fois au niveau périphérique et central. Ils jouent un rôle dans différents types de douleur pouvant toucher les tissus superficiels tels que la peau, les tissus profonds tels que les articulations et les muscles, ou les viscères tels que le système digestif, les poumons et le cœur. L'implication du canal ASIC3, anciennement nommé DRASIC pour « Dorsal Root ASIC », a été montrée dans plusieurs types de douleurs, tels que la douleur post-opératoire (Deval et al., 2011), la douleur musculaire (Sluka et al., 2003), la douleur inflammatoire (Deval et al., 2008; Ikeuchi et al., 2008, 2009; Marra et al., 2016; Sluka et al., 2013; Hsieh et al., 2017), ainsi que dans la douleur articulaire, qu'elle soit d'origine inflammatoire ou non (Ikeuchi et al., 2008, 2009; Izumi et al., 2012; Sluka et al., 2013; Sugimura et al., 2015; Hsieh et al., 2017).

Dans cette partie, je me focaliserai essentiellement sur le rôle des canaux ASIC3 dans les douleurs d'origine musculosquelettique.

### 1. Allodynies/hyperalgies primaires et secondaires

Afin de mieux décrire la mise en place de douleurs chroniques chez les différents modèles animaux générés et décrits dans la littérature, il est important de distinguer allodynie/hyperalgie primaire et allodynie/hyperalgie secondaire. Lorsqu'une douleur s'installe suite à une lésion ou un trauma par exemple, l'inflammation déclenchée générera alors une allodynie/hyperalgie primaire, c'est-à-dire au niveau de la lésion, et une hyperalgie secondaire, à distance de la lésion. La mise en place d'une allodynie/hyperalgie secondaire constitue d'ailleurs, en plus du facteur durée anormalement longue de la douleur, une caractéristique des douleurs chroniques. Une allodynie/hyperalgie secondaire peut impliquer des mécanismes de sensibilisation centrale, notamment lorsque celle-ci devient bilatérale.

## 2. Modèles animaux de douleurs musculosquelettiques et canaux ASIC3

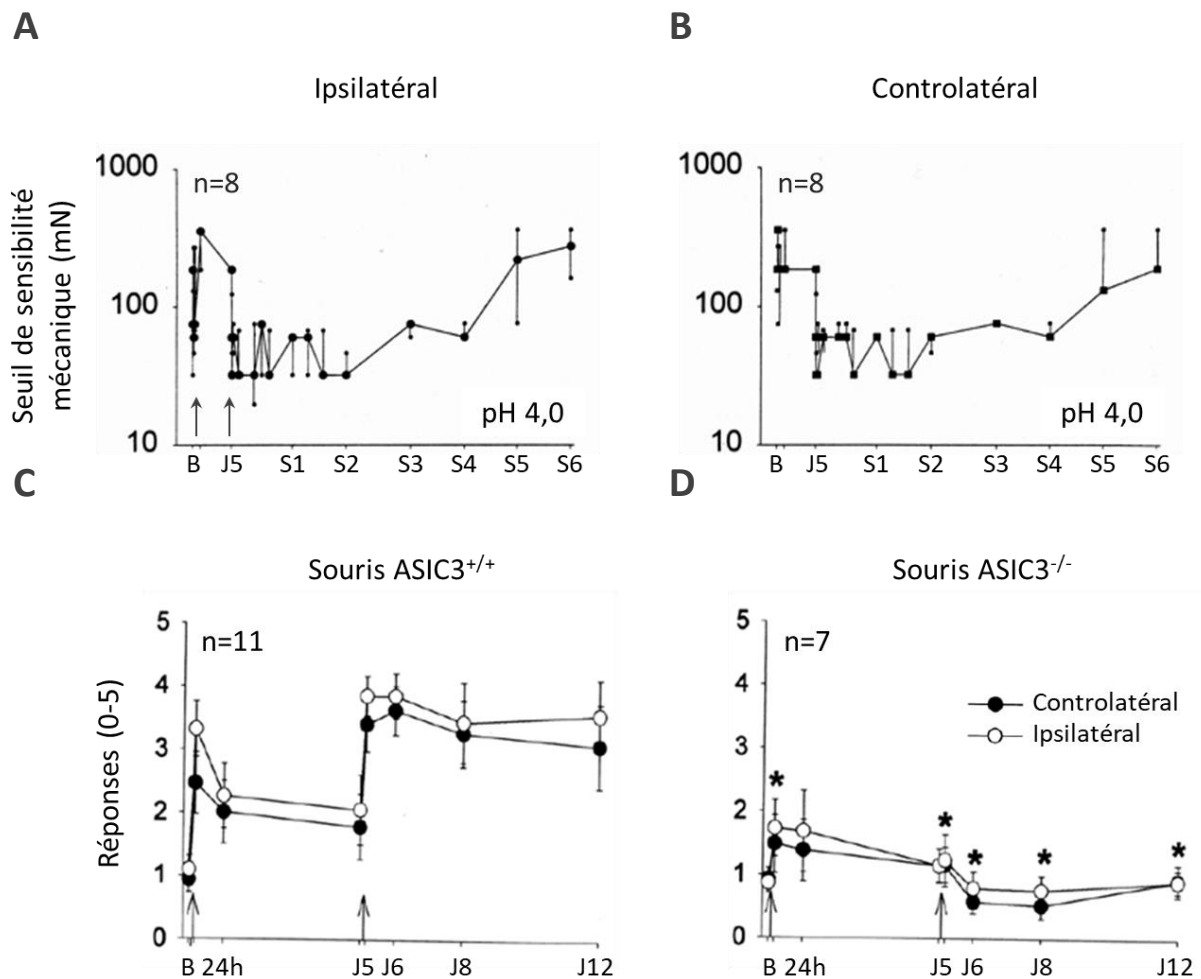
### a. Modèles de douleurs musculosquelettiques non inflammatoires et canaux ASIC3

#### i. Douleur musculaire non inflammatoire et ASIC3

Au début des années 2000, l'équipe du Dr Sluka a développé un modèle murin de douleur musculaire chronique induit par deux injections intramusculaires unilatérales (à 5 jours d'intervalle) d'une solution acide à pH 4,0 chez le rat. La sensibilité mécanique des animaux est mesurée au niveau de la voûte plantaire ipsi- et controlatérale. Les animaux développent une hyperalgie mécanique secondaire bilatérale jusqu'à 4 semaines après la seconde injection (**Figure 14A et 14B**). Le blocage des fibres afférentes périphériques au site d'injection par administration locale de lidocaïne inhibe transitoirement l'hyperalgie mécanique ipsilatérale, mais n'a aucun effet en controlatéral, suggérant que des mécanismes de sensibilisation centrale sont responsables de la bilatéralisation de cette hyperalgie (**Sluka et al., 2001**). Dans ce modèle, aucune hyperalgie thermique n'est observée.

L'accès aux différents outils pharmacologiques capables de moduler l'activité des canaux ASIC, ainsi que la génération de différentes lignées transgéniques murines invalidées pour les gènes codant pour les ASIC, ont été d'un intérêt particulier afin de démontrer la contribution de ces canaux dans la détection, la modulation et la sensibilisation des messages douloureux à travers le système nociceptif. Ainsi, après avoir généré une lignée de souris invalidées pour le gène ASIC3, le même groupe a démontré la même année dans une autre publication l'implication d'ASIC3 dans un modèle de douleur musculaire aiguë induit par une injection de solution acide à pH 4,0 chez la souris (**Price et al., 2001**). La sensibilité mécanique secondaire des animaux est mesurée 4h après l'injection : les souris ASIC3<sup>+/+</sup> développent une hyperalgie mécanique secondaire, alors que les souris ASIC3<sup>-/-</sup> en sont en partie protégées (**Price et al., 2001**). Un peu moins de deux ans plus tard, ils reproduisent ce modèle de douleur musculaire chronique chez la souris (**Sluka et al., 2003**) en appliquant le même protocole qu'ils avaient réalisé chez le rat (**Sluka et al., 2001**). L'étude montre que l'hyperalgie mécanique secondaire et bilatérale induit par injection d'une solution acide est dépendante de la présence d'ASIC3, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développant pas d'hyperalgie ipsi-ou controlatérale (**Figure 14C et 14D**) (**Sluka et al., 2003**). Par injections précoces (avant la 2<sup>nde</sup> injection acide) ou tardives (une fois que l'hyperalgie est installée) de la toxine inhibitrice d'ASIC3, l'APETx2, d'autres auteurs démontrent dans ce modèle qu'ASIC3 est nécessaire pour le développement et la mise en

place, mais pas dans le maintien, de cette d'hyperalgie mécanique secondaire et bilatérale (Figure 15) (Karczewski et al., 2010).

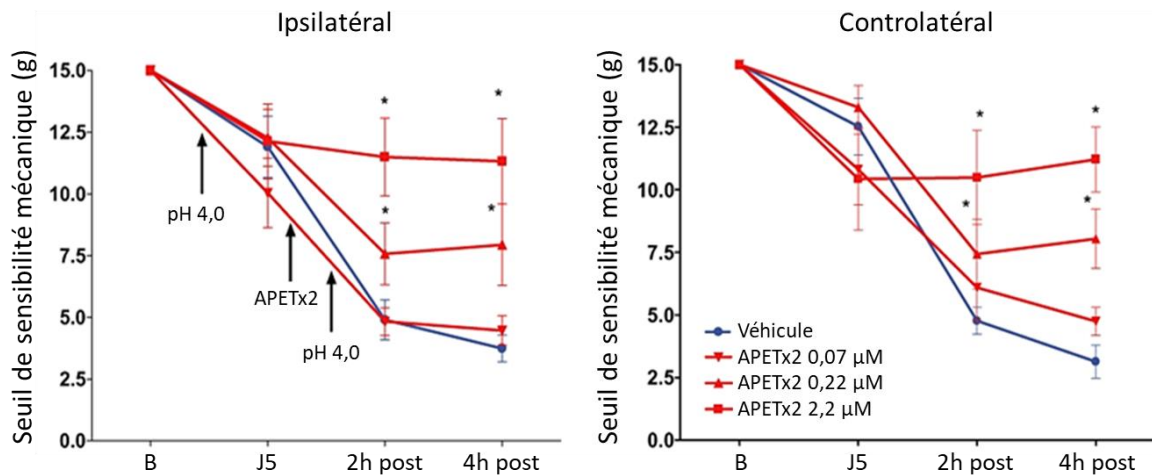
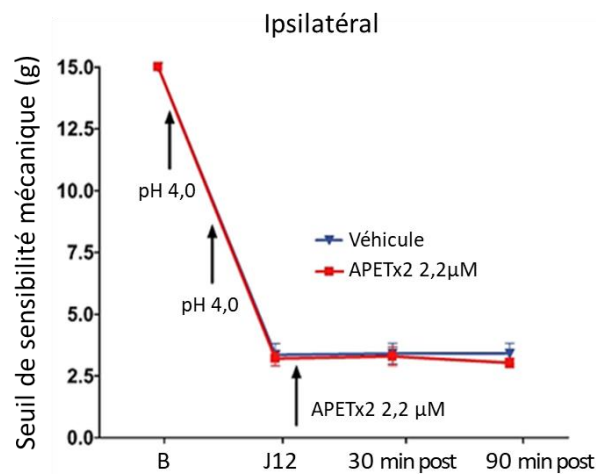


**Figure 14 : Modèle de douleur musculaire non inflammatoire dépendant d'ASIC3**

Des injections intramusculaires unilatérales (flèches) d'une solution acide à pH 4,0 sont réalisées chez le rat (A et B) et la souris (C et D), et l'hyperalgie mécanique secondaire est mesurée grâce à des filaments de von Frey, soit par détermination des seuils de sensibilité mécanique (A et B), soit par le nombre de levées de la patte en réponse à un filament de 0,4mN (C et D).

- A. Deux injections induisent une hyperalgie mécanique secondaire persistante chez le rat qui dure au moins 4 semaines.
- B. L'hyperalgie mécanique secondaire devient bilatérale après la seconde injection.
- C. Les souris ASIC3<sup>+/+</sup> développent une hyperalgie mécanique secondaire bilatérale qui dure au moins une semaine après la seconde injection.
- D. Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développent pas d'hyperalgie mécanique secondaire, ni de la patte ipsilatérale, ni de la patte controlatérale.

(D'après Sluka et al., 2001 et 2003)

**A****B**

**Figure 15 : ASIC3 est nécessaire à la mise en place de l’hyperalgie mécanique secondaire bilatérale dans un modèle de douleur musculaire non inflammatoire**

Des injections intramusculaires unilatérales d’une solution acide à pH 4,0 sont réalisées chez le rat, et l’hyperalgie mécanique secondaire est mesurée grâce à des filaments de von Frey.

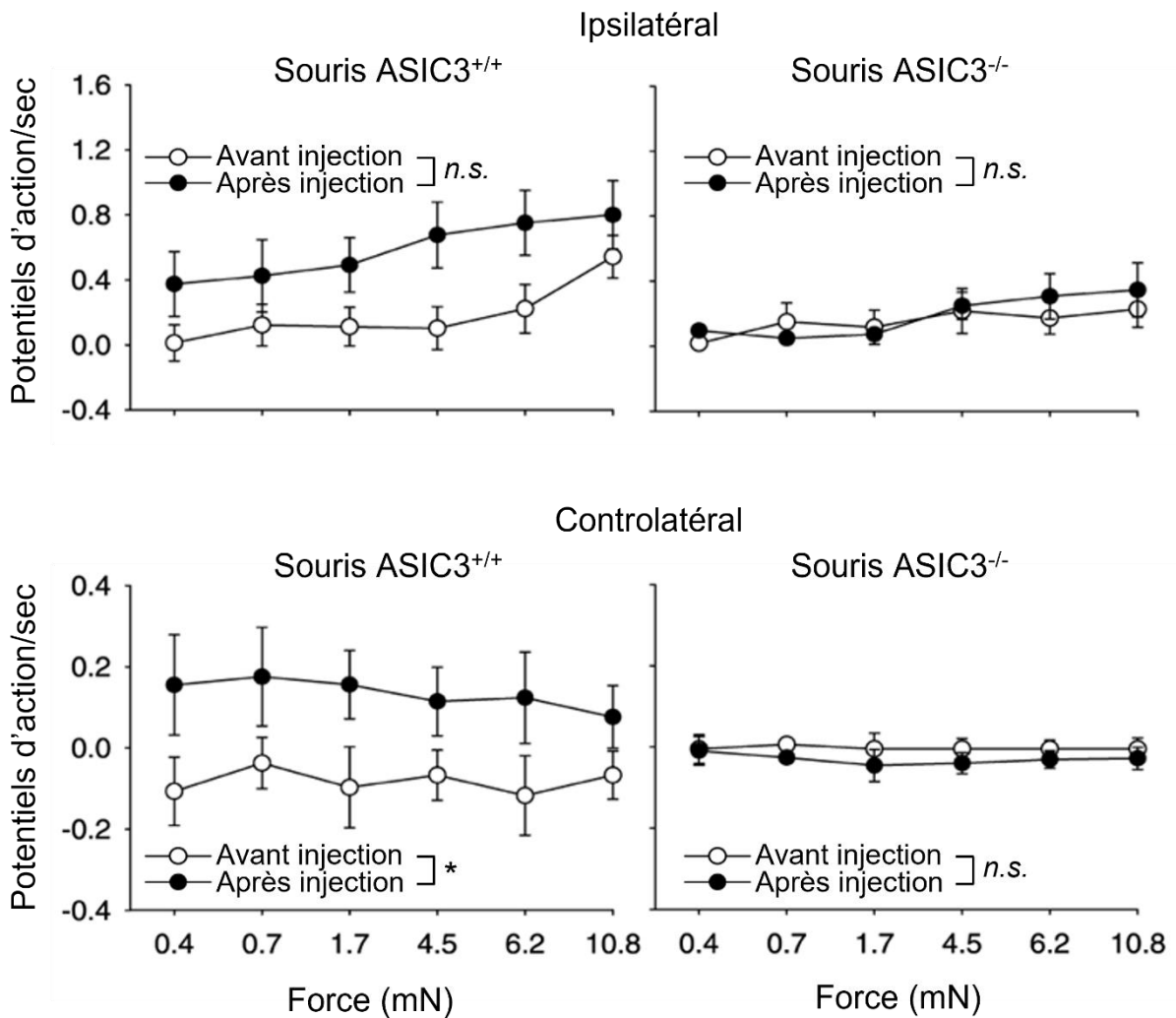
A. Les animaux développent une hyperalgie mécanique secondaire bilatérale suite aux injections.

L’injection intramusculaire précoce (entre les deux injections acides) d’APETx2 à 2,2 $\mu$ M atténue l’hyperalgie mécanique secondaire bilatérale des animaux. Gauche, patte ipsilatérale. Gauche, controlatérale.

B. L’injection intramusculaire tardive (1 semaine suivante la seconde injection) d’APETx2 ne reverse pas l’hyperalgie mécanique secondaire bilatérale développée par les animaux.

(D’après Karczewski et al., 2010)

Afin de tester l'hypothèse d'une sensibilisation centrale à l'origine de la bilatéralisation hyperalgique observée, des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires *in vivo* de neurones spinaux ayant pour champ récepteur la voûte plantaire de la patte injectée ont été réalisés avant et 4h après la 2<sup>nde</sup> injection de la solution acide, et en réponse l'application de filaments de von Frey de force croissante. L'activité électrique des neurones spinaux des souris ASIC3+/+ en réponse à la stimulation des voûtes plantaires ipsi- et controlatérales par les filaments de von Frey est significativement augmentée après la 2<sup>nde</sup> injection. Cette sensibilisation centrale n'est pas observée chez les souris ASIC3<sup>-/-</sup> (**Figure 16**) (**Sluka et al., 2003**).



**Figure 16 : Sensibilisation centrale dans un modèle de douleur musculaire avec hyperalgie mécanique secondaire bilatérale**

Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires (potentiels d'action) *in vivo* de la moelle épinière en réponse à l'application de filaments de von Frey sur la voûte plantaire, avant et 4h après les deux injections à pH 4,0. Les injections acides induisent une sensibilisation centrale bilatérale chez les souris ASIC3<sup>+/+</sup>. Aucune sensibilisation centrale ne se développe chez les souris ASIC3<sup>-/-</sup>.

Haut, enregistrements en réponse à la stimulation de la patte ipsilatérale. Bas, enregistrements en réponse à la stimulation de la patte controlatérale.

(D'après Sluka et al., 2003)

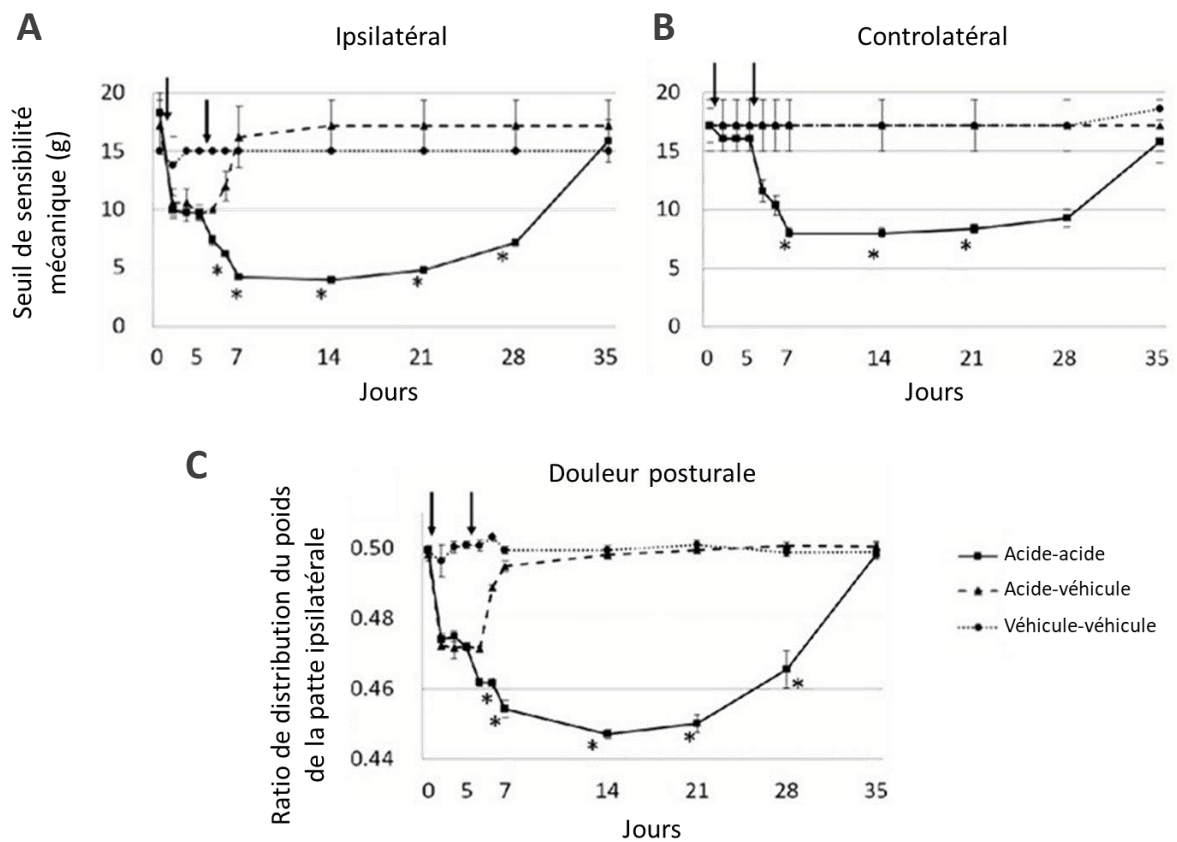
## **ii. Douleur articulaire non inflammatoire et ASIC3**

L'injection intra-articulaire de monoiodoacétate (MIA) inhibe la glyceraldéhyde-3-phosphatase déshydrogénase, perturbant ainsi la glycolyse dans les chondrocytes et conduisant à la mort par apoptose des chondrocytes, et constitue chez le rat et la souris, un bon modèle d'ostéoarthrose (Kalbhen, 1987; van der Kraan et al., 1989; Clarke et al., 1997; Guingamp et al., 1997; Combe et al., 2004). Une étude utilisant ce modèle chez le rat (articulation du genou), montre que les animaux développent des douleurs posturales (test de weight-bearing) et une hyperalgie mécanique secondaire qui durent pendant au moins 28 jours après l'injection, avec une surexpression d'ASIC3 dans les DRG innervant l'articulation accompagnée de lésions cartilagineuses. L'injection précoce d'APETx2, un inhibiteur sélectif d'ASIC3, réduit la surexpression d'ASIC3 dans les DRG innervant l'articulation, la sévérité de l'ostéoarthrose, et atténue la douleur posturale et l'hyperalgie mécanique secondaire des animaux. En revanche, l'injection tardive d'APETx2 ne permet pas de reverser la douleur posturale, l'hyperalgie mécanique secondaire, ni d'atténuer la sévérité de l'ostéoarthrose des animaux (Izumi et al., 2012).

Appliqué aux articulations, le protocole de Kathleen Sluka de douleur musculaire chronique non inflammatoire (Sluka et al., 2001, 2003) a permis de développer un autre modèle murin de douleur articulaire chronique non inflammatoire chez le rat. Les animaux ayant reçu la double injection unilatérale de solution saline acide (pH 4,0) dans l'articulation du genou développent des hyperalgies mécaniques bilatérales primaire (site d'injection) et secondaire (Figure 17A) ainsi qu'une douleur posturale (Figure 17B) qui sont maintenues pendant 28 jours. Des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* montrent une augmentation de l'activité des fibres C afférentes de l'articulation après injection intra-articulaire de la solution saline à pH 4,0. L'injection précoce d'APETx2 (et non tardive) protège les animaux du développement des hyperalgies mécaniques bilatérales primaire et secondaire chroniques ainsi que de la douleur posturale, et atténue significativement l'activité des fibres C en réponse à l'injection de la solution saline acide (Sugimura et al., 2015).

Ces résultats suggèrent que dans un contexte non inflammatoire de douleur articulaire ou musculaire, ASIC3 est impliqué dans l'initiation et la mise en place et non dans le maintien de l'hyperalgie mécanique primaire et secondaire bilatérale.





**Figure 17 : Modèle de douleur articulaire non inflammatoire**

Des injections intra-articulaires unilatérales (flèches) d'une solution acide à pH 4,0 ou d'une solution témoin sont réalisées chez le rat. L'hyperalgie mécanique secondaire est mesurée grâce à des filaments de von Frey (A et B), et la douleur posturale est déterminée par le test de Dynamic Weight Bearing (C).

- A. Deux injections acides sont nécessaires pour induire une hyperalgie mécanique secondaire persistante chez le rat. Une seule injection n'induit qu'une hyperalgie transitoire.
- B. L'hyperalgie mécanique secondaire devient bilatérale après la seconde injection acide.
- C. Deux injections acides induisent une douleur posturale persistante. Une seule injection n'induit qu'un défaut postural transitoire.

(D'après Sugimura et al., 2015)

## **b. Modèles de douleurs musculosquelettiques inflammatoires et canaux ASIC3**

L'injection intramusculaire ou intra-articulaire (genou) unilatérale de carraghénine (3%) chez le rat induit aux sites d'injection respectifs des signes de réaction immunitaire tels que l'infiltration de neutrophiles dès 4h suivant l'injection, ainsi que la présence de macrophages jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine suivant l'injection. Aucun signe de réaction inflammatoire n'est observé du côté controlatéral du muscle ou du genou injecté (**Radhakrishnan et al., 2003**).

### ***i. Douleur musculaire inflammatoire et ASIC3***

L'injection intramusculaire de carraghénine (3%) chez le rat et la souris induit le développement d'une hyperalgie mécanique bilatérale primaire aiguë (4h et 24h post injection) (**Skyba et al., 2005; Walder et al., 2010**) ainsi que le développement d'hyperalgies secondaires aiguës et chroniques (dès 24h et jusqu'à 5 à 8 semaines post injection), à la fois thermique et mécanique (**Radhakrishnan et al., 2003; Sluka et al., 2007; Walder et al., 2010**). Cependant, la bilatéralisation des hyperalgies secondaires n'est pas claire, suite à l'injection intramusculaire de carraghénine. Deux études montrent une bilatéralisation des hyperalgies secondaires mécanique et/ou thermique chez le rat (**Radhakrishnan et al., 2003**) et la souris (**Walder et al., 2010**), tandis que dans une autre étude chez la souris, la propagation de ces hyperalgies du côté controlatéral n'est pas évidente (**Sluka et al., 2007**).

Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> sont protégées de l'hyperalgie secondaire mécanique, mais pas thermique, ainsi dans un contexte d'inflammation musculaire les canaux ASIC3 seraient impliqués dans le développement de l'hyperalgie secondaire *mécanique* et non *thermique* (**Sluka et al., 2007**). De plus, toujours ainsi dans un contexte d'inflammation musculaire, ASIC3 semble spécifiquement être impliqué dans le développement de l'hyperalgie mécanique *secondaire*, et non *primaire*. À l'inverse, ASIC1 (ASIC1a et ASIC1b) ne jouerait pas de rôle dans l'induction de l'hyperalgie mécanique *secondaire*, mais *primaire* (**Walder et al., 2010**). L'injection intramusculaire d'un inhibiteur non spécifique des ASIC (A-317567) après induction inflammatoire est capable de reverser l'hyperalgie mécanique secondaire de souris sauvages et ASIC1<sup>-/-</sup>.

L'injection intramusculaire unilatérale de carraghénine induit une augmentation de l'expression d'ASIC3 et ASIC2 (pas de ASIC1) dans les DRG lombaires ipsilatéraux et controlatéraux innervant le muscle injecté (**Walder et al., 2010**). De manière intéressante, la

réexpression d'ASIC3 (par injection d'un vecteur viral codant pour ASIC3) spécifiquement dans le muscle enflammé, et non dans la peau de la zone mesurée par les filaments de von Frey, restaure l'hyperalgie mécanique secondaire dans les souris ASIC3<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent que l'expression d'ASIC3 par les fibres afférentes musculaires (et non les fibres afférentes cutanées de la zone secondaire) est nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique secondaire dans un contexte inflammatoire (Sluka et al., 2007).

Ces résultats suggèrent que dans contexte inflammatoire de douleur musculaire, ASIC3 est nécessaire au développement ainsi qu'au maintien de l'hyperalgie mécanique secondaire bilatérale.

### ***ii. Douleur articulaire inflammatoire et ASIC3***

L'induction d'inflammation articulaire par l'injection intra-articulaire unilatérale de kaolin et/ou carraghénine dans le genou provoque le développement d'une hyperalgie mécanique primaire, d'une hyperalgie thermique secondaire (jusqu'à 6 à 7 semaines post injection), ainsi que d'une hyperalgie secondaire mécanique bilatérale (jusqu'à 4 à 6 semaines post injection) (Radhakrishnan et al., 2003; Skyba et al., 2005; Ikeuchi et al., 2008). Cependant, encore une fois la bilatéralisation de l'hyperalgie thermique secondaire n'est pas claire. Une étude montre que l'hyperalgie thermique secondaire est bilatérale (Radhakrishnan et al., 2003), une autre qu'elle est unilatérale (Ikeuchi et al., 2008).

Dans l'étude d'Ikeuchi et al., 2008, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> comme les souris ASIC3<sup>+/+</sup> développent une hyperalgie mécanique primaire (Figure 18A), ainsi qu'une hyperalgie thermique secondaire. Les souris ASIC3<sup>+/+</sup> développent également une hyperalgie mécanique secondaire bilatérale (Figure 18B), qui dure pendant au moins 2 semaines, et des expériences d'immunohistologie montrent une augmentation de l'expression d'ASIC3 dans les fibres afférentes primaires innervant l'articulation du genou en condition inflammatoire. En revanche, contrairement aux souris ASIC3<sup>+/+</sup>, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développent pas d'hyperalgie mécanique secondaire (Figure 18B), suggérant qu'ASIC3 est impliqué dans le développement d'hyperalgie mécanique secondaire, mais pas dans le développement d'hyperalgie mécanique primaire ni d'hyperalgie thermique secondaire, dans un contexte de douleur articulaire inflammatoire (Ikeuchi et al., 2008). Les auteurs ont réalisé quelques mois plus tard, dans ce même modèle murin de douleur articulaire inflammatoire, des expériences

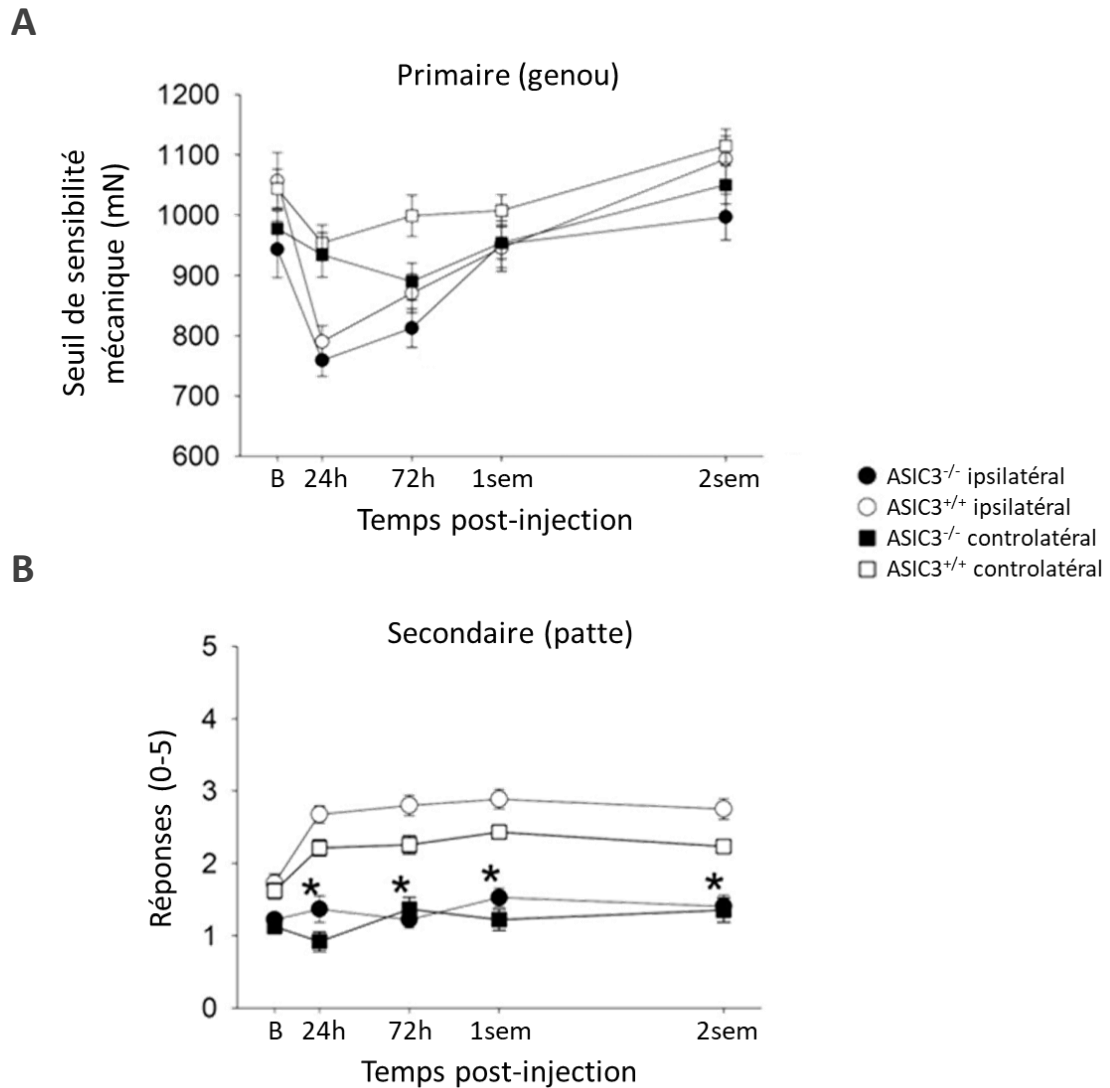
de marquage immunohistochimique (ASIC3 et CGRP) des DRG innervant spécifiquement l'articulation du genou grâce à l'injection d'un marqueur rétrograde. La majorité des neurones exprimant ASIC3 co-expriment également CGRP, un marqueur des neurones peptidergiques (62% des neurones rétrogradement marqués ASIC3+), et la plupart de ces neurones sont de petit diamètre (94%). Après induction d'inflammation articulaire, il y a une augmentation du nombre de neurones co-exprimant ASIC3 et CGRP (neurones ASIC3+ peptidergiques), et également un changement de la distribution de la taille du soma des neurones exprimant ASIC3 mais pas CGRP (diminution du diamètre moyen des neurones ASIC3+ non peptidergiques) (Ikeuchi et al., 2009).

Les résultats de ces deux études suggèrent que la régulation positive d'ASIC3 dans les neurones peptidergiques, ainsi qu'un changement phénotypique des neurones non peptidergiques exprimant ASIC3, jouent un rôle dans le développement de l'hyperalgie mécanique secondaire observée dans ce modèle d'arthrite induit par injection de carraghénine (Ikeuchi et al., 2008, 2009). En revanche, dans ce modèle, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si ASIC3 est nécessaire au maintien de l'hyperalgie mécanique secondaire.

Chez la souris, des injections intra-articulaires (cheville) répétées (une injection/semaine pendant 4 semaines) de CFA permettent de générer un modèle de polyarthrite rhumatoïde. Ces injections induisent une inflammation synoviale (pannus et acidose du liquide synovial), des lésions ostéo-cartilagineuses de l'articulation injectée, une augmentation sérique d'IL-6 et TNF- $\alpha$ , un gonflement ipsilatéral de l'articulation et bilatéral des pattes, ainsi qu'une hyperalgie mécanique bilatérale des pattes qui est maintenue pendant au moins 1 semaine suivant le début du protocole. Une autre caractéristique de ce modèle est la surexpression d'ASIC3 dans les DRG lombaires ipsilatéraux. Le groupe s'est alors intéressé aux conséquences de la délétion génétique d'ASIC3 sur le développement d'arthrite. Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ont une réduction significative des aspects histologiques inflammatoires observés dans les souris ASIC3<sup>+/+</sup> tout au long du protocole. Dans la phase aigüe de l'arthrite, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> développent une hyperalgie mécanique bilatérale et possèdent des scores arthritiques similaires aux souris ASIC3<sup>+/+</sup>. En revanche, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> semblent protégées du maintien dans le temps de cette hyperalgie mécanique bilatérale arthritique, avec des scores arthritiques et une hyperalgie mécanique bilatérale significativement atténués dans la phase

chronique comparé aux souris ASIC3<sup>+/+</sup> (Hsieh et al., 2017). Ainsi, dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde, ASIC3 semble essentiel dans le développement et le maintien de la douleur dans la phase chronique de la pathologie, mais pas dans l'initiation de cette douleur dans la phase aigüe.

Une précédente étude utilisant un autre modèle polyarthrite rhumatoïde induit par injection intraveineuse d'anticorps anti collagène II (CAIA, Collagen antibody-induced arthritis) montre également l'implication d'ASIC3 dans le développement d'une hyperalgie mécanique secondaire (patte). La délétion génétique d'ASIC3 n'a aucune incidence sur l'hyperalgie primaire des animaux (cheville) (Sluka et al., 2013). De manière surprenante, malgré une hyperalgie mécanique secondaire atténuée, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> dans ce modèle ont des signes d'arthrite plus sévères que les souris ASIC3<sup>+/+</sup>, avec une augmentation des aspects histologiques inflammatoires, tout en ayant une activité physique légèrement plus élevée que les souris ASIC3<sup>+/+</sup>.



**Figure 18 : ASIC3 est nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique secondaire dans un modèle de douleur articulaire inflammatoire**

Une injection intra-articulaire unilatérale de carraghénine est réalisée chez la souris. L'hyperalgie mécanique primaire (A) est mesurée par détermination du seuil de sensibilité mécanique en réponse à une compression de l'articulation appliquée par une pince calibrée. L'hyperalgie mécanique secondaire (B) est déterminée par le nombre de levées de la patte en réponse à un filament de 0,4mN.

A. Les souris ASIC3<sup>+/+</sup> et ASIC3<sup>-/-</sup> développent une hyperalgie mécanique primaire unilatérale qui revient au seuil basal une semaine après l'injection.

B. Les souris ASIC3<sup>+/+</sup> développent une hyperalgie mécanique secondaire bilatérale persistant pendant au moins 2 semaines après l'injection. Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développent pas d'hyperalgie mécanique secondaire, ni de la patte ipsilatérale, ni de la patte controlatérale.

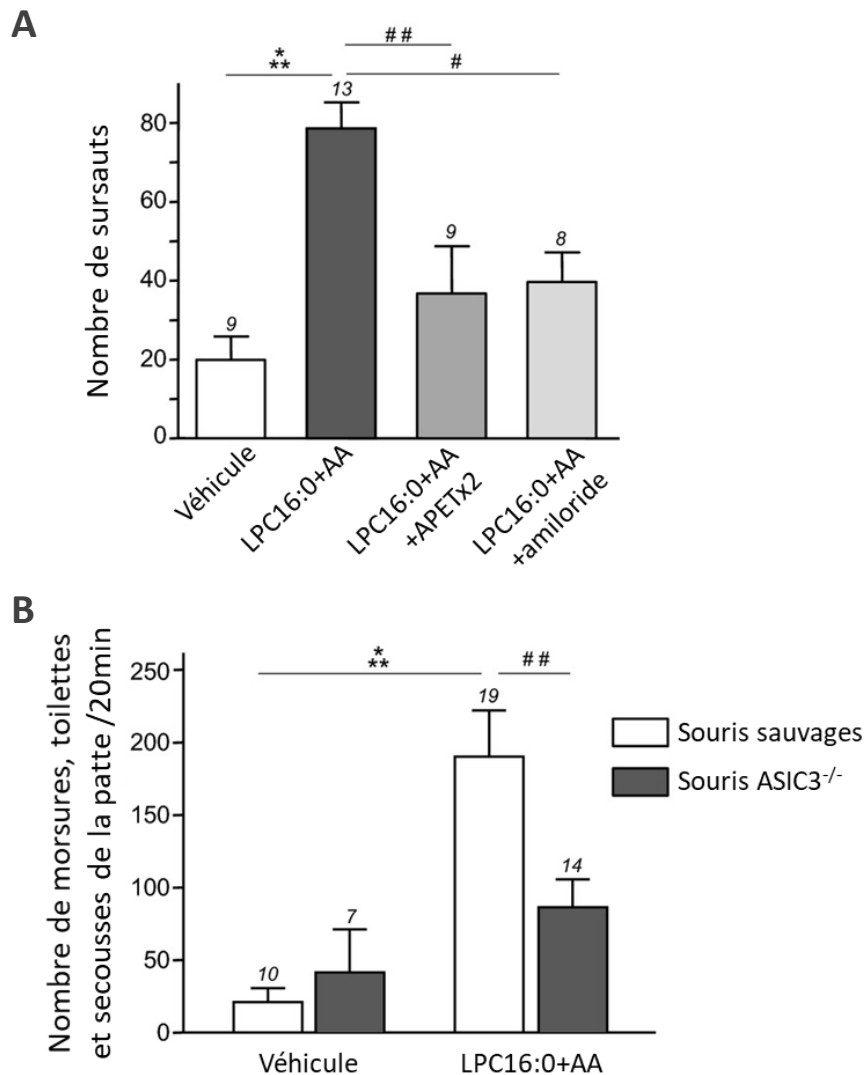
(D'après Ikeuchi et al., 2008)

### 3. Canaux ASIC3, lipides et douleurs musculosquelettiques

Plusieurs études ont montré que des lipides étaient capables de moduler l'activité de divers canaux ioniques impliqués dans la détection des stimuli douloureux dans les fibres afférentes primaires (**Maingret et al., 2000b; Flemming et al., 2006; Andersson et al., 2007; Gentry et al., 2010; Marra et al., 2016**). Il a été démontré que les canaux ASIC3 peuvent être modulés par des lipides, tels que l'acide arachidonique (AA) et la lysophosphatidylcholine (LPC), qui sont détectés chez des patients souffrant de douleurs chroniques (**Marra et al., 2016; Hung et al., 2020**). La LPC pourrait jouer un rôle important dans les douleurs des tissus profonds, plus particulièrement dans les douleurs associées aux troubles musculosquelettiques (**Marra et al., 2016; Zhai et al., 2019; Hung et al., 2020**). Des analyses lipidomiques ont détectés la LPC dans les liquides synoviaux de patients souffrant de différentes pathologies articulaires associées à des scores importants de douleurs (**Marra et al., 2016**), et une suractivation de la conversion de phosphatidylcholine (PC) en LPC due à une surexpression d'une phospholipase A<sub>2</sub> été mise en évidence dans une cohorte de patients souffrant d'ostéoarthrose (OA) (**Zhai et al., 2019**).

Il a été montré au laboratoire par patch-clamp que des exsudats synoviaux prélevés chez des patients souffrant de différentes pathologies articulaires activent spécifiquement les canaux ASIC3 en système hétérologue, et c'est le contenu en lipides de ces exsudats qui est responsable de ces effets. Parmi les lipides détectés dans ces exsudats, la LPC possède un effet important sur ASIC3 : en système hétérologue elle active directement un courant soutenu au pH physiologique de 7,4, et potentialise les courants induits par des acidifications modérées (pH 7,0). Cette potentialisation des courants ainsi que l'apparition d'un courant constitutif en absence d'acidification extracellulaire s'explique par un décalage de la courbe d'activation en fonction du pH, amenant ainsi à une augmentation du courant de fenêtre. La co-application de LPC avec de l'AA a un effet encore plus important sur les courants à pH 7,4 des cellules exprimant ASIC3, qui est inhibé par l'application d'APETx2. La co-application de LPC+ AA à pH 7,4 sur des neurones de DRG de rat active un courant uniquement dans les neurones exprimant des courants ASIC natifs, courant inhibé par l'application d'APETx2 ou d'amiloride. Elle augmente l'activité des fibres C cutanées (enregistrements en nerf-peau), et cet effet est inhibé par l'amiloride. La co-injection en sous-cutanée de LPC16:0 et d'AA induit chez le rat (**Figure 19A**) et la souris (**Figure 19B**) un comportement douloureux dépendant d'ASIC3 : les

comportements douloureux sont atténués chez les souris ASIC3<sup>-/-</sup> (**Figure 19B**) et chez le rat lorsque l'APETx2 ou l'amiloride sont injectés avec les lipides (**Figure 19A**) (Marra et al., 2016).



**Figure 19 : Les comportements douloureux induits par injections sous-cutanées de LPC16:0+AA sont dépendants d'ASIC3**

Une injection en sous-cutanée dans la patte de LPC16:0+ AA est réalisée chez le rat (A) et la souris (B). Les comportements douloureux sont déterminés par le nombre de sursauts (A) ou le nombre de morsures, secousses et toilettes de la patte injectée (B).

A. Les rats injectés avec de la LPC16:0 et de l'AA développent un comportement douloureux qui est atténué lorsque l'APETx2 ou l'amiloride sont co-injectés aux lipides.

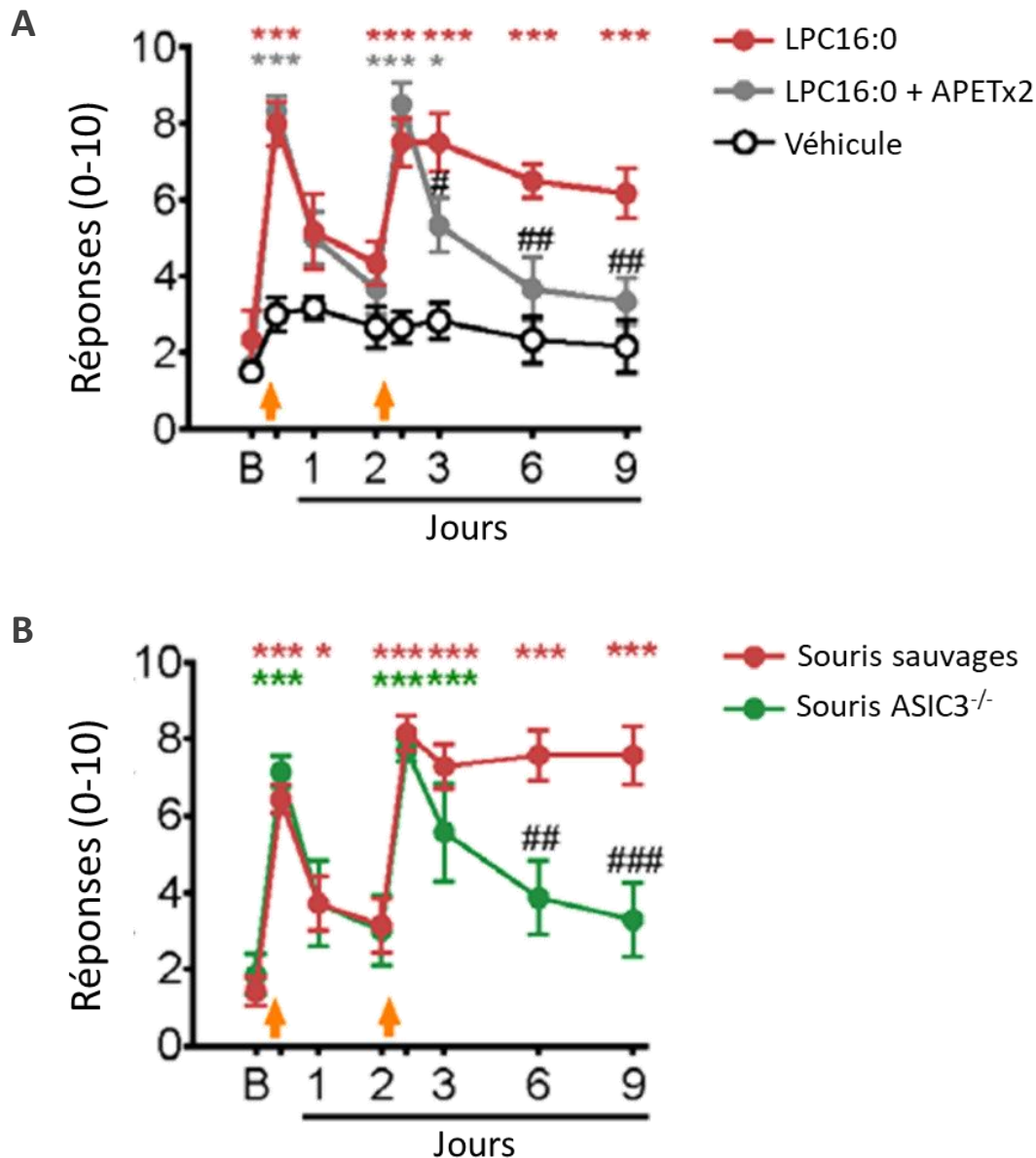
B. Les souris ASIC3<sup>+/+</sup> injectées avec de la LPC16:0 et de l'AA développent un comportement douloureux. Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développent pas de comportements douloureux à la suite de l'injection de ces lipides.

(D'après Marra et al., 2016)



Un nouveau modèle murin de fibromyalgie induit par une exposition à des stress sonores non douloureux (RISS) a récemment été développé (**Hung et al., 2020**). La fibromyalgie est un syndrome douloureux caractérisé par des douleurs chroniques diffuses, notamment musculaires, sans cause apparente (pas d'inflammation, de lésions musculosquelettiques ni de neuropathie), et associé à des troubles de l'humeur, des insomnies et des comportements anxieux. Dans le modèle de Hung et al., les souris exposées aux RISS présentent des comportements douloureux et anxieux proches de la description clinique des symptômes : hyperalgie mécanique musculaire « primaire » (muscle, maintenue jusqu'à 2 semaines), hyperalgie mécanique « secondaire » (patte, maintenue au-delà de 4 semaines), hyperalgie thermique « secondaire » (maintenue au-delà de 4 semaines), et comportements anxieux (tests de l'*Open field* et de l'*Elevated plus maze*), sans apparentes inflammation, acidose tissulaire, lésion tissulaire ou neuropathie. Des expériences de marquages immunohistochimiques dans les neurones de DRG des souris suggèrent que l'excès de nociception dans ce modèle de fibromyalgie impliquent principalement des fibres amyélinisées C, et qu'il y aurait une sensibilisation au niveau spinal (**Hung et al., 2020**).

Des analyses lipidomiques par spectrométrie de masse réalisées sur des prélèvements sanguins d'une cohorte de patients souffrant de fibromyalgie, ainsi que du modèle murin RISS, montrent une augmentation significative des taux de LPC (comparé à des sujets sains et à des souris témoins respectivement), et une espèce ressort en particulier, la LPC16:0. De manière intéressante, il y a une corrélation positive entre les scores de douleur des patients ayant une forme sévère de fibromyalgie et les taux de LPC16:0. Partant de ce constat, les auteurs testent l'effet d'injections intramusculaires unilatérales de LPC16:0 (2 injections) chez des souris sauvages. Les souris développent une hyperalgie mécanique secondaire (maintenue au-delà de 4 semaines). L'implication d'ASIC3 a ensuite été étudié dans les deux modèles (RISS et LPC16:0). Les souris sauvages qui ont reçu une co-injection de LPC16:0 et d'APETx2 (**Figure 20A**), ainsi que les souris ASIC3<sup>-/-</sup> LPC-injectées (**Figure 20B**) ou exposées aux RISS, sont protégées de l'hyperalgie mécanique secondaire chronique normalement observée dans les deux modèles (**Hung et al., 2020**).



**Figure 20 : ASIC3 est nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique secondaire dans un modèle de douleur musculaire induit par injection de LPC16:0**

Deux injections intramusculaires (flèches) unilatérales de LPC16:0 sont réalisées chez la souris. L'hyperalgie mécanique secondaire est déterminée par le nombre de levées de la patte en réponse à un filament de von Frey 0,2mN.

C. Deux injections intramusculaires de LPC16:0 induisent le développement d'une hyperalgie mécanique secondaire persistante chez les souris sauvages qui est largement atténuée lorsque l'APETx2 est co-injecté au LPC16:0. Une seule injection n'induit qu'une hyperalgie transitoire, même lorsque l'APETx2 est co-injecté.

D. À la suite de la première injection de LPC16:0, les souris sauvages comme les souris ASIC3<sup>-/-</sup> développent une hyperalgie mécanique secondaire transitoire. Contrairement aux souris sauvages, les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ne développent pas d'hyperalgie mécanique secondaire persistante.

(D'après Hung et al., 2020)

# RESULTATS

## I. Contexte de l'étude

---

Les canaux ASICs sont impliqués dans différents types de douleurs, et les canaux ASIC3 exprimés dans les neurones sensoriels périphériques joueraient un rôle de senseur majeur de l'acidose tissulaire douloureuse pendant une inflammation (**Deval et al., 2008**). Lors d'une inflammation tissulaire, plusieurs composés pro-inflammatoires sont libérés, tels que des cytokines, et également des lipides issus de la dégradation des membranes plasmiques. Par exemple, en cas d'inflammation, la synthèse et la sécrétion de phospholipases, les sPLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub> sécrétées), augmentent. Les PLA<sub>2</sub> sont des enzymes clivant les phospholipides en lysophospholipides et acides gras, et participent ainsi à la formation et l'activation de médiateurs inflammatoires (**Pruzanski et Vadas, 1991**).

Pendant longtemps, les seuls ligands endogènes connus des canaux ASICs étaient les protons. Lors de mon arrivée en thèse, l'équipe venait de montrer qu'un lipide issu de la dégradation des membranes plasmiques active ASIC3, sans aucune acidification extracellulaire (**Marra et al., 2016**) : grâce à une collaboration avec le CHU de Nice, l'équipe a testé par patch-clamp l'effet d'exsudats inflammatoires, prélevés dans les articulations du genou de patients ayant des scores de douleurs élevés (8-9/10), sur l'activité de ces canaux. Bien que non acides, ces exsudats humains activent un courant soutenu dans des cellules exprimant spécifiquement ASIC3. Un lysophospholipide en forte concentration a été identifié dans ces épanchements inflammatoires : la lysophosphatidylcholine 16:0 (LPC16:0). Appliquée seule, elle active également ASIC3 sans acidification extracellulaire. La LPC16:0 a ainsi été identifiée comme un nouvel activateur endogène du canal ASIC3. Cette découverte ouvre la voie vers de nouvelles perspectives quant aux rôles de la LPC16:0 et des canaux ASIC3 dans la douleur articulaire chez l'humain.

L'objectif de ma thèse a été de caractériser l'implication de la LPC16:0 et du canal ionique ASIC3 dans le développement de douleurs articulaires chroniques dans un modèle murin. La majeure partie de mon travail de thèse a nécessité la réalisation d'expériences de comportement sur des souris sauvages et invalidées pour les canaux ASIC3.

## II. Article

---

« **Lysophosphatidylcholine 16:0 mediates persistent joint pain through Acid-Sensing Ion Channel 3: preclinical and clinical evidences** »

Florian Jacquot<sup>#</sup>, Spiro Khoury<sup>#</sup>, **Bonnie Labrum<sup>#</sup>**, Kévin Delanoe, Ludivine Pidoux, Julie Barbier, Lauriane Delay, Agathe Bayle, Youssef Aissouni, David A. Barriere, Kim Kultima, Eva Freyhult, Anders Hugo, Eva Kosek, Aisha S. Ahmed, Alexandra Jurczak, Eric Lingueglia, Camilla I. Svensson, Véronique Breuil, Thierry Ferreira, Fabien Marchand\*, Emmanuel Deval\*

*Publié dans PAIN,*

*doi : 10.1097/j.pain.0000000000002596*

# Lysophosphatidylcholine 16:0 mediates chronic joint pain associated to rheumatic diseases through acid-sensing ion channel 3

Florian Jacquot<sup>a</sup>, Spiro Khoury<sup>b</sup>, Bonnie Labrum<sup>c</sup>, Kévin Delanoe<sup>c</sup>, Ludivine Pidoux<sup>c</sup>, Julie Barbier<sup>a</sup>, Lauriane Delay<sup>a</sup>, Agathe Bayle<sup>a</sup>, Youssef Aissouni<sup>a</sup>, David A. Barriere<sup>a</sup>, Kim Kultima<sup>d</sup>, Eva Freyhult<sup>d</sup>, Anders Hugo<sup>e</sup>, Eva Kosek<sup>f,g</sup>, Aisha S. Ahmed<sup>h</sup>, Alexandra Jurczak<sup>i</sup>, Eric Lingueglia<sup>c</sup>, Camilla I. Svensson<sup>i</sup>, Véronique Breuil<sup>i</sup>, Thierry Ferreira<sup>b</sup>, Fabien Marchand<sup>a</sup>, Emmanuel Deval<sup>c,\*</sup>

## Abstract

Rheumatic diseases are often associated to debilitating chronic pain, which remains difficult to treat and requires new therapeutic strategies. We had previously identified lysophosphatidylcholine (LPC) in the synovial fluids from few patients and shown its effect as a positive modulator of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) able to induce acute cutaneous pain in rodents. However, the possible involvement of LPC in chronic joint pain remained completely unknown. Here, we show, from 2 independent cohorts of patients with painful rheumatic diseases, that the synovial fluid levels of LPC are significantly elevated, especially the LPC16:0 species, compared with postmortem control subjects. Moreover, LPC16:0 levels correlated with pain outcomes in a cohort of osteoarthritis patients. However, LPC16:0 do not appear to be the hallmark of a particular joint disease because similar levels are found in the synovial fluids of a second cohort of patients with various rheumatic diseases. The mechanism of action was next explored by developing a pathology-derived rodent model. Intra-articular injections of LPC16:0 is a triggering factor of chronic joint pain in both male and female mice, ultimately leading to persistent pain and anxiety-like behaviors. All these effects are dependent on ASIC3 channels, which drive sufficient peripheral inputs to generate spinal sensitization processes. This study brings evidences from mouse and human supporting a role for LPC16:0 via ASIC3 channels in chronic pain arising from joints, with potential implications for pain management in osteoarthritis and possibly across other rheumatic diseases.

**Keywords:** Chronic pain, Joint, Osteoarthritis, Lysophosphatidylcholine, Lipid, Acid-sensing ion channels, Sodium channels

## 1. Introduction

Chronic joint pain is the primary reason why patients seek care from rheumatologists, representing a heavy burden for modern societies.<sup>4,14</sup> In addition to economical costs, chronic joint pain considerably impairs the patients' quality of life, leading to disabilities and psychological distress.<sup>4,36</sup> Despite major advances in inflammatory arthritis therapies, most patients, especially those suffering from osteoarthritis (OA), continue to experience life-disabling pain. The development of new therapeutic strategies requires a better understanding of the

pathophysiology of joint pain, with careful identification of the triggering factors and associated mechanisms.

In the past 2 decades, signaling lipids have been shown to contribute to the onset and maintenance of pain. Lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidic acid (LPA), the most prominent lysoglycerophospholipids,<sup>41</sup> are emerging as potential direct pain mediators, besides well-known thromboxanes, leukotrienes and prostaglandins.<sup>15,32</sup> Lysophosphatidic acid has been already identified as a key promoter of nerve demyelination and certainly of neuropathic pain.<sup>22,52</sup> Paradoxically, LPA receptor

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

F. Jacquot, S. Khoury, B. Labrum contributed equally to this work.

<sup>a</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France, <sup>b</sup> Lipotoxicity and Channelopathies (LiTch)—ConicMeds, Université de Poitiers, France, <sup>c</sup> Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, LabEx ICST, FHU InovPain, France, <sup>e</sup> Orthocenter, Stockholm, Sweden, <sup>d</sup> Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden, <sup>f</sup> Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, <sup>g</sup> Department of Surgical Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden, <sup>h</sup> Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, <sup>i</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, <sup>j</sup> CHU-Nice, Hôpital Pasteur, France

\*Corresponding author. Address: IPMC, UMR 7275 CNRS/Université Côte d'Azur, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. E-mail address: deval@ipmc.cnrs.fr (E. Deval).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.painjournalonline.com](http://www.painjournalonline.com)).

PAIN 00 (2022) 1–15

Copyright © 2022 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the International Association for the Study of Pain. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002596>

signaling has also documented physiological roles in myelinating cells during nervous system development.<sup>54–56</sup> The role of LPC in pain remains more elusive because its effects could be partially mediated by LPA through the action of autotaxin, the LPC-to-LPA converting enzyme.<sup>50,51</sup> Nevertheless, some studies support a direct role of LPC in pain associated to its ability to activate/potentiate pain-related ion channels.<sup>2,12,15,31,32</sup> We already reported high levels of LPC in the synovial fluids of painful joint patients,<sup>32</sup> and an overactivation of the conversion pathway of PC-to-LPC has been recently observed in OA patients.<sup>57</sup> Lysophosphatidylcholine seems also important in pain originating from muscles.<sup>18</sup>

Lysophosphatidylcholine is able to activate and potentiate pain-related acid-sensing ion channel 3 (ASIC3),<sup>32</sup> a subtype of the ASIC channel family, widely expressed in nociceptors and also gated by extracellular protons.<sup>53</sup> Acid-sensing ion channel 3 have been involved in animal models of inflammatory and noninflammatory pain,<sup>9,43</sup> especially in the development of chronic pain states originating from joints<sup>20,23,48</sup> and muscles.<sup>18,44,45</sup> Genetic deletion of ASIC3 reduced secondary pain behaviors in different models of arthritis, such as intra-articular complete Freund adjuvant (CFA) or carrageenan, and in collagen antibodies-induced arthritis model.<sup>17,20,21,46</sup> However, its direct role in inflammation is still debated with proresolving and worsening effects reported.<sup>17,46</sup> Blockade of ASIC3 with APETx2<sup>10</sup> attenuated both disease and pain progression of the early phase in a OA rat model.<sup>23</sup> Finally, ASIC3-dependent pain behaviors can be induced upon injection of LPC in rodent paw or muscle.<sup>18,32</sup> Here, we investigated the clinical relevance of LPC in chronic joint pain and explored its mechanism of action involving peripheral ASIC3 channels following intra-articular administrations of LPC16:0 in mice.

## 2. Methods

### 2.1. Patient cohorts

#### 2.1.1. Cohort of patients with osteoarthritis (first cohort)

Thirty-five patients with knee OA (16 women and 19 men, average age, 64.8 years, range 49–73 years) participated. This study was approved by the Regional Ethical Review Board in Stockholm, Sweden (reference number 2011/2036-31-1, 2012/2006-32) and followed the guidelines of the Declaration of Helsinki. All patients were recruited consecutively from the waiting list for total knee replacement at Ortho Center, Upplands Väsby, Sweden. The patient inclusion criteria were 25 to 75 years of age, radiologically verified knee OA, and the presence of knee pain as the dominant pain symptom and a motivation for surgical procedure. The patients were excluded if they suffered from chronic pain due to causes other than knee OA (eg, fibromyalgia, degenerative disc disease, disc herniation, inflammatory rheumatic disease, or neurologic disease) or in case of previous knee surgery planned for total knee replacement. Information regarding medication was collected from all patients. Eight patients were taking analgesics (3 codeine, 2 tramadol, 2 buprenorphin plaster, 1 ketobemidone), 12 were taking acetaminophen, and 16 had previously been taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs at demand; however, these had been stopped 14 days before the surgical procedure. All patients received 2 g of acetaminophen (paracetamol) and 10 mg of oxycodone orally as premedication before the operation. All participants were informed about the study procedure, and written consent was obtained. Knee joint synovial fluid was collected during surgery and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analysis.

#### 2.1.2. Cohort of patients with different joint diseases (second cohort)

Fifty patients suffering from different painful joint diseases (32 women and 18 men, average age, 68.6 years, range, 26–94 years), recruited in the Rheumatology Department of Nice University Hospital, France, participated and were distributed as follow: rheumatoid arthritis (RA,  $n = 6$ ), chondrocalcinosis (CCA,  $n = 12$ ), spondyloarthritis (SPA,  $n = 5$ ), psoriatic arthritis ( $n = 4$ ), gout ( $n = 5$ ), and OA ( $n = 18$ ). All subjects provided informed consent before inclusion, and the study was approved by the Nice University Institutional Review Board for Research on Human Subjects. By contrast with the first OA cohort, information about medications was not available for all patients excluding the possibility to perform correlation studies between LPC levels in synovial fluids and patient pain outcomes. The study has been conducted in accordance with the French national regulations regarding patient consent and ethical review. The study was registered in the ClinicalTrials.gov protocol registration system (NCT 01867840). All samples were obtained from patients with acute knee joint effusion requiring joint puncture for diagnosis and/or treatment. The synovial fluids remaining after biological analysis for patients' care were included in the present study and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analysis.

#### 2.1.3. Postmortem control subjects

Ten postmortem specimens with no history of knee or hip OA or inflammatory rheumatic diseases were included as controls. Synovial fluid from the knee joint was collected during an autopsy procedure and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analysis.

#### 2.1.4. Questionnaires

Only OA patients from the first cohort completed questionnaires and scales within a week before the operation. Global pain intensity at the day of examination (visual analogue scale [VAS] global) and pain in the affected knee (VAS knee) were all scored using 100-mm VAS, with 0 indicating “no pain” and 100 indicating “the worst imaginable pain.” The severity of patient-reported symptoms was assessed by Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), which consists of 5 subscales: (1) pain, (2) other symptoms, (3) activity in daily living, (4) function in sport and recreation, and (5) knee-related quality of life.<sup>38,39</sup> Each KOOS subscale contains questions scored from 0 to 4, and the average score of all 5 KOOS subscales was calculated and used for the analysis.

#### 2.1.5. Patient demographic data and lysophosphatidylcholine concentrations

The demographic data (age, sex, body mass index [BMI]) and LPC concentrations found in patients synovial fluids from the first (OA patients) and the second cohorts, as well as in postmortem control specimens, are reported in supplementary tables 1 and 3 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Part of the data of the first cohort (age, sex, BMI, VAS global, VAS knee, KOOS assessment, and interleukin [IL]-6 levels in the knee synovial fluids) have also been reported elsewhere.<sup>26</sup>

## 2.2. Lipidomic analysis of patient samples

### 2.2.1. Chemical and lipid standards

Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), and formic acid ( $\text{HCOOH}$ ) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin



Fallavier, France). Water (H<sub>2</sub>O) used for lipid extraction was from Milli-Q quality. Lysophosphatidylcholine standards were purchased from Avanti Polar Lipids via Sigma Aldrich and then prepared at the appropriate concentration and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2. Lipid extraction

All patients' samples were processed in the same manner by the same laboratory as follow. Extraction of lipids from human synovial fluid (HSF) samples was adapted from the Folch method.<sup>13</sup> Fifty microliters of each patient sample were diluted with water to a final volume of 1 mL. The diluted samples were then transferred into glass tubes (Pyrex Labware) and vortexed for 1 minute. Lipids were extracted using 4-mL chloroform (CHCl<sub>3</sub>)/methanol (CH<sub>3</sub>OH) (2:1, vol/vol) and shaken with an orbital shaker (IKA VX basic Vibrax, Sigma-Aldrich) at 1500 rpm for 2 hours at room temperature. After centrifugation for 10 minutes with a swingout centrifuge at 410 g, aqueous phases were eliminated, and lipid-containing organic phases were supplemented with 1 mL of a 4:1 (vol/vol) 2N KCl/CH<sub>3</sub>OH solution. Samples were shaken for 10 minutes at 1500 rpm, centrifuged for 5 minutes, and the upper aqueous phases were eliminated. The resulting organic phases were complemented with 1 mL of a 3:48:47 (vol/vol/vol) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O solution, shaken for 10 minutes and centrifuged for 5 minutes. The aqueous phases were eliminated, and the organic phases containing whole lipids were transferred into new glass tubes. Lipid extracts were then evaporated until dryness at 60°C under a stream of nitrogen, redissolved in 500  $\mu\text{L}$  CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:2, vol/vol) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### 2.2.3. Mass spectrometry analysis of lysophosphatidylcholine

Lipid extracts were diluted once in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:2, vol/vol) before addition of 1% (vol/vol) formic acid. An optimized quantity of the internal standard LPC13:0 (0.1  $\mu\text{g}$  of LPC13:0 for 100  $\mu\text{L}$  of lipid extract) was added to each sample to quantify LPC species. Diluted lipid extracts were analyzed in the positive ion mode by direct infusion on a SYNAPT G2 High-Definition Mass Spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA) equipped with an Electrospray Ionization Source. The flow rate was 5  $\mu\text{L}/\text{minute}$ . All High Resolution full-scan mass spectrometry (MS) experiments were acquired in profile mode over 1 minute with a normal dynamic range from 300 to 1200  $m/z$ . Ionization conditions in positive ion mode have been optimized, and all LPC species, including the LPC internal standard, were detected as protonated ions  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ .

Identification of LPC species was based on their exact masses in the full-scan spectrum and on tandem MS experiments in the positive ion mode. Tandem mass spectrometry/MS fragmentation was performed by collision-induced-dissociation, which notably allowed to obtain structural information about LPC species by identifying the choline polar head group (characteristic and prominent fragment ion for all LPC species with  $m/z$  184).

Lysophosphatidylcholine species were quantified by normalizing the intensity of the protonated ion  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$  corresponding to each LPC individual species in the full-scan spectrum to the intensity of the internal standard LPC 13:0  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$  and multiplying by the amount of the internal LPC standard. In addition, corrections were applied to the data for isotopic overlap. Total LPC amount was calculated by summing the quantities of all individual LPC species. All spectra were recorded with MassLynx software© (Version 4.1, Waters). Data processing for high-

resolution full-scan experiments was performed with the help of ALEX Software.<sup>19</sup>

## 2.3. Animals and behavioral experiments

### 2.3.1. Animals

Experiments were performed on adult male and/or female C57Bl6J wild-type (WT) mice (Janvier Labs, Le Genest, France) as well as ASIC3-knockout (ASIC3<sup>-/-</sup>) and WT littermates (ASIC3<sup>+/+</sup>), breed in animal facilities of IPMC and UCA Medicine School with agreements no. C061525 and no. C63115.15, respectively. Animals were kept with a 12-hour light/dark cycle with ad libitum access to food and water and were acclimated to housing and husbandry conditions for at least 1 week before experiments. All experiments followed guidelines of the International Association for the Study of Pain.<sup>59</sup> All the protocols used were approved by the local ethical committees (CIEPAL-Azur and CEMEA-Auvergne) and the French government (agreements no. 02595.02, APAFIS#13499, APAFIS#17387) in accordance with European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC).

### 2.3.2. Joint pain models

Monoarthritis was induced by a single intra-articular injection of 12  $\mu\text{L}$  of CFA (heat-killed *Mycobacterium butyricum* 2 mg/mL, Sigma) under isoflurane (2.5%) anesthesia and was used as a positive control. Concerning the LPC-induced joint pain model, mice received 2 consecutive intra-articular injections of saline solutions containing either LPC16:0 (10 or 20 nmol; Avanti polar lipids, Coger, France) or vehicle (EtOH 2%-4%), 5 days apart, within the ankle or knee joints (10  $\mu\text{L}$ ) under isoflurane (2.5%) anesthesia. The mechanical (von Frey test) and heat (thermal test) pain thresholds, as well as the weight-bearing between hind paws (static weight-bearing test) were measured before and after LPC/CFA/vehicle injections over a month period (see figures for schematic protocol of experiments).

### 2.3.3. Pharmacological experiments

The autotaxin inhibitor S32826 (Biotechne, France), was injected in mice ankles (10 nmol) either at the time of the first LPC16:0 injection or 5 days after the second LPC16:0 injection. When S32826 was coinjected with the first LPC16:0 administration, mechanical allodynia was assessed from 30 to 240 minutes post injection. For experiments where S32826 was administrated 5 days after the second LPC16:0 injection, the mechanical allodynia was assessed 30 and 60 minutes post injection. APETx2 (Smartox, Saint-Égrève, France), the ASIC3 pharmacological inhibitor,<sup>10</sup> was coinjected in mice knees together with LPC16:0 (0.1 nmol APETx2 + 20 nmol LPC16:0), either at the first or the second intra-articular administration of LPC16:0.

### 2.3.4. Mechanical sensitivity

Mechanical sensitivity was evaluated by performing von Frey tests. Two types of von Frey tests were used, the classical up-down method of Dixon<sup>11</sup> modified by Chaplan<sup>7</sup> with von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) and the dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Gemonio, Italy). For both methods, freely moving animals were placed in individual plastic boxes on a wire mesh surface, so that von Frey mechanical stimuli could be applied to the plantar surfaces of their hind paws. For up-down von Frey experiments, animals followed an habituation period



before a set of calibrated von Frey filaments ranging from 0.02 to 1.4 g was applied to the plantar surface of each hind paw, alternatively or only on the ipsilateral hind paw, until withdrawal or licking of the paw to the stimulus. The 50% paw mechanical threshold was evaluated before (Baseline) and at different time points after the first and second LPC16:0 or vehicle injections, or after the CFA injection. For experiments using the dynamic plantar aesthesiometer, a ramp of force was applied through a single filament (up to 7.5 g in 10 seconds), and paw withdrawal thresholds (g) were measured in duplicate. A mean withdrawal threshold was then calculated for each animal hind paw. Three baseline measures were made prior LPC16:0 or vehicle intra-articular injections, the third baseline measure served as the reference mechanical withdrawal threshold for statistical analyses.

### 2.3.5. Heat sensitivity

Heat sensitivity in mice was assessed by the paw immersion test using a thermoregulated water bath maintained at  $46.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Mice were maintained under a soft cloth except the ipsilateral hind paw, which was immersed in water until withdrawal (a cutoff of 30 seconds was used to avoid any potential tissue damage).

### 2.3.6. Weight-bearing experiments

Static weight-bearing apparatus (Bioseb) was used to evaluate spontaneous weight distribution between hind paws, which could be considered as a measure of ongoing pain. Following 2 training sessions to habituate animals, mice were placed in a plastic glass enclosure so that each hind paw rested on separate transducer pads. Once mice were settled in correct position, the force exerted by each hind paw was measured over a period of 5 seconds. Weight-bearing differences were recorded as an average of 4/5 trials and expressed as contralateral/ipsilateral ratio. The weight distribution was assessed before (baseline) and at different time points following vehicle, CFA or LPC injections.

### 2.3.7. Assessment of anxiety-like behaviors

#### 2.3.7.1. Open field test

Mice were individually placed in the middle of an open field ( $50 \times 50 \times 50$  cm) under dim light conditions (30 lux). The distance travelled and the velocity were automatically calculated during the 5 minutes of testing period as well as the time spent in the center for each mouse (Ethovision XT 13; Noldus, Wageningen, the Netherlands).

#### 2.3.7.2. Elevated plus maze

The elevated plus maze (EPM) consists of 4 arms, 2 opposite open arms ( $37.5 \times 5$  cm) and 2 opposite closed arms ( $37.5 \times 5$  cm with 20 cm high walls), joined by a common central platform ( $5 \times 5$  cm), subjected to an equal illumination (30 lux). The maze was elevated to 60 cm above the floor. Each mouse was placed randomly into the center of the EPM facing an open arm. The time spent into the open arms, considered when head, gravity center and tail points were located within the arm, was automatically recorded for 5 minutes and calculated for each animal (Ethovision XT 13; Noldus).

#### 2.3.7.3. Marble burying test

Briefly, mice were individually placed in the experimental cage ( $42.5 \times 27.6 \times 15.3$  cm) containing 20 marbles (4 lines of 5 equidistant marbles) disposed on the top of 5-cm-thickness litter.

Animals were left undisturbed during 30 minutes in a quiet room. At the end, mice were removed, and the numbers of buried marbles were quantified. A marble was considered as buried when at least 50% of its surface was covered with litter.

#### 2.3.7.4. Hole board test

The hole board test consists of a board ( $39.5 \times 39.5$  cm) with 16 equidistant holes, 3 cm in diameter, equally distributed throughout the platform and placed 70 cm above the floor. Mice were individually placed randomly on one corner of the board facing away the experimenter and videotaped. The number of head dips in the holes was quantified for 5 minutes by a blind experimenter.

## 2.4. Immunohistochemistry on tibiotarsal joints and amygdala

At day 28, 4 and 5 mice of the vehicle and LPC16:0 10 nmol groups, respectively, were terminally anaesthetized using a mixture of ketamine/xylazine and quickly perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Ipsilateral tibiotarsal joints were excised, post fixed in 4% PFA in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 48 hours at  $4^\circ\text{C}$  and decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.6, Sigma) during 2 weeks at  $4^\circ\text{C}$  as previously described.<sup>5</sup> Brain was also excised and post fixed in 4% PFA in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 24 hours at  $4^\circ\text{C}$ . After cryoprotection (PB-Sucrose 30%) for at least 48 hours, samples were included in Tissue-Tek OCT cryo embedding compound.

Twenty-micrometer, cryostat-thick, frozen sections of joints were processed, mounted on Superfrost slides, blocked with phosphate buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA) 1% and, incubated with primary antibodies in PBS + Triton 0.2% overnight at room temperature following 3 washes in PBS. Monocytes, macrophages, and osteoclasts lineage was labeled with a rat antibody against myeloid protein CD68 (1:1,000; AbD Serotec, #MCA1957, Oxford, United Kingdom) and peptide-rich sensory nerve fibers with a rabbit anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) (1:2,000, Calbiochem, Meudon, France, #PC205L). After washes, sections were incubated with the corresponding secondary antibody (1:1,000, AlexaFluor 488 and AlexaFluor 546 for CD68 and CGRP, respectively, Molecular Probes, Eugene, OR). After PBS washes, sections were then coverslipped with fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) and observed with Nikon Eclipse Ni-E microscope. Quantitative analyses were performed with NIS-Elements software and at least 3 to 6 sections per joint per animal ( $n = 4-5$  per group) were quantified using regions of interest (ROIs) on tibiotarsal joint. Results are presented as the mean intensity of signal per joint area in one ROI ( $2500 \times 2500 \mu\text{m}$ ) for CD68 and in 2 ROIs ( $570 \times 570 \mu\text{m}$ ) for CGRP.

Transverse sections ( $30 \mu\text{m}$ ) of the brain containing the amygdala were cut on a cryotome (Microm HM450; Thermo Scientific, Illkirch, France). Free floating sections of the amygdala were stained for c-Fos immunohistochemistry as follows: after 3 washes in tris buffered saline (TBS) 0.05M pH 7.6, sections were incubated for 1 hour in a blocking solution (TBS 0.05M, BSA 3%, Triton 0.4%, donkey serum 1%) and then overnight at  $4^\circ\text{C}$  with a rabbit primary antibody anti-Fos (1:2000 in TBST; Santa Cruz, Santa Cruz, CA). After 3 washes in TBS 0.05M, sections were incubated for 2 hours with the appropriate secondary antibody (AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG; 1:1000; Molecular Probes). Sections were then washed in TBS 0.05M, mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with Dako fluorescent mounting medium. From each animal, 3 to 6 sections were randomly selected for counting c-Fos-positive cells in the ipsilateral side of

the BLA ( $n = 4$  per group) observed with Nikon Eclipse Ni-E microscope by a blinded investigator, and an average of these counts was taken.

### 2.5. Electronic microscopy

Potential demyelination of the saphenous nerve was assessed at day 7, after the 2 knee injections of 20 nmol of LPC16:0 or vehicle using electronic microscopy as previously described.<sup>35</sup> Briefly, 4 animals in each group were terminally anesthetized and perfused with PAF4%/2.5% glutaraldehyde (diluted with 0.1 M sodium cacodylate buffer). A segment of the saphenous nerve was isolated proximal to the ipsilateral knee joint from vehicle and LPC16:0 groups and processed for electronic microscopy to evaluate the G ratio. This was calculated using the equation  $G = \sqrt{\frac{r}{R}}$ , where  $r$  is the internal axonal radius, and  $R$  is the total axonal radius.

### 2.6. Quantitative Polymerase Chain Reaction

At days 14 and 28, 4 to 6 mice from each of the different groups (LPC16:0 10 nmol at days 14 and 28, CFA only at day 14 or vehicle at days 14 and 28) were terminally anesthetized using a mixture of ketamine/xylazine, and ankle joints were dissected out and muscles and tendons trimmed. Samples were then flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Frozen joints were pulverized with a biopulverizer (BioSpec, Bartlesville, OK) followed by RNA extraction with TRIzol using Tissue Lyser II (30 Hz frequency for 2 minutes with 2 cycles, Qiagen, Hilden, Germany). Equal amounts of RNA from each sample were reverse transcribed in 20  $\mu\text{L}$  to produce complementary DNA (cDNA) using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's recommendation. SYBR Green-based detection was carried out on a real-time polymerase chain reaction instrument (Biorad CFX96 Touch, France) for *Il6* (Interleukin-6; F-ACCGCTATGAAGTTCCTCTC, R-GTATCCTCTGTGAAGTCTCCTC), *Tnf* (tumor necrosis factor; F-GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT, R-CCTCCACTTGGTGGTTTGCT), *Apc5* (tartrate-resistant acid phosphatase; F-CACATAGCCCACACCGTTTCTC, R-TGCCTACCTGTGTGGACATGA), and *Tnfrsf11* (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; F-TCTCAGATGTCTCTTTTCGTCAC, R-CTCAGTGTGTCATGGAAGAGCTG). In each experiment, samples were assayed in triplicate. Data were analyzed using the threshold cycle ( $C_t$ ) relative quantification method. Relative quantities were determined using the equation:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ . RNA 18S (F-GCCGCTAGAGGTGAA, R-CATTCTTGGCAAATG) was used as housekeeping gene.

### 2.7. In vivo imaging

Inflammation and bone remodeling were assessed in vivo using an IMS Spectrum small animal imaging system (Perkin Elmer, Waltham, MA). Each mouse received 2 nmol of MMPsense 680 (150  $\mu\text{L}$ ; Perkin Elmer) or Cat K 680 FAST (100  $\mu\text{L}$ ; Perkin Elmer) by intravenous route at day 7 and day 14, after LPC16:0 (10 nmol) or vehicle, to assess inflammation and bone remodeling, respectively ( $n = 5$  in each group). Six hours or 24 hours later for Cat K 680 or MMP680, respectively, acquisition was performed under isoflurane anesthesia (1.5%). Imaging was performed using the ex/em = 675/720 nm band-pass filters. Quantification analysis was performed with Living Image Software (Perkin Elmer) using fixed-sized rectangular ROI focused on ipsilateral or contralateral tibiotarsal joint of the hind paws. Results are presented as the total counts of radiance efficiency

(radiance photons per second per square centimeter per steradian) per incident excitation power (microwatt per square centimeter).

### 2.8. Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK) 293 cell line was grown in DMEM medium (Lonza BioWhittaker) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest) and 1% of antibiotics (penicillin + streptomycin, Lonza BioWhittaker). One day after plating, cells were transfected with pIRES2-rASIC1a-EGFP, pIRES2-rASIC3-EGFP, or pIRES2-hASIC3a-EGFP vector using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2 to 4 days after transfection.

### 2.9. Primary culture of dorsal root ganglia neurons

Lumbar dorsal root ganglia (DRG L1-L6) were rapidly dissected out from euthanized adult male C57Bl6J (Janvier Lab, at least 8 weeks of age) and ASIC3<sup>-/-</sup> mice, and placed in cold Ca-free/Mg-free HBSS medium (Corning) supplemented with 10 mM glucose and 5 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7.5 with NaOH). After removing the roots, DRGs were enzymatically dissociated at  $37^{\circ}\text{C}$  for  $2 \times 20$  minutes in the HBSS solution supplemented with calcium ( $\text{CaCl}_2$  5 mM) and containing collagenase type II (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France) and dispase (Gibco, France). Dorsal root ganglia were then mechanically triturated and washed in a complete neurobasal A (NBA) medium (Gibco Invitrogen supplemented with 2% B27, 2 mM L-glutamine and 1% antibiotics: penicillin + streptomycin, Lonza BioWhittaker), before being plated in 35-mm petri dishes. Neurons were then kept in culture at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 week with one-third of the culture medium renewed every 2 days (complete NBA supplemented with 10 ng/mL NT3, 2 ng/mL glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), 10 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 100 ng/mL nerve growth factor (NGF) and 100 nM retinoic acid) and were used for patch clamp experiments at least 2 days after plating.

### 2.10. Patch clamp experiments

The whole-cell configuration of the patch clamp technique was used to record either membrane currents (voltage clamp) or membrane potentials (current clamp). The patch pipettes were made by heating and pulling borosilicate glass tubes (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) with a vertical P830 puller (Narishige, Tokyo, Japan), so that the pipette resistances were comprised between 3 and 7 M $\Omega$ . Patch pipettes were filled with an intracellular solution containing either 135 mM KCl, 2.5 mM ATP- $\text{Na}_2$ , 2.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM EGTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.3 with KOH for DRG neurons or 135 mM KCl, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.3 with KOH for HEK cells. Cells were bathed into an extracellular solution made of 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 10 mM HEPES for HEK cells, and this medium was supplemented with 10 mM glucose for DRG neurons. pH of extracellular solutions were adjusted to different values with NMDG-Cl, including the control pH 7.4 solution and the test pH 6.6 solution. During patch-clamp recordings, the cell under investigation was continuously superfused with extracellular solutions using a homemade 8-outlet system digitally controlled by solenoid valves (Warner Instruments, Hamden, CT), allowing rapid changes of the immediate cell environment from control to test solutions. Electrophysiological signals generated by patch-clamped cells were amplified and low-pass

filtered at 2 kHz using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Berkshire, United Kingdom), digitized with a 1550 A-D/D-A converter (Molecular Devices), sampled at 20 kHz and stored on a computer using Clampex software (V10.7, Molecular Devices). Analyses of these electrophysiological signals were then made offline using Clampfit software (V10.7, Molecular Devices). GFP<sup>+</sup> HEK cells were considered as positively transfected when the peak amplitudes of pH6.6-evoked ASIC1a or ASIC3 currents were  $\geq 200$  pA. Nontransfected cells corresponded to GFP<sup>-</sup> cells with a pH6.6-evoked current  $< 200$  pA. Dorsal root ganglia neurons were considered as ASIC<sup>+</sup> when they exhibited a transient pH6.6-evoked current with a peak amplitude  $\geq 20$  pA; otherwise, they were considered as ASIC<sup>-</sup>.

### 2.11. In vivo electrophysiological recordings of spinal dorsal horn neurons

Single unit extracellular recordings of lumbar dorsal horn neurons were made using tungsten paralyne-coated electrodes (0.5M $\Omega$  impedance, WPI, Hertfordshire, United Kingdom). The tip of a recording electrode was initially placed at the dorsal surface of the spinal cord using a micromanipulator (M2E, France), and this initial position corresponded to 0  $\mu\text{m}$  on the micromanipulator's micrometer. The electrode was then progressively moved down into the dorsal horn until the receptive field of a spinal neuron was localized on the ipsilateral plantar hind paw using mechanical stimulations including nonnoxious brushing and noxious pinching. In this study, experiments were focused on 2 types of spinal neurons that were distinguished as follow: (1) low threshold (LT) neurons only responding to non-noxious sensory stimulations and (2) high-threshold (HT) neurons that dynamically respond to noxious stimulations. The depth of spinal neurons recorded in this study was  $80 \pm 16$   $\mu\text{m}$  (range from 10 to 228  $\mu\text{m}$ ) and  $202 \pm 21$   $\mu\text{m}$  (range from 10  $\mu\text{m}$  to 571  $\mu\text{m}$ ) for LT and HT neurons, respectively. Activities of neurons were sampled at 20 kHz, filtered (0.3–30 kHz band pass) and amplified using a DAM80 amplifier (WPI, Europe), digitized with a A/D-D/A converter (1401 data acquisition system, Cambridge Electronic Design, Cambridge, United Kingdom), and recorded on a computer using Spike 2 software (Cambridge Electronic Design).

### 2.12. Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Significant differences between the data sets are evaluated using *P* values, which were calculated using either parametric or nonparametric tests followed by adequate post hoc tests (see figure legends). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Association between VAS knee, VAS global, KOOS, and LPC16:0 content was assessed using analysis of variance using age, gender, BMI, and IL-6 as covariates. The analysis was performed using R 3.6.3. Differences between sets of data and correlations were considered significant when *P* values were less or equal to 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Patients with painful joint diseases exhibit high levels of knee synovial LPC16:0

The knee synovial fluids of 35 OA patients from a first cohort (supplementary table 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>) displayed significantly higher concentrations of LPC compared with control specimens ( $77.4 \pm 5.0$   $\mu\text{M}$  and  $40.0 \pm 3.4$   $\mu\text{M}$ , respectively; **Fig. 1A**), with LPC16:0 being the most represented species and the only one significantly increased

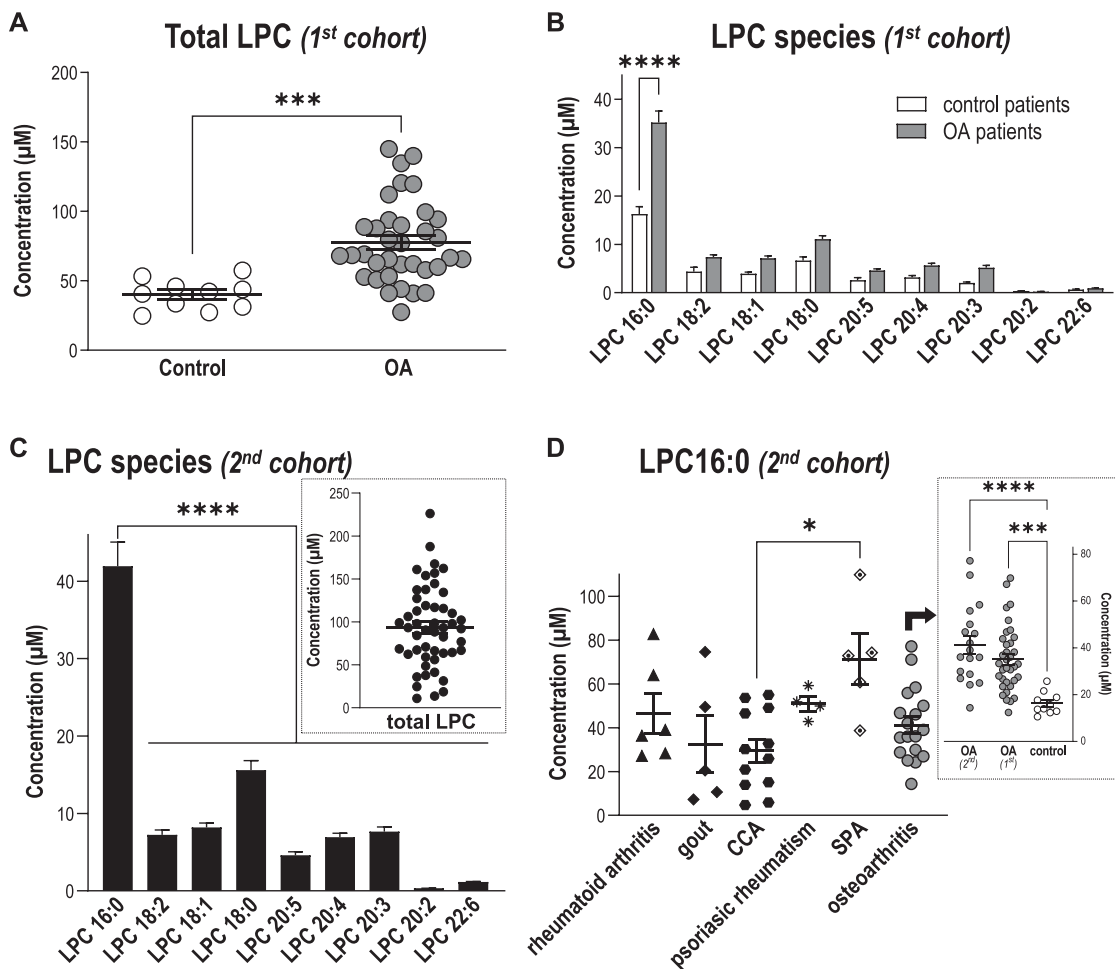
compared with control specimens ( $35.2 \pm 2.4$   $\mu\text{M}$  vs  $16.3 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$ ; **Fig. 1B**). Correlation studies were conducted between LPC16:0 concentrations and pain outcomes, including VAS (global and knee VAS) and KOOS, with data adjusted for patients' age, gender, BMI, and synovial fluid IL-6 level (supplementary table 2, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Significant correlations between LPC16:0 concentrations and pain (VAS) were observed ( $P = 0.016$  or  $P = 0.031$  for VAS knee and VAS global, respectively, supplementary table 2, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), and an inverse correlation with KOOS questionnaire almost reached statistical significance ( $P = 0.060$ , supplementary table 2, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Including or excluding IL-6 levels in the analysis of variance did not have drastic impact on the association between LPC16:0 and pain measures ( $P = 0.016/0.019$ ,  $P = 0.031/0.066$  and  $P = 0.060/0.080$  for VAS knee, VAS global and KOOS, respectively). In line with this, there were no significant correlations between LPC16:0 and IL-6 levels in synovial fluids (supplementary table 2, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), indicating that LPC16:0 involvement in patient pain outcomes was not associated to an IL-6-dependent inflammation in this first OA cohort. Previously, OA symptom severity in this cohort, including pain, correlated with IL-6 levels in the synovial fluid but was inversely associated to IL-6 levels in the cerebrospinal fluid.<sup>26</sup>

We next assessed whether increase of LPC16:0 knee synovial fluid levels could be the hallmark of painful joint pathologies associated with inflammation in a second heterogeneous cohort of patients with different joint diseases (**Figs. 1C and D**; supplementary table 3, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). The data from these 50 patients, irrespective of the disease, showed a distribution of LPC species (**Fig. 1C**) similar to the first OA cohort (**Fig. 1B**), with a total LPC concentration of  $93.6 \pm 6.7$   $\mu\text{M}$  (**Fig. 1C**, inset), significantly higher than control specimens (**Fig. 1A**,  $P = 0.0007$ , unpaired *t* test). Lysophosphatidylcholine 16:0 was also the major contributor to this elevated LPC level, with an average concentration of  $41.9 \pm 3.1$   $\mu\text{M}$  (**Fig. 1C**) significantly higher than control specimens (**Fig. 1B**,  $P = 0.0006$ , unpaired *t* test). When the analysis was made according to the patients' diseases (**Fig. 1D** and supplementary Fig. 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), LPC16:0 levels in the different subgroups of patients were similar, except a difference between CCA and SPA patients. Importantly, OA patients from this second cohort displayed an elevated level of LPC16:0 similar to the first OA cohort and significantly different from control specimens (**Fig. 1D**, inset).

### 3.2. Intra-articular LPC16:0 injections induce persistent pain and anxiety-like behaviors in mice

As LPC16:0 concentration was higher in the synovial fluids of joint pain patients (**Fig. 1**), we investigated its potential pronociceptive and associated anxiogenic effects in mice. Two ankle intra-articular injections of LPC16:0 were made 5 days apart (**Figs. 2A–E** and supplementary Fig. 2, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), and a single ankle CFA injection was used as a positive control. The dose of LPC16:0 injected (10 nmol) corresponded to the amount of lipids we had previously shown to generate acute pain-like behaviors following intraplantar injection in mice,<sup>32</sup> and it was in the lower range of quantities assessed here in patient synovial fluids. The first LPC16:0 injection induced short-lasting ipsilateral mechanical allodynia compared with vehicle, whereas the second injection led to a long-lasting mechanical allodynia until the end of the protocol (day 28), which remained ipsilateral, similar to CFA (**Fig. 2B** and supplementary Fig. 2A, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>) and





**Figure 1.** Levels of LPC16:0 are increased in synovial fluids of patients suffering from joint pain. Quantifications of LPC species were performed in knee human synovial fluid (HSF) samples. Total lipids were extracted from HSF samples and analyzed by direct infusion in mass spectrometry (MS) using an electrospray ionization source (ESI) in the positive ion mode (see “Methods” section for details). (A) Comparison of total LPC concentrations ( $\mu\text{M}$ ) between a first cohort of patients with osteoarthritis (OA,  $n = 35$  patients) and postmortem control subjects ( $n = 10$ ), showing significantly higher levels of LPC in patients compared with control specimens ( $***P = 0.0003$ , unpaired  $t$  test). (B) Distribution of the different LPC species concentrations ( $\mu\text{M}$ ) in the HSF of OA patients and postmortem control specimens. Although mean concentrations of most LPC species were higher in the HSF of OA patients, LPC16:0 was the most abundant and the only one to be significantly elevated compared with postmortem control subjects ( $***P < 0.0001$ , 2-way ANOVA followed by a Sidak multiple comparison test). (C) Distribution of the different LPC species concentrations ( $\mu\text{M}$ ) in the HSF of a second cohort of patients suffering from different joint pathologies ( $n = 50$ ), showing significantly higher level of LPC16:0 compared with the others species ( $****P < 0.0001$ , One-way ANOVA followed by a Dunnett multiple comparison test). *Inset:* Total LPC concentration in HSF of the second cohort of patients. (D) LPC16:0 concentrations in the different subgroups of patients from the second cohort: rheumatoid arthritis (RA,  $n = 6$ ), gout ( $n = 5$ ), CCA ( $n = 12$ ), psoriatic arthritis ( $n = 4$ ), SPA ( $n = 5$ ), and OA ( $n = 18$ ). The LPC16:0 concentrations in all the different subgroups of patients are comparable, except a difference between CCA and SPA ( $*, P < 0.05$ , Kruskal–Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test). *Inset:* LPC16:0 concentrations in HSF of OA patients from the first and second cohort are similar and higher than control postmortem ( $***P < 0.001$  and  $****P < 0.0001$ , 1-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test). ANOVA, analysis of variance; CCA, chondrocalcinosis; HSF, human synovial fluid; LPC, lysophosphatidylcholine; OA, osteoarthritis; SPA, spondyloarthritis.

consistent with models based on local intra-articular injections in mice. The second injection was also associated to weight-bearing deficit and thermal hyperalgesia (Fig. 2C and supplementary Fig. 2B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Importantly, the effect of intra-articular LPC16:0 was not due to its conversion to LPA by autotaxin because neither cotreatment nor posttreatment with an autotaxin inhibitor (S32826) altered its pronociceptive effect (Figs. 2D and E). Because joint pain is often associated with comorbidities such as anxiety,<sup>36</sup> we therefore assessed anxiety-like behaviors in our model of LPC16:0-induced persistent joint pain at days 19 to 23 (Figs. 2F and G and supplementary Fig. 2C–E, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). LPC16:0 or CFA induced a significant decrease in the time spent in the center of an open field without any locomotor impairment (Fig. 2F and supplementary Fig. 2C), indicating

increased thigmotaxis. This is in good agreement with what was shown previously on locomotor impairments following CFA intraplantar injections.<sup>42</sup> The development of anxiety-like behaviors was demonstrated in both LPC16:0 and CFA groups in the EPM, hole board, and marble burying tests (Fig. 2G, supplementary Fig. 2D–E, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>) and was associated to increased neuronal activity within the amygdala (supplementary Fig. 3, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>).

**3.3. Intra-articular LPC16:0 does not cause peripheral nerve sprouting, inflammation, or bone alterations**

No peptidergic nerve fibers sprouting (CGRP staining, Fig. 3A) nor cell infiltration (CD68<sup>+</sup> macrophage lineage cells influx,

**Fig. 3B**) were observed in the joint of LPC16:0 mice compared with control at day 28. When potential LPC16:0-induced joint inflammation was evaluated, no fluorescence increase of the MMP680 matrix metalloprotease marker was observed at day 7 in the ipsilateral joint of LPC16:0 mice compared with the contralateral joint and control mice (**Fig. 3C**). A potential LPC16:0-induced bone remodeling was also investigated and no increase in the cathepsin K activity was detected at day 14 in the ipsilateral joints of LPC16:0 mice compared with the contralateral ones and control mice (**Fig. 3D**). In good agreement with these observations, *Il6* and *Tnf* messenger RNA levels in the ipsilateral joint of LPC16:0-injected mice were similar to controls at days 14 and 28, whereas an increase was observed in CFA mice, as expected (**Figs. 3E and F**). Finally, *Apc5* and *Tnfsf11* messenger RNA levels in the joints of LPC16:0 mice were also similar to control at days 14 and 28 (**Figs. 3G and H**). These results indicate no change in peripheral nerve sprouting, bone alterations, or apparent inflammation following intra-articular LPC16:0 in the subacute and chronic stages of pain behaviors.

### 3.4. The *in vivo* pronociceptive effects of LPC16:0 are largely dependent on acid-sensing ion channel 3 in a sex-independent manner

LPC16:0 activated rat and human ASIC3 in transfected HEK293 cells<sup>32</sup> (supplementary Fig. 4A–C, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>) and induced an ASIC3-dependent depolarizing current in mouse DRG neurons (**Figs. 4A–D**). The *in vivo* involvement of this channel in pain and anxiety-like behaviors following intra-articular LPC16:0 injections was thus investigated using wild-type (ASIC3<sup>+/+</sup>) and ASIC3-knockout (ASIC3<sup>-/-</sup>) mice (**Fig. 5** and supplementary Fig. 5, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). LPC16:0 injections induced long-lasting mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in both male and female ASIC3<sup>+/+</sup> mice, indicating no sex dimorphism (**fig. 5A–B** and supplementary Fig. 5A–B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). These pain behaviors were significantly reduced in both male and female ASIC3<sup>-/-</sup> mice. The persistent LPC16:0-induced pain state was also associated to anxiety-like behaviors assessed between days 19 and 23 in male and female ASIC3<sup>+/+</sup> mice, which were significantly reduced in ASIC3<sup>-/-</sup> mice, as shown in the EPM and marble burying tests (**Fig. 5C–F**). Finally, LPC16:0 did not alter locomotor behaviors in both ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice at day 20 (supplementary Fig. 5C, D, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Thus, the development of LPC16:0-induced pain and associated anxiety-like behaviors were mediated by ASIC3 in both sexes.

### 3.5. LPC16:0 injections into mouse knee joint also produce persistent pain-like behaviors, which are associated to spinal neuron sensitization

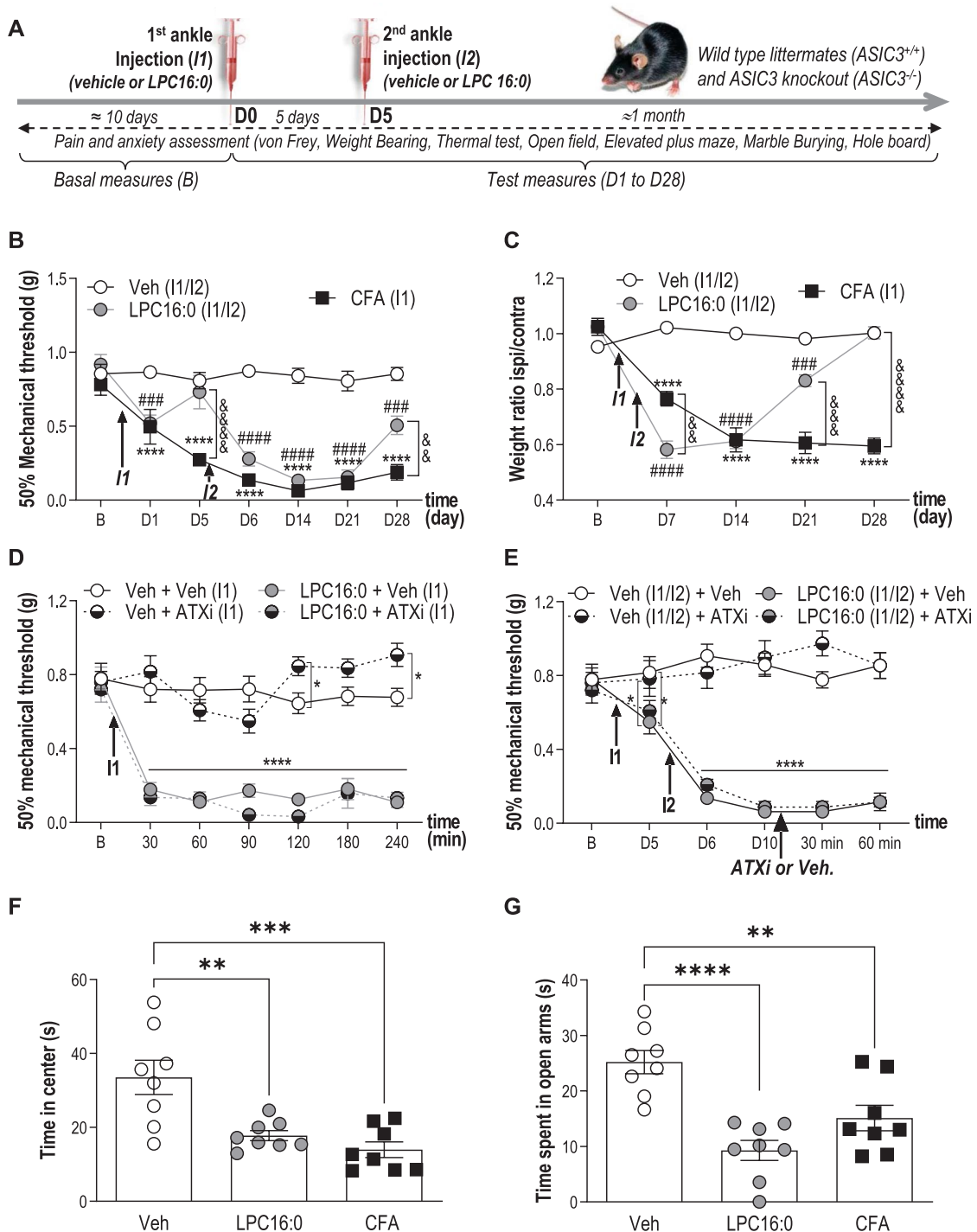
LPC16:0 was injected into mouse knee joint to determine whether the results obtained with the ankle can be extended to other joints (**Fig. 6** and supplementary Fig. 6, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Mice injected in the knee (**Fig. 6A**) with LPC16:0 at 10 or 20 nmol developed dose-dependent mechanical allodynia (**Fig. 6B**), weight-bearing deficit, and thermal hyperalgesia (supplementary Fig. 6A and B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), associated with anxiety-like behaviors (supplementary Fig. 6C and D) not because of locomotor impairment (supplementary Fig. 6E, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). We also did not observe any saphenous nerve demyelination<sup>33,47</sup> following 20 nmol of LPC16:

0 knee injections (supplementary Fig. 6F, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). When mechanical thresholds were assessed with the dynamic plantar aesthesiometer test, LPC16:0 knees injections (20 nmol) also induced long-lasting ipsilateral allodynia in both male and female wild-type mice, which was clearly secondary to the injection site (**Fig. 6C**, supplementary Fig. 6G, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). As for the ankle joint, LPC16:0 knee injection-induced pain was significantly reduced in both male and female ASIC3<sup>-/-</sup> mice compared with WT (**Fig. 6D**). This long-lasting pain state was also significantly reduced in male WT when APETx2, an ASIC3 blocker,<sup>10,32</sup> was coinjected with LPC16:0 either at the first or the second administration, further supporting an effect primarily mediated through peripheral ASIC3 activation (**Fig. 6E**). Finally, 2 LPC16:0 intra-articular injections were necessary to induce persistent pain as for the ankle (supplementary Fig. 6H, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). These results support a similar LPC-induced ASIC3-dependent persistent pain state upon 2 intra-articular knee or ankle injections of LPC16:0, suggesting a central sensitization process. The activity of spinal dorsal horn neurons was therefore recorded *in vivo* following LPC16:0 knee injections in WT mice (**Figs. 6F–H**). Electrophysiological recordings clearly demonstrated a sensitization of spinal HT but not LT neurons associated to LPC16:0 knee injections, which correlated with persistent secondary allodynia.

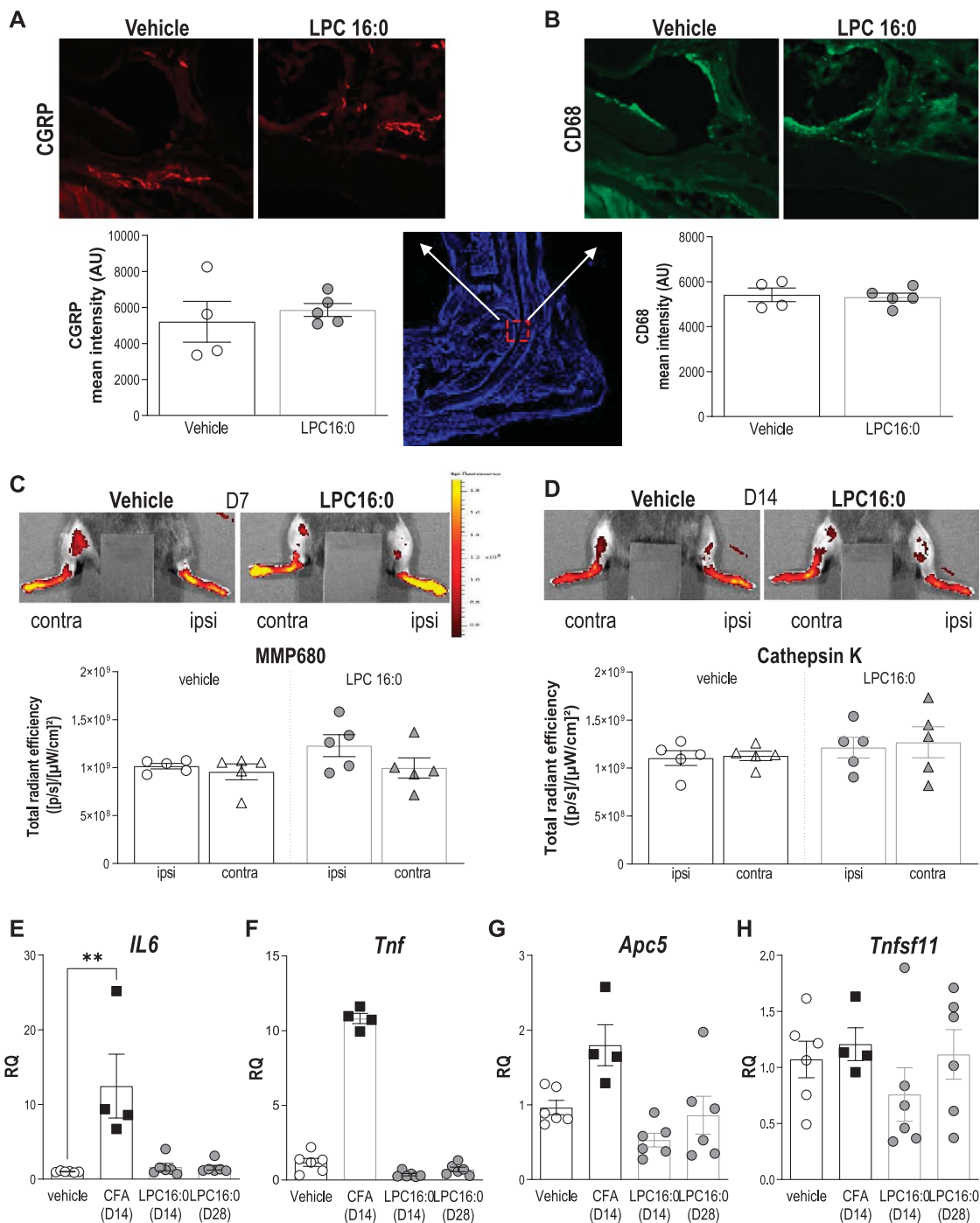
## 4. Discussion

Here, we identify LPC16:0 as the major LPC species in HSFs and a critical trigger of chronic joint pain through peripheral ASIC3 channel activation in mice. Compared with control specimens, the knee synovial fluids from a first cohort of OA patients displayed an elevated LPC16:0 content, which correlated with their knee and global pain (VAS knee and VAS global), regardless of age, gender, BMI, and IL-6 synovial fluid levels. Correlation with knee injury and osteoarthritis outcome score (KOOS) almost reach statistical significance ( $P = 0.060$ ). This absence of a statistically significant correlation can be explained by the more holistic nature of the patient's overall OA experience assessed by this questionnaire. A specific increase in LPC16:0 content was further confirmed in a second cohort of patients with different joint diseases, including OA but also other pathologies such as RA, suggesting that LPC is probably not the hallmark of a particular joint pathology. Previous works also reported an increase in plasma and/or synovial LPC contents in OA and RA patients<sup>27,28,57</sup> but without any information on its possible contribution to chronic joint pain.

We demonstrate that ankle or knee intra-articular administrations of LPC16:0 in mice led to the development of chronic pain as well as anxiety-like behaviors, independently of the LPC-to-LPA conversion by autotaxin, excluding a role of LPA in these effects. Our data support a direct role of LPC16:0 as a triggering factor of pain-like behaviors in this new preclinical model of persistent joint pain. Because the levels of LPC16:0 correlated with pain outcomes in OA patients, these data could be also relevant in humans. The persistent pain state in mice did not seem to be associated with nerve sprouting, demyelination, or inflammatory processes because no changes in CGRP joint staining, nerve fiber G ratio, *in vivo* metalloprotease activity, or expression of TNF and IL-6 were observed in joints following LPC16:0 administrations. Hung et al.<sup>18</sup> also failed to observe any inflammatory signs following intramuscular administration of LPC16:0 in mice. The elevated level of LPC, especially LPC16:0, in the synovial fluid of OA patients could therefore explain why



**Figure 2.** Lysophosphatidylcholine injections into mouse ankle joints produce long-lasting pain-like behaviors associated with anxiety-related behaviors. (A) Timeline of the experimental procedures used. (B) Effect of intra-articular ankle injections of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle (Veh) on mechanical allodynia in male mice. Ipsilateral mechanical paw withdrawal threshold was assessed using the up and down method with von Frey filament from D1 to D28. Results are expressed as 50% mechanical threshold (n = 8-16 mice per group; \*\*\*\**P* < 0.0001 for Veh vs CFA; ###*P* < 0.001 and ####*P* < 0.0001 for Veh vs LPC16:0; &&*P* < 0.01 and &&&*P* < 0.0001 for CFA vs LPC16:0; 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test). (C) Effect of intra-articular injections of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle on weight-bearing in male mice. Results are expressed as the weight ratio between the ipsilateral and contralateral hind paws (n = 8 mice per group; \*\*\*\**P* < 0.0001 for Veh vs CFA; ###*P* < 0.001 and ####*P* < 0.0001 for Veh vs LPC16:0; &&*P* < 0.01, &&&*P* < 0.001, and &&&&*P* < 0.0001 for CFA vs LPC16:0; 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test). (D) The autotaxin inhibitor S32826 (ATXi) was co-injected at the dose of 10 nmol with LPC16:0 (10 nmol) and mechanical paw withdrawal thresholds were assessed from 30 to 240 minutes post injection (n = 8 mice per group, \**P* < 0.05 and \*\*\*\**P* < 0.0001, 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test). (E) S32826 was injected at D10, ie, after the 2 injections of LPC16:0 (10 nmol) 5 days apart (I1/I2), in the same ankle joint, and mechanical paw withdrawal thresholds were assessed at 30 and 60 minutes post injection (n = 8 per group, \**P* < 0.05 and \*\*\*\**P* < 0.0001, 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test). (F–G) Effect of intra-articular injections of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle on the time spent in the center of an open field test at D20 (F) and on the time spent in the open arms in the elevated plus maze test at D23 (G). The open field and elevated plus maze test lasted 5 minutes and the time spent in the center and the open arms, respectively, was automatically calculated using Ethovision XT 13 (Noldus). One-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests with \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001 (n = 8 mice per group). ANOVA, analysis of variance; CFA, complete Freund adjuvant; LPC, lysophosphatidylcholine.

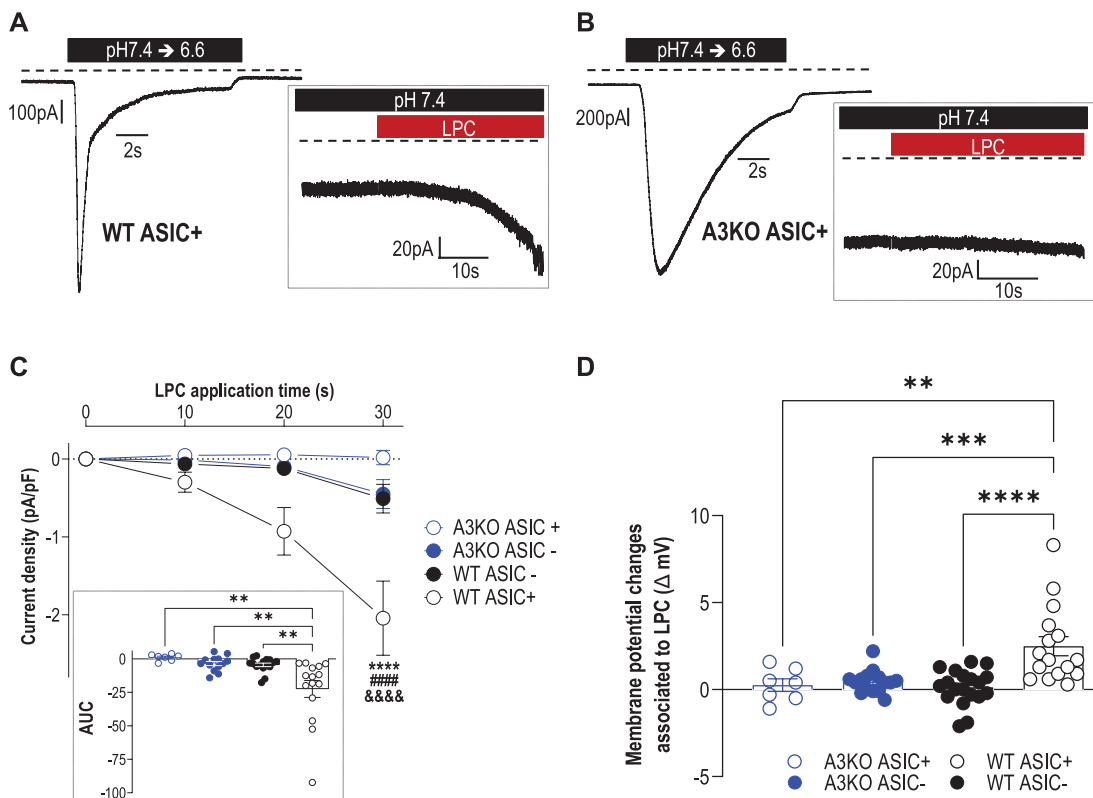


**Figure 3.** LPC16:0 injections into mouse ankle are not associated to peripheral nerve sprouting, inflammation, nor bone alterations. (A–B) Analysis of CGRP and CD68 expression in the ipsilateral tibiotarsal joint at D28, following intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle in male mice. *Top*, representative photomicrographs of CGRP (A) and CD68 (B) staining in vehicle and LPC16:0-treated mice. *Bottom*, quantification of CGRP-positive fibers (A) in 2 ROIs (570 × 570 μm) and of CD68-positive cells (B) in one ROI (2500 × 2500 μm) from the ipsilateral tibiotarsal joint of vehicle and LPC16:0-injected mice. Results are expressed as a mean intensity (n = 4 for each group, no significant differences, Mann–Whitney tests). (C–D) Evaluation of the effect of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle on inflammation and bone remodeling using in vivo fluorescent imaging for metalloprotease (MMP680) activity at D7 (C) and cathepsin K activity at D14 (D), respectively, in the ipsilateral and contralateral hind paws of male mice. *Upper panels*, illustrations; *Lower panels*, MMP680 ratio quantification (C) and cathepsin K activity ratio quantification (D). Data from n = 5 animals per group (no significant differences, Kruskal–Wallis tests followed by Dunn multiple comparison tests). (E–H) Relative levels of *IL6* (E), *Tnf* (F), *Apc5* (TRAP) (G), and *Tnfsf11* (RANK-L) (H) messenger RNA expressed in the ipsilateral joint, determined by quantitative polymerase chain reaction after intra-articular injections of LPC16:0 (10 nmol, D14 and D28), CFA (D14), and vehicle (D14/D28; n = 4–6 for each group, \*\**P* < 0.01, Kruskal–Wallis tests followed by Dunn multiple comparison tests). CFA, complete Freund adjuvant; LPC, lysophosphatidylcholine; ROI, region of interest.

they still suffered from chronic joint pain despite well controlled inflammation and possibly even in the absence of it, as supported here by the lack of correlation between LPC16:0 and IL-6 levels in patient synovial fluids. No change in cathepsin K activity and joint

expression of TRAP and RANK-L was observed in our model, indicating that LPC16:0 also did not lead to bone alterations/remodeling, which could contribute to chronic joint pain as already suggested in rheumatic diseases such as OA<sup>34,40,58</sup> and





**Figure 4.** LPC16:0 induces a noninactivating, ASIC3-dependent current associated with membrane depolarization in mouse DRG neurons. Whole-cell patch clamp experiments performed on WT and ASIC3 knockout (A3KO) DRG neurons expressing (ASIC+) or not expressing (ASIC-) a pH6.6-evoked ASIC current. (A–B) Native pH6.6-evoked ASIC currents recorded at  $-80$  mV in DRG neurons from wild-type (WT ASIC+, A) and ASIC3-knockout (A3KO ASIC+, B) mice. *Insets* show the effect of LPC16:0 ( $5 \mu\text{M}$ ) applied for 30 seconds on the same neurons. (C) Analysis of the current densities measured after 10-, 20-, and 30-second applications of LPC16:0 onto WT ASIC+, WT ASIC-, A3KO ASIC+, and A3KO ASIC- neurons (see methods,  $n = 7-16$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared with WT ASIC-, \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared with A3KO ASIC+ and &&&& $P < 0.0001$  compared with A3KO ASIC-; Three-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test). *Inset* shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 ( $n = 7-16$ , \*\* $P < 0.01$ , 1-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test). (D) Membrane potential changes associated with 30-second application of LPC16:0 on WT ASIC+, WT ASIC-, A3KO ASIC+, and A3KO ASIC- neurons ( $n = 7-19$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 1-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test). ANOVA, analysis of variance; ASIC3, acid-sensing ion channel 3; DRG, dorsal root ganglia; LPC, lysophosphatidylcholine; WT, wild-type.

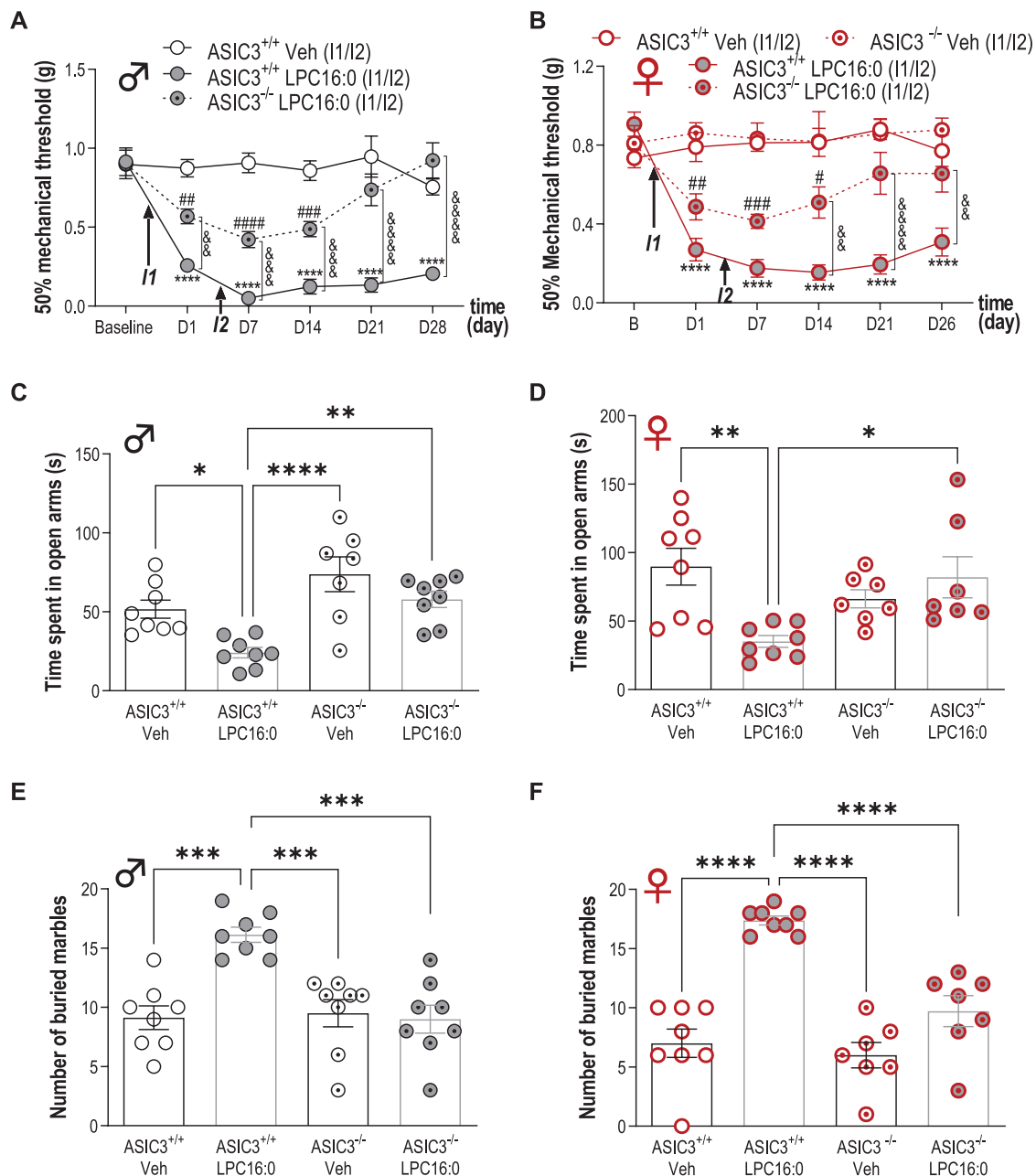
RA.<sup>24</sup> This might explain the lack of clear correlation between joint damage and pain in OA.<sup>3,16</sup>

Chronic joint pain associated with rheumatic diseases is generally considered to be mainly under inflammatory condition. However, there is a frequent disconnect between disease activity such as inflammation and chronic joint pain especially in RA.<sup>29</sup> Indeed, despite the success of conventional disease-modifying antirheumatic drugs, alone or in combination with biologic agents, on disease activity, a significant number of patients still complain from persistent pain, and more than 60% are not satisfied by their pain management.<sup>37,49</sup> In addition, joint pain is an early marker of an emerging RA before any evident sign of inflammation.<sup>6</sup> This discrepancy between disease activity and pain indicates that synovitis is not the only driver of joint pain at least in RA<sup>1,25</sup> but that additional mechanisms are at play. Our LPC-induced chronic joint pain model in mice is actually not a model of rheumatic disease per se because it is not associated with any evident signs of inflammation nor joint damages, but rather a model of joint pain (arthralgia), one of the main symptoms of rheumatic diseases. We show that LPC within joints is a critical triggering factor of pain but is not sufficient by itself to mimic the whole clinical status of a particular rheumatic disease. This latest point is actually an advantage because it allows identification of a new potential noninflammatory nociceptive pathway in rheumatic diseases besides the well-described inflammatory mechanisms.

Both inflammatory and noninflammatory components could therefore participate in systemic pain and its chronicity in rheumatic diseases, but their respective contributions and/or triggering roles still remain to be determined. In addition, our data indicate that intra-articular LPC16:0 administrations are not associated to joint inflammatory processes in the subacute stage of pain behaviors, but we cannot completely rule out an effect of inflammation in the hyperacute stage following intra-articular LPC injection.

The pronociceptive effects of LPC16:0 following joint administration in mice are dependent on peripheral ASIC3 channel in a sex-independent manner. Indeed, both pain and anxiety-like behaviors were significantly reduced in both male and female ASIC3 KO mice, or following local pharmacological inhibition of these channels. The contribution of ASIC3 in the development of pain-like behaviors evoked by LPC16:0 appeared to be more pronounced following injections into the knee than into the ankle of mice. Such a difference might illustrate a predominant role of ASIC3 in the development of secondary hypersensitivity, as proposed previously.<sup>20,44</sup> Because pain measurements were taken at the plantar level, they were clearly associated to secondary pain following knee injections; however, they more likely reflected a mixture of primary and secondary pain for ankle injections. ASIC3, which was constitutively activated by LPC16:0 in cultured DRG neurons, induced a sustained membrane

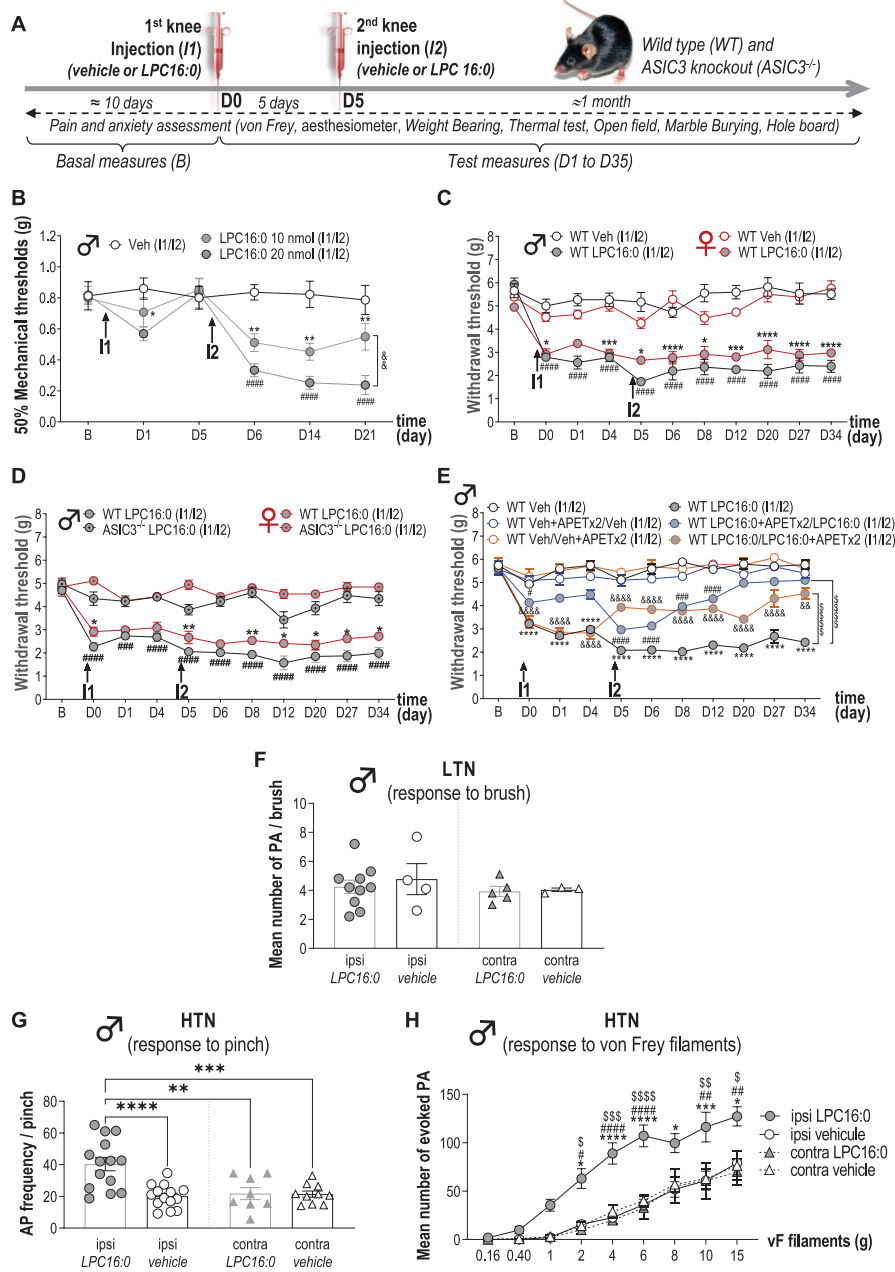




**Figure 5.** Acid-sensing ion channel 3 is crucial for the development of both pain and anxiety-like behaviors induced by LPC16:0 injections into mouse ankle joints of male and female mice. Time course effect of intra-articular ankle injections of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle in male (A) or female (B) ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice. Mechanical paw withdrawal threshold was assessed using the up and down method with von Frey filaments from D1 to D28 and from D1 to D26, for male and female mice, respectively (n = 7–8 mice per group, \*\*\*\*P < 0.0001 for ASIC3<sup>+/+</sup> Veh vs ASIC3<sup>+/+</sup> LPC16:0; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001, and ####P < 0.0001 for ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0 vs ASIC3<sup>+/+</sup> Veh (♂) or ASIC3<sup>-/-</sup> Veh (♀); &&P < 0.01 and &&&P < 0.0001 for ASIC3<sup>+/+</sup> LPC16:0 vs ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0; 2-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests). In (A), both male ASIC3<sup>+/+</sup> and male ASIC3<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Fig. 5E, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>), did not exhibit any changes in mechanical paw withdrawal threshold following vehicle injections. (C–F) Effect of intra-articular ankle injections of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle on the time spent in the open arm in the elevated plus maze test at D23 (C–D), on the number of buried marble in the marble burying test at D19 (E–F), in male (C–E) or female (D–F) ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice. The elevated plus maze test lasted 5 minutes and the time spent in the open arm was automatically calculated using Ethovision XT 13 (Noldus). The marble burying test lasted 30 minutes and was analyzed by a blind experimenter (n = 7–8 mice per group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*\*P < 0.0001, 1-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests). ANOVA, analysis of variance; LPC, lysophosphatidylcholine.

depolarization similar to the ASIC3-dependent depolarization we already shown to sensitize these neurons.<sup>8</sup> It is thus very likely that intra-articular injections of LPC16:0 could drive an ASIC3-dependent nociceptive input leading to a persistent pain state originating from joints. ASIC3 has been already associated to long-lasting pain states following repeated acid injections in rodent joints<sup>48</sup> and muscles<sup>44</sup> and more recently following LPC injections in mouse muscle.<sup>18</sup> The stimulation of ASIC3 channels

in sensory nerve endings of deep tissues appears to be a key step for the development of chronic pain. The effect of LPC16:0 on ASIC3 expressed in joint nociceptors probably results in the sensitization of dorsal horn neurons as supported by the enhanced output of spinal HT nociceptive, but not LT, neurons. Central sensitization was also proposed to occur after repeated intramuscular injections of LPC16:0 in mice, which induced increased expression of c-fos and pERK in spinal dorsal horn



**Figure 6.** Lysophosphatidylcholine knee injections generate persistent secondary mechanical allodynia associated with sensitization of spinal dorsal horn neuron activity. (A) Timeline of the experimental procedures used. (B) Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol), or vehicle (Veh) on mechanical allodynia in the ipsilateral paw of male mice. Paw withdrawal thresholds (PWTs) were assessed using the up and down method with von Frey filament from D1 to D21. Results are expressed as 50% mechanical thresholds (n = 8 mice per group; \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 for LPC16:0 10 nmol vs Veh, #####P < 0.0001 for LPC16:0 20 nmol vs Veh and &&P < 0.01 for LPC16:0 20 nmol vs LPC16:0 10 nmol; 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test). (C) Ipsilateral paw PWTs of female and male WT mice injected twice in the knees with LPC16:0 (20 nmol) or vehicle (Veh) were assessed using a dynamic plantar aesthesiometer (n = 6 mice per group; \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, and \*\*\*\*P < 0.0001 for WT female Veh vs WT female LPC16:0; #####P < 0.0001 for WT male Veh vs WT male LPC16:0; 3-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test). (D) Ipsilateral PWTs of female and male, WT and ASIC3<sup>-/-</sup> mice injected twice with LPC16:0 (n = 5-18 mice per group; \*P < 0.05, and \*\*P < 0.01 for female WT LPC16:0 vs ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0, ###P < 0.001, and #####P < 0.0001 for male WT LPC16:0 vs ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0; 3-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test). (E) Ipsilateral PWTs of male WT mice injected twice with LPC16:0 or vehicle, with or without coinjection of APETx2 (0.1 nmol) at the first or the second injection (n = 6-12 per group; \*\*\*\*P < 0.0001 for WT Veh vs WT LPC16:0; #P < 0.05, ###P < 0.01, and #####P < 0.0001 for WT Veh + APETx2/Veh vs WT LPC16:0 + APETx2/LPC16:0; &&P < 0.01, and &&&P < 0.0001 for WT Veh/Veh+APETx2 vs WT LPC16:0/LPC16:0 + APETx2; 2-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test; \$\$\$\$P < 0.0001 for main effects on curves, 2-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test). (F) Mean number of action potentials (APs) emitted by spinal low threshold neurons (LTNs) following light brushing of their receptive fields, located on the plantar surface. Spinal LTN-evoked activities were not different whether they were recorded ipsilaterally or contralaterally to the knees injected twice with LPC16:0 or vehicle (n = 3-10 LTNs, no significant differences, Kruskal-Wallis test followed by a Dunn post hoc test). (G) Frequencies of APs emitted by spinal HTNs following pinching (n = 8-14 HTNs; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, and \*\*\*\*P < 0.0001, 1-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test). (H) Mean number of APs evoked by spinal HTNs following application of von Frey filaments of increasing strength (n = 8-14 HTNs; \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, and \*\*\*\*P < 0.0001 for ipsi LPC16:0 vs ipsi vehicle; #P < 0.05, ##P < 0.01, and #####P < 0.0001 for ipsi LPC16:0 vs contra LPC16:0; \$P < 0.05, \$\$P < 0.01, \$\$\$P < 0.001, and \$\$\$\$P < 0.0001 for ipsi LPC16:0 vs contra vehicle; 3-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test). ANOVA, analysis of variance; ASIC3, acid-sensing ion channel 3; LPC, lysophosphatidylcholine; WT, wild type.

neurons.<sup>18</sup> Moreover, several clinical studies demonstrated the presence of central sensitization in OA patients.<sup>30</sup>

To conclude, LPC16:0 could be involved in joint pain from different etiologies of inflammatory and noninflammatory origins and more generally across rheumatic musculoskeletal diseases. However, it remains to be demonstrated whether an elevated level of LPC16:0 could be used as an objective biomarker of chronic joint pain across different etiologies. Our data bring both human and rodent evidences for a crucial role of this lipid in chronic joint pain and identify LPC-activated ASIC3 channels as promising targets for chronic joint pain management.

### Conflict of interest statement

E. Kosek reports grants from Donation from Lundblad family, personal fees from Eli Lilly, personal fees from Sandoz, personal fees from UCB Pharma, outside the submitted work. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

### Acknowledgements

The authors thank Drs A. Baron, S. Diochot, J. Noel, and M. Salinas for helpful discussions, V. Friend and J. Salvi-Leyral for technical support, and V. Berthieux for secretarial assistance. The authors also thank Tycho Tullberg, MD, PhD, CEO of Stockholm Spine Center during the data collection period for generous support and for providing research facilities at Stockholm Spine Center. The authors thank orthopaedic surgeons Ingemar Gladh and Per Gerdin for patient recruitment and taking tissue samples during surgery at Ortho Center, Stockholm. Furthermore, the authors thank Carola Skärvinge, research nurse at Stockholm Spine Center for excellent logistic assistance and Azar Baharpoor, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet for support and laboratory assistance.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM grant #19618), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0015-01 and ANR-17-CE16-0018) and the NeuroMod Institute of University Côte d'Azur (UCA). This work was also supported by the Conseil Regional Auvergne-Rhône-Alpes (project Ressourcement S3, Arth-Innov) and Feder as well as the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25). The authors thank the multimodal imaging platform IVIA and CICS, Clermont-Ferrand, France, for in vivo imaging and electronic microscopy, respectively. The study has also received funding from Stockholm County Council, Swedish research Council (K2013-52X-22,199-01-3), and Eli Lilly, USA. The research leading to these results has also received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no. 602919 and from a generous donation from Leif Lundblad and family.

Author contributions: F. Jacquot, designed, performed and analyzed behavioral experiments as well as in vivo imaging; L. Delay, A. Bayle performed and analyzed behavioral experiment; J. Barbier performed and analyzed the electronic microscopy and immunohistochemistry experiments; Y. Aissouni and A. Jurczak did quantitative polymerase chain reaction experiments; D.A. Barriere helped in experimental design and critical reading of the manuscript; F. Marchand conceived, designed and analyzed behavioral experiments and wrote manuscript; C.I. Svensson helped in quantitative polymerase chain reaction experiment, experimental design and critical reading of the manuscript; A. Hugo, diagnosed patients and

collected patient samples (Swedish cohort); A.S. Ahmed, performed patient data and sample collection (Swedish cohort); E. Kosek, PI for patient data and sample collection (Sweden) and critical reading of the manuscript; K. Kultima and E. Freyhult helped in data analysis related to patients and critical reading of the manuscript; S. Khoury and T. Ferreira conceived, designed and performed lipidomic experiments, and analyzed data; B. Labrum designed, performed and analyzed behavioral experiments using the dynamic aesthesiometer; K. Delanoe and L. Pidoux designed, performed and analyzed electrophysiological experiments; E. Lingueglia helped in experimental design and critical reading of the manuscript; V. Breuil coordinated the clinical aspects of the study (French cohort); E. Deval conceived, designed, performed and analyzed experiments, and wrote the manuscript. All authors participated in the critical reading of the manuscript and give their consent for this final draft.

### Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B579>.

### Article history:

Received 14 September 2021

Received in revised form 7 December 2021

Accepted 8 December 2021

Available online 27 January 2022

### References

- [1] Altawil R, Saevardottir S, Wedren S, Alfredsson L, Klareskog L, Lampa J. Remaining pain in early rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016;68:1061–8.
- [2] Andersson DA, Nash M, Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 2007;27:3347–55.
- [3] Barr AJ, Campbell TM, Hopkinson D, Kingsbury SR, Bowes MA, Conaghan PG. A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:228.
- [4] Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 2006;10:287–333.
- [5] Castaneda-Corral G, Jimenez-Andrade JM, Bloom AP, Taylor RN, Mantyh WG, Kaczmarek MJ, Ghilardi JR, Mantyh PW. The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A. *Neuroscience* 2011;178:196–207.
- [6] Catrina AI, Svensson CI, Malmstrom V, Schett G, Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:79–86.
- [7] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55–63.
- [8] Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 2003;44:662–71.
- [9] Deval E, Lingueglia E. Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* 2015;94:49–57.
- [10] Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *Embo J* 2004;23:1516–25.
- [11] Dixon WJ. The up-and-down method for small samples. *J Am Stat Assoc* 1965;60:967.
- [12] Flemming PK, Dedman AM, Xu SZ, Li J, Zeng F, Naylor J, Benham CD, Bateson AN, Muraki K, Beech DJ. Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J Biol Chem* 2006;281:4977–82.
- [13] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- [14] Gaskin DJ, Richard P. The economic costs of pain in the United States. *J Pain* 2012;13:715–24.

- [15] Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 2010;6:4.
- [16] Hannan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 2000;27:1513–17.
- [17] Hsieh WS, Kung CC, Huang SL, Lin SC, Sun WH. TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 2017;7:8870.
- [18] Hung CH, Lee CH, Tsai MH, Chen CH, Lin HF, Hsu CY, Lai CL, Chen CC. Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16: 0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Ann Rheum Dis* 2020;79:1644–56.
- [19] Husen P, Tarasov K, Katafiasz M, Sokol E, Vogt J, Baumgart J, Nitsch R, Ekroos K, Ejsing CS. Analysis of lipid experiments (ALEX): a software framework for analysis of high-resolution shotgun lipidomics data. *PLoS One* 2013;8:e79736.
- [20] Ikeuchi M, Kolker SJ, Burnes LA, Walder RY, Sluka KA. Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *PAIN* 2008;137:662–9.
- [21] Ikeuchi M, Kolker SJ, Sluka KA. Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *J Pain* 2009;10:336–42.
- [22] Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 2004;10:712–18.
- [23] Izumi M, Ikeuchi M, Ji Q, Tani T. Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci* 2012;19:77.
- [24] Kleyer A, Finzel S, Rech J, Manger B, Krieter M, Faustini F, Araujo E, Hueber AJ, Harre U, Engelke K, Schett G. Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:854–60.
- [25] Koop SM, ten Klooster PM, Vonkeman HE, Steunebrink LM, van de Laar MA. Neuropathic-like pain features and cross-sectional associations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:237.
- [26] Kosek E, Finn A, Ultenius C, Hugo A, Svensson C, Ahmed AS. Differences in neuroimmune signalling between male and female patients suffering from knee osteoarthritis. *J Neuroimmunol* 2018;321:49–60.
- [27] Kosinska MK, Liebisch G, Lochnit G, Wilhelm J, Klein H, Kaesser U, Lasczkowski G, Rickert M, Schmitz G, Steinmeyer J. A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2013;65:2323–33.
- [28] Kosinska MK, Mastbergen SC, Liebisch G, Wilhelm J, Dettmeyer RB, Ishaque B, Rickert M, Schmitz G, Lafeber FP, Steinmeyer J. Comparative lipidomic analysis of synovial fluid in human and canine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:1470–8.
- [29] Lee YC, Cui J, Lu B, Frits ML, Iannaccone CK, Shadick NA, Weinblatt ME, Solomon DH. Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R83.
- [30] Luch E, Torres R, Nijis J, Van Oosterwijck J. Evidence for central sensitization in patients with osteoarthritis pain: a systematic literature review. *Eur J Pain* 2014;18:1367–75.
- [31] Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 2000;275:10128–33.
- [32] Marra S, Ferru-Clement R, Breuil V, Delaunay A, Christin M, Friend V, Sebille S, Cognard C, Ferreira T, Roux C, Euler-Ziegler L, Noel J, Lingueglia E, Deval E. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* 2016;35:414–28.
- [33] Meiri H, Steinberg R, Medalion B. Detection of sodium channel distribution in rat sciatic nerve following lysophosphatidylcholine-induced demyelination. *J Membr Biol* 1986;92:47–56.
- [34] Nwosu LN, Allen M, Wyatt L, Huebner JL, Chapman V, Walsh DA, Kraus VB. Pain prediction by serum biomarkers of bone turnover in people with knee osteoarthritis: an observational study of TRAcP5b and cathepsin K in OA. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:858–65.
- [35] O'Brien MS, Philpott HTA, McDougall JJ. Targeting the Nav1.8 ion channel engenders sex-specific responses in lysophosphatidic acid-induced joint neuropathy. *PAIN* 2019;160:269–78.
- [36] O'Brien T, Breivik H. The impact of chronic pain-European patients' perspective over 12 months. *Scand J Pain* 2012;3:23–9.
- [37] Radawski C, Genovese MC, Hauber B, Nowell WB, Hollis K, Gaich CL, DeLozier AM, Gavigan K, Reynolds M, Cardoso A, Curtis JR. Patient perceptions of unmet medical need in rheumatoid arthritis: a cross-sectional survey in the USA. *Rheumatol Ther* 2019;6:461–71.
- [38] Roos EM, Roos HP, Lohmander LS, Ekdahl C, Beynon BD. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)—development of a self-administered outcome measure. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28:88–96.
- [39] Roos EM, Toksvig-Larsen S. Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)—validation and comparison to the WOMAC in total knee replacement. *Health Qual Life Outcomes* 2003;1:17.
- [40] Sagar DR, Ashraf S, Xu L, Burston JJ, Menhinick MR, Poulter CL, Bennett AJ, Walsh DA, Chapman V. Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1558–65.
- [41] Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:42–60.
- [42] Sheahan TD, Siuda ER, Bruchas MR, Shepherd AJ, Mohapatra DP, Gereau RW IV, Golden JP. Inflammation and nerve injury minimally affect mouse voluntary behaviors proposed as indicators of pain. *Neurobiol Pain* 2017;2:1–12.
- [43] Sluka KA, Gregory NS. The dichotomized role for acid sensing ion channels in musculoskeletal pain and inflammation. *Neuropharmacology* 2015;94:58–63.
- [44] Sluka KA, Price MP, Breese NM, Stucky CL, Wemmie JA, Welsh MJ. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *PAIN* 2003;106:229–39.
- [45] Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K, Audette KM, Yeomans DC, Wilson SP. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *PAIN* 2007;129:102–12.
- [46] Sluka KA, Rasmussen LA, Edgar MM, O'Donnell JM, Walder RY, Kolker SJ, Boyle DL, Firestein GS. Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:1194–202.
- [47] Smith ME, Kocsis JD, Waxman SG. Myelin protein metabolism in demyelination and remyelination in the sciatic nerve. *Brain Res* 1983;270:37–44.
- [48] Sugimura N, Ikeuchi M, Izumi M, Kawano T, Aso K, Kato T, Ushida T, Yokoyama M, Tani T. Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *Eur J Pain* 2015;19:629–38.
- [49] Taylor P, Manger B, Alvaro-Gracia J, Johnstone R, Gomez-Reino J, Eberhardt E, Wolfe F, Schwartzman S, Furfaro N, Kavanaugh A. Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Int Med Res* 2010;38:1213–24.
- [50] Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tomimaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2002;277:39436–42.
- [51] Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002;158:227–33.
- [52] Velasco M, O'Sullivan C, Sheridan GK. Lysophosphatidic acid receptors (LPARs): potential targets for the treatment of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2017;113:608–17.
- [53] Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na<sup>+</sup> channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 1997;272:20975–8.
- [54] Weiner JA, Chun J. Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5233–8.
- [55] Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J. Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci* 2001;21:7069–78.
- [56] Weiner JA, Hecht JH, Chun J. Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/pA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol* 1998;398:587–98.
- [57] Zhai G, Pelletier JP, Liu M, Aitken D, Randell E, Rahman P, Jones G, Martel-Pelletier J. Activation of the phosphatidylcholine to lysophosphatidylcholine pathway is associated with osteoarthritis knee cartilage volume loss over time. *Sci Rep* 2019;9:9648.
- [58] Zhu S, Zhu J, Zhen G, Hu Y, An S, Li Y, Zheng Q, Chen Z, Yang Y, Wan M, Skolasky RL, Cao Y, Wu T, Gao B, Yang M, Gao M, Kuliwaba J, Ni S, Wang L, Wu C, Findlay D, Eltzschig HK, Ouyang HW, Crane J, Zhou FQ, Guan Y, Dong X, Cao X. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. *J Clin Invest* 2019;129:1076–93.
- [59] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *PAIN* 1983;16:109–10.



# Supplementary informations

## Supplementary Results

### LPC in patients with microcrystalline arthropathies

Although LPC16:0 did not appear to be the hallmark of a particular joint pathology, patients with microcrystalline arthropathies (CCA and gout) displayed lower levels of synovial LPC16:0 (**supplementary fig. 1**) than patients suffering from other inflammatory rheumatic diseases (RA + SPA + PA), suggesting that LPC16:0 might have a less prominent role in pain associated with these two particular joint pathologies, even if patients number is still too low to conclude.

### LPC16:0 induces an ASIC3-dependent current associated to DRG neurons' depolarization

Extracellular application of LPC16:0 in HEK293 cells transfected with rat or human ASIC3 channels induced a progressive and non-inactivating inward current at resting pH 7.4, *i.e.* without any extracellular pH changes (**supplementary fig. 4A, C and D**). Conversely, no significant LPC-activated currents were observed in ASIC1a-transfected cells, nor in non-transfected ones (**supplementary fig. 4B, D**). Furthermore, a LPC16:0-induced current was observed in primary cultured mouse DRG neurons (**fig. 4A-C**). This current had a significantly higher density in wild-type neurons that expressed a pH 6.6-induced native ASIC current (WT ASIC+) compared to neurons without native ASIC current (WT ASIC-), and to neurons isolated from ASIC3 knockout mice, expressing (KO ASIC+) or not-expressing (KO ASIC-) native ASIC currents (**fig. 4C**). Therefore, ASIC3 contributed largely to the LPC16:0-induced currents in mouse DRG neurons. A small ASIC3-independent current was still observed, suggesting an effect of LPC16:0 on other native ion channels, as expected [1-3]. Finally, the neuronal depolarization associated to a 30-sec application of LPC16:0 was significantly higher in WT ASIC+ neurons than in WT ASIC-, KO ASIC+ or KO ASIC- neurons, supporting a leading role of ASIC3 in the excitatory effect of LPC16:0 on DRG neuron membrane potential (**fig. 4D**).

### Knee injections of LPC16:0 induces sensitization of spinal high threshold neurons

Recordings were obtained from spinal dorsal horn neurons receiving either non-noxious sensory inputs (low threshold neurons, LTNs) or noxious nociceptive inputs (high threshold neurons, HTNs), with receptive fields located in mice hindpaws (**fig. 6F-H**). Brushing-evoked activity of ipsilateral LTNs was not modified in LPC16:0-treated mice compared to vehicle or to contralateral LTNs (**fig. 6F**). Conversely, the evoked activities of HTNs in response to both pinch (**fig. 6G**) or von Frey filaments (**fig. 6H**) were significantly enhanced in mice injected with LPC16:0. Ipsilateral HTNs of LPC16:0-treated mice emitted on average twice as much APs in response to pinch as ipsilateral HTNs from vehicle-treated mice or contralateral HTNs (**fig. 6G**). Moreover, ipsilateral HTNs of LPC16:0-treated mice clearly displayed mechanical sensitization in response to the application of increasing von Frey filaments, with a response curve significantly shifted to the left compared to contralateral HTNs or to ipsilateral

HTNs from vehicle-treated mice (**fig. 6H**). *In vivo* recordings of spinal dorsal horn neurons clearly demonstrated a sensitization of spinal high threshold, but not low threshold neurons induced by LPC16:0 knee injections, which was correlated with the persistent secondary allodynia observed.

### **Supplementary References**

- [1] Andersson DA, Nash M, Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 2007;27(12):3347-3355.
- [2] Flemming PK, Dedman AM, Xu SZ, Li J, Zeng F, Naylor J, Benham CD, Bateson AN, Muraki K, Beech DJ. Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J Biol Chem* 2006;281(8):4977-4982.
- [3] Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 2010;6:4.

## Supplementary tables and figures

patient number	Sexe	Age (year)	BMI	Joint pathology	LPC concentration in synovial fluid ( $\mu\text{M}$ )									Sum
					LPC 16:0	LPC 18:2	LPC 18:1	LPC 18:0	LPC 20:5	LPC 20:4	LPC 20:3	LPC 20:2	LPC 22:6	
1	F	67	26,8	OA	42,00	8,87	8,77	14,79	5,56	6,30	6,09	0,20	1,14	93,72
2	F	63		OA	51,74	15,40	12,32	18,84	11,63	11,42	11,33	0,16	1,74	134,58
3	F	71	21,8	OA	46,80	13,36	11,21	17,87	9,85	9,73	10,23	0,22	1,15	120,43
4	M	70	27,0	OA	36,04	9,03	7,54	13,91	6,64	7,10	8,02	0,12	1,59	89,98
5	F	67	26,6	OA	23,60	4,68	4,86	8,05	2,85	3,96	3,96	0,23	0,58	52,77
6	M	67	31,5	OA	18,42	4,53	3,97	6,65	2,02	2,24	2,40	0,18	0,48	40,90
7	F	68	26,3	OA	33,06	3,83	4,82	11,62	1,56	2,60	3,62	0,16	0,42	61,68
8	F	61	24,7	OA	12,40	2,92	2,49	4,03	1,54	1,72	1,71	0,19	0,50	27,50
9	M	67	25,2	OA	38,10	11,76	8,95	10,37	6,69	5,72	4,60	0,43	1,11	87,74
10	F	73	25,7	OA	27,52	5,42	4,50	9,48	4,28	4,31	4,95	0,40	1,17	62,02
11	F	54	34,2	OA	67,15	11,95	15,34	19,31	7,36	12,06	9,92	0,29	1,61	144,99
12	M	49	31,1	OA	20,92	5,69	4,25	5,47	2,39	2,90	2,03	0,14	0,37	44,15
13	F	67	27,0	OA	57,21	7,63	9,94	18,70	4,93	8,74	11,24	0,11	1,16	119,66
14	M	70		OA	43,87	8,50	8,24	14,12	5,41	6,92	6,04	0,24	0,98	94,32
15	M	68	27,3	OA	26,66	7,77	6,20	9,39	5,29	5,42	3,57	0,49	0,87	65,66
16	F	61	32,0	OA	17,13	4,93	4,27	5,60	3,05	2,92	2,55	0,31	0,53	41,29
17	M	73	28,0	OA	69,79	10,79	10,83	17,98	7,96	10,44	10,27	0,19	1,64	139,88
18	M	60	30,4	OA	25,30	5,38	6,62	8,07	3,43	4,74	3,48	0,20	0,48	57,69
19	F	52	23,2	OA	34,94	6,44	6,35	7,99	3,82	4,89	3,88	0,19	0,59	69,09
20	M	69	25,7	OA	47,57	8,13	10,88	13,14	5,27	8,76	4,68	0,14	0,83	99,42
21	M	60	27,2	OA	31,87	5,83	5,97	8,81	3,73	5,03	4,31	0,23	0,80	66,57
22	F	64		OA	26,02	5,19	6,18	12,93	3,33	5,30	5,32	0,38	1,00	65,65
23	F	61	27,4	OA	17,74	3,36	3,78	7,90	1,93	2,71	2,95	0,27	0,47	41,11
24	F	62	27,9	OA	36,81	8,08	7,62	9,86	4,39	5,33	3,84	0,19	0,95	77,07
25	M	58	24,3	OA	33,28	10,83	9,07	10,86	4,72	6,01	3,92	0,26	0,79	79,75
26	M	66	28,4	OA	38,14	7,23	7,22	14,54	3,51	4,34	4,69	0,36	0,88	80,91
27	M	69	31,9	OA	30,58	4,39	5,91	10,02	2,38	4,44	4,17	0,18	0,86	62,96
28	M	56	29,0	OA	19,70	5,91	5,65	7,01	3,71	4,42	3,40	0,30	0,68	50,77
29	M	72	24,6	OA	30,66	7,14	5,78	9,38	4,74	4,76	4,70	0,41	0,83	68,42
30	F	67	24,8	OA	27,97	5,53	5,63	8,66	3,03	4,33	3,78	0,16	0,78	59,86
31	M	66	36,3	OA	41,35	7,70	7,31	11,42	4,89	5,52	5,08	0,30	1,98	85,55
32	M	73	22,5	OA	23,46	4,84	5,74	6,76	2,90	5,15	3,52	0,15	0,71	53,21
33	M	68	30,1	OA	31,38	8,31	5,92	7,78	5,31	4,43	3,90	0,16	0,70	67,88
34	F	67	30,1	OA	44,50	6,86	6,22	13,01	4,37	5,85	6,92	0,12	0,97	88,81
35	M	63	33,2	OA	58,52	9,34	9,63	13,64	5,73	7,25	6,61	0,17	1,23	112,12
1				PM controls	25,74	5,20	5,03	7,21	2,64	3,91	2,33	0,40	0,77	53,23
2				PM controls	12,94	1,76	2,58	5,19	1,02	1,87	1,33	0,22	0,37	27,28
3				PM controls	12,31	2,65	3,28	6,34	1,60	2,69	1,45	0,35	0,59	31,26
4				PM controls	17,66	11,93	6,08	5,46	7,30	5,24	2,82	0,20	0,71	57,41
5				PM controls	13,71	2,65	3,85	3,80	1,97	4,47	2,15	0,39	0,65	33,64
6				PM controls	10,55	2,59	2,54	4,58	1,29	1,59	1,07	0,24	0,32	24,76
7				PM controls	21,58	4,33	4,54	5,74	2,05	2,93	1,81	0,26	0,54	43,77
8				PM controls	15,68	5,50	4,13	10,82	3,12	3,11	2,08	0,47	0,93	45,85
9				PM controls	18,83	3,69	3,49	6,32	2,23	2,51	2,44	0,23	0,89	40,64
10				PM controls	14,00	3,11	3,67	10,98	2,56	3,59	2,68	0,82	0,81	42,22

**Supplementary Table 1. Subject characteristics and LPC concentrations in the knee synovial fluids of the first patients' cohort.** Sexe, age and body mass index (BMI) are reported for each osteoarthritic (OA, n=35) patients. The concentrations of the different lysophosphatidyl-choline (LPC) species (LPC16:0, LPC18:2, LPC18:0, LPC20:5, LPC20:4; LPC20:3, LPC20:2, LPC 22:6) as well as the total concentrations of LPC (Sum) in the synovial fluid of each OA patient and postmortem control (n=10) are also reported in  $\mu\text{M}$ .

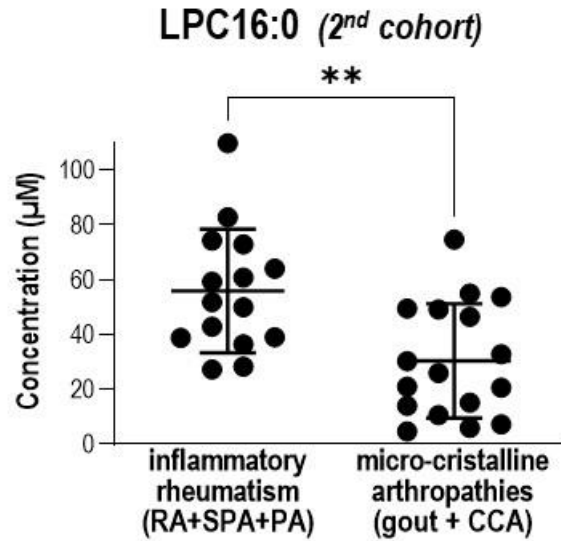
	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>VASknee</b>	<b>1</b>	<b>268,6853147</b>	<b>268,6853147</b>	<b>6,681551328</b>	<b>0,016250218</b>
Gender	1	4,056135654	4,056135654	0,100866244	0,753539278
Age	1	29,27231263	29,27231263	0,727931333	0,401989662
BMI	1	41,38427425	41,38427425	1,029126407	0,32048253
log2IL6	1	76,66705017	76,66705017	1,906523367	0,180074114
Residuals	24	965,1123273	40,21301364	#N/A	#N/A
	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>VASglobal</b>	<b>1</b>	<b>220,9059633</b>	<b>220,9059633</b>	<b>5,232414512</b>	<b>0,031281663</b>
Gender	1	3,462192865	3,462192865	0,082006062	0,777054523
Age	1	20,99892522	20,99892522	0,497383952	0,487440874
BMI	1	38,38032914	38,38032914	0,909082707	0,349863012
log2IL6	1	88,18017338	88,18017338	2,088649903	0,161328797
Residuals	24	1013,249831	42,21874295	#N/A	#N/A
	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>KOOS</b>	<b>1</b>	<b>176,9162648</b>	<b>176,9162648</b>	<b>3,883437194</b>	<b>0,060404618</b>
Gender	1	6,938092967	6,938092967	0,15229605	0,699792949
Age	1	14,70660843	14,70660843	0,322820461	0,575195495
BMI	1	38,56010835	38,56010835	0,846421663	0,36672193
log2IL6	1	54,6975084	54,6975084	1,200649012	0,284066243
Residuals	24	1093,358832	45,55661799	#N/A	#N/A

**Supplementary Table 2. Statistical analysis of LPC16:0 concentrations in the synovial fluids of OA patients (first cohort) and of their pain outcomes (VAS knee, VAS global and KOOS). Analysis of variance (ANOVA) was made using age, gender, BMI and IL-6 as covariates.**

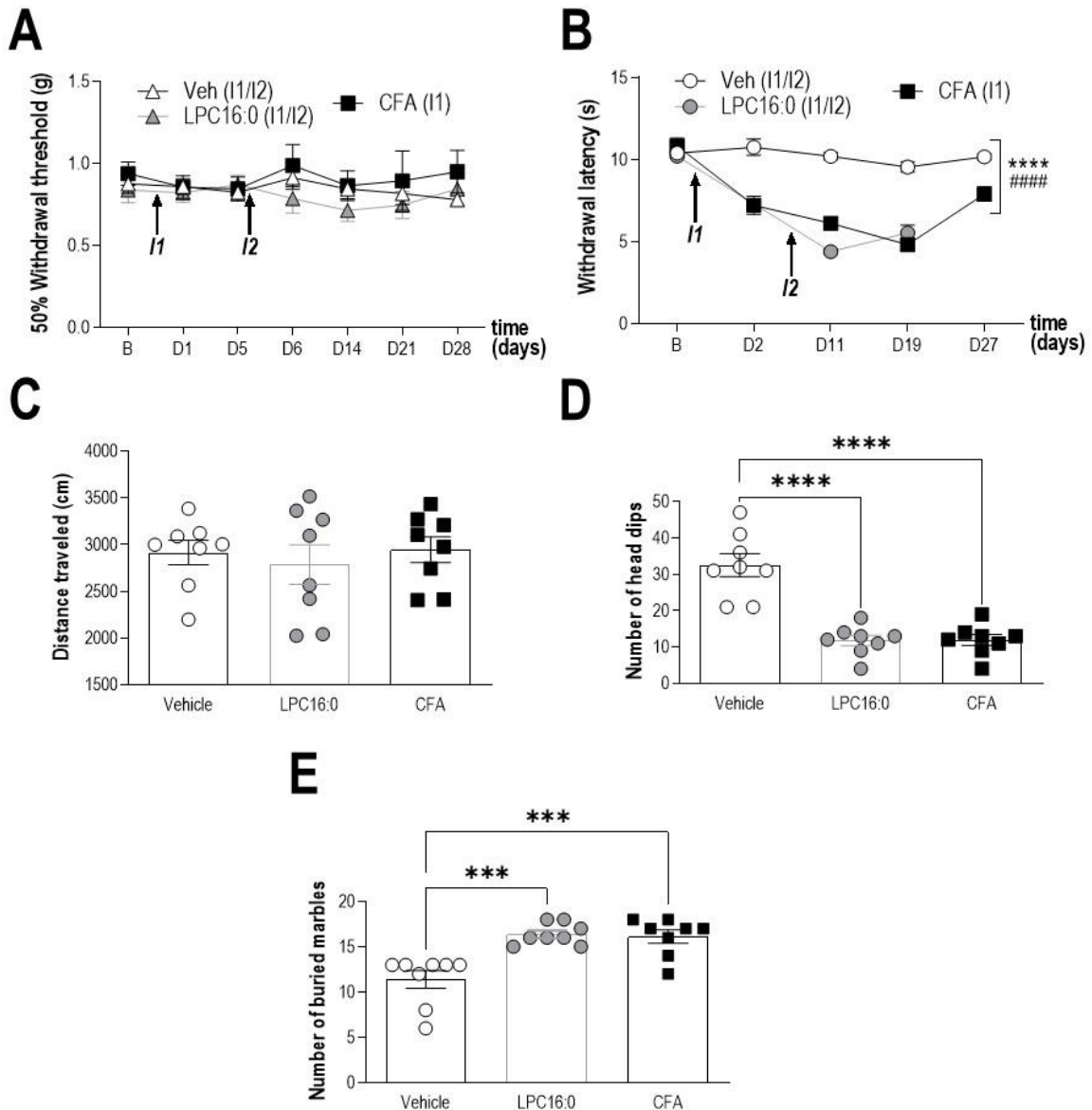


Patient number	Sexe	Age (year)	BMI	Joint pathology	LPC concentration in synovial fluid (µM)									
					LPC 16:0	LPC 18:2	LPC 18:1	LPC 18:0	LPC 20:5	LPC 20:4	LPC 20:3	LPC 20:2	LPC 22:6	Sum
1	F	26	30.1	RA	82.78	8.62	10.53	23.77	4.66	11.14	10.04	0.30	2.07	153.91
2	F	71	18.1	RA	39.00	4.97	6.65	16.06	3.30	5.36	7.42	0.33	1.03	84.12
3	F	71	36.0	RA	28.29	3.32	5.85	14.05	1.65	4.10	5.46	0.69	1.11	64.52
4	F	47	35.2	RA	64.02	13.02	12.30	31.05	8.44	9.56	15.76	0.64	2.02	156.81
5	F	75	26.8	RA	27.19	8.43	7.07	8.72	4.80	6.03	4.01	0.25	0.82	67.31
6	F	36	ND	RA	36.40	4.24	7.03	13.00	2.67	6.35	5.87	0.31	1.09	76.97
7	F	63	32.0	OA	46.08	10.77	9.22	19.68	7.38	7.52	10.33	0.44	1.35	112.78
8	F	77	28.3	OA	28.75	5.58	6.26	9.16	3.96	5.83	5.59	0.27	0.90	66.30
9	F	74	25.4	OA	24.24	6.77	4.59	9.01	4.64	4.07	4.87	0.23	0.61	59.02
10	M	73	24.8	OA	29.93	5.58	4.68	11.79	4.27	5.66	7.64	0.22	1.04	70.81
11	M	87	27.2	OA	77.17	14.50	19.62	33.14	9.40	15.73	15.31	0.44	2.44	187.75
12	M	79	24.7	OA	50.03	9.37	9.89	15.93	3.06	5.12	4.19	0.19	0.78	98.56
13	F	71	ND	OA	26.94	7.73	7.08	10.64	4.32	4.65	4.55	0.25	0.71	66.88
14	M	80	27.3	OA	42.03	9.65	9.03	15.06	5.90	7.51	7.86	0.48	1.38	98.89
15	F	82		OA	55.82	19.32	14.32	24.93	16.76	16.00	17.45	0.47	2.46	167.54
16	M	82	32.3	OA	71.07	11.07	14.10	29.61	7.17	11.79	14.19	0.26	1.70	160.97
17	F	55	40.4	OA	35.54	8.19	10.68	14.48	5.44	8.66	8.13	0.31	1.65	93.08
18	M	70	29.9	OA	35.91	12.71	9.22	14.54	8.87	7.72	7.79	0.33	0.89	97.98
19	F	59	29.2	OA	36.06	8.77	7.40	13.52	4.64	5.27	5.56	0.38	1.00	82.61
20	F	94	24.5	OA	58.35	7.73	10.24	16.39	4.90	8.23	8.32	0.23	1.26	115.64
21	F	78	33.2	OA	14.36	5.09	4.05	5.50	4.02	4.06	3.57	0.13	0.64	41.42
22	F	70	29.0	OA	39.05	12.16	9.32	16.43	6.20	6.85	6.55	0.33	1.09	97.98
23	F	94	21.8	OA	25.00	4.49	4.86	9.74	2.83	3.75	4.72	0.23	0.51	56.14
24	F	57	33.9	OA	46.79	9.54	9.55	17.24	5.82	7.55	8.09	0.26	1.34	106.19
25	M	74	23.5	gout	10.59	1.51	2.60	3.90	0.93	2.19	2.10	0.27	0.49	24.58
26	F	63	32.6	gout	74.62	5.81	12.11	24.35	2.98	12.36	10.60	0.23	1.62	144.66
27	M	74	18.7	gout	20.53	1.62	3.18	5.49	0.81	2.94	2.22	0.30	0.74	37.82
28	M	91	24.3	gout	7.20	1.31	2.20	2.90	0.80	2.08	1.45	0.22	0.53	18.70
29	M	64	28.7	gout	49.48	4.16	7.59	14.21	2.43	6.71	7.21	0.33	1.27	93.38
30	F	81	23.4	CCA	13.88	1.45	2.97	6.26	0.86	2.35	2.60	0.39	0.50	31.26
31	M	83	ND	CCA	49.08	4.51	8.12	15.74	1.95	5.44	5.30	0.68	1.21	92.02
32	F	67	ND	CCA	25.93	8.53	5.05	9.52	5.18	3.78	4.51	0.24	0.87	63.60
33	F	83	17.8	CCA	53.61	9.02	12.10	18.99	5.09	8.78	7.80	0.44	1.03	116.86
34	F	66	22.6	CCA	46.49	4.72	8.72	20.89	2.84	6.95	10.06	0.29	1.07	102.04
35	F	84	24.7	CCA	5.84	0.81	1.66	2.27	0.41	1.09	0.95	0.23	0.29	13.55
36	M	69	24.6	CCA	15.05	1.97	2.68	7.07	1.24	2.54	4.30	0.37	0.61	35.81
37	M	79	21.0	CCA	30.21	3.46	5.73	9.41	2.08	4.84	5.51	0.40	0.64	62.28
38	M	71	40.2	CCA	20.90	2.39	5.34	7.53	1.55	5.25	4.68	0.29	0.68	48.61
39	M	75	24.8	CCA	54.96	7.73	11.26	15.24	5.98	11.12	10.47	0.44	1.69	118.88
40	M	73	ND	CCA	4.66	0.83	1.26	1.66	0.43	0.82	0.68	0.24	0.32	10.90
41	F	85	ND	CCA	32.75	4.69	6.30	9.59	3.29	5.45	5.59	0.19	0.82	68.66
42	F	50	20.7	PA	49.91	6.67	9.57	18.54	4.81	8.82	10.07	0.46	1.10	109.94
43	F	66	30.1	PA	59.22	14.56	13.30	16.07	11.02	11.60	9.82	0.18	1.52	137.29
44	M	68	26.1	PA	51.78	17.14	12.40	19.49	11.30	9.87	10.39	0.30	1.62	134.29
45	M	59	26.0	PA	42.83	4.87	7.19	16.81	2.66	5.13	7.63	0.30	0.92	88.35
46	F	55	34.7	SPA	72.94	6.49	9.31	24.59	4.04	7.56	10.83	0.35	1.59	137.69
47	F	41	20.8	SPA	109.87	9.82	16.43	44.07	6.96	15.16	21.20	0.38	2.34	226.23
48	F	33	28.0	SPA	38.73	6.59	6.66	17.12	4.50	6.63	9.08	0.24	0.97	90.52
49	F	48	22.5	SPA	74.26	13.76	13.14	32.42	6.99	8.68	11.51	0.42	0.98	162.17
50	F	57	26.4	SPA	60.79	6.54	9.34	21.62	4.10	10.07	12.85	0.36	1.66	127.33

**Supplementary Table 3. Subject characteristics and LPC concentrations in the knee synovial fluids of the second patients' cohort.** Sexe, age and body mass index (BMI) and joint pathology are reported for each patient (n=50). The concentrations of the different lysophosphatidyl-choline (LPC) species (LPC16:0, LPC18:2, LPC18:0, LPC20:5, LPC20:4, LPC20:3, LPC20:2, LPC 22:6) as well as the total concentrations of LPC (Sum) in the synovial fluid of each patient are also reported in µM. Rheumatoid arthritis (RA, n=6), osteoarthritis (OA, n=18), gout (n=5), chondrocalcinosis (CCA, n=12), psoriatic arthritis (PA, n=4) and spondyloarthritis (SPA, n=5).

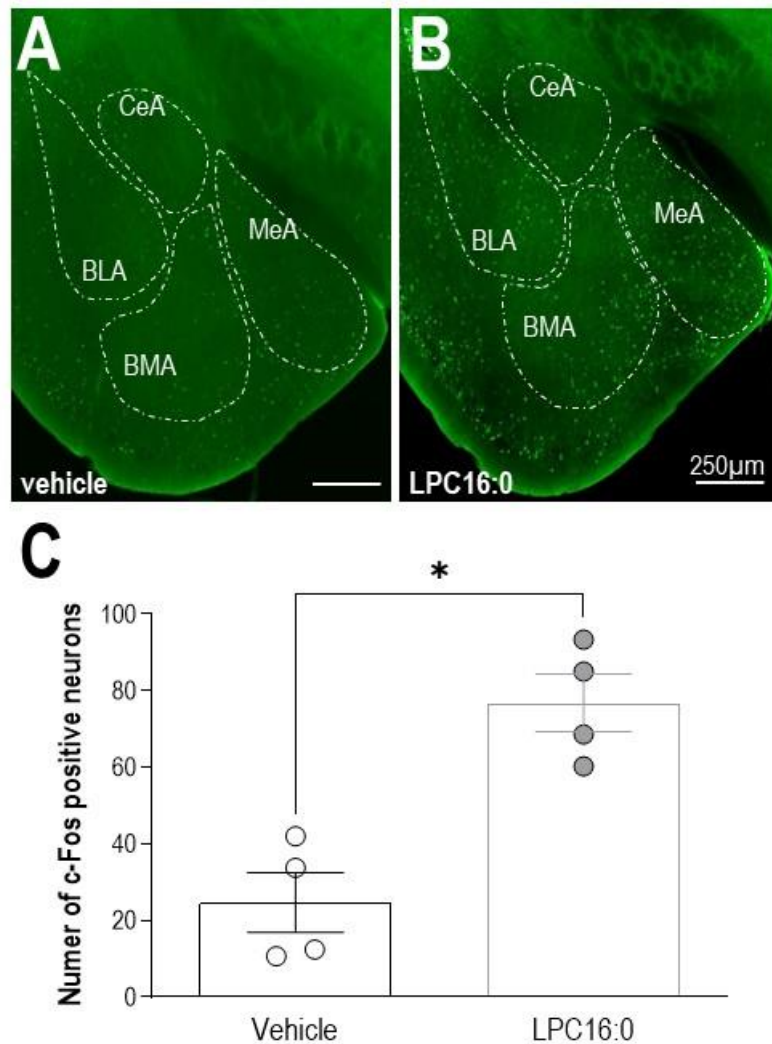


**Supplementary Figure 1. LPC16:0 concentrations in knee synovial fluids from patients of the second cohort.** LPC16:0 concentrations in the synovial fluids of patients from the second cohort grouped in two main joint pathologies, *i.e.*, inflammatory rheumatism: rheumatoid arthritis (RA) + spondyloarthritis (SPA) + psoriatic arthritis (PA), and micro-cristalline arthropathies: gout + chondrocalcinosis (CCA); \*\* $p < 0.01$ , Unpaired t test).

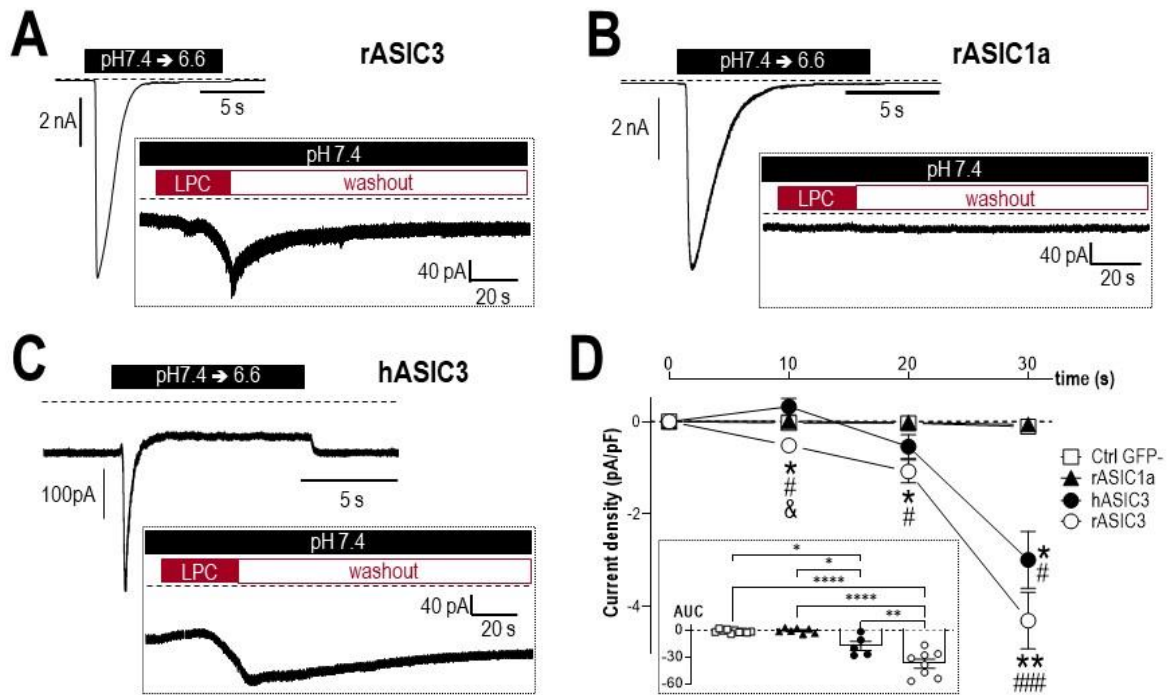


**Supplementary Figure 2. LPC injections into mouse ankle produce long-lasting pain-like behaviors associated with anxiety.** (A) Effect of intra-articular ankle administrations of LPC16:0 (10 nmol), complete Freund adjuvant (CFA) or vehicle on mechanical allodynia of the contralateral paw of male mice. Mechanical paw threshold was assessed using the up and down method with von Frey filament on the contralateral hindpaw from D1 to D28. Results are expressed as 50% mechanical threshold (n=8-16 mice per group; no significant differences, two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). (B) Effect of intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle on thermal hyperalgesia in male mice. Thermal withdrawal threshold was assessed using the paw immersion test at 46°C (n=8-16 mice per group; \*\*\*\*p<0.0001, #####p<0.0001 and &&&p<0.0001 for a main effect on CFA and LPC16:0 curves, respectively, as compared to Veh curve; mixed-effect analysis followed by a Tukey's multiple comparison test). (C-E) Effect of intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle in male mice on the distance travelled in the open field test at D20 (C), on the number of head dips in the hole board test at D22 (D), and on the number of buried marbles in the marble burying test at D19 (E). The open field test lasted 5 min and the distance travelled was automatically calculated using Ethovision XT 13 (Noldus). The

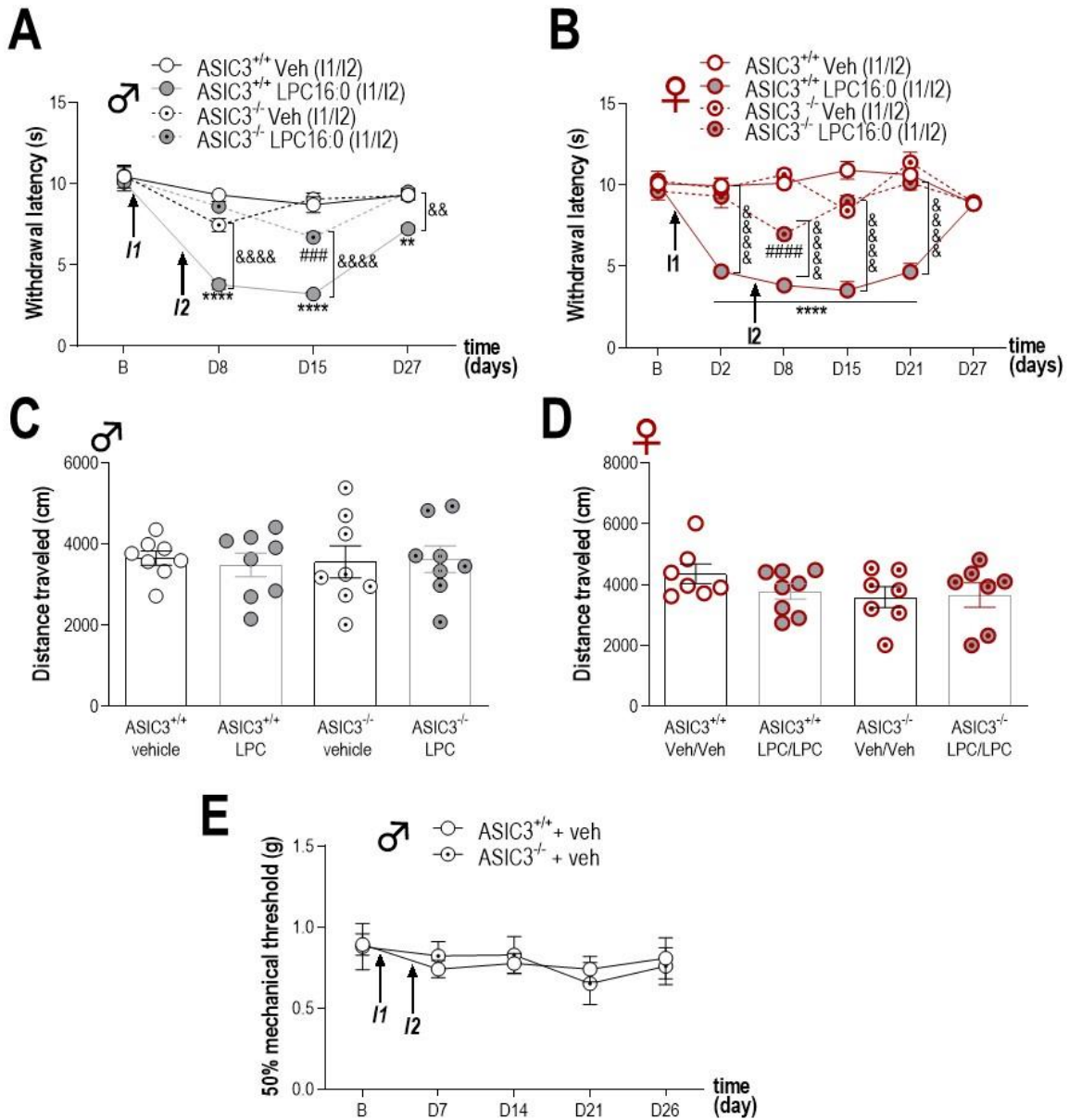
hole board and the marble burying tests lasted 5 and 30 min, respectively, and were analyzed by a blind experimenter (n=8 mice per group; \*\*\*p<0.001 and \*\*\*\*p<0.0001, one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test)



**Supplementary Figure 3. Intra-articular LPC16:0 injections in mice are associated to increased neuronal activity within the amygdala.** (A-B) Representative photomicrographs of c-fos expression in the amygdala at D28, after intra-articular administrations of vehicle (A) or LPC16:0 (10 nmol, B) in the ankle joint of male mice. (C) Quantification of c-fos positive neurons in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA). CeA: central nucleus of the amygdala; BMA: basomedial amygdala; MeA: medial amygdala (n= 4 in each group, \*p<0.05, Mann-Whitney test).



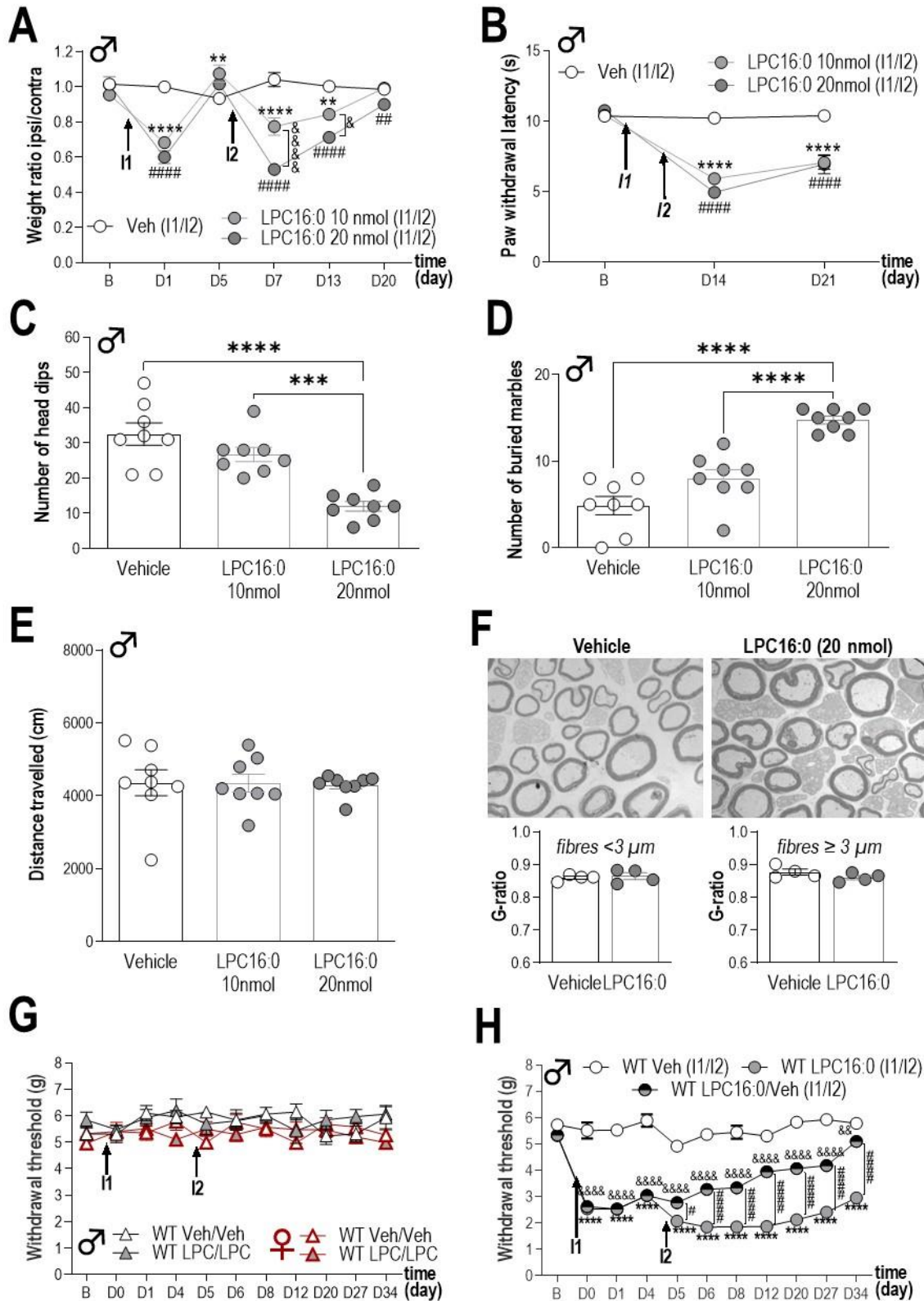
**Supplementary Figure 4. LPC16:0 induces a non-inactivating ASIC3 current in a recombinant expression system. (A-C)** Typical ASIC current traces recorded in patch-clamp (HP -50mV) from HEK293 cells transfected with rat ASIC3 (rASIC3, **A**), rat ASIC1a (rASIC1a, **B**) or human ASIC3 (hASIC3, **C**), following extracellular acidification from pH 7.4 to pH 6.6. *Insets* show the effects of LPC16:0 (5 μM) applied for 30 seconds at the resting pH 7.4. **(D)** Analysis of the current densities measured after 10, 20 and 30 second-applications of LPC16:0 (5 μM) onto HEK cells either non-transfected (Ctrl GFP-, n=10) or transfected with rASIC1a (n=7), hASIC3 (n=5) or rASIC3 (n=8). Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test was used (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to Ctrl GFP-, # $p < 0.05$  and ### $p < 0.001$  compared to ASIC1a, & $p < 0.05$  compared to hASIC3). *Inset* shows the area under curve (AUC) obtained for the different transfection conditions (Ctrl GFP-, rASIC1a, hASIC3 and rASIC3). AUC were calculated using Prism software over 30 second periods from the baseline fixed at 0 (n=5-10, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test).



**Supplementary Figure 5. ASIC3 is crucial for the development of both pain and anxiety-like behaviors induced by ankle LPC16:0 injections in male and female mice. (A-B)** Effect of intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle on thermal hyperalgesia in male **(A)** and female **(B)** ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice. Thermal withdrawal threshold was assessed using the paw immersion test at 46°C (n=7-8 mice per group; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  for ASIC3<sup>+/+</sup> Veh vs. ASIC3<sup>+/+</sup> LPC16:0; ### $p < 0.001$  and #### $p < 0.0001$  for ASIC3<sup>-/-</sup> Veh vs. ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0; && $p < 0.01$  and &&& $p < 0.0001$  for ASIC3<sup>+/+</sup> LPC16:0 vs. ASIC3<sup>-/-</sup> LPC16:0; Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests). **(C-D)** Effect of intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle on the distance travelled in the open field test at D20 in male **(C)** and female **(D)** ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice (n=7-8 mice per group, no significant difference, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests). The open field test lasted 5 min and the distance travelled was automatically calculated using Ethovision XT 13 (Noldus). **(E)** Time course effect of intra-articular ankle injections of vehicle in male ASIC3<sup>+/+</sup> and ASIC3<sup>-/-</sup> mice. Ipsilateral mechanical

paw withdrawal thresholds were assessed with von Frey filaments using the up and down method (n=8 mice per group, no significant differences, Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests).





**Supplementary Figure 6. LPC knee injections generate dose-dependent weight bearing deficit, thermal hyperalgesia and anxiety-like behaviors, without apparent nerve demyelination. (A)** Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol) or vehicle on weight bearing in male mice. Results are expressed as the weight ratio between the ipsilateral and contralateral hindpaws (n=8 mice per group; \*\* $p < 0.01$  and



\*\*\*\* $p < 0.0001$  for Veh vs. LPC16:0 10 nmol; ## $p < 0.01$  and #### $p < 0.0001$  for Veh vs. LPC16:0 20 nmol; & $p < 0.05$  and &&& $p < 0.0001$  for LPC16:0 10 nmol vs. LPC16:0 20 nmol; Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). **(B)** Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol) or vehicle on thermal hyperalgesia in male mice. Thermal withdrawal threshold was assessed using the paw immersion test at 46°C (n= 8 mice per group; \*\*\*\* $p < 0.0001$  and #### $p < 0.0001$  for Veh vs. LPC16:0 10 nmol and Veh vs. LPC16:0 20 nmol, respectively; Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). **(C-D)** Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol) or vehicle on the number of head dips in the hole board test at D22 **(C)** and the number of buried marble in the marble burying test at D19 **(D)**, in male mice. The hole board and marble burying tests lasted 5 and 30 min, respectively, and were analyzed by a blind experimenter (n=8 mice per group; \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). **(E)** Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol) or vehicle on the distance travelled in the open field test in male mice. The open field test lasted 5 min and the distance travelled was automatically calculated using Ethovision XT 13 (Noldus; n=8 mice per group; no significant differences, one-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). **(F)** Representative electron photomicrographs of saphenous nerve sections from knee of male mice injected with vehicle (upper left) or LPC16:0 (20 nmol, upper right) at D7. G-ratios (lower panels) were calculated as a measure of myelin thickness and separated into small (left) and large (right) diameters based on internal axonal size (n=162 to 235 fibers per animal with 4 animals per group, no significant differences, Mann-Whitney tests). **(G)** Contralateral paw withdrawal thresholds (PWTs) of female and male WT mice injected twice in the knees with LPC16:0 (20 nmol) or vehicle. PWTs were assessed using a dynamic plantar aesthesiometer (n=6 per group; no significant differences; three-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). **(H)** Ipsilateral PWTs of male WT mice injected once or twice with LPC16:0 (20 nmol, n=8-14 per group, dynamic plantar aesthesiometer, \*\*\*\* $p < 0.0001$  for WT LPC16:0 vs. WT Veh; && $p < 0.01$  and &&& $p < 0.0001$  for WT LPC16:0/Veh vs. WT Veh; # $p < 0.05$  and #### $p < 0.0001$  for WT LPC16:0 vs. WT LPC16:0/Veh; Two-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test).

# DISCUSSION

Bien que la douleur soit un processus physiologique de défense indispensable à la survie d'un organisme, lorsque que le système nociceptif se dérégule, conséquence ou non d'une maladie ou lésion apparente, des douleurs chroniques peuvent alors se développer et elles deviennent alors une pathologie en soi. Difficiles à traiter, les douleurs chroniques sont un handicap et empiètent sur le bien-être quotidien des patients, qui développent fréquemment des troubles anxieux et dépressifs associés. Il existe en réalité plusieurs types de douleurs chroniques qui impliquent des processus différents, dont il est indispensable d'identifier les mécanismes afin de proposer des traitements efficaces et adaptés.

Exprimés dans les neurones sensoriels périphériques et détecteurs de légères acidoses extracellulaires, les canaux ASIC3 sont apparus à partir des années 1990 comme des acteurs potentiellement importants dans la détection des stimuli nocifs (**Waldmann et al., 1997b; Babinski et al., 1999**). Plus récemment, l'identification d'un nouvel activateur endogène d'ASIC3, la lysophosphatidylcholine (LPC), lipide capable d'activer un courant ASIC3 sans acidification extracellulaire, et retrouvé dans les liquides synoviaux inflammatoires de patients souffrant de douleurs chroniques associées à différentes pathologies articulaires, suggèrent un mécanisme de régulation d'ASIC3 par la LPC dans la perception douloureuse de ces pathologies (**Marra et al., 2016**).

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux effets de la LPC dans le développement de douleurs chroniques, et j'ai établi et caractérisé un modèle animal de douleur articulaire chronique basé sur des observations cliniques.

## I. Taux élevés de LPC16:0 dans les liquides synoviaux de patients souffrants de différentes arthropathies

---

Des analyses lipidomiques ciblées ont été réalisées dans les liquides synoviaux de sujet témoins (post-mortem sans historique d'OA ou de rhumatisme inflammatoire) et de patients issus de deux cohortes indépendantes : 35 patients atteints d'ostéoarthrose (OA) et 50 patients atteints de différentes maladies rhumatismales, dont l'ostéoarthrose. La comparaison de ces analyses lipidomiques révèle une concentration de LPC16:0 significativement plus élevée dans les liquides synoviaux des patients par rapport aux témoins.

Des analyses de corrélation entre les taux de LPC16:0 des liquides synoviaux de la première cohorte (OA) et différentes échelles de scores (douleurs, qualité de vie) ont été réalisées. Il existe une corrélation positive et significative entre le taux de LPC16:0 dans les liquides synoviaux des patients et leurs scores de douleur VAS global et VAS genou ( $p=0.016$  et  $p=0.031$  respectivement, VAS : « Visual Analogue Score »), indépendamment du sexe, de l'âge, de l'IMC, et des taux d'IL-6 dans les liquides synoviaux. Une corrélation inverse entre les taux de LPC16:0 et les scores KOOS (« Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score », score international évaluant la qualité de vie associée à des pathologies du genou) atteint presque le seuil de significativité ( $p=0,060$ ). L'absence de significativité de cette dernière corrélation s'explique probablement par la nature de ce questionnaire qui considère une multitude de critères plus larges que les VAS, et qui peuvent plus facilement être influencés par la personnalité et les émotions individuelles de chacun que par la douleur seule, englobant l'impact des douleurs sur le quotidien et la qualité de vie globale des patients (douleur, raideur, capacité à exécuter des mouvements de tous les jours ou à pratiquer une activité sportive, bien-être, etc.). De précédents travaux ont également montré des taux élevés de LPC synoviaux, mais aussi plasmatiques, chez des patients souffrant de douleurs musculosquelettiques (OA, polyarthrite rhumatoïde et fibromyalgie) (**Kosinska et al., 2013, 2016; Zhai et al., 2019; Hung et al., 2020**), ainsi qu'une corrélation positive entre les taux de LPC16:0 sanguins et les scores de douleurs de patients atteints de fibromyalgie (**Hung et al., 2020**). Le regroupement par type de pathologies des taux de LPC16:0 des patients de la 2<sup>nd</sup>e cohorte montre que la LPC16:0 ne semble pas être un marqueur d'une pathologie en particulier. En revanche, les patients atteints de pathologies microcristallines

(chondrocalcinose, goutte) ont des taux de LPC16:0 significativement plus bas que les patients atteints d'autres pathologies rhumatismales inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, arthrite psoriasique), suggérant que la LPC16:0 contribuerait moins aux douleurs associées à ces deux arthropathies microcristallines.

## II. Origine de l'augmentation de LPC16:0 synovial : un contexte inflammatoire ?

---

Certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, induisent la surexpression de phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>), enzymes responsables de l'hydrolyse de phospholipides en lysophospholipides et acides gras, et notamment de la formation de LPC (**Leistad et al., 2011**). Bien que l'OA soit considérée comme une arthropathie non inflammatoire, la dégénération cartilagineuse peut être associée à des épisodes inflammatoires (**Goldring, 2000; Hunter et Felson, 2006**), et les niveaux d'IL-6 sont un marqueur de la sévérité de la progression des symptômes arthritiques (**Livshits et al., 2009; Pelletier et al., 2010; Kosek et al., 2018**). De plus, il y a une surexpression d'une PLA<sub>2</sub> sécrétée (sPLA<sub>2</sub>) dans le cartilage et les membranes synoviales de patients atteints d'OA, qui est corrélée positivement aux taux d'IL-6 (**Zhai et al., 2019**). Dans notre étude, l'inclusion ou l'exclusion des données sur les taux d'IL-6 des liquides synoviaux dans l'analyse statistique n'a que peu d'impact sur les résultats des corrélations entre les taux de LPC16:0 et les scores VAS et KOOS. De plus, aucune corrélation n'est observée entre les taux de LPC16:0 et les taux d'IL-6 dans les liquides synoviaux des patients, indiquant que l'implication de la LPC16:0 dans les niveaux de douleur des patients n'est pas associée à un contexte inflammatoire impliquant la cytokine IL-6. Il aurait été intéressant de disposer également des taux d'IL-6 des sujets témoins et des patients de la 2<sup>nde</sup> cohorte afin de pousser les analyses, notamment à d'autres pathologies articulaires.

Nos résultats démontrent que des injections intra-articulaires de LPC16:0, que ce soit dans la cheville ou le genou, conduisent aux développements de comportements douloureux et anxieux chez la souris, et ces effets ne sont pas dus à la conversion de la LPC en LPA (acide lysophosphatidique) par l'autotaxine. Les animaux ne présentent aucun signe de lésion nerveuse, ou osseuse, ni de démyélinisation ou d'inflammation apparente. Dans un modèle de fibromyalgie qui présente une augmentation significative de LPC16:0 plasmatique, aucune

inflammation n'est non plus détectée, en revanche il y a une augmentation de l'état oxydatif des leucocytes (Hung et al., 2020). En effet, nous avons vu que la LPC peut être produite par des sPLA<sub>2</sub> durant un processus inflammatoire, mais en conditions non inflammatoires et dans un contexte de stress oxydatif, la LPC peut également le produit de l'oxydation de lipides par le biais de Lp-PLA<sub>2</sub> (lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub>), aussi appelées PAF-AH (Plasma Platelet-activating-Factor-acetylhydrolase), ou directement par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Karabina et al., 1997; Tselepis et John Chapman, 2002; Karabina et Ninio, 2006; Srinivasan et Bahnson, 2010; Choi et al., 2011).

L'absence d'inflammation dans notre modèle suggère que l'augmentation de LPC16:0 n'entraînerait pas de processus inflammatoires potentiels dans les différentes pathologies représentées par les deux cohortes de patients. Ainsi, le modèle que nous avons développé est un nouveau modèle pré-clinique de *douleur articulaire chronique*, présentant des comorbidités de troubles anxieux associés, mais ne représentant pas une arthropathie particulière. L'étude du groupe de Hung ouvre des pistes quant à la cause de l'augmentation de LPC16:0, qui pourrait s'expliquer par une oxydation de phosphatidylcholine en LPC dans un contexte de stress oxydatif, mais notre modèle n'exclue pas la possibilité que la formation de LPC16:0 soit la conséquence d'un contexte inflammatoire chez les patients. De plus, la formation de LPC16:0 pourrait également être la conséquence directe des altérations osseuses associées à arthropathies telles que l'OA ou la polyarthrite rhumatoïde. En effet, en clinique, ces atteintes osseuses contribuent aux douleurs des patients (Sagar et al., 2014; Zhu et al., 2019), ainsi l'absence d'altération osseuse dans notre modèle de douleur articulaire chronique suggère que chez les patients l'augmentation de LPC16:0 serait le résultat plutôt que la cause des lésions osseuses.

### **III. Un nouveau modèle de douleur articulaire chronique induit par injections de LPC16:0 et dépendant d'ASIC3**

---

#### **A. ASIC3 est impliqué dans le développement d'une allodynie mécanique secondaire et de troubles anxieux dans ce modèle**

Dans le modèle que nous avons développé, les effets de la LPC16:0 sur les comportements douloureux et anxieux sont dépendants d'ASIC3. Les souris ASIC3<sup>-/-</sup> ou co-injectées localement

avec un inhibiteur d'ASIC3 (l'APETx2) sont en partie (injections dans la cheville) ou majoritairement (injections dans le genou) protégées du développement de comportements douloureux. Que les injections intra-articulaires aient été faites dans la cheville ou le genou des animaux, les mesures de seuils de sensibilité ont été prises au niveau de la voûte plantaire. Dans le cas d'injections dans la cheville, du fait de la proximité de la zone mesurée, les résultats reflètent à la fois des allodynies primaire (articulation injectée) et secondaire (voûte plantaire de la patte), alors que dans le cas d'injections dans le genou, la zone mesurée est clairement secondaire au site d'injection. De précédents travaux qui ont montré dans des modèles de douleurs musculaires et articulaires qu'ASIC3 contribue au développement d'hyperalgie secondaire et non primaire (Sluka et al., 2003; Ikeuchi et al., 2008; Walder et al., 2010), pourraient ainsi expliquer dans notre modèle la différence d'implication d'ASIC3 en fonction de l'articulation injectée. Ainsi, ASIC3 serait plus particulièrement impliqué dans le développement de douleurs secondaires

## **B. ASIC3 est impliqué dans le développement d'une hyperalgie thermique dans ce modèle**

Les animaux ayant reçu des injections de LPC16:0 développent de manière ASIC3-dépendante à la fois une allodynie mécanique et une hyperalgie thermique. Le groupe de Kathleen Sluka n'avait pas observé d'hyperalgie thermique dans un modèle de douleur musculaire non inflammatoire induit par injections d'une solution hyper acide (pH 4,0) (Sluka et al., 2001). En revanche dans des modèles inflammatoires de douleurs musculaire et articulaire induits par injection de carraghénine, les animaux développent une hyperalgie thermique (Radhakrishnan et al., 2003; Sluka et al., 2007; Ikeuchi et al., 2008) qui est indépendante d'ASIC3 (Sluka et al., 2007; Ikeuchi et al., 2008). Notre modèle de douleur articulaire ne semble pas être un modèle inflammatoire. La mixité des données de la littérature ainsi que de notre étude complexifie leur interprétation, mais ces résultats suggèrent dans leur ensemble que des douleurs *musculaires non inflammatoires liées à une acidose tissulaire* ne sont pas associées à une hyperalgie thermique, que le développement d'une hyperalgie thermique indépendante d'ASIC3 est spécifique de douleurs *inflammatoires*, et que dans un contexte de douleur articulaire induite par injections de LPC16:0 n'induisant pas d'inflammation, une hyperalgie thermique dépendante d'ASIC3 se développe.

Dans chacun de ces modèles, il semble exister suivant l'origine de la douleur (acide, inflammation, LPC), des mécanismes d'activation/sensibilisation de différents types de fibres afférentes primaires (fibres polymodales ou fibres répondant spécifiquement aux stimuli mécaniques ou thermiques), certains étant dépendants d'ASIC3, d'autres non.

### **C. Absence de dimorphisme sexuel dans ce modèle et dans sa dépendance à ASIC3**

Dans la littérature, il a été montré depuis quelque temps déjà que la majorité des patients souffrants de douleurs chroniques sont des femmes et qu'elles ont une prévalence plus élevée que les hommes dans le développement de syndromes douloureux chroniques tels que la migraine, le syndrome du côlon irritable, la fibromyalgie ou encore liés à des arthropathies (**Unruh, 1996; Berkley, 1997; Fillingim et al., 2009; Ruau et al., 2012; Mogil, 2012**). Malgré un dimorphisme sexuel apparent, les expériences scientifiques dans le domaine de la douleur ont quasiment toujours été réalisées sur des modèles murins mâles (certaines études ne précisent même pas le sexe de leur modèle) (**Mogil et Chanda, 2005**). C'est d'ailleurs le cas dans une majorité de domaines de recherche, pouvant être un biais dans une grande partie de la littérature scientifique (**Beery et Zucker, 2011; Mogil, 2020**). Les scientifiques justifiaient l'utilisation uniquement de mâles par la crainte que le cycle hormonal des femelles complique l'interprétation des résultats, et que la plupart des précédentes études avaient été réalisées sur des mâles et qu'il fallait donc continuer ainsi (**Dance, 2019**). Aujourd'hui, des politiques d'inclusion des mâles et de femelles dans les projets scientifiques ont été mises en place par les institutions de recherches à travers les pays, incitant à considérer le sexe d'un individu comme un paramètre biologique (**Tannenbaum et al., 2019; Mogil, 2020**). Un des facteurs expliquant un dimorphisme sexuel est l'influence des hormones sexuelles, notamment des œstrogènes (**Li et al., 2009; Gupta et al., 2011; Qu et al., 2015**).

Dans notre étude, les injections intra-articulaires de LPC16:0 induisent des comportements douloureux et anxieux dépendants d'ASIC3, sans dimorphisme sexuel. En effet, les souris sauvages mâles et femelles développent de manière similaire des symptômes douloureux et anxieux, et les souris ASIC3<sup>-/-</sup>, mâles comme femelles, sont protégées de la même façon du développement de ces comportements. Ces résultats sont surprenants, car d'une part des études montrent que de manière générale les femmes sont plus sensibles à la



douleur que les hommes (**Berkley, 1997; Kim et al., 1999; Mogil, 2020**), et d'autre part les canaux ASIC3 sont positivement modulés par un œstrogène, l'17 $\beta$ -estradiol (E2) (**Qu et al., 2015; Ren et al., 2018**). En effet, des expériences d'électrophysiologie montrent que les courants ASIC3 sont potentialisés par l'application de 17 $\beta$ -estradiol (E2) dans des neurones de DRG de rats femelles (**Qu et al., 2015**). De plus, des expériences de western-blot montrent que les neurones de DRG de rats femelles ont une expression plus forte d'ASIC3 que ceux des mâles, ainsi que l'œstrogène E2 induit une surexpression d'ASIC3 via le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  dans des cellules HEK293T co-transfectées avec ASIC3 et ER $\alpha$  (**Ren et al., 2018**). L'injection sous-cutanée dans la patte d'acide acétique induit un comportement douloureux significativement plus prononcé chez les souris femelles que chez les mâles, et les femelles ovariectomisées ont un comportement douloureux ainsi qu'un niveau d'expression d'ASIC3 dans les neurones de DRG comparables au souris mâles, castrées ou non (**Qu et al., 2015; Ren et al., 2018**). De manière intéressante, l'administration intradermique d'E2 dans la patte des souris injectées avec l'acide acétique exacerbe le comportement douloureux des souris mâles, et reverse l'atténuation des comportements douloureux chez les femelles ovariectomisées (**Qu et al., 2015**).

En considérant l'ensemble de ces données, nous aurions pu nous attendre à des différences mâles/femelles dans notre modèle de douleur articulaire. Ce n'est d'ailleurs pas le seul modèle de douleur à ne pas présenter de dimorphisme sexuel. En effet, parmi les modèles animaux de douleur présentés dans la partie II. D. « Canal ASIC3 et douleurs musculosquelettiques », certains modèles ont fait l'objet de comparaison mâles et femelles. C'est le cas des modèles inflammatoires articulaires et musculaires induits par injection de carraghénine, ainsi que le modèle de fibromyalgie induit stress sonore (RISS) de Hung et al., 2020, qui ne présentent pas de dimorphisme sexuel concernant les hyperalgies mécaniques (primaires ou secondaires) et thermiques (**Sluka et al., 2007; Ikeuchi et al., 2008; Walder et al., 2010; Hung et al., 2020**). Pourtant, dans un modèle d'inflammation cutanée induit par injection de carraghénine, les souris femelles sont plus sensibles à un stimulus mécanique (test de von Frey) que les mâles, et les souris mâles et femelles délétées génétiquement pour les récepteurs aux œstrogènes ont une sensibilité comparable aux souris mâles sauvages, suggérant un rôle sexe-spécifique des œstrogènes dans le développement de la douleur dans ce modèle (**Li et al., 2009**).

## D. Les injections de LPC16:0 induisent une sensibilisation centrale

Le développement d'une allodynie (ou d'une hyperalgie) secondaire et persistante après la guérison de la zone primaire lésée fait intervenir des mécanismes de sensibilisation dans le système nerveux central (**Coderre et al., 1993**). Une sensibilisation centrale est définie par une amplification des signaux neuronaux dans le système nerveux central qui ici sont à l'origine d'hypersensibilités douloureuses. Des phénomènes de sensibilisation centrale ont été décrits dans de multiples syndromes douloureux chroniques en rhumatologie, tels que l'OA, la fibromyalgie ou encore la polyarthrite rhumatoïde, et sont souvent corrélés à la sévérité des symptômes douloureux (**Nijs et al., 2021**).

Ainsi, dans notre modèle, le développement d'une allodynie secondaire persistante après 2 injections intra-articulaires de LPC16:0 suggère la mise en place d'une sensibilisation centrale. À l'issue du protocole de von Frey ( $\geq 30$  jours post 2<sup>nd</sup>e injection), des enregistrements extracellulaires *in vivo* de neurones spinaux ipsilatéraux ou controlatéraux à la patte injectée (ayant pour champ récepteur la voûte plantaire) ont été réalisés en réponse à l'application de stimuli nocifs et non nocifs sur la voûte plantaire des souris ayant reçu 2 injections de LPC16:0 ou de véhicule. Les injections de LPC16:0 induisent une sensibilisation (augmentation du nombre de potentiels d'action émis) des neurones spinaux ipsilatéraux répondants spécifiquement à des stimuli nociceptifs (neurones de haut-seuil), que ce soit en réponse au pincement ou à l'application de filaments de von Frey croissants. En accord avec ces résultats, Hung et al., ont montré dans un modèle de fibromyalgie associé à une augmentation plasmatique de LPC16:0, une surexpression de c-fos et pERK dans les neurones spinaux, indices d'une sensibilisation centrale (**Hung et al., 2020**). Ces données suggèrent que la LPC16:0 joue un rôle dans le développement de douleurs chroniques par la mise en place d'une sensibilisation centrale, possiblement dans différents types de douleurs musculosquelettiques. Le groupe de Kathleen Sluka a montré que deux injections intramusculaires d'une solution acide induit une allodynie secondaire persistante associée à une sensibilisation centrale (neurones spinaux WDR « Wide Dynamic Range neurons ») de manière ASIC3-dépendante (**Sluka et al., 2003**). Dans notre modèle, les comportements douloureux induits par la LPC16:0 étant dépendants d'ASIC3, il est possible que la sensibilisation centrale observée soit également dépendante d'ASIC3. Afin de confirmer cela,

il aurait été intéressant de tester si les souris ASIC3<sup>-/-</sup> sont protégés de cette sensibilisation induite par injections intra-articulaires de LPC16:0.

## **E. Absence de bilatéralisation de l'allodynie et de la sensibilisation centrale**

Les modèles animaux de douleur musculaire et articulaire présentés dans la partie II. D. « Canal ASIC3 et douleurs musculosquelettiques », qu'ils soient inflammatoires ou non, ont une bilatéralisation des allodynies mécaniques, c'est-à-dire que les hypersensibilités se propagent à la patte controlatérale (**Price et al., 2001; Sluka et al., 2001; Radhakrishnan et al., 2003; Sluka et al., 2003, 2007; Ikeuchi et al., 2008; Walder et al., 2010; Karczewski et al., 2010; Sugimura et al., 2015**). Le groupe de Kathleen Sluka montre dans leur modèle que cela se traduit par une sensibilisation dépendante d'ASIC3 des neurones spinaux ipsilatéraux, mais également controlatéraux (**Sluka et al., 2003**). En accord avec ces résultats, ils avaient montré dans une étude précédente, que l'anesthésie locale par injection de lidocaïne 24h suivant la 2<sup>nd</sup>e injection acide dans le même muscle n'empêchait pas la propagation de l'allodynie mécanique vers la patte controlatérale, suggérant déjà que les fibres afférentes primaires ne sont pas impliquées dans cette bilatéralisation, mais que cela ferait plutôt intervenir des phénomènes de sensibilisation centrale (**Sluka et al., 2001**).

Au vu de ces modèles animaux, nous avons ainsi testé si l'allodynie mécanique induite par injections unilatérale intra-articulaires de LPC16:0 se bilatéralise. Dans notre modèle, l'allodynie ne se propage pas controlatéralement et persiste uniquement du côté ipsilatéral, et ce, pendant toute la durée du protocole (environ 1 mois). En accord avec cette observation, nous n'avons d'ailleurs pas observé de sensibilisation centrale des neurones spinaux controlatéraux. Contrairement à ces modèles inflammatoires ou induits par injections d'une solution acide, notre modèle de douleur articulaire induit par injections de LPC16:0 n'induit qu'une sensibilisation unilatérale associée au développement d'allodynie secondaire, en tout cas au niveau articulaire. Il aurait été intéressant de savoir si les injections intramusculaires de LPC16:0 dans le modèle de Hung et al. induisent ou non une sensibilisation centrale et une bilatéralisation de l'allodynie, mais cela n'est pas décrit dans leur article.

Outre une sensibilisation spinale, l'activité de régions supraspinales, notamment du tronc cérébral, contribue également au développement et au maintien d'allodynies/hyperalgies

secondaires, et sont probablement à l'origine de la propagation controlatérale des douleurs (Urban et al., 1999; Urban et Gebhart, 1999; Porreca et al., 2002; Sluka et al., 2003). Dans notre modèle, la LPC16:0 ne participe pas au développement de douleurs controlatérales, et les raisons de cette différence avec d'autres modèles de douleurs bilatérales, ainsi que la contribution éventuelle de ces structures supraspinales demeurent encore inconnues.

L'ensemble de ces données montrent dans différents contextes de douleurs persistantes, des phénomènes de sensibilisation spinale, et suggèrent l'implication de structures supraspinales. Au sein de ces structures, il semble exister des mécanismes différents qui restent encore à élucider, dont certains seraient à l'origine du développement d'allodynies/hyperalgies secondaires unilatérales et/ou bilatérales.

# CONCLUSION GENERALE

Une des premières causes de consultation médicale, les douleurs chroniques sont un problème majeur de santé publique. Les troubles musculosquelettiques sont souvent associées à des douleurs chroniques invalidantes, qui demeurent difficiles à soulager par les traitements disponibles sur le marché, et qui nécessitent de nouvelles approches thérapeutiques.

Notre étude montre une augmentation des taux de LPC16:0 dans les liquides synoviaux de patients issus de deux cohortes indépendantes souffrant de différentes pathologies articulaires douloureuses. Ces taux élevés de LPC16:0 sont corrélés aux niveaux de douleur de patients atteints d'OA, mais ce lipide ne semble pas être un marqueur d'une pathologie articulaire spécifique. Cependant, la LPC16:0 pourrait être un biomarqueur de douleurs chroniques associées à différentes étiologies, mais des données supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

Des injections intra-articulaires de LPC16:0 chez la souris induisent sans dimorphisme sexuel des douleurs chroniques qui sont associées à des comportements anxieux et une sensibilisation centrale. Ces comportements douloureux et anxieux sont dépendants de la présence d'ASIC3, canal ionique exprimé dans les neurones sensoriels périphériques et impliqué dans la nociception. La LPC16:0 potentialise fortement les courants ASIC3 en système hétérologue, active un courant ASIC3 soutenu dans les neurones de DRG, et induit une dépolarisation constitutive sensibilisant ces neurones. Ainsi, il semblerait que les injections intra-articulaires de LPC16:0, via les canaux ASIC3 des neurones sensoriels innervant l'articulation, initient la mise en place de mécanismes conduisant au développement de douleurs persistantes.

Mes travaux de thèse ont permis d'établir un nouveau modèle de douleur articulaire chronique basé sur des données cliniques, et identifient la LPC16:0 comme un facteur déclenchant de douleurs articulaires chroniques via les canaux ASIC3 chez la souris, et possiblement chez l'humain. Ces données murines et cliniques, font de la LPC16:0 et des canaux ASIC3 des cibles d'intérêt dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soulager les douleurs chroniques d'origine articulaire.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmad, S., Dahllund, L., Eriksson, A.B., Hellgren, D., Karlsson, U., Lund, P.-E., Meijer, I.A., Meury, L., Mills, T., Moody, A., et al. (2007). A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2114-2121.
- Akopian, A.N., Chen, C.C., Ding, Y., Cesare, P., et Wood, J.N. (2000). A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* *11*, 2217-2222.
- Albuisson, J., Murthy, S.E., Bandell, M., Coste, B., Louis-Dit-Picard, H., Mathur, J., Fénéant-Thibault, M., Tertian, G., de Jaureguiberry, J.-P., Syfuss, P.-Y., et al. (2013). Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat. Commun.* *4*, 1884.
- Alcaix, D.D. (2012). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *9*, 9.
- Allen, N.J., et Attwell, D. (2002). Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J. Physiol.* *543*, 521-529.
- Alloui, A., Chassaing, C., Schmidt, J., Ardid, D., Dubray, C., Cloarec, A., et Eschalier, A. (2002). Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *443*, 71-77.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* *25*, 2368-2376.
- Altman, R.D., et Barthel, H.R. (2011). Topical therapies for osteoarthritis. *Drugs* *71*, 1259-1279.
- Alvarez de la Rosa, D., Krueger, S.R., Kolar, A., Shao, D., Fitzsimonds, R.M., et Canessa, C.M. (2003). Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J. Physiol.* *546*, 77-87.
- Anderson, B.J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr. Anaesth.* *18*, 915-921.
- Andersson, D.A., Nash, M., et Bevan, S. (2007). Modulation of the Cold-Activated Channel TRPM8 by Lysophospholipids and Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Neurosci.* *27*, 3347-3355.

Arnadóttir, J., et Chalfie, M. (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 111-137.

Askwith, C.C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M.P., et Welsh, M.J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26, 133-141.

Askwith, C.C., Wemmie, J.A., Price, M.P., Rokhlina, T., et Welsh, M.J. (2004). Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H<sup>+</sup>-activated currents in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 18296-18305.

Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., et Priestley, J.V. (1995). Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1484-1494.

Aziz, Q., Giamberardino, M.A., Barke, A., Korwisi, B., Baranowski, A.P., Wesselmann, U., Rief, W., Treede, R.-D., et Pain, T.I.T. for the C. of C. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary visceral pain. *PAIN* 160, 69-76.

Babini, E., Paukert, M., Geisler, H.-S., et Grunder, S. (2002). Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J. Biol. Chem.* 277, 41597-41603.

Babinski, K., Lê, K.T., et Séguéla, P. (1999). Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J. Neurochem.* 72, 51-57.

Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G., et Séguéla, P. (2000). Mammalian ASIC2a and ASIC3 Subunits Co-assemble into Heteromeric Proton-gated Channels Sensitive to Gd<sup>3+</sup>\*. *J. Biol. Chem.* 275, 28519-28525.

Bae, C., Gnanasambandam, R., Nicolai, C., Sachs, F., et Gottlieb, P.A. (2013). Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1162-E1168.

Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., et Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849-857.



Bang, H., Kim, Y., et Kim, D. (2000). TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J. Biol. Chem.* 275, 17412-17419.

Bannwarth, B., Netter, P., Lapicque, F., Gillet, P., Péré, P., Boccard, E., Royer, R.J., et Gaucher, A. (1992). Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous dose of propacetamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34, 79-81.

Baron, A., et Lingueglia, E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* 94, 19-35.

Baron, A., Schaefer, L., Lingueglia, E., Champigny, G., et Lazdunski, M. (2001). Zn<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> are coactivators of acid-sensing ion channels. *J. Biol. Chem.* 276, 35361-35367.

Baron, A., Waldmann, R., et Lazdunski, M. (2002). ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 539, 485-494.

Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., et Lingueglia, E. (2008). Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 1498-1508.

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

Barrière, D.A., Mallet, C., Blomgren, A., Simonsen, C., Daulhac, L., Libert, F., Chapuy, E., Etienne, M., Högestätt, E.D., Zygmunt, P.M., et al. (2013). Fatty acid amide hydrolase-dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. *PLoS One* 8, e70690.

Barrière, D.A., Boumezbeur, F., Dalmann, R., Cadeddu, R., Richard, D., Pinguet, J., Daulhac, L., Sarret, P., Whittingstall, K., Keller, M., et al. (2020). Paracetamol is a centrally acting analgesic using mechanisms located in the periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* 177, 1773-1792.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., et Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267-284.

Bassilana, F., Champigny, G., Waldmann, R., de Weille, J.R., Heurteaux, C., et Lazdunski, M. (1997). The Acid-sensitive Ionic Channel Subunit ASIC and the Mammalian Degenerin MDEG

Form a Heteromultimeric H<sup>+</sup>-gated Na<sup>+</sup> Channel with Novel Properties\*. *J. Biol. Chem.* 272, 28819-28822.

Bässler, E.L., Ngo-Anh, T.J., Geisler, H.S., Ruppertsberg, J.P., et Gründer, S. (2001). Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J. Biol. Chem.* 276, 33782-33787.

Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., et Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.

Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.-E., et Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.

Beery, A.K., et Zucker, I. (2011). Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 565-572.

Bennett, M.I., Kaasa, S., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., Treede, R.-D., et IASP Taskforce for the Classification of Chronic Pain (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic cancer-related pain. *Pain* 160, 38-44.

Benoliel, R., Svensson, P., Evers, S., Wang, S.-J., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., Treede, R.-D., et Pain, T.I.T. for the C. of C. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary headache or orofacial pain. *PAIN* 160, 60-68.

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

Berkley, K.J. (1997). Sex differences in pain. *Behav. Brain Sci.* 20, 371-380; discussion 435-513.

Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., et Leone, S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 12, 250-275.

Besson, J.M., et Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* 67, 67-186.

Bevan, S., et Yeats, J. (1991). Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* *433*, 145-161.

Björkman, R. (1995). Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Experimental studies in the rat. Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* *103*, 1-44.

Björkman, R., Hallman, K.M., Hedner, J., Hedner, T., et Henning, M. (1994). Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain* *57*, 259-264.

Blanchard, M.G., Rash, L.D., et Kellenberger, S. (2012). Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 2167-2177.

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

Bonifacio, G., Lelli, C.I.S., et Kellenberger, S. (2014). Protonation controls ASIC1a activity via coordinated movements in multiple domains. *J. Gen. Physiol.* *143*, 105-118.

Bonnefont, J., Courade, J.-P., Alloui, A., et Eschalier, A. (2003). [Antinociceptive mechanism of action of paracetamol]. *Drugs* *63 Spec No 2*, 1-4.

Booth, I.R., Edwards, M.D., Black, S., Schumann, U., et Miller, S. (2007). Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 431-440.

Bouchama, A., et Knochel, J.P. (2002). Heat stroke. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1978-1988.

Boutaud, O., Aronoff, D.M., Richardson, J.H., Marnett, L.J., et Oates, J.A. (2002). Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7130-7135.

Brohawn, S.G., del Marmol, J., et MacKinnon, R. (2012). Crystal Structure of the Human K2P TRAAK, a Lipid- and Mechano-Sensitive K+ Ion Channel. *Science* *335*, 436-441.

Brohawn, S.G., Su, Z., et MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 3614-3619.

Bron, R., Wood, R.J., Brock, J.A., et Ivanusic, J.J. (2014). Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J. Comp. Neurol.* *522*, 2967-2979.

Brown, D.J.A., Brugger, H., Boyd, J., et Paal, P. (2012). Accidental Hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1930-1938.

Brumovsky, P., Villar, M.J., et Hökfelt, T. (2006). Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Exp. Neurol.* 200, 153-165.

Bujalska, M. (2004). Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 605-610.

Cain, D.M., Khasabov, S.G., et Simone, D.A. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J. Neurophysiol.* 85, 1561-1574.

Cashman, J.N. (1996). The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. *Drugs* 52, 13-23.

Catarsi, S., Babinski, K., et Séguéla, P. (2001). Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF. *Neuropharmacology* 41, 592-600.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., et Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

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

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

Chalfie, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 44-52.

Chalfie, M., et Sulston, J. (1981). Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 82, 358-370.

Chen, C.C., England, S., Akopian, A.N., et Wood, J.N. (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10240-10245.

Chen, C.-C., Zimmer, A., Sun, W.-H., Hall, J., Brownstein, M.J., et Zimmer, A. (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8992-8997.

Chen, X., Kalbacher, H., et Gründer, S. (2005). The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H<sup>+</sup> affinity. *J. Gen. Physiol.* *126*, 71-79.

Chen, X., Kalbacher, H., et Gründer, S. (2006a). Interaction of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 1 with the Tarantula Toxin Psalmotoxin 1 is State Dependent. *J. Gen. Physiol.* *127*, 267-276.

Chen, X., Paukert, M., Kadurin, I., Pusch, M., et Gründer, S. (2006b). Strong modulation by RFamide neuropeptides of the ASIC1b/3 heteromer in competition with extracellular calcium. *Neuropharmacology* *50*, 964-974.

Chen, Y.-J., Deng, S.-M., Chen, H.-W., Tsao, C.-H., Chen, W.-T., Cheng, S.-J., Huang, H.-S., Tan, B.C.-M., Matzuk, M.M., Flint, J., et al. (2021). Follistatin mediates learning and synaptic plasticity via regulation of *Asic4* expression in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *118*, e2109040118.

Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., et al. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat. Neurosci.* *15*, 1015-1021.

Choi, J., Zhang, W., Gu, X., Chen, X., Hong, L., Laird, J.M., et Salomon, R.G. (2011). Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 111-118.

Christensen, A.P., et Corey, D.P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 510-521.

Chu, X.-P., Wemmie, J.A., Wang, W.-Z., Zhu, X.-M., Saugstad, J.A., Price, M.P., Simon, R.P., et Xiong, Z.-G. (2004). Subunit-Dependent High-Affinity Zinc Inhibition of Acid-Sensing Ion Channels. *J. Neurosci.* *24*, 8678-8689.

Clarke, K.A., Heitmeyer, S.A., Smith, A.G., et Taiwo, Y.O. (1997). Gait analysis in a rat model of osteoarthritis. *Physiol. Behav.* *62*, 951-954.

Coderre, T.J., Katz, J., Vaccarino, A.L., et Melzack, R. (1993). Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* *52*, 259-285.

Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S., et Zilberberg, N. (2008). A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J. Biol. Chem.* *283*, 19448-19455.

Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., et Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* *54*, 379-386.

Combe, R., Bramwell, S., et Field, M.J. (2004). The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett.* *370*, 236-240.

Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., et Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science* *330*, 55-60.

Coste, B., Murthy, S.E., Mathur, J., Schmidt, M., Mechioukhi, Y., Delmas, P., et Patapoutian, A. (2015). Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nat. Commun.* *6*.

Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* *444*, 894-898.

Dalman, R., Daulhac, L., Antri, M., Eschalier, A., et Mallet, C. (2015). Supra-spinal FAAH is required for the analgesic action of paracetamol in an inflammatory context. *Neuropharmacology* *91*, 63-70.

Dance, A. (2019). Why the sexes don't feel pain the same way. *Nature* *567*, 448-450.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* *405*, 183-187.

Delfini, M.-C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., François, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TFAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep.* *5*, 378-388.

Deval, E., Baron, A., Lingueglia, E., Mazarguil, H., Zajac, J.-M., et Lazdunski, M. (2003). Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* *44*, 662-671.

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

Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., et Lingueglia, E. (2010). Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacol. Ther.* *128*, 549-558.

Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., et Lingueglia, E. (2011). Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain. *J. Neurosci.* *31*, 6059-6066.

Devereaux, A.L., Mercer, S.L., et Cunningham, C.W. (2018). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. *ACS Chem. Neurosci.* *9*, 2395-2407.

Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., et Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* *54*, 371-378.

Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., et Patapoutian, A. (2008). Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections. *J. Neurosci.* *28*, 566-575.

Dinakar, P., et Stillman, A.M. (2016). Pathogenesis of Pain. *Semin. Pediatr. Neurol.* *23*, 201-208.

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

Diochot, S., Salinas, M., Baron, A., Escoubas, P., et Lazdunski, M. (2007). Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *49*, 271-284.

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

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

Dionne, R.A. (1999). Additive analgesic effects of oxycodone and ibuprofen in the oral surgery model. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 57, 673-678.

Djoughri, L., et 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.

Dossier de presse, Inserm (2016). 1 Français sur 2 souffre de douleurs articulaires.

Drew, L.J., Rohrer, D.K., Price, M.P., Blaver, K.E., Cockayne, D.A., Cesare, P., et Wood, J.N. (2004). Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J. Physiol.* 556, 691-710.

Du, J., Reznikov, L.R., et Welsh, M.J. (2014). Expression and activity of acid-sensing ion channels in the mouse anterior pituitary. *PloS One* 9, e115310.

Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., et Xu, T.-L. (2007). Upregulation of Acid-Sensing Ion Channel ASIC1a in Spinal Dorsal Horn Neurons Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J. Neurosci.* 27, 11139-11148.

Dubin, A.E., et Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760-3772.

Dubin, A.E., Schmidt, M., Mathur, J., Petrus, M.J., Xiao, B., Coste, B., et Patapoutian, A. (2012). Inflammatory signals enhance piezo2-mediated mechanosensitive currents. *Cell Rep.* 2, 511-517.

Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., et al. (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237-251.

Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Torres, J.M., Bee, L., Dickenson, A.H., Gringhuis, M., Minett, M.S., Hong, G.S., Lee, E., Oh, U., et al. (2013). A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nat. Commun.* 4, 1682.



Emery, E.C., et Ernfors, P. (2018). Dorsal Root Ganglion Neuron Types and Their Functional Specialization.

Enyedi, P., et Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K<sup>+</sup> Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol. Rev.* *90*, 559-605.

Ernstrom, G.G., et Chalfie, M. (2002). Genetics of sensory mechanotransduction. *Annu. Rev. Genet.* *36*, 411-453.

Escoubas, P., De Welle, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., et Lazdunski, M. (2000). Isolation of a Tarantula Toxin Specific for a Class of Proton-gated Na<sup>+</sup> Channels\*. *J. Biol. Chem.* *275*, 25116-25121.

Faucherre, A., Nargeot, J., Mangoni, M.E., et Jopling, C. (2013). *piezo2b* Regulates Vertebrate Light Touch Response. *J. Neurosci.* *33*, 17089-17094.

Feng, Z., Smith, D.L., Ellis McKenzie, F., et Levin, S.A. (2004). Coupling ecology and evolution: malaria and the S-gene across time scales. *Math. Biosci.* *189*, 1-19.

Fields, H. (1990). Pain syndromes in neurology. p.

Fields, H.L. (1987). Pain (McGraw-Hill Book Company).

Fillingim, R.B., King, C.D., Ribeiro-Dasilva, M.C., Rahim-Williams, B., et Riley, J.L. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J. Pain* *10*, 447-485.

Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., et Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* *17*, 3297-3308.

Flemming, P.K., Dedman, A.M., Xu, S.-Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C.D., Bateson, A.N., Muraki, K., et Beech, D.J. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J. Biol. Chem.* *281*, 4977-4982.

Flower, R.J., et Vane, J.R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* *240*, 410-411.

François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noël, J., Wood, J.N., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep.* *10*, 370-382.

Frelin, C., Barbry, P., Vigne, P., Chassande, O., Cragoe, E.J., et Lazdunski, M. (1988). Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na<sup>+</sup> transport via the Na<sup>+</sup> channel, the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biochimie* 70, 1285-1290.

García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., et Corey, D.P. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1459-1464.

García-Añoveros, J., Samad, T.A., Žuvella-Jelaska, L., Woolf, C.J., et Corey, D.P. (2001). Transport and Localization of the DEG/ENaC Ion Channel BNaC1 $\alpha$  to Peripheral Mechanosensory Terminals of Dorsal Root Ganglia Neurons. *J. Neurosci.* 21, 2678-2686.

Gardner, E.P., et Johnson, K.O. (2014). The Somatosensory System: Receptors and Central Pathways. In *Principles of Neural Science*, (New York, NY: McGraw-Hill Education), p.

Gasser, H.S. (1941). The classification of nerve fibers. *Ohio J. Sci.* 41, 145-159.

Gatchel, R.J., et Okifuji, A. (2006). Evidence-Based Scientific Data Documenting the Treatment and Cost-Effectiveness of Comprehensive Pain Programs for Chronic Nonmalignant Pain. *J. Pain* 7, 779-793.

Gautam, M., et Benson, C.J. (2013). Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *FASEB J.* 27, 793-802.

Gentry, C., Stoakley, N., Andersson, D.A., et Bevan, S. (2010). The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol. Pain* 6, 4.

Ghelardini, C., Di Cesare Mannelli, L., et Bianchi, E. (2015). The pharmacological basis of opioids. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 12, 219-221.

Gitterman, D., Wilson, J., et Randall, A. (2005). Functional properties and pharmacological inhibition of ASIC channels in the human SJ-RH30 skeletal muscle cell line. *J. Physiol.* 562, 759-769.

Goldberg, Y.P., MacFarlane, J., MacDonald, M.L., Thompson, J., Dube, M.-P., Mattice, M., Fraser, R., Young, C., Hossain, S., Pape, T., et al. (2007). Loss-of-function mutations in the

Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin. Genet.* *71*, 311-319.

Goldenberg, D.L., Burckhardt, C., et Crofford, L. (2004). Management of fibromyalgia syndrome. *JAMA* *292*, 2388-2395.

Goldring, M.B. (2000). Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* *2*, 459-465.

Gonzales, E.B., Kawate, T., et Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* *460*, 599-604.

Gottschalk, A., et Smith, D.S. (2001). New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia. *Am. Fam. Physician* *63*, 1979-1984.

Graham, G.G., et Scott, K.F. (2005). Mechanism of action of paracetamol. *Am. J. Ther.* *12*, 46-55.

Grape, S., Schug, S.A., Lauer, S., et Schug, B.S. (2010). Formulations of Fentanyl for the Management of Pain. *Drugs* *70*, 57-72.

Green, G.A. (2001). Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2. *Clin. Cornerstone* *3*, 50-60.

Gründer, S., et Chen, X. (2010). Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* *2*, 73-94.

Gründer, S., Geissler, H.S., Bässler, E.L., et Ruppersberg, J.P. (2000). A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* *11*, 1607-1611.

Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., et Gillet, P. (1997). Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* *40*, 1670-1679.

Güler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., et Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 6408-6414.

Gunthorpe, M.J., Smith, G.D., Davis, J.B., et Randall, A.D. (2001). Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* *442*, 668-674.

Gupta, S., McCarson, K.E., Welch, K.M.A., et Berman, N.E.J. (2011). Mechanisms of pain modulation by sex hormones in migraine. *Headache* 51, 905-922.

Häse, C.C., Le Dain, A.C., et Martinac, B. (1995). Purification and Functional Reconstitution of the Recombinant Large Mechanosensitive Ion Channel (MscL) of *Escherichia coli*\*. *J. Biol. Chem.* 270, 18329-18334.

Hedrick, P. (2004). Estimation of relative fitnesses from relative risk data and the predicted future of haemoglobin alleles S and C. *J. Evol. Biol.* 17, 221-224.

Hesselager, M., Timmermann, D.B., et Ahring, P.K. (2004). pH Dependency and Desensitization Kinetics of Heterologously Expressed Combinations of Acid-sensing Ion Channel Subunits \*. *J. Biol. Chem.* 279, 11006-11015.

Hinz, B., Cheremina, O., et Brune, K. (2008). Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 383-390.

Högestätt, E.D., Jönsson, B.A.G., Ermund, A., Andersson, D.A., Björk, H., Alexander, J.P., Cravatt, B.F., Basbaum, A.I., et Zygmunt, P.M. (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* 280, 31405-31412.

Hoheisel, U., Reinöhl, J., Unger, T., et Mense, S. (2004). Acidic pH and capsaicin activate mechanosensitive group IV muscle receptors in the rat. *Pain* 110, 149-157.

Hökfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G., et Pernow, B. (1975). Substance P: Localization in the Central Nervous System and in Some Primary Sensory Neurons. *Science* 190, 889-890.

Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G., et Arimura, A. (1976). Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1, 131-136.

Hsieh, W.-S., Kung, C.-C., Huang, S.-L., Lin, S.-C., et Sun, W.-H. (2017). TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* 7, 8870.

Huang, S.M., Li, X., Yu, Y., Wang, J., et Caterina, M.J. (2011). TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol. Pain* 7, 37.

Hung, C.-H., Lee, C.-H., Tsai, M.-H., Chen, C.-H., Lin, H.-F., Hsu, C.-Y., Lai, C.-L., et Chen, C.-C. (2020). Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Ann. Rheum. Dis.* *79*, 1644-1656.

Hunter, D.J., et Felson, D.T. (2006). Osteoarthritis. *BMJ* *332*, 639-642.

Hylands-White, N., Duarte, R.V., et Raphael, J.H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatol. Int.* *37*, 29-42.

Hyson, J.M. (2001). Man and pain: eternal partners. *J. Hist. Dent.* *49*, 115-121.

Ikeda, R., Cha, M., Ling, J., Jia, Z., Coyle, D., et Gu, J.G. (2014). Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive A $\beta$ -afferent impulses. *Cell* *157*, 664-675.

Ikeuchi, M., Kolker, S.J., Burnes, L.A., Walder, R.Y., et Sluka, K.A. (2008). Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* *137*, 662-669.

Ikeuchi, M., Kolker, S.J., et Sluka, K.A. (2009). Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *J. Pain* *10*, 336-342.

Immke, D.C., et McCleskey, E.W. (2003). Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca<sup>2+</sup> blockade. *Neuron* *37*, 75-84.

Izumi, M., Ikeuchi, M., Ji, Q., et Tani, T. (2012). Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J. Biomed. Sci.* *19*, 77.

Jahr, H., van Driel, M., van Osch, G.J.V.M., Weinans, H., et van Leeuwen, J.P.T.M. (2005). Identification of acid-sensing ion channels in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *337*, 349-354.

Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., et Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* *449*, 316-323.

Jensen, J.E., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., Rosengren, K.J., Lau, C.H.Y., Mobli, M., Brust, A., Alewood, P.F., King, G.F., et Rash, L.D. (2014). Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores. *J. Med. Chem.* *57*, 9195-9203.

- Jiang, Q., Papasian, C.J., Wang, J.Q., Xiong, Z.G., et Chu, X.P. (2010). Inhibitory regulation of acid-sensing ion channel 3 by zinc. *Neuroscience* 169, 574-583.
- Jin, P., Jan, L.Y., et Jan, Y.-N. (2020). Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 43, 207-229.
- Joeres, N., Augustinowski, K., Neuhof, A., Assmann, M., et Gründer, S. (2016). Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1. *Sci. Rep.* 6, 27647.
- Jones, N.G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., et McMahon, S.B. (2004). Acid-induced pain and its modulation in humans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10974-10979.
- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., et Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260-265.
- Jóźwiak-Bebenista, M., et Nowak, J.Z. (2014). Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol. Pharm.* 71, 11-23.
- Kalbhen, D.A. (1987). Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J. Rheumatol.* 14 *Spec No*, 130-131.
- Kambrun, C., Roca-Lapirot, O., Salio, C., Landry, M., Moqrich, A., et Le Feuvre, Y. (2018). TAF4A Reverses Mechanical Allodynia through Activation of GABAergic Transmission and Microglial Process Retraction. *Cell Rep.* 22, 2886-2897.
- Kanaya, K., Iba, K., Dohke, T., Okazaki, S., et Yamashita, T. (2016). TRPV1, ASICs and P2X2/3 expressed in bone cells simultaneously regulate bone metabolic markers in ovariectomized mice. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 16, 145-151.
- Kang, D., Choe, C., et Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* 564, 103-116.
- Karabina, S.-A., et Ninio, E. (2006). Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise? *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1351-1358.
- Karabina, S.A., Elisaf, M., Bairaktari, E., Tzallas, C., Siamopoulos, K.C., et Tselepis, A.D. (1997). Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein

subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 595-602.

Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., et Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1273-1278.

Karczewski, J., Spencer, R.H., Garsky, V.M., Liang, A., Leitl, M.D., Cato, M.J., Cook, S.P., Kane, S., et Urban, M.O. (2010). Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br. J. Pharmacol.* 161, 950-960.

Kerckhove, N., Mallet, C., François, A., Boudes, M., Chemin, J., Voets, T., Bourinet, E., Alloui, A., et Eschalier, A. (2014). Ca(v)3.2 calcium channels: the key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *Pain* 155, 764-772.

Kim, S.E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B., et Patapoutian, A. (2012). The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature* 483, 209-212.

Kim, S.J., Calejesan, A.A., Li, P., Wei, F., et Zhuo, M. (1999). Sex differences in late behavioral response to subcutaneous formalin injection in mice. *Brain Res.* 829, 185-189.

Kim, Y., Gnatenco, C., Bang, H., et Kim, D. (2001). Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflugers Arch.* 442, 952-960.

Knowlton, W.M., Bifolck-Fisher, A., Bautista, D.M., et McKemy, D.D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150, 340-350.

Knowlton, W.M., Palkar, R., Lippoldt, E.K., McCoy, D.D., Baluch, F., Chen, J., et McKemy, D.D. (2013). A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2837-2848.

Kolker, S.J., Walder, R.Y., Usachev, Y., Hillman, J., Boyle, D.L., Firestein, G.S., et Sluka, K.A. (2010). Acid-sensing ion channel 3 expressed in type B synoviocytes and chondrocytes modulates hyaluronan expression and release. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 903-909.

- Korkushko, A.O., et Kryshtal, O.A. (1984). [Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations]. *Neirofiziologija Neurophysiol.* *16*, 557-561.
- Kosek, E., Finn, A., Ultenius, C., Hugo, A., Svensson, C., et Ahmed, A.S. (2018). Differences in neuroimmune signalling between male and female patients suffering from knee osteoarthritis. *J. Neuroimmunol.* *321*, 49-60.
- Kosinska, M.K., Liebisch, G., Lochnit, G., Wilhelm, J., Klein, H., Kaesser, U., Lasczkowski, G., Rickert, M., Schmitz, G., et Steinmeyer, J. (2013). A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* *65*, 2323-2333.
- Kosinska, M.K., Mastbergen, S.C., Liebisch, G., Wilhelm, J., Dettmeyer, R.B., Ishaque, B., Rickert, M., Schmitz, G., Lafeber, F.P., et Steinmeyer, J. (2016). Comparative lipidomic analysis of synovial fluid in human and canine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *24*, 1470-1478.
- van der Kraan, P.M., Vitters, E.L., van de Putte, L.B., et van den Berg, W.B. (1989). Development of osteoarthritic lesions in mice by « metabolic » and « mechanical » alterations in the knee joints. *Am. J. Pathol.* *135*, 1001-1014.
- Krämer, H.H., Lundblad, L., Birklein, F., Linde, M., Karlsson, T., Elam, M., et Olausson, H. (2007). Activation of the cortical pain network by soft tactile stimulation after injection of sumatriptan. *Pain* *133*, 72-78.
- Krishtal, O.A., et Pidoplichko, V.I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* *5*, 2325-2327.
- Krishtal, O.A., et Pidoplichko, V.I. (1981a). Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Res.* *214*, 150-154.
- Krishtal, O.A., et Pidoplichko, V.I. (1981b). A « receptor » for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neurosci. Lett.* *24*, 243-246.
- Krishtal, O.A., et Pidoplichko, V.I. (1981c). A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* *6*, 2599-2601.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* *436*, 647-654.



Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., et Corey, D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277-289.

Law, P.Y., Wong, Y.H., et Loh, H.H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 389-430.

Lawson, S.N. (1979). The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J. Neurocytol.* 8, 275-294.

Lawson, S.N., et Waddell, P.J. (1991). Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J. Physiol.* 435, 41-63.

Lawson, S.N., Fang, X., et Djouhri, L. (2019). Nociceptor subtypes and their incidence in rat lumbar dorsal root ganglia (DRGs): focussing on C-polymodal nociceptors, A $\beta$ -nociceptors, moderate pressure receptors and their receptive field depths. *Curr. Opin. Physiol.* 11, 125-146.

Le Bars, D., et Willer, J.-C. (2004). Physiologie de la douleur. *EMC - Anesth.-Réanimation* 1, 227-266.

Ledford, H., et Callaway, E. (2021). Medicine Nobel goes to scientists who discovered biology of senses. *Nature* 598, 246-246.

Lee, C.-H., et Chen, C.-C. (2018). Roles of ASICs in Nociception and Proprioception. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1099, 37-47.

Lee, B., Cho, H., Jung, J., Yang, Y.D., Yang, D.-J., et Oh, U. (2014). Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol. Pain* 10, 5.

Lee, C.-Y., Huang, T.-J., Wu, M.-H., Li, Y.-Y., et Lee, K.-D. (2019). High Expression of Acid-Sensing Ion Channel 2 (ASIC2) in Bone Cells in Osteoporotic Vertebral Fractures. *BioMed Res. Int.* 2019, 4714279.

Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., et Caterina, M.J. (2005). Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1304-1310.

Leistad, L., Feuerherm, A.J., Faxvaag, A., et Johansen, B. (2011). Multiple phospholipase A2 enzymes participate in the inflammatory process in osteoarthritic cartilage. *Scand. J. Rheumatol.* *40*, 308-316.

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., et Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J.* *15*, 1004-1011.

Li, J., Hou, B., Tumova, S., Muraki, K., Bruns, A., Ludlow, M.J., Sedo, A., Hyman, A.J., McKeown, L., Young, R.S., et al. (2014). Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature* *515*, 279-282.

Li, L., Fan, X., Warner, M., Xu, X.-J., Gustafsson, J.-A., et Wiesenfeld-Hallin, Z. (2009). Ablation of estrogen receptor alpha or beta eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain* *143*, 37-40.

Liljencrantz, J., et Olausson, H. (2014). Tactile C fibers and their contributions to pleasant sensations and to tactile allodynia. *Front. Behav. Neurosci.* *8*.

Lin, S.-H., Cheng, Y.-R., Banks, R.W., Min, M.-Y., Bewick, G.S., et Chen, C.-C. (2016). Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors. *Nat. Commun.* *7*, 11460.

Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J. Biol. Chem.* *282*, 17325-17329.

Lingueglia, E. (2013). ENAC, Degenerins, ASICs, and Related Channels. In *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, éd. (Berlin, Heidelberg: Springer), p. 664-674.

Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., et Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* *378*, 730-733.

Lingueglia, E., Weille, J.R. de, Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., et Lazdunski, M. (1997). A Modulatory Subunit of Acid Sensing Ion Channels in Brain and Dorsal Root Ganglion Cells \*. *J. Biol. Chem.* *272*, 29778-29783.

Linnarsson Lab. <http://mousebrain.org>.

Liu, Y., Hagan, R., et Schoellerman, J. (2018). Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a). *Sci. Rep.* *8*, 7179.

Livshits, G., Zhai, G., Hart, D.J., Kato, B.S., Wang, H., Williams, F.M.K., et Spector, T.D. (2009). Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. *Arthritis Rheum.* *60*, 2037-2045.

Löken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., et Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat. Neurosci.* *12*, 547-548.

Lou, S., Duan, B., Vong, L., Lowell, B.B., et Ma, Q. (2013). Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 870-882.

Ma, S., Cahalan, S., LaMonte, G., Grubaugh, N.D., Zeng, W., Murthy, S.E., Paytas, E., Gamini, R., Lukacs, V., Whitwam, T., et al. (2018). Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell* *173*, 443-455.e12.

Mahdi, J.G. (2010). Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery. *J. Saudi Chem. Soc.* *14*, 317-322.

Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., et Honoré, E. (1999a). TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* *274*, 1381-1387.

Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., et Honoré, E. (1999b). Mechano- or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel\*. *J. Biol. Chem.* *274*, 26691-26696.

Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., et Honoré, E. (2000a). TREK-1 is a heat-activated background K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* *19*, 2483-2491.

Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., et Honoré, E. (2000b). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* *275*, 10128-10133.

Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A.M., Marshall, K.L., Wellnitz, S.A., Firozi, P., Woo, S.-H., Ranade, S., Patapoutian, A., et al. (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* *509*, 617-621.

Maldonado, R. (2010). Le système opioïde endogène et l'addiction aux drogues. *Ann. Pharm. Fr.* *68*, 3-11.

Mallet, C., Daulhac, L., Bonnefont, J., Ledent, C., Etienne, M., Chapuy, E., Libert, F., et Eschalier, A. (2008). Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* *139*, 190-200.

Mallet, C., Barrière, D.A., Ermund, A., Jönsson, B.A.G., Eschalier, A., Zygmunt, P.M., et Högestätt, E.D. (2010). TRPV1 in Brain Is Involved in Acetaminophen-Induced Antinociception. *PLoS ONE* *5*, e12748.

Mallet, C., Eschalier, A., et Daulhac, L. (2017). Paracetamol: Update on its Analgesic Mechanism of Action (IntechOpen).

Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebillé, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J.* *35*, 414-428.

Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A.H., Adler, J., et Kung, C. (1987). Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 2297-2301.

Martini, A., Bondiolotti, G.P., Sacerdote, P., Pierro, L., Picotti, G.B., Panerai, A.E., Restelli, L., Zancaner, F., et Monza, G. (1984). Diclofenac increases beta-endorphin plasma concentrations. *J. Int. Med. Res.* *12*, 92-95.

Martino, F., Perestrelo, A.R., Vinarský, V., Pagliari, S., et Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front. Physiol.* *9*, 824.

Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., et al. (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* *10*, 943-945.

McCormack, K. (1994). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain* *59*, 9-43.

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

Mitra, R., et Jones, S. (2012). Adjuvant analgesics in cancer pain: a review. *Am. J. Hosp. Palliat. Care* 29, 70-79.

Miyamoto, T., Petrus, M.J., Dubin, A.E., et Patapoutian, A. (2011). TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat. Commun.* 2, 369.

Miyamoto, T., Mochizuki, T., Nakagomi, H., Kira, S., Watanabe, M., Takayama, Y., Suzuki, Y., Koizumi, S., Takeda, M., et Tominaga, M. (2014). Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in urothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.* 289, 16565-16575.

Mogil, J.S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 859-866.

Mogil, J.S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 353-365.

Mogil, J.S., et Chanda, M.L. (2005). The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 117, 1-5.

Molliver, D.C., Immke, D.C., Fierro, L., Paré, M., Rice, F.L., et McCleskey, E.W. (2005). ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol. Pain* 1, 35.

Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., et Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472.

Muramatsu, S., Shiraishi, S., Miyano, K., Sudo, Y., Toda, A., Mogi, M., Hara, M., Yokoyama, A., Kawasaki, Y., Taniguchi, M., et al. (2016). Metabolism of AM404 From Acetaminophen at Human Therapeutic Dosages in the Rat Brain. *Anesthesiol. Pain Med.* 6, e32873.

Nicholas, M., Vlaeyen, J.W.S., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Giamberardino, M.A., Goebel, A., et al. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain* 160, 28-37.

Nijs, J., George, S.Z., Clauw, D.J., Fernández-de-las-Peñas, C., Kosek, E., Ickmans, K., Fernández-Carnero, J., Polli, A., Kapreli, E., Huysmans, E., et al. (2021). Central sensitisation in chronic

pain conditions: latest discoveries and their potential for precision medicine. *Lancet Rheumatol.* 3, e383-e392.

Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., et al. (2009). The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28, 1308-1318.

O'Brien, T., et Breivik, H. (2012). The impact of chronic pain-European patients' perspective over 12 months. *Scand. J. Pain* 3, 23-29.

O'Hagan, R., Chalfie, M., et Goodman, M.B. (2005). The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat. Neurosci.* 8, 43-50.

Ottani, A., Leone, S., Sandrini, M., Ferrari, A., et Bertolini, A. (2006). The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 280-281.

Ouellet, M., et Percival, M.D. (2001). Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 273-280.

Paladini, A., et Varrassi, G. (2020). Multimodal Pharmacological Analgesia in Pain Management (IntechOpen).

Palangio, M., Damask, M.J., Morris, E., Doyle, R.T., Jiang, J.G., Landau, C.J., et de Padova, A. (2000). Combination hydrocodone and ibuprofen versus combination codeine and acetaminophen for the treatment of chronic pain. *Clin. Ther.* 22, 879-892.

Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., et Caterina, M.J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 11425-11436.

Patel, A.J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., et Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 17, 4283-4290.

Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., et Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat. Neurosci.* 2, 422-426.

Paukert, M., Babini, E., Pusch, M., et Gründer, S. (2004). Identification of the Ca<sup>2+</sup> blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J. Gen. Physiol.* *124*, 383-394.

Paukert, M., Chen, X., Polleichtner, G., Schindelin, H., et Gründer, S. (2008). Candidate amino acids involved in H<sup>+</sup> gating of acid-sensing ion channel 1a. *J. Biol. Chem.* *283*, 572-581.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* *108*, 705-715.

Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., et McIntyre, P. (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* *296*, 2046-2049.

Peigneur, S., Béress, L., Möller, C., Marí, F., Forssmann, W.-G., et Tytgat, J. (2012). A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J.* *26*, 5141-5151.

Pelletier, J.-P., Raynauld, J.-P., Caron, J., Mineau, F., Abram, F., Dorais, M., Haraoui, B., Choquette, D., et Martel-Pelletier, J. (2010). Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 2095-2101.

Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., et al. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* *155*, 2534-2544.

Pergolizzi, J., Aloisi, A.M., Dahan, A., Filitz, J., Langford, R., Likar, R., Mercadante, S., Morlion, B., Raffa, R.B., Sabatowski, R., et al. (2010). Current knowledge of buprenorphine and its unique pharmacological profile. *Pain Pract. Off. J. World Inst. Pain* *10*, 428-450.

Perrot, S., Cohen, M., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., Treede, R.-D., et IASP Taskforce for the Classification of Chronic Pain (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary musculoskeletal pain. *Pain* *160*, 77-82.

Peyronnet, R., Martins, J.R., Duprat, F., Demolombe, S., Arhatte, M., Jodar, M., Tauc, M., Durantou, C., Paulais, M., Teulon, J., et al. (2013). Piezo1-dependent stretch-activated channels are inhibited by Polycystin-2 in renal tubular epithelial cells. *EMBO Rep.* *14*, 1143-1148.

Pickering, G., Lorient, M.-A., Libert, F., Eschalier, A., Beaune, P., et Dubray, C. (2006). Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin. Pharmacol. Ther.* *79*, 371-378.

Pickering, G., Estève, V., Lorient, M.-A., Eschalier, A., et Dubray, C. (2008). Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin. Pharmacol. Ther.* *84*, 47-51.

Piletta, P., Porchet, H.C., et Dayer, P. (1991). Central analgesic effect of acetaminophen but not of aspirin. *Clin. Pharmacol. Ther.* *49*, 350-354.

Pini, L.A., Sandrini, M., et Vitale, G. (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* *308*, 31-40.

Pogorzala, L.A., Mishra, S.K., et Hoon, M.A. (2013). The Cellular Code for Mammalian Thermosensation. *J. Neurosci.* *33*, 5533-5541.

Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I., et Kellenberger, S. (2006). Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J. Physiol.* *576*, 215.

Porreca, F., Ossipov, M.H., et Gebhart, G.F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* *25*, 319-325.

Price, M.P., Snyder, P.M., et Welsh, M.J. (1996). Cloning and expression of a novel human brain Na<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* *271*, 7879-7882.

Price, M.P., Lewin, G.R., McIlwrath, S.L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Mannsfeldt, A.G., Brennan, T.J., Drummond, H.A., et al. (2000). The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* *407*, 1007-1011.

Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., et Welsh, M.J. (2001). The DRASIC Cation Channel Contributes to the Detection of Cutaneous Touch and Acid Stimuli in Mice. *Neuron* *32*, 1071-1083.



Price, M.P., Gong, H., Parsons, M.G., Kundert, J.R., Reznikov, L.R., Bernardinelli, L., Chaloner, K., Buchanan, G.F., Wemmie, J.A., Richerson, G.B., et al. (2014). Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli. *Genes Brain Behav.* *13*, 179-194.

Pruzanski, W., et Vadas, P. (1991). Phospholipase A2--a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol. Today* *12*, 143-146.

Qu, Z.-W., Liu, T.-T., Ren, C., Gan, X., Qiu, C.-Y., Ren, P., Rao, Z., et Hu, W.-P. (2015). 17 $\beta$ -Estradiol Enhances ASIC Activity in Primary Sensory Neurons to Produce Sex Difference in Acidosis-Induced Nociception. *Endocrinology* *156*, 4660-4671.

Radhakrishnan, R., Moore, S.A., et Sluka, K.A. (2003). Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* *104*, 567-577.

Raffa, R.B. (2001). Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J. Clin. Pharm. Ther.* *26*, 257-264.

Raja, S.N., Meyer, R.A., et Campbell, J.N. (1988). Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* *68*, 571-590.

Ranade, S.S., Qiu, Z., Woo, S.-H., Hur, S.S., Murthy, S.E., Cahalan, S.M., Xu, J., Mathur, J., Bandell, M., Coste, B., et al. (2014). Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 10347-10352.

Ranade, S.S., Syeda, R., et Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* *87*, 1162-1179.

Ren, P., Wang, W.-B., Pan, H.-H., Qiu, C.-Y., et Hu, W.-P. (2018). Up-regulation of ASIC3 expression by  $\beta$ -estradiol. *Neurosci. Lett.* *684*, 200-204.

Ruau, D., Liu, L.Y., Clark, J.D., Angst, M.S., et Butte, A.J. (2012). Sex differences in reported pain across 11,000 patients captured in electronic medical records. *J. Pain* *13*, 228-234.

Sabatowski, R., Schäfer, D., Kasper, S.M., Brunsch, H., et Radbruch, L. (2004). Pain treatment: a historical overview. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 701-716.

Sadler, K.E., Moehring, F., Shiers, S.I., Laskowski, L.J., Mikesell, A.R., Plautz, Z.R., Brezinski, A.N., Mecca, C.M., Dussor, G., Price, T.J., et al. (2021). Transient receptor potential canonical 5

mediates inflammatory mechanical and spontaneous pain in mice. *Sci. Transl. Med.* *13*, eabd7702.

Sagar, D.R., Ashraf, S., Xu, L., Burston, J.J., Menhinick, M.R., Poulter, C.L., Bennett, A.J., Walsh, D.A., et Chapman, V. (2014). Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1558-1565.

Salavert, A., Zazzo, A., Martin, L., Antolín, F., Gauthier, C., Thil, F., Tombret, O., Bouby, L., Manen, C., Mineo, M., et al. (2020). Direct dating reveals the early history of opium poppy in western Europe. *Sci. Rep.* *10*, 20263.

Salinas, M., Lazdunski, M., et Lingueglia, E. (2009). Structural Elements for the Generation of Sustained Currents by the Acid Pain Sensor ASIC3\*. *J. Biol. Chem.* *284*, 31851-31859.

Samways, D.S.K., Harkins, A.B., et Egan, T.M. (2009). Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell Calcium* *45*, 319-325.

Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., et Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14628-14633.

Sarikaya, E. (2019). *Functions of Purinergic Receptors* (IntechOpen).

Sawada, Y., Hosokawa, H., Hori, A., Matsumura, K., et Kobayashi, S. (2007). Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res.* *1160*, 39-46.

Sawynok, J., Esser, M.J., et Reid, A.R. (2001). Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci.* *26*, 21-29.

Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjörk, E., et Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 333-341.

Scholz, J., Finnerup, N.B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K.D., et al. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain* *160*, 53-59.

Scholz, N., Monk, K.R., Kittel, R.J., et Langenhan, T. (2016). Adhesion GPCRs as a Putative Class of Metabotropic Mechanosensors. *Handb. Exp. Pharmacol.* *234*, 221-247.

Schug, S.A., Lavand'homme, P., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., Treede, R.-D., et IASP Taskforce for the Classification of Chronic Pain (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic postsurgical or posttraumatic pain. *Pain* 160, 45-52.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., et Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651-655.

Sharma, C.V., et Mehta, V. (2014). Paracetamol: mechanisms and updates. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 14, 153-158.

Sheather-Reid, R.B., et Cohen, M.L. (1998). Efficacy of Analgesics in Chronic Pain: A Series of N-of-1 Studies. *J. Pain Symptom Manage.* 15, 244-252.

Sherwood, T.W., et Askwith, C.C. (2009). Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14371-14380.

Sherwood, T., Franke, R., Conneely, S., Joyner, J., Arumugan, P., et Askwith, C. (2009). Identification of protein domains that control proton and calcium sensitivity of ASIC1a. *J. Biol. Chem.* 284, 27899-27907.

Sherwood, T.W., Lee, K.G., Gormley, M.G., et Askwith, C.C. (2011). Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9723-9734.

Sherwood, T.W., Frey, E.N., et Askwith, C.C. (2012). Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 303, C699-C710.

Shi, S., Luke, C.J., Miedel, M.T., Silverman, G.A., et Kleyman, T.R. (2016). Activation of the *Caenorhabditis elegans* Degenerin Channel by Shear Stress Requires the MEC-10 Subunit\*. *J. Biol. Chem.* 291, 14012-14022.

Skyba, D.A., Radhakrishnan, R., et Sluka, K.A. (2005). Characterization of a method for measuring primary hyperalgesia of deep somatic tissue. *J. Pain* 6, 41-47.

Sluka, K.A., Kalra, A., et Moore, S.A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24, 37-46.

Sluka, K.A., Price, M.P., Breese, N.M., Stucky, C.L., Wemmie, J.A., et Welsh, M.J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106, 229-239.

Sluka, K.A., Radhakrishnan, R., Benson, C.J., Eshcol, J.O., Price, M.P., Babinski, K., Audette, K.M., Yeomans, D.C., et Wilson, S.P. (2007). ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129, 102-112.

Sluka, K.A., Rasmussen, L.A., Edgar, M.M., O'Donnell, J.M., Walder, R.Y., Kolker, S.J., Boyle, D.L., et Firestein, G.S. (2013). Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 65, 1194-1202.

Smith, E.S., Cadiou, H., et McNaughton, P.A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145, 686-698.

Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190.

Srinivasan, P., et Bahnon, B.J. (2010). Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association: Insights from the Structure. *Pharmaceuticals* 3, 541-557.

Staruschenko, A., Dorofeeva, N.A., Bolshakov, K.V., et Stockand, J.D. (2007). Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Dev. Neurobiol.* 67, 97-107.

Steen, K.H., et Reeh, P.W. (1993). Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci. Lett.* 154, 113-116.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819-829.

Sugimura, N., Ikeuchi, M., Izumi, M., Kawano, T., Aso, K., Kato, T., Ushida, T., Yokoyama, M., et Tani, T. (2015). Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *19*, 629-638.

Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F.R., et Kung, C. (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* *368*, 265-268.

Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., et Kung, C. (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the *MscL* gene, protein, and activities. *Annu. Rev. Physiol.* *59*, 633-657.

Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., et McCleskey, E.W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 711-716.

Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F., et Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* *438*, 1022-1025.

Talavera, K., Startek, J.B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y.A., Sanchez, A., Naert, R., et Nilius, B. (2020). Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol. Rev.* *100*, 725-803.

Tan, C.-H., et McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* *536*, 460-463.

Tannenbaum, C., Ellis, R.P., Eyssel, F., Zou, J., et Schiebinger, L. (2019). Sex and gender analysis improves science and engineering. *Nature* *575*, 137-146.

Tattersall, G.J., Sinclair, B.J., Withers, P.C., Fields, P.A., Seebacher, F., Cooper, C.E., et Maloney, S.K. (2012). Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Compr. Physiol.* *2*, 2151-2202.

Tjølsen, A., Lund, A., et Hole, K. (1991). Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* *193*, 193-201.

Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., et Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* *25*, 1804-1815.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., et Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

Torebjörk, H.E., et 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.

Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., et Campbell, J.N. (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J. Physiol.* 483, 747-758.

Treede, R.-D., Meyer, R.A., et Campbell, J.N. (1998). Myelinated Mechanically Insensitive Afferents From Monkey Hairy Skin: Heat-Response Properties. *J. Neurophysiol.* 80, 1082-1093.

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.

Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., et Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.

Tselepis, A.D., et John Chapman, M. (2002). Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler. Suppl.* 3, 57-68.

Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Nishigaki, M., Shibata, Y., et Shimada, S. (2002). Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J. Clin. Invest.* 110, 1185-1190.

Unruh, A.M. (1996). Gender variations in clinical pain experience. *Pain* 65, 123-167.

Urban, M.O., et Gebhart, G.F. (1999). Spinal contributions to hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7687-7692.

Urban, M.O., Zahn, P.K., et Gebhart, G.F. (1999). Descending facilitatory influences from the rostral medial medulla mediate secondary, but not primary hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 90, 349-352.

Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P.V., et al. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* *18*, 145-153.

Verkest, C., Piquet, E., Diochot, S., Dauvois, M., Lanteri-Minet, M., Lingueglia, E., et Baron, A. (2018). Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine. *Br. J. Pharmacol.* *175*, 4154.

Viel, E., Bredeau, O., et Licata, N. (2013). Chronicisation de la douleur : le cas des douleurs chroniques post- chirurgicales et post-traumatiques. *10*.

Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., et Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 8026-8033.

Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., et al. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* *70*, 482-494.

Walder, R.Y., Rasmussen, L.A., Rainier, J.D., Light, A.R., Wemmie, J.A., et Sluka, K.A. (2010). ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury. *J. Pain* *11*, 210-218.

Waldmann, R., et Lazdunski, M. (1998). H<sup>+</sup>-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* *8*, 418-424.

Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., et Lazdunski, M. (1996). The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* *271*, 10433-10436.

Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., et Lazdunski, M. (1997a). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* *386*, 173-177.

Waldmann, R., Bassilana, F., Weille, J. de, Champigny, G., Heurteaux, C., et Lazdunski, M. (1997b). Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na<sup>+</sup> Channel Specific for Sensory Neurons \*. *J. Biol. Chem.* *272*, 20975-20978.

Waldmann, R., Champigny, G., Lingueglia, E., De Weille, J.R., Heurteaux, C., et Lazdunski, M. (1999). H(+)-gated cation channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *868*, 67-76.

Wang, Y., et Xiao, B. (2018). The mechanosensitive Piezo1 channel: structural features and molecular bases underlying its ion permeation and mechanotransduction. *J. Physiol.* *596*, 969-978.

Wang, S., Cao, S., Arhatte, M., Li, D., Shi, Y., Kurz, S., Hu, J., Wang, L., Shao, J., Atzberger, A., et al. (2020). Adipocyte Piezo1 mediates obesogenic adipogenesis through the FGF1/FGFR1 signaling pathway in mice. *Nat. Commun.* *11*, 2303.

Wang, W., Duan, B., Xu, H., Xu, L., et Xu, T.-L. (2006). Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J. Biol. Chem.* *281*, 2497-2505.

Wang, W., Yu, Y., et Xu, T.-L. (2007). Modulation of acid-sensing ion channels by Cu<sup>2+</sup> in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* *145*, 631-641.

Warner, T.D., Vojnovic, I., Giuliano, F., Jiménez, R., Bishop-Bailey, D., et Mitchell, J.A. (2004). Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I<sub>2</sub>: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *310*, 642-647.

Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., et Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 47044-47051.

Weidner, C., Schmelz, M., Schmidt, R., Hansson, B., Handwerker, H.O., et Torebjörk, H.E. (1999). Functional Attributes Discriminating Mechano-Insensitive and Mechano-Responsive C Nociceptors in Human Skin. *J. Neurosci.* *19*, 10184-10190.

de Weille, J., et Bassilana, F. (2001). Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca<sup>2+</sup> ions. *Brain Res.* *900*, 277-281.

Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., et al. (2002). The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. *Neuron* *34*, 463-477.



Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., et Welsh, M.J. (2003). Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5496-5502.

Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A., et Fischer, J.A. (1984). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci. Lett.* 52, 199-204.

Woo, S.-H., Ranade, S., Weyer, A.D., Dubin, A.E., Baba, Y., Qiu, Z., Petrus, M., Miyamoto, T., Reddy, K., Lumpkin, E.A., et al. (2014). Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* 509, 622-626.

Wu, L.-J., Duan, B., Mei, Y.-D., Gao, J., Chen, J.-G., Zhuo, M., Xu, L., Wu, M., et Xu, T.-L. (2004). Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* 279, 43716-43724.

Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., et al. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181-186.

Xu, J., Mathur, J., Vessières, E., Hammack, S., Nonomura, K., Favre, J., Grimaud, L., Petrus, M., Francisco, A., Li, J., et al. (2018). GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology. *Cell* 173, 762-775.e16.

Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., et McCleskey, E.W. (2006). Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ. Res.* 99, 501-509.

Yang, H., Yu, Y., Li, W.-G., Yu, F., Cao, H., Xu, T.-L., et Jiang, H. (2009). Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol.* 7, e1000151.

Yermolaieva, O., Leonard, A.S., Schnizler, M.K., Abboud, F.M., et Welsh, M.J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6752-6757.

Young, F. (2008). A life without pain? Hedonists take note. *Clin. Genet.* 73, 31-33.

Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., Yu, F., Liu, H., Jiang, H., et Xu, T.-L. (2010). A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* *68*, 61-72.

Zarychanski, R., Schulz, V.P., Houston, B.L., Maksimova, Y., Houston, D.S., Smith, B., Rinehart, J., et Gallagher, P.G. (2012). Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* *120*, 1908-1915.

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* *174*, 999-1014.e22.

Zhai, G., Pelletier, J.-P., Liu, M., Aitken, D., Randell, E., Rahman, P., Jones, G., et Martel-Pelletier, J. (2019). Activation of The Phosphatidylcholine to Lysophosphatidylcholine Pathway Is Associated with Osteoarthritis Knee Cartilage Volume Loss Over Time. *Sci. Rep.* *9*, 9648.

Zhu, S., Zhu, J., Zhen, G., Hu, Y., An, S., Li, Y., Zheng, Q., Chen, Z., Yang, Y., Wan, M., et al. (2019). Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. *J. Clin. Invest.* *129*, 1076-1093.

Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., et Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* *447*, 855-858.

Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., et Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18114-18119.

Zöllner, C., et Stein, C. (2007). Opioids. In *Analgesia*, C. Stein, éd. (Berlin, Heidelberg: Springer), p. 31-63.

Zygmunt, P.M., Chuang, H., Movahed, P., Julius, D., et Högestätt, E.D. (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *396*, 39-42.

## ANNEXE

**« Antibody-induced pain-like behavior and bone erosion: links to subclinical inflammation, osteoclast activity and ASIC3-dependent sensitization »**

Alexandra Jurczak\*, Lauriane Delay\*, Julie Barbier, Nils Simon, Emerson Krock, Katalin Sandor, Nilesh M Agalave, Resti Rudjito, Gustaf Wigerblad, Katarzyna Rogóż, Arnaud Briat, Elisabeth Miot-Noirault, Arisai Martinez-Martinez, Dieter Brömme, Caroline Grönwall, Vivianne Malmström, Lars Klareskog, Spiro Khoury, Thierry Ferreira, **Bonnie Labrum**, Emmanuel Deval, Juan Miguel Jiménez-Andrade, Fabien Marchand#, Camilla I Svensson#

*Publié dans PAIN,*

*doi : 10.1097/j.pain.0000000000002543*

# Antibody-induced pain-like behavior and bone erosion: links to subclinical inflammation, osteoclast activity, and acid-sensing ion channel 3-dependent sensitization

Alexandra Jurczak<sup>a</sup>, Lauriane Delay<sup>b</sup>, Julie Barbier<sup>b</sup>, Nils Simon<sup>a</sup>, Emerson Krock<sup>a</sup>, Katalin Sandor<sup>a</sup>, Nilesh M. Agalave<sup>a</sup>, Resti Rudjito<sup>a</sup>, Gustaf Wigerblad<sup>a</sup>, Katarzyna Rogóza<sup>a</sup>, Arnaud Briat<sup>c</sup>, Elisabeth Miot-Noirault<sup>c</sup>, Arisai Martinez-Martinez<sup>d</sup>, Dieter Brömme<sup>e</sup>, Caroline Grönwall<sup>f</sup>, Vivianne Malmström<sup>f</sup>, Lars Klareskog<sup>f</sup>, Spiro Khoury<sup>g</sup>, Thierry Ferreira<sup>g</sup>, Bonnie Labrum<sup>h</sup>, Emmanuel Deval<sup>h</sup>, Juan Miguel Jiménez-Andrade<sup>d</sup>, Fabien Marchand<sup>b</sup>, Camilla I. Svensson<sup>a,\*</sup>

## Abstract

Several bone conditions, eg, bone cancer, osteoporosis, and rheumatoid arthritis (RA), are associated with a risk of developing persistent pain. Increased osteoclast activity is often the hallmark of these bony pathologies and not only leads to bone remodeling but is also a source of pronociceptive factors that sensitize the bone-innervating nociceptors. Although historically bone loss in RA has been believed to be a consequence of inflammation, both bone erosion and pain can occur years before the symptom onset. Here, we have addressed the disconnection between inflammation, pain, and bone erosion by using a combination of 2 monoclonal antibodies isolated from B cells of patients with RA. We have found that mice injected with B02/B09 monoclonal antibodies (mAbs) developed a long-lasting mechanical hypersensitivity that was accompanied by bone erosion in the absence of joint edema or synovitis. Intriguingly, we have noted a lack of analgesic effect of naproxen and a moderate elevation of few inflammatory factors in the ankle joints suggesting that B02/B09-induced pain-like behavior does not depend on inflammatory processes. By contrast, we found that inhibiting osteoclast activity and acid-sensing ion channel 3 signaling prevented the development of B02/B09-mediated mechanical hypersensitivity. Moreover, we have identified secretory phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine 16:0 as critical components of B02/B09-induced pain-like behavior and shown that treatment with a secretory phospholipase A2 inhibitor reversed B02/B09-induced mechanical hypersensitivity and bone erosion. Taken together, our study suggests a potential link between bone erosion and pain in a state of subclinical inflammation and offers a step forward in understanding the mechanisms of bone pain in diseases such as RA.

**Keywords:** Pain, Osteoclasts, Bone, Autoantibodies, Rheumatoid arthritis, ASIC3, Lipids, LPC, sPLA<sub>2</sub>

## 1. Introduction

Many different pathological bone conditions, including bone cancer, osteoporotic fractures, and rheumatoid arthritis (RA) are associated with a high risk of developing persistent pain.<sup>7,41,63</sup>

Preclinical data indicate that osteoclast-inhibiting drugs, such as bisphosphonates and antireceptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) antibodies, are antinociceptive in animal models of different bone pathologies.<sup>20,64,66,88,104</sup> Moreover, in

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

A. Jurczak and L. Delay contributed equally to this work.

F. Marchand and C.I. Svensson contributed equally to this work.

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, <sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France, <sup>c</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm UMR 1240, IMoST, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Clermont-Ferrand, France, <sup>d</sup> Unidad Academica Multidisciplinaria Reynosa Aztlan, Universidad Autonoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, Mexico, <sup>e</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, <sup>f</sup> Department of Medicine, Division of Rheumatology, Center for Molecular Medicine, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden, <sup>g</sup> Lipotoxicity and Channelopathies (LiTch)—ConicMeds, Université de Poitiers, Poitiers, France, <sup>h</sup> Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, LabEx ICST, FHU InovPain, France

\*Corresponding author. Address: Department of Physiology and Pharmacology, Center for Molecular Medicine L8:03, Karolinska Institutet, Stockholm 171 76, Sweden. Tel.: +46 8 524 87948. E-mail address: camilla.svensson@ki.se (C.I. Svensson).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.painjournalonline.com](http://www.painjournalonline.com)).

PAIN 00 (2022) 1–18

Copyright © 2022 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the International Association for the Study of Pain. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002543>

some human studies, these types of drugs are also associated with pain relief.<sup>1,17,59</sup> Thus, increased osteoclast activity may lead not only to increased bone resorption and structural changes in bone microarchitecture but also to the production of algogenic factors that sensitize nociceptors innervating the bone.

Osteoclasts secrete protons (H<sup>+</sup>) through vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) which, together with enzymes such as cathepsin K and matrix metalloproteinases, enable bone matrix degradation.<sup>91</sup> Nociceptors respond to H<sup>+</sup> mainly through acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), and inhibition of these receptors attenuates pain-related behaviors in experimental models of bone pain.<sup>25,29,31,36,83</sup> Osteoclasts can also produce other pronociceptive factors, including lipids,<sup>51</sup> chemokines,<sup>98</sup> and neurotrophic factors.<sup>104</sup> Hence, osteoclasts may contribute to pain-like behaviors in various ways. Bone-related pain is often associated with tissue inflammation, neuronal sprouting, or tumor growth<sup>57,68</sup> and in such conditions several pronociceptive mechanisms are likely acting in synchrony. Interestingly, induction of osteoclastogenesis by local or systemic administration of RANKL does not produce pain-related behaviors in mice, suggesting that enhanced osteoclast activity in the absence of other local changes is not pain-inducing.<sup>16</sup> Thus, the exact role of osteoclasts and how they contribute to sensitization of nociceptors are not fully understood yet.

Historically, bone loss in RA has been considered a consequence of synovial inflammation, but recent reports suggest that bone degradation starts even before the onset of clinical symptoms.<sup>47,60</sup> Joint pain is also an early indicator of emerging RA.<sup>11,75</sup> Furthermore, many patients with established RA continue to report moderate to severe pain despite a marked reduction in inflammation and disease activity in response to antirheumatic treatment.<sup>52</sup> This discrepancy between disease activity and pain indicates that synovitis is not the only driver of joint pain in RA<sup>3,48</sup> and that additional mechanisms are at play. Indeed, pain-associated behaviors are present before and after the phase of joint inflammation observed in animals subjected to antibody-induced arthritis.<sup>5,15,23</sup> In our previous work, we found that mice injected with osteoclast-activating monoclonal antibodies (mAbs) derived from synovial B cells from patients with RA displayed bone loss and pain-related behaviors without any visible signs of inflammation.<sup>4,50,86,98</sup> Although the definitive targets of these antibodies are unknown, we have here used one of them, 1103:01B02 (B02), together with 1325:01B09 (B09), which preferentially binds to acetylated and citrullinated peptides.<sup>55,81,86</sup> The combination of B02 and B09 mAbs was used as a tool to examine osteoclast contribution to pain-related behaviors that occur in the absence of overt tissue pathology. Thus, the aim of the current study was to examine the contribution of osteoclast activity to mechanical hypersensitivity induced by mAbs derived from patients with RA.

## 2. Methods

### 2.1. Mice

Because the prevalence of RA is higher in women than in men (3:1) we only used female mice in this study. BALB/c female mice (10–12 weeks old) were purchased from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France) or Charles River (Freiberg, Germany) and were housed in a temperature-controlled room with a 12-hour light–dark cycle, with food and water ad libitum. C57BL/6J WT-littermates and ASIC3 knock-out female mice<sup>99</sup> were bred in the University of Clermont Auvergne Medical School animal facility (France) and housed as described above. For APETx2

pharmacological experiment, C57BL/6J female mice were purchased from Janvier labs. All procedures performed in France and Sweden were approved by the local ethical committees (Comité Régional d'éthique en matière d'expérimentation animale Auvergne and Stockholm Norra Djurförsöksetiska nämnd, respectively). All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC) as well as with the International Association for the Study of Pain and ARRIVE guidelines. The number of animals used for each experiment is listed in the figure legends.

### 2.2. Monoclonal antibodies

Synovial fluid samples were drawn from knee joints of 2 female patients with RA based on the clinical need to alleviate the symptoms of active joint inflammation. Both patients attended the Rheumatology clinic at Karolinska University Hospital and fulfilled RA criteria as defined by the American College of Rheumatology 1987. Informed consent to use the samples for research was obtained from the patients in accordance with a protocol approved by the Ethical Review Committee North (KI forskningsetikkommitté Nord) of Karolinska University Hospital. Both patients were carrying Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha (HLA-DR) shared epitope allele and were seropositive, with high anticyclic citrullinated antibodies (CCP) levels measured by CCPlus (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden). Monoclonal antibodies were generated from single memory B cells<sup>54</sup> (1103:01B02 and control mAbs 1362:01E02 and 1276:01G09) or antibody-secreting cells (1325:01B09) isolated from synovial fluid mononuclear cells from the patients with RA.<sup>86</sup> After isolation, Ig variable regions were cloned into vectors and mAbs were expressed as recombinant immunoglobulin G (IgG) in Expi293 human embryonic kidney (HEK) cells (Life Technologies, Carlsbad, CA). Antibodies were purified using Protein G Sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare, Stockholm, Sweden) and assessed for reactivity using a range of modified peptide and/or protein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a custom-designed autoantigen microarray (Thermo Fisher Scientific—Immunodiagnosics, Uppsala, Sweden),<sup>32</sup> as previously described.<sup>81,86</sup> In-depth binding was also investigated with a large extracellular matrix peptide microarray with 53019 cit-peptides, 49022 carb-peptides, and equivalent native control peptides (Roche NimbleGen Pleasanton, CA, US). The exact steps in the process of cloning and expression have been described elsewhere.<sup>4</sup> All IgGs were endotoxin tested (<10 EU/mg IgG) and extensively quality-controlled with ELISA, sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and size exclusion chromatography. Murine chimera antibodies of the human mAbs (hB02, hB09) were generated by replacing human gamma and lambda/kappa constant regions with the murine IgG2a constant regions. The 1325:01B09 antibody binds to citrullinated, acetylated, and carbamylated peptides and is classified as an antimodified protein antibody. The 1103:01B02 antibody is negative for reactivity towards all screened citrulline-containing and arginine-containing peptides. 1103:01B02 does not show polyreactivity or general nonspecific reactivity,<sup>81</sup> despite it previously having had functional activity and osteoclast binding,<sup>50</sup> it is currently not known which epitopes 1103:01B02 binds to. Two control antibodies, 1276:01G09 and 1362:01E02, have not had any detectable reactivity. Human and murine chimera mAbs were used interchangeably in this study because we have previously confirmed that both yield comparable effects on pain-like behavior and bone morphology. The mAb 1103:

01B02 (human and murine) will be referred to as B02, the 1325:01B09 (human and murine) as B09, and the control mAbs 1362:01E02 and 1276:01G09 (human and murine) as E02 and G09, respectively. Each mAb was injected intravenously alone (2 mg) or in combination (B02/B09; 1 mg each).

### 2.3. Collagen antibody-induced arthritis

Collagen antibody-induced arthritis (CAIA) was induced as previously described.<sup>5</sup> In brief, mice were injected i.v. with anticollagen type II arthritogenic cocktail (1.5 mg/mouse; Chondrex, Woodinville, WA) on day 0. Lipopolysaccharide (LPS, 25 µg/mouse, Chondrex) was injected intraperitoneally (i.p.) on day 5 to synchronize the onset of joint inflammation. The control group received saline solution i.v. on day 0 and i.p. on day 5. Mice were killed 16 days after CAIA induction at the peak of inflammation.

### 2.4. Arthritis scoring

The development of joint inflammation in the forepaws and hind paws was monitored daily through visual inspection, performed by a blinded researcher, as previously described.<sup>67</sup> In brief, 1 point was given for each inflamed toe or knuckle, and if the ankle and/or wrist was inflamed, 5 points were given, resulting in a maximum arthritis score of 15 points per paw and 60 points per mouse.

### 2.5. Behavioral tests

Paw mechanical sensitivity was assessed using von Frey hairs based on the up-down method.<sup>14</sup> von Frey hairs used in France for APETx2, ASIC3 KO, paracetamol and morphine experiments were as follows: 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, and 1.4 g (Bioseb, Vitrolles, France). In Sweden, von Frey OptiHair (Marstock OptiHair, Schriesheim, Germany) was used with a logarithmically incremental stiffness of 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 mN (converted to 0.051, 0.102, 0.204, 0.408, 0.815, 1.63, and 3.26 g, respectively). A cutoff of 4 g was applied to avoid tissue damage, and thus, nociceptive responses in the supra-threshold range were not assessed. Animals were acclimatized for at least 1 hour in an individual clear acrylic cubicle placed on the top of an elevated wire mesh. Three baselines were measured on 3 different days followed by randomization of the mice into different groups. The filaments were applied on the right and left hind paws alternatively, with a 5-minute interval between stimuli. Quick withdrawal or licking and/or biting of the paw to the stimulus was considered a positive response. Withdrawal threshold (the threshold of mechanical hypersensitivity at which there was a 50% probability of paw withdrawal) was calculated for both hind paws and averaged. The 50% paw mechanical threshold was evaluated before and at different time points (refer to Pharmacological experiments section) after control antibody, phosphate-buffered saline (PBS), or B02/B09 administration. The investigator performing behavioral testing was blinded to the experimental groups and treatments throughout the whole study.

### 2.6. Quantitative real-time polymerase chain reaction

Ankle joints of the hind legs were processed for gene expression analysis 14 days post-B02/B09 injection and 16 days post-CAIA. Ankle joints were dissected out and trimmed 6 mm from each side of the joint capsule, which was followed by removal of muscles and tendons. Samples were flash frozen and stored in  $-70^{\circ}\text{C}$  until further processing. Joint tissue was pulverized with BioPulviser (BioSpec, Bartlesville, OK), followed by bead homogenization using

TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol and followed by a reverse transcription reaction using the High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen). qPCR was performed using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) or BioRad CFX RT-PCR System (Bio-Rad Laboratories, Stockholm, Sweden) using hydrolysis probes to measure the relative mRNA levels. Predeveloped probes (Applied Biosystems) for *Acp5* (Mm00475698\_m1), *Ctsk* (Mm00484039\_m1), *Tc1r1* (Mm00469406\_m1), *Asic3* (Mm00805460\_m1), *Asic1* (Mm01306001\_g1), *Il1β* (Mm00434228\_m1), *Tnf* (Mm00443258\_m1), *Il6* (Mm00446190\_m1), *Cxcl1* (Mm04207460\_m1), *Cxcl2* (Mm00436450\_m1), *Ptgs2* (Mm00478374\_m1), *Pla2g2a* (Mm00448160\_m1), *Pla2g5* (Mm00448162\_m1), *Pla2g10* (Mm01344436\_g1), *Enpp2* (Mm00516572\_m1), *Lpar1* (Mm00439145\_m1), *Lpar2* (Mm00469562\_m1), *Lpar3* (Mm00469694\_m1), *Lpar4* (Mm01228532\_m1), *Lpar5* (Mm01190818\_m1), and *Lpar6* (Mm00163058) were used for mRNA analysis. Data were normalized against housekeeping genes: *Rplp2* (Mm00782638\_s1) or *Hprt* (Mm03024075\_m1). Relative fold changes were calculated by the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ).

### 2.7. Immunohistochemistry

Mice were terminally anaesthetized using pentobarbital and quickly perfused transcardially with saline, followed by 4% paraformaldehyde (PFA). After perfusion, L3-L4-L5 left dorsal root ganglia (DRG) were excised, postfixed 4 hours in the same perfusion fixative, cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer for 48 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ , and frozen in optimal cutting temperature (OCT; HistoLab, Göteborg, Sweden) compound. Transverse DRG sections (12 µm) were cut on a cryostat, dried for 30 minutes at room temperature, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before staining.

Dorsal root ganglion sections were stained as follows: After 3 washes with PBS, sections were blocked with PBS containing 0.2% Triton X-100 and 1% bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich BSA to reduce nonspecific binding. Sections were then incubated overnight at room temperature in a humid chamber with primary antibody (Guinea pig anti-ASIC3, 1/200, #AB5927; Merck Millipore, Molsheim France) diluted in PBS + 0.2% Triton X-100 and 1% BSA. After 5 washes 5 minutes each with PBS, sections were incubated with the appropriate secondary antibody (goat anti-guinea pig Alexa 488; Alexa Fluor, Life Technology, Illkirch, France) in PBS + 0.2% Triton X-100 + 1% BSA 2 hours at room temperature. Sections were then washed 3 times in PBS and cover-slipped with fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark). Negative control sections were stained only with the secondary antibody and subjected to the same experimental conditions. Sections were visualized under a Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope run with Nikon analysis software (NIS element). Counting of ASIC3-positive DRG neurons in L3-L4-L5 DRG (4-6 sections for each animal,  $n = 5$  per group) was performed by a blinded experimenter. Signal above background in the form of punctate staining in cytoplasm and/or membrane was considered as a positive cell.

### 2.8. Joint histology

Hind ankle joints were postfixed in 4% PFA (HistoLab, Göteborg, Sweden) for 48 hours. Next, tissue was decalcified in 10% EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 4 to 5 weeks, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Sagittal sections (5 µm) were



cut and stained with hematoxylin and eosin (Histolab) and scored by 2 blinded investigators on a scale from 0 to 3, where 0 is normal and 3 is severe synovitis, bone erosion, and/or cartilage destruction, as previously described.<sup>5</sup>

### 2.9. Lipocalin-2 ELISA

At day 36 after B02/B09 or PBS administration, mice were terminally anaesthetized using pentobarbital ( $n = 8/\text{group}$ ). The right ankle joint was excised and snap frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were then crushed in liquid nitrogen with a pestle and mortar and subsequently homogenized in lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM TrisHCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, and 0.5 mM sodium vanadate) using a glass homogenizer. Homogenates were then centrifuged at 14,000 $\times g$  for 10 minutes at 4°C, and supernatants were collected. Whole-cell lysates were next titrated to determine their protein concentrations using Pierce BCA Protein Assay kit (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom). Lipocalin-2 (LCN2) was measured using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique according to the manufacturer's guidelines (DuoSet, # DY1857; R&D system, Minneapolis, MN). Samples were processed in duplicates, and values were calculated from the standard curve.

### 2.10. Two-Deoxyglucosone 750 imaging

Glucose uptake as a surrogate of tissue inflammation assessment was measured in vivo using an IVIS Spectrum small animal imaging system (Perkin Elmer) at day 18 after B02/B09 or PBS administration ( $n = 8$  in each group). Each mouse received 10 nmol/100  $\mu\text{L}$  of Xenolight RediJect 2-deoxyglucosone (DG)-750 (Perkin Elmer) by i.v. administration. Three hours later, acquisition was performed under isoflurane anesthesia (1.5%). Imaging was performed using the ex/em = 745/820 nm bandpass filters. Quantification analysis was performed with Living Image Software using region of interest (ROI) delineated on hind paws (ankle joint). The results are presented as the average of both hind paws of total counts of radiance efficiency (radiance [photons per second per square centimeter per steradian] per incident excitation power [microwatt per square cm]).

### 2.11. Microcomputed tomography

At day 28, animals from each group (saline, 1276:01G09, 1103:01B02, 1325:01B09, and 1103:01B02+1325:01B09;  $n = 6-19$  per group) were terminally anaesthetized using isoflurane or pentobarbital and quickly perfused transcardially with saline followed by 4% PFA. The right leg was dissected out, skin and muscles were carefully removed to avoid any bone damage, and postfixed in the same perfusion fixative for 48 hours. After 3 washes with PBS, the right leg was stored in 0.01M PBS at 4°C until scanning.

The trabecular bone was analyzed at the level of proximal tibia and talus using a microcomputed tomography (micro-CT) system (Skyscan 1272; Bruker, Kontich, Belgium). The scanning process was performed according to the guidelines for micro-CT analysis for rodent bone structure. The scanning was made at a 10- $\mu\text{m}$  voxel size with an X-ray power of 60 kVp and 166  $\mu\text{A}$  with an integration time of 627 ms. Obtained images were reconstructed using NRecon software (Bruker). The trabecular ROI was evaluated by selecting 2 mm in the vertical axis, subsequent to 0.5 mm from the growth plate (reference point). The CT analyzer program (Bruker) was used to determine trabecular bone parameters; an automatic segmentation algorithm (CT analyzer)

was applied to isolate the trabecular bone from the cortical bone. The parameters used for the trabecular bone were bone mineral density, trabecular bone volume ratio (BV/TV), trabecular separation (Tb.Sp), and trabecular number (Tb.N). Finally for cortical bone, cortical thickness (Ct.Th) was obtained.

### 2.12. Cathepsin K activity imaging

Bone resorption was assessed in vivo using a small animal IVIS Spectrum imaging system (Perkin Elmer, Waltham, MA) using the CatK680 FAST fluorescent imaging agent (Perkin Elmer), which localizes to sites of increased bone resorption and osteoclast activity.<sup>82</sup> On day 21 after B02/B09 or PBS administration, 2 nmol/100  $\mu\text{L}$  Cat K 680 FAST (Perkin Elmer) was injected i.v. ( $n = 5/\text{group}$ ) and image acquisition was performed 6 hours later under isoflurane anesthesia (1.5%) using the ex/em = 675/720 nm bandpass filters. Quantification analysis was performed as described for 2-DG fluorescent imaging.

### 2.13. Scintigraphic imaging

To evaluate cartilage remodeling, in vivo scintigraphic imaging was performed in the same animals with <sup>99m</sup>Tc-technetium-N-[triethylammonium]-3-propyl-<sup>15</sup>ane-N5 (NTP 15-5) at days 2 and 28 after B02/B09 or PBS administration ( $n = 8-11$  for each group). Planar acquisition (10 minutes, 15% window at 140 keV) was performed 30 minutes after i.v. administration of 25MBq of <sup>99m</sup>Tc-NTP 15-5 on the animal placed in ventral decubitus on a parallel collimator (20 mm/1.8/0.2) of a gamma camera for small animals (Ylmager, Biospace, Nesles-la-Vallée, France) under isoflurane anesthesia (1%). To evaluate bone remodeling, in vivo scintigraphic imaging was also performed with <sup>99m</sup>Tc-technetium-hydroxymethylene diphosphonate (<sup>99m</sup>Tc-HMDP, Osteocys, IBA) radiotracer at days 4 and 31 after B02/B09 or PBS administration ( $n = 8-11$  for each group). The bone imaging phase was acquired 2.5 hours after intravenous injection of 10 MBq per mouse of <sup>99m</sup>Tc-HMDP. Planar acquisition was performed (5 minutes, 15% window at 140 keV) as described for <sup>99m</sup>Tc-NTP 15-5. Quantitative analysis of both scintigrams was performed with *GammaVision+*, with ROIs delineated over the hind paws, and results are presented as the average of both hind paws of the total counts in cpm in the ROI. For each radiotracer, the injected dose to each animal was determined by acquiring an image of the syringe before and after injection and counting using an activimeter (Capintec, Florham Park, NJ).

### 2.14. Pharmacological experiments

Ten days after B02/B09 injection, when mechanical hypersensitivity has developed, animals received subcutaneous (s.c.) injections of naproxen (50 mg/kg, Sigma-Aldrich) or saline during 3 consecutive days (days 10, 11, and 12;  $n = 6-7$  per group). Mechanical withdrawal thresholds were assessed 180 minutes after each injection. To reduce the number of animals used for this study, we allowed 6 days of drug washout, after which mice were subjected to s.c. injections with a secretory phospholipase A2 (sPLA<sub>2</sub>) inhibitor (varespladib, 3 mg/kg for 3 days followed by 6 mg/kg for 6 days, BioNordika, Stockholm, Sweden) or vehicle (20% DMSO in PBS) twice daily on days 19 to 24 post-B02/B09 injection ( $n = 6-7$  per group).

In the second cohort of mice, 14 days after B02/B09 or PBS injection, mice received either saline (s.c.) or morphine (3 mg/kg, s.c. Tocris, Bristol, United Kingdom), just after baseline threshold measurement ( $n = 8$  per group). Mechanical thresholds were

assessed 30 and 60 minutes posttreatment. After 1 week of drug washout (ie, 21 days after B02/B09 or PBS injection), mice received either saline (s.c.) for the one previously treated with morphine or paracetamol (200 mg/kg, Sigma-Aldrich) for the one previously treated with saline, just after baseline threshold measurement. Mechanical thresholds were then assessed at 45 minutes postinjection.

In the third cohort of mice, 2 different osteoclast inhibitors, bisphosphonate (zoledronate, Sigma-Aldrich) and cathepsin K inhibitor tanshinone IIA sulfonic sodium (T06, kindly provided by Dr. Dieter Brömme, University of British Columbia, Vancouver, Canada), were used.<sup>70</sup> T06 (40 mg/kg) was resuspended in distilled water and given by oral gavage every day for the whole duration of the study (1-14 days post-B02/B09 injection) in 100  $\mu$ L/10g body weight volume. Zoledronate (100  $\mu$ g/kg) or saline were injected intraperitoneally (i.p.) into mice on days 1, 4, 7, and 10 post-B02/B09 injection.

In the fourth cohort of mice, APETx2 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), a selective ASIC3 channel blocker,<sup>19</sup> was injected at days 14 and 23 post-B02/B09 or PBS administration. Each mouse was injected intraarticularly (i.a.) into the right ankle joint (ipsilateral) with 20  $\mu$ mol of APETx2, diluted in 10  $\mu$ L of saline, under 1.5 to 2% isoflurane anesthesia. Mechanical thresholds were assessed before and after B02/B09 or PBS administration and 1, 4, and 24 hours after i.a. injection. The contralateral paw, injected with saline, was used as an internal control (n = 8 per group).

In the fifth cohort of mice, bafilomycin A1 (BafA1, Abcam, Cambridge, United Kingdom), a selective V-ATPase inhibitor was used. After the induction of mechanical hypersensitivity with B02/B09, mice (n = 6 per group) received daily s.c. injections of BafA1 (25  $\mu$ g/kg) or vehicle (0.01% DMSO in PBS) for 5 consecutive days (days 12-16) and were tested for mechanical thresholds at 1 and 3 days posttreatment (days 17 and 19). Mice injected with 1362:01E02 (n = 3) were used as control.

### 2.15. Primary osteoclast cultures

Osteoclasts were derived from mononuclear hematopoietic cell population from the bone marrow of BALB/c female mice (16-20 weeks old). Hind limbs were carefully dissected keeping the long bones intact, followed by skin and muscle removal. Total bone marrow was flushed out from both tibia and femur using 1 mL-syringe filled with cold  $\alpha$ MEM complete serum (Life Technologies, Carlsbad, CA). To remove cell aggregates, the cell suspension was pipetted up and down and flushed through a 70- $\mu$ m cell strainer, followed by centrifugation for 7 minutes at 300g. Cells were resuspended in 15 mL of selection medium ( $\alpha$ MEM) supplemented with 1:100 PEST (ThermoFisher) and 10% FBS (Sigma-Aldrich) and plated onto a T75 flask with a ventilated cap (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> overnight to allow adherence of stromal cells. Next day, non-adherent cells were removed and harvested by centrifugation for 7 minutes at 300g, followed by counting using 0.4% Trypan blue stain (ThermoFisher). Cells were resuspended in  $\alpha$ MEM supplemented with 30 ng/mL M-CSF and 50 ng/mL RANKL (R&D Systems, Minneapolis, MN) and seeded onto 96-well plates at a density of  $1.00 \times 10^6$  cells/mL and cultured for 5 days at 37°C and 7% CO<sub>2</sub>. Antibodies 1103:01B02, 1325:01B09, and 1276:01G09 were added to the culture at a concentration of 5  $\mu$ g/mL on the day of seeding and on day 4, during media change. At the end of experiment, cells were fixed with 4% PFA, washed with 0.01M PBS, and tartrate-resistant acid phosphatase stained using a leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich). The number of multinucleated cells (1-3, 3-9, and >9nuclei) was counted and

averaged for each condition (5 wells/condition). Observations have been repeated in 3 independent experiments.

### 2.16. Lipid extraction

Lysophosphatidylcholine (LPC) species content was assessed in bone marrow extracted from B02/B09-injected and PBS-injected groups 28 days postinjection. The lipid extraction was adapted from the Folch method.<sup>24</sup> In brief, 50  $\mu$ L of bone marrow sample was diluted in 950  $\mu$ L of water and transferred into glass tubes with PTFE caps (PyrexLabware, Stoke-on-Trent, United Kingdom) containing 500  $\mu$ L of glass beads ( $\varnothing$  0.3-0.4 mm, Sigma-Aldrich). Mixtures were supplemented with 4 mL of a 2/1 (vol/vol) chloroform (CHCl<sub>3</sub>)/methanol (CH<sub>3</sub>OH) solution containing lipid standards (LPC17:0 or LPC13:0), and lipid extractions were performed on an orbital shaker (IKA VXR basic Vibrax; Sigma-Aldrich) at 1500 rpm for 2 hours at room temperature. From the resulting emulsions, aqueous phases were dissociated from the lipid-containing organic phases with a swing-out centrifuge for 5 minutes at 410 g. Aqueous phases were discarded, and organic ones were supplemented with 1 mL of a 4/1 (vol/vol) 2N KCl/CH<sub>3</sub>OH solution. Samples were shaken for 10 minutes, and organic and aqueous phases were separated as described before. The resulting organic phases were complemented with 1 mL of 3/48/47 (vol/vol/vol) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O solution, and an additional shaking step was performed. The resulting organic phases were isolated, transferred into new glass tubes, and supplemented with 1 mL of a 3/48/47 (vol/vol/vol) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O solution and shaken for 10 minutes. The final organic phases containing the whole lipids were isolated, solvent evaporated at 80°C under a nitrogen beam (1 bar), and stored at -80°C until analysis.

### 2.17. Phospholipid purification and mass spectrometry analysis

Purification of phospholipids from the total lipid extract was performed on a silica column (Bond ELUT-SI; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using 2 mL of a 50/45/5 (vol/vol/vol) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O solution, after elution of nonpolar lipids and glycolipids with appropriate solutions. The eluted fractions containing the phospholipids were analyzed by direct infusion on a SYNAPT G2 High-Definition Mass Spectrometer HDMS (Waters Corporation, Milford, MA) equipped with an electrospray ionization source in the positive ion mode, as described elsewhere.<sup>44</sup> All spectra were recorded with the MassLynx software (Version 4.1, Waters).

### 2.18. Electrophysiology

HEK293 cell lines were grown as described previously.<sup>22</sup> One day after plating, cells were transfected with pIRES2-mASIC3-EGFP vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2 to 4 days after transfection. Whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to measure membrane currents (voltage clamp). Recordings were made at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) with a 2 kHz low-pass filter. Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1440 A-D/D-A converter (Axon Instruments) and recorded on a hard disk using pClamp software (version 10; Axon Instruments). The patch pipettes (2-8 M $\Omega$ , borosilicate glass, WPI, Sarasota, FL) contained (in mM) the following: 135 KCl, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.25 with KOH). The control bath solution contained (in mM) the following: 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4



with N-methyl-D-glucamine). ASIC currents were induced by shifting 1 of 8 outlets of the microperfusion system from a holding control solution (ie, pH 7.4) to an acidic test solution (ie, pH 7.0). Whole-cell recording experiments were performed at  $-80$  mV, and acute application of B02 and B09 at  $1 \mu\text{g/mL}$  or LPC 16:0 (Avanti Polar Lipids, Coger, France) at  $10 \mu\text{M}$  was made at resting pH 7.4.

### 2.19. Quantification and statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism 8 (San Diego, CA). To compare differences between groups split into 2 independent variables, 2-way analysis of variance was used followed by the Bonferroni post hoc test. To analyze differences between 2 groups, unpaired 2-tailed student t-test was used, whereas comparisons of 3 groups or more were assessed by 1-way analysis of variance, followed by the Bonferroni post hoc test. All data are presented as mean  $\pm$  SEM, and  $P$  values less than 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Monoclonal antibodies from patients with rheumatoid arthritis differ in their pronociceptive properties but can act in synergy to prolong pain-like behavior when combined

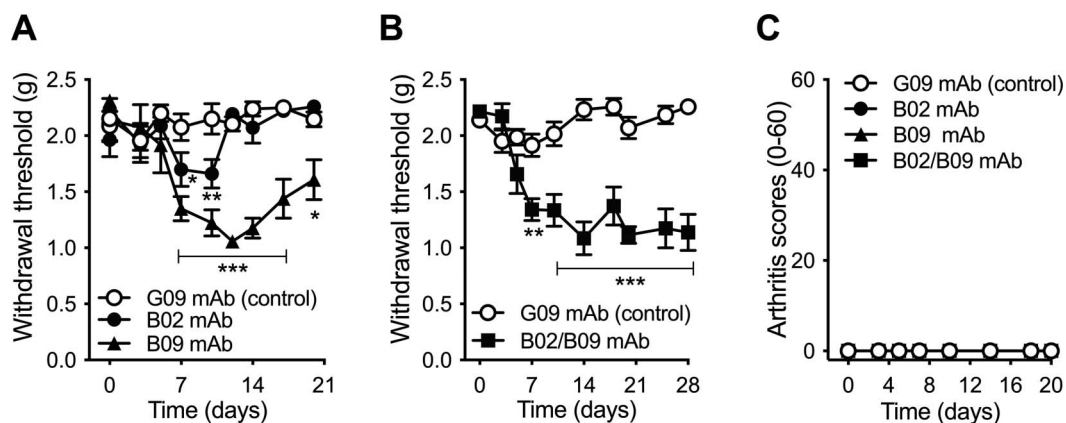
To allow a side-by-side comparison, 2 different RA single-cell-derived recombinant human mAbs, B02 and B09, as well as human control antibody (G09), were injected alone (1 mg) or in combination (2 mg total, 1 mg/antibody) intravenously (i.v.) into female mice. Mice were then monitored for arthritis clinical scores and mechanical hypersensitivity. Although the G09 control antibody did not change the mechanical threshold throughout the whole experiment, the B09 mAb injected alone significantly reduced withdrawal thresholds from days 7 to 20 postinjection (Fig. 1A). By contrast, the B02 mAb only induced a transient mechanical hypersensitivity at days 7 and 10 postinjection. Interestingly, the administration of B02/B09 combination significantly increased and prolonged mechanical hypersensitivity measured from days 7 up to 28 postinjection, compared with B09 and B02 alone (Fig. 1B). This result suggests a potentiation of the pronociceptive effect of B09 when combined with B02. None of the mAbs injected alone or in combination induced any visual signs of joint inflammation (eg, edema or redness) throughout the study (Fig. 1C).

### 3.2. B02/B09-induced hypersensitivity is associated with subclinical inflammation

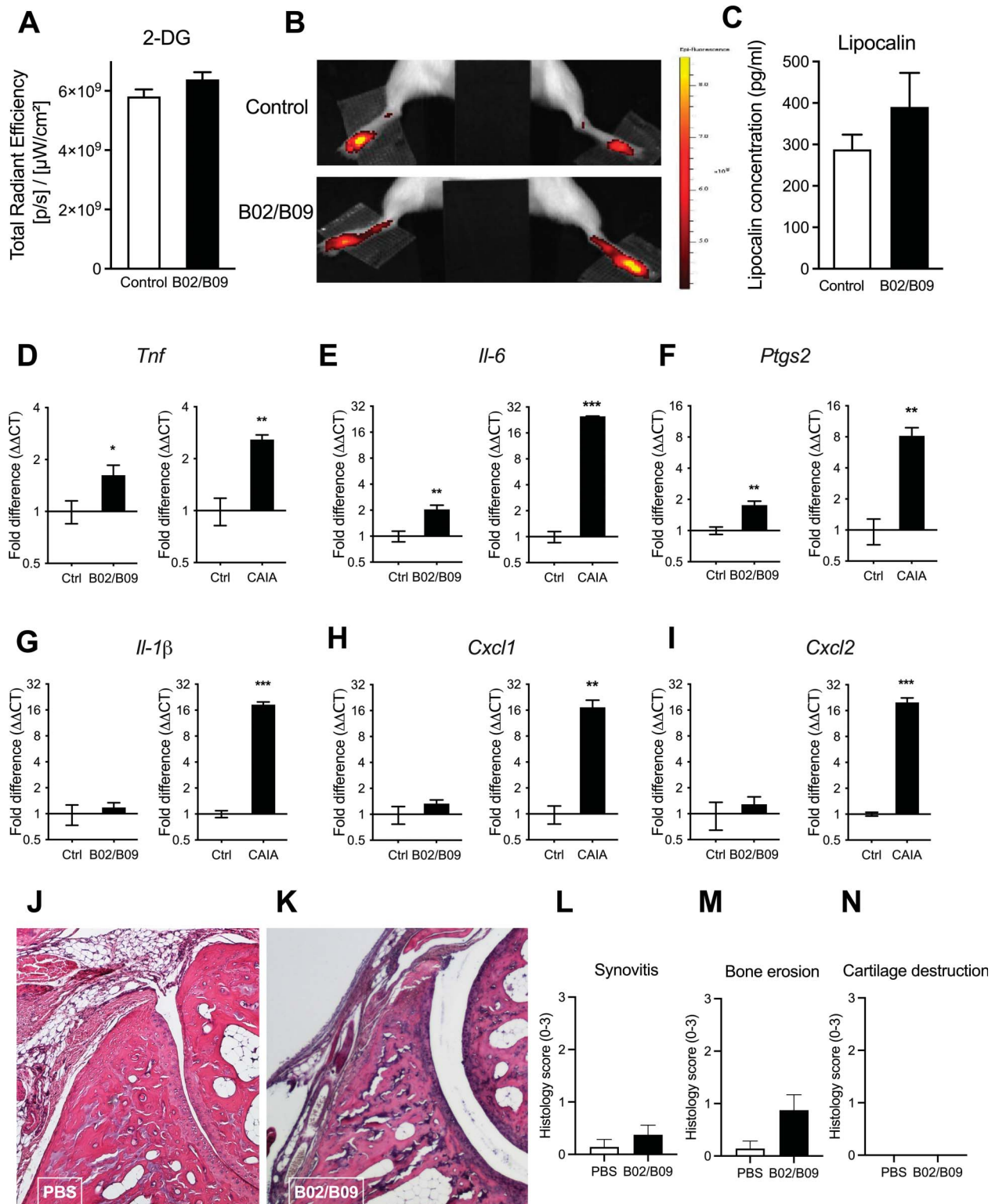
To further investigate whether pain-related behavior induced by B02/B09 was driven by low-grade, subclinical joint inflammation, which cannot be detected by means of visual inspection, we performed 4 different types of analysis in ankle joints from mice injected with B02/B09 or PBS. In vivo assessment of changes in 2-DG fluorescently labelled glucose uptake, used as an indicator of inflammation, did not show any significant increase of 2-DG joint accumulation in the ankle joints 18 days after B02/B09 administration compared with the control group (Figs. 2A and B). Lipocalin-2, a protein released by neutrophils that regulates immune cell recruitment to the site of inflammation, was used as a marker of low-grade inflammation. It did not significantly increase in the ankle joint of the B02/B09 group compared with the control group at day 36 (Fig. 2C). Next, mRNA levels for a series of inflammation-associated factors were assessed in the ankle joints of B02/B09-injected and PBS-injected mice, 14 days post injection. Ankle joints from mice during the inflammatory phase of CAIA (day 16) were used as positive control. We found a significant but small increase of *Tnf* (Fig. 2D), *Il-6* (Fig. 2E), and *Ptgs2* (Fig. 2F) mRNA levels in the B02/B09 ankle joints but no significant changes in *Il-1 $\beta$*  (Fig. 2G), *Cxcl1* (Fig. 2H), or *Cxcl2* (Fig. 2I) mRNA levels compared with control joints. By contrast, mRNA levels for all 6 factors were elevated in ankle joints from CAIA mice compared with controls and with a much higher magnitude compared with B02/B09 joints. Finally, histological examination of ankle joints 14 days after B02/B09 or PBS injections (Figs. 2J and K) did not show signs of cell infiltration or synovial hyperplasia (Figs. 2L–N). These data suggest that B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is accompanied by low-grade subclinical joint inflammation that cannot yet be detected by means of visual inspection or in vivo imaging.

### 3.3. B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is reversed by morphine but not an nonsteroidal anti-inflammatory drug or paracetamol

Inflammation-induced pain is typically reduced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. To assess the contribution of inflammation to B02/B09-induced reduction in withdrawal thresholds, naproxen (50 mg/kg) was administrated



**Figure 1.** Monoclonal antibodies from patients with RA differ in their pronociceptive properties but can act in synergy to prolong pain-like behavior when combined. (A) A single i.v. injection of human B02 or B09 (2 mg/mouse) induces transient mechanical hypersensitivity when compared with human control antibody G09 (2 mg/mouse). (B) When B02 and B09 (1 mg each/mouse) are combined, the mAbs induce long-lasting pain-like behavior (28 days), compared with the control antibody (2 mg/mouse). (C) None of the human mAbs injected alone or in combination cause visual signs of inflammation (0–60). Data presented as mean  $\pm$  SEM, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with a control mAb;  $n = 6$  to 11/group. mAb, monoclonal antibody; RA, rheumatoid arthritis.



**Figure 2.** B02/B09-induced pain-like behavior is associated with subclinical inflammation. (A-B) B02/B09-injected mice do not show increased metabolic activity in the ankle joints, measured in vivo 3 hours after i.v. injection of 2-DG-750 luminescent probe (10 nmol/100 μL), day 14 post-mAb injection (n = 8-11/group, results are presented as total counts of radiant efficiency/incident excitation power and compared with the PBS-injected control group). (C) Lipocalin-2 levels measured in ankle joint homogenates 36 days post-mAb injection are not significantly elevated in the B02/B09 group compared with control (n = 8/group). Gene expression of (D) *Tnf*, (E) *Il-6*, and (F) *Ptgs2*, but not (G) *Il-1β*, (H) *Cxcl1*, and (I) *Cxcl2*, is significantly increased in ankle joints 14 days post-B02/B09 injection compared with the vehicle-injected control group (PBS), whereas mRNA for all factors is elevated in joints collected in the inflammatory phase of the CAIA model (day 16) (D-I), compared with the control group. The mRNA data were normalized to *Rplp2* mRNA levels and are presented as fold changes (n=5-6/group). (J-K) Representative ankle joint sections stained with hematoxylin and eosin 14 days after B02/B09 or PBS i.v. injection. (L-N) B02/B09 joints show signs of bone erosion but not synovitis or cartilage damage, compared with control (n = 7-8). Data presented as mean ± SEM, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. 2-DG, 2-deoxyglucosone, CAIA, collagen antibody-induced arthritis; Ctrl, control.

once a day for 3 days. No reversal of mechanical hypersensitivity was observed compared with vehicle (**Fig. 3A**). Furthermore, paracetamol injection (200 mg/kg) did not reduce mechanical hypersensitivity in B02/B09-injected animals, compared with vehicle control. By contrast, systemic administration of 3 mg/kg morphine rapidly reversed mechanical allodynia at 30 and 60 minutes after injection compared with vehicle control. Taken together, these results indicate that B02/B09 antibody-induced mechanical hypersensitivity cannot be classified as a classical model of inflammatory pain but as a model in which pain-related behaviors are mainly driven by other mechanisms (**Fig. 3B and C**).

### 3.4. B02/B09 monoclonal antibodies alter bone homeostasis and induce bone erosion

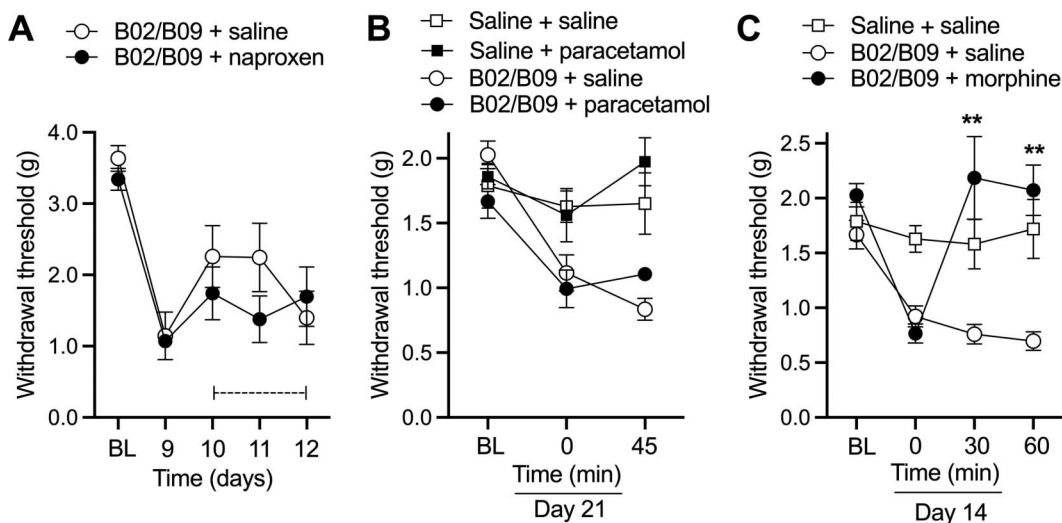
We next tested whether B02 and B09, alone or in combination, have an impact on bone microarchitecture and osteoclast number. Micro-CT was used to evaluate alterations of bone density and microarchitecture in the proximal tibias from saline-injected, G09-injected, B02-injected, B09-injected, and B02/B09-injected mice at day 28 post injection (**Figs. 4A–D**). The morphometric parameters examined were bone volume fraction (BV/TV), Tb.N, Tb.Sp, and Ct.Th.. Although injecting the mAbs alone did not alter any of the parameters, the B02/B09 combination significantly reduced BV/TV, Tb.N, and Ct.Th and increased Tb.Sp compared with the control groups. There was no difference in morphometric parameters between mice injected with saline and the control mAb G09.

To assess the direct effect of the mAbs on osteoclast formation, we tested the effect of B02, B09, and the combination on bone marrow-derived osteoclast precursor cells in vitro. When combined, B02/B09 stimulated the formation of TRAP<sup>+</sup> multinucleated cells (**Fig. 4E**), with a significant effect on the generation of small osteoclasts (4–9 nuclei; **Fig. 4F**), but none on the formation of big cells (>9 nuclei, **Fig. 4G**) or preosteoclasts (2–3 nuclei, **Fig. 4H**). Importantly, B02 alone also enhanced osteoclast formation, which is consistent with the earlier report on the B02 mAb effects on human osteoclasts.<sup>50</sup>

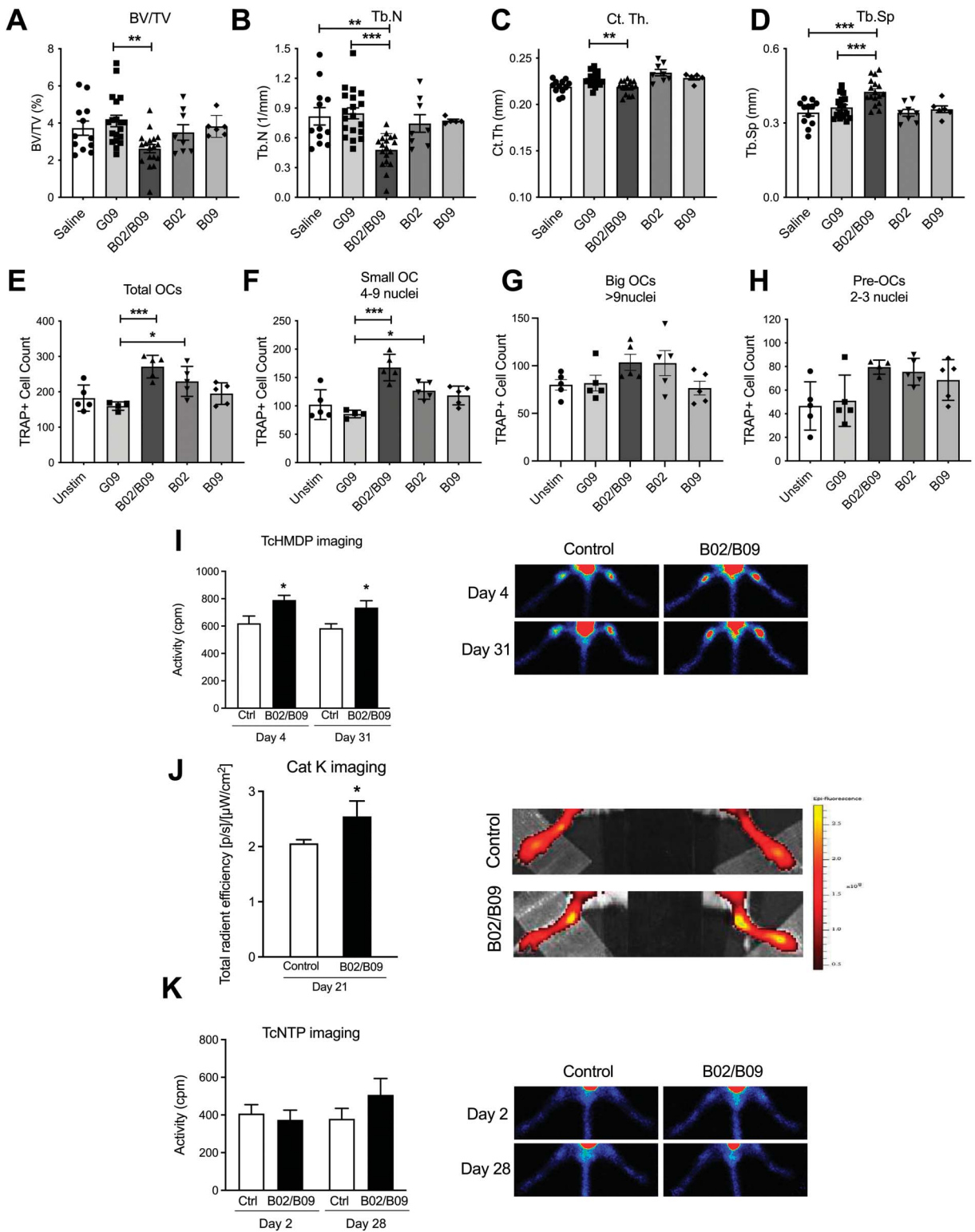
Next, to assess the temporal changes in B02/B09-driven bone metabolism, as well as the potential effect on cartilage remodeling, we performed scintigraphic and near-infrared fluorescent in vivo imaging. The <sup>99m</sup>Tc-HMDP radiotracer is used for bone scanning because it accumulates in areas of active bone metabolism. We found a significant increased accumulation of <sup>99m</sup>Tc-HMDP at days 4 and 31 after B02/B09 administration (**Fig. 4I**) compared with PBS administration. This indicates that the B02/B09 mAbs rapidly increased bone metabolism. Cat K 680 FAST is an activatable fluorescent agent that is optically silent on injection and produces fluorescent signal after cleavage by cathepsin K. A significant increase in cathepsin K signal in the ankle joint at day 21 after B02/B09 administration was observed compared with the PBS-injected group (**Fig. 4J**), reinforcing the micro-CT and <sup>99m</sup>Tc-HMDP scintigraphic observations. <sup>99m</sup>Tc-NTP targets proteoglycans and is used as a radioligand for in vivo functional monitoring of cartilage involvement.<sup>62</sup> We did not detect any statistically significant increase of <sup>99m</sup>Tc-NTP accumulation within the ankle joints at days 2 and 28 in mice injected with B02/B09 (**Fig. 4K**) compared with PBS injection, indicating a lack of in vivo cartilage remodeling. Overall, these results show that only B02 combined with B09 drive osteoclastogenesis in vitro and bone remodeling that leads to increased bone erosion in vivo.

### 3.5. Osteoclast inhibitors reverse B02/B09-induced mechanical hypersensitivity

To assess whether the observed bone remodeling is involved in B02/B09-induced mechanical hypersensitivity, we examined the antinociceptive effect of 2 osteoclast inhibitors with different mechanisms of action. Daily administration of T06 (40 mg/kg), a cathepsin K inhibitor which inhibits osteoclast activity, prevented mechanical allodynia development after B02/B09 administration compared with the vehicle control group (**Fig. 5A**). In a separate experiment, mice received zoledronate (100 μg/kg), which is a nitrogen-containing bisphosphonate that leads to osteoclast apoptosis and prevents bone mineral dissolution and matrix digestion.<sup>21</sup> When injected on days 1, 4, 7, and 10 after B02/B09



**Figure 3.** B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is reversed by morphine but not an NSAID or paracetamol. (A) Repeated treatment with naproxen (50 mg/kg, i.p.) on days 10, 11, and 12 post-mAb injection does not reverse mechanical hypersensitivity induced by human B02/B09 antibodies. (B) Paracetamol (200 mg/kg; i.p.) administered on day 21 post-mAb injection has no analgesic effect in B02/B09-injected mice, measured 45 minutes post-drug administration. (C) Bolus injection of morphine (3 mg/kg, s.c.) administered on day 17 post-mAb reverses mechanical hypersensitivity induced by B02/B09, assessed 30 and 60 minutes post-drug administration. \*\* $P < 0.01$ , compared with saline vehicle control. Data presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  to 7/group. \*\* $P < 0.01$ , compared with saline vehicle control. Dashed line indicates dosing period. BL, baseline; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug.



**Figure 4.** Intravenous injection of B02/B09 mAbs alters bone homeostasis and induces bone erosion. Micro-CT analysis of the proximal tibia shows that B02/B09 (2 mg i.v.) significantly reduces (A) trabecular bone volume (BV/TV), (B) trabecular number (Tb.N), and (C) cortical thickness (Ct. Th) and increases (D) trabecular separations (Tb. Sp) compared with G09 control (G09) or saline (n = 6-19/group). (E) Human B02/B09 increases the total number of TRAP+ osteoclasts in vitro with a significant effect on the number of (F) small osteoclasts (4-9 nuclei), but not (G) big osteoclasts (4-9 nuclei) or (H) preosteoclasts (2-3 nuclei), compared with a control antibody (G09) (n = 5 samples/group). (I) *In vivo* scintigraphy at days 4 and 31 using the <sup>99m</sup>Tc-HMDP radiotracer (n = 8-12 mice/group) and (J) *in vivo* imaging assessing cathepsin K activity at day 21 show that B02/B09 injection stimulates bone remodeling (n = 5/group), compared with saline-injected control. (K) *In vivo* scintigraphy at days 2 and 28 using the <sup>99m</sup>Tc-NTP 15-5 radiotracer shows that B02/B09 does not induce cartilage remodeling (n = 12-14/group), compared with saline-injected control. Data presented as mean ± SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Ctrl, control; OC, osteoclast; TcHMDP, technetium hydroxymethylene diphosphonate; TcNTP, technetium- N-[triethylammonium]-3-propyl-<sup>15</sup>ane-N5; Unstim, unstimulated.



injection, zoledronate also prevented the development of mechanical allodynia in the B02/B09 group compared with the PBS control group (Fig. 5B). At the end of the zoledronate study, ankle joints were collected and processed for mRNA analysis by qPCR. A significant increase in mRNA levels of the osteoclast activity-associated factors, *Acp5* (Fig. 5C), *Ctsk* (Fig. 5D), and *Tcirg1* (Fig. 5E), were observed in the ankle joints of the B02/B9 group, 14 days post injection. Importantly, treatment with zoledronate completely abolished B02/B09-induced upregulation of these factors (Figs. 5C–E). These findings point towards a relationship between increased osteoclast activity and mechanical hypersensitivity in B02/B09-injected mice.

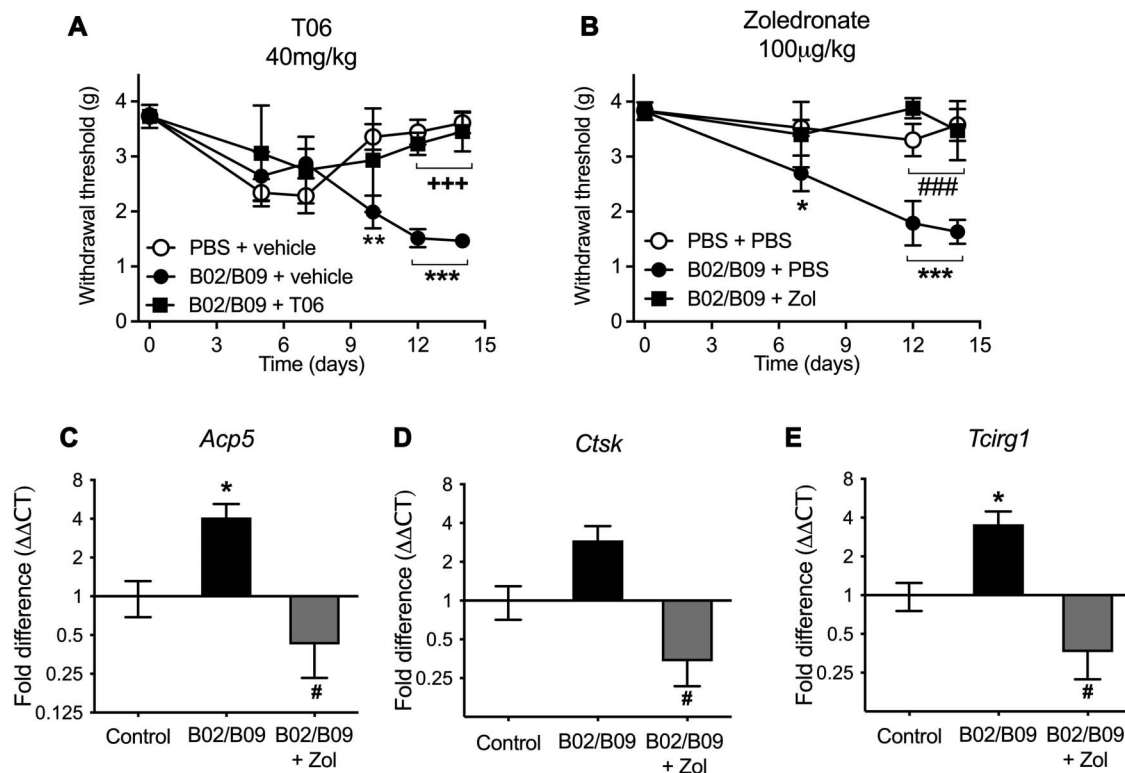
### 3.6. B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is dependent on acid-sensing ion channel 3 activation

As part of the bone resorbing process osteoclasts release protons into an extracellular compartment formed between osteoclasts and bone surface. As nociceptors express acid-sensing proton-gated ion channels such as ASIC3, acidification of the local bone environment can be detected by primary sensory neurons.<sup>42,72</sup> To assess whether ASIC3 is involved in B02/B09-induced mechanical hypersensitivity, we treated mice with APETx2, a selective ASIC3 inhibitor, on 2 separate occasions. Intra-articular administration of APETx2 (20  $\mu$ mol) reversed the mechanical withdrawal threshold in the ipsilateral paw of the injected ankle, both on day 14 (Fig. 6A) and day 23 post-B02/B09 administration (Fig. 6B). The effect was detectable 1 hour postinjection at day 14 and lasted up to 24 hours

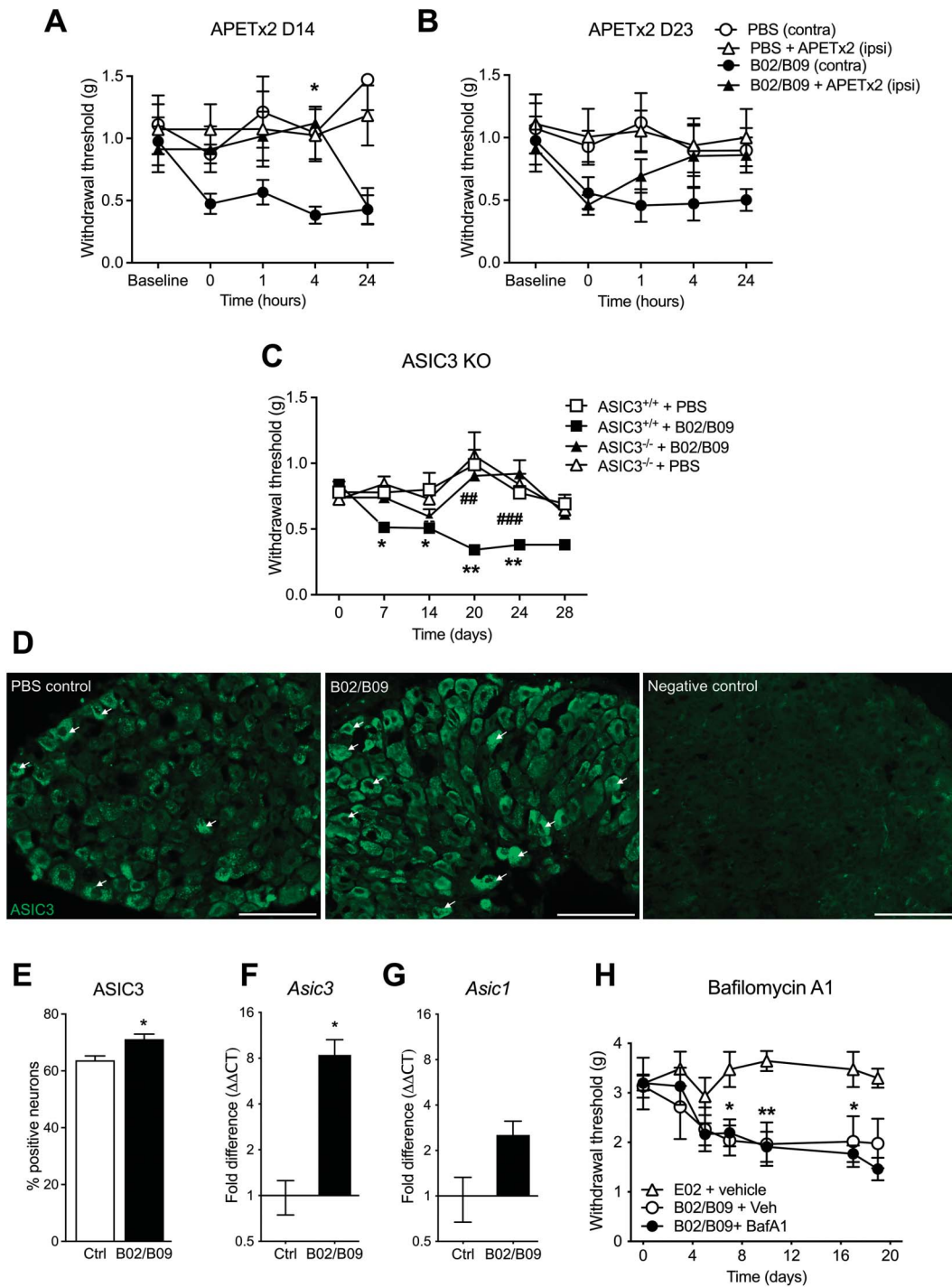
after administration when tested on day 23, compared with the B02/B09 contralateral paw of the saline-injected ankle in both experiments. Intra-articular administration of APETx2 or saline did not change the mechanical paw threshold in the PBS-treated group.

To further strengthen the observations that B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is ASIC3-dependent, we used ASIC3-deficient mice. ASIC3 WT animals developed significant mechanical allodynia from day 7 up to day 28 after B02/B09 administration (Fig. 6C) compared with the ASIC3 WT PBS-treated group. In contrast, ASIC3-deficient mice did not exhibit any significant mechanical allodynia after B02/B09 administration compared with the ASIC3 KO PBS-treated group. Collectively, these results support the involvement of ASIC3 in pain-related behaviors induced by B02/B09 administration.

To assess whether increased osteoclast activity induced changes in ASIC3 expression in primary sensory neurons, we performed ASIC3 immunohistochemistry on L3–L5 DRG from B02/B09-injected mice and PBS controls. Fourteen days post injection, the percentage of ASIC3-positive neurons was significantly increased in the B02/B09-treated group (Figs. 6D and E) compared with the PBS treated group ( $71.18 \pm 0.8\%$  vs  $63.74 \pm 0.77\%$ ). Because ASIC channels are also expressed by osteoclasts and involved in differentiation and acidification, we also assessed gene expression of *Asic1* and *Asic3* in the ankle joints of B02/B09 mice, 14 days after antibody injection. Interestingly, only *Asic3* mRNA expression (Fig. 6F) was significantly increased compared with the PBS group while *Asic1* mRNA expression (Fig. 6G) remained unchanged.



**Figure 5.** B02/B09-induced pain-like behavior is reversed by osteoclast inhibitors. (A) T06 (40 mg/kg) given daily by oral gavage for the whole duration of the study (1–14 days) prevents B02/B09-induced mechanical hypersensitivity, compared with the B02/B09 group treated with distilled water vehicle ( $n = 6$ –8/group). (B) Zoledronate (100  $\mu$ g/kg) administered i.p. on days 1, 4, 7, and 10 post-mAb injection prevents the development of B02/B09-induced pain-like behavior ( $n = 6$ /group). Statistical significance (2-way analysis of variance (ANOVA)) between B02/B09+vehicle and PBS+PBS/veh is marked by \* and difference between B02/B09+vehicle and B02/B09+T06 or B02/B09+Zol is marked respectively with + or #. Data presented as mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Increased gene expression of (C) *Acp5*, (D) *Ctsk*, and (E) *Tcirg1* in ankle joints of B02/B09-injected mice is prevented in zoledronate-treated mice ( $n = 6$ –12/group). Statistical significance (1-way ANOVA) between B02/B09-injected and PBS-injected control is marked by \* and difference between B02/B09 and B02/B09+Zol is marked by #; \* or # $P < 0.05$ . T06, tanshinone IIA sulfonic sodium; Zol, zoledronate.



**Figure 6.** B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is dependent on ASIC3 activation. Intra-articular administration of APETx2 (20  $\mu$ M) into the ankle joint (A) day 14 and (B) day 23 post-mAbs injection transiently reverses mechanical hypersensitivity in the injected paw of B02/B09 mice, compared with the contralateral paw (n = 6-8/group). (C) ASIC3 KO mice do not develop mechanical hypersensitivity after B02/B09 injection in comparison with WT mice (n = 26-29 mice/group until day 14 and n = 9-19/group until day 28). Statistical significance (two-way ANOVA) between ASIC3<sup>-/-</sup> + B02/B09 and ASIC3<sup>+/+</sup> + B02/B09 is marked by #, and difference between ASIC3<sup>+/+</sup> + B02/B09 and ASIC3<sup>+/+</sup> + PBS is marked by \*. (D-E) Fourteen days post-B02/B09 injection, there is a significant increase in ASIC3-positive neurons in L3-5 DRG, compared with the PBS-treated group (71.18  $\pm$  0.8% vs 63.74  $\pm$  0.77%). Negative control was stained only with the secondary antibody, scale bar = 100  $\mu$ m. Arrows point to representative cells with positive ASIC3 staining. (F) *Asic3*, but not *Asic1*, mRNA levels are significantly elevated in ankle joints of B02/B09-injected mice 14 days post-mAb injection compared with the PBS control group. (H) Repeated injections of bafilomycin A1 (25  $\mu$ g/kg, s.c.) on days 12 to 16 post-B02/B09 administration did not reverse mechanical hypersensitivity induced by human B02/B09 compared with the vehicle-injected control group (0.01% DMSO in PBS). Data presented as mean  $\pm$  SEM, \*P < 0.05, \*\*or ##P < 0.01, ###P < 0.001. ANOVA, analysis of variance; ASIC3, acid-sensing ion channel 3; BafA1, bafilomycin A1; Ctrl, control; DRG, dorsal root ganglion.

Because ASIC3 can be activated by protons, we investigated whether blocking proton release through vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase from osteoclasts attenuates mechanical hypersensitivity induced by B02/B09. Repeated dosing of bafilomycin A1

(25  $\mu$ g/kg), a potent and specific inhibitor of V-ATPase that prevents the acidification of vesicles present in the osteoclast ruffled membrane, on days 12 to 16 post-B02/B09 injection did not alter mechanical hypersensitivity in the B02/B09 group

(Fig. 6H). This suggests that B02/B09-induced pain-like behavior is not directly linked to acidification but that other osteoclast-derived ligands are involved in ASIC3 activation instead.

### 3.7. B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is accompanied by increased levels of lysophosphatidylcholine and increased secretory phospholipase A2 activity

Small extracellular pH variations are considered the dominant, endogenous signals that trigger ASIC3 activation. However, certain lipids, such as LPC, induce constitutive activation of ASIC3 at a physiological pH of 7.4 without any extracellular acidification. Furthermore, LPC is increased in joint exudates of patients with RA.<sup>40,58</sup> Therefore, we sought to investigate whether B02/B09-induced pain-like behavior is accompanied by increased LPC levels that could sensitize ASIC3. We assessed the levels of different LPC species in bone marrow extracts of B02/B09-treated mice and controls using mass spectrometry. Of 8 detected LPC species, we found that LPC 16:0 was the most abundant (Fig. 7A) and significantly increased in the B02/B09 group ( $69.38 \pm 12.5$  ng/sample) compared with control ( $38.96 \pm 4.03$  ng/sample).

To ascertain whether B02/B09 could directly activate and/or potentiate ASIC3 currents, we undertook patch-clamp experiments in HEK293 cells transfected with ASIC3. As expected, a typical ASIC3 current was recorded after an extracellular pH drop from pH 7.4 to pH 7.0, with a transient peak and a sustained plateau (Figs. 7B and C). No significant changes of this pH 7.0-evoked ASIC3 current was observed after acute exposure of the cells to B02/B09 (1  $\mu$ g/mL for each) compared with its vehicle (Fig. 7D). B02/B09 was also unable to activate any ASIC3 current at resting pH 7.4 (Fig. 7E). By contrast, and as previously shown,<sup>58</sup> LPC 16:0 extracellular application both activated ASIC3 at resting pH 7.4 and potentiated its pH 7.0-evoked current (Figs. 7C–E). Together, these data demonstrated that, contrary to LPC, the B02/B09 mix had no acute effects on ASIC3 channel activity.

### 3.8. B02/B09-induced pain-like behavior and bone erosion are associated with increased secretory phospholipase A2 activity

Because B02/B09-injection leads to a significant elevation of LPC 16:0 content in the bone marrow, we assessed whether gene expression levels of sPLA<sub>2</sub> isoforms involved in LPC production (*Pla2g2a*, *Pla2g5*, and *Pla2g10*) were increased in the ankle joints of B02/B09-injected mice. Fourteen days post antibody administration, *Pla2g2a* (Fig. 8A) and *Pla2g5* (Fig. 8B) mRNA levels in the B02/B09 group were significantly increased and, importantly, reduced in ankle joints of mice treated with zoledronate. *Pla2g10* mRNA levels in the B02/B09 groups receiving vehicle or zoledronate were unchanged compared with control (Fig. 8C). By contrast, *Pla2g2a* and *Pla2g5* expression in joints from the inflammatory phase of CAIA did not change and even showed a tendency towards being downregulated, although not statistically significant (Figs. 8A and B). *Pla2g10* was also unchanged in CAIA mice (Fig. 8C). Taken together, this suggests that the altered *Pla2g2a* and *Pla2g5* gene expressions in the B02/B09 group are unlikely to be associated with ongoing inflammation.

Finally, to address whether B02/B09 mAb-induced pain-like behavior is dependent on elevated sPLA<sub>2</sub> activity, mice with B02/B09-induced hypersensitivity were treated with varespladib, an inhibitor of the IIa, V, and X isoforms of secretory PLA<sub>2</sub>. A dose

escalation study was performed, where 3 mg/kg/d was administered once a day for 3 days (initiated day 16 post-B02/B09 injection), followed by 6 mg/kg twice a day for the next 5 consecutive days of the study. Repeated injections of varespladib resulted in significant reversal of mechanical hypersensitivity in the treated group at day 24 post-B02/B09 injection, compared with mice that received vehicle (Fig. 8D). Importantly, treatment with varespladib significantly reversed B02/B09-induced bone erosion in the talus bone (Figs. 8E–H), suggesting that sPLA<sub>2</sub> contributes to autoantibody-driven bone loss in this model (Fig. 9).

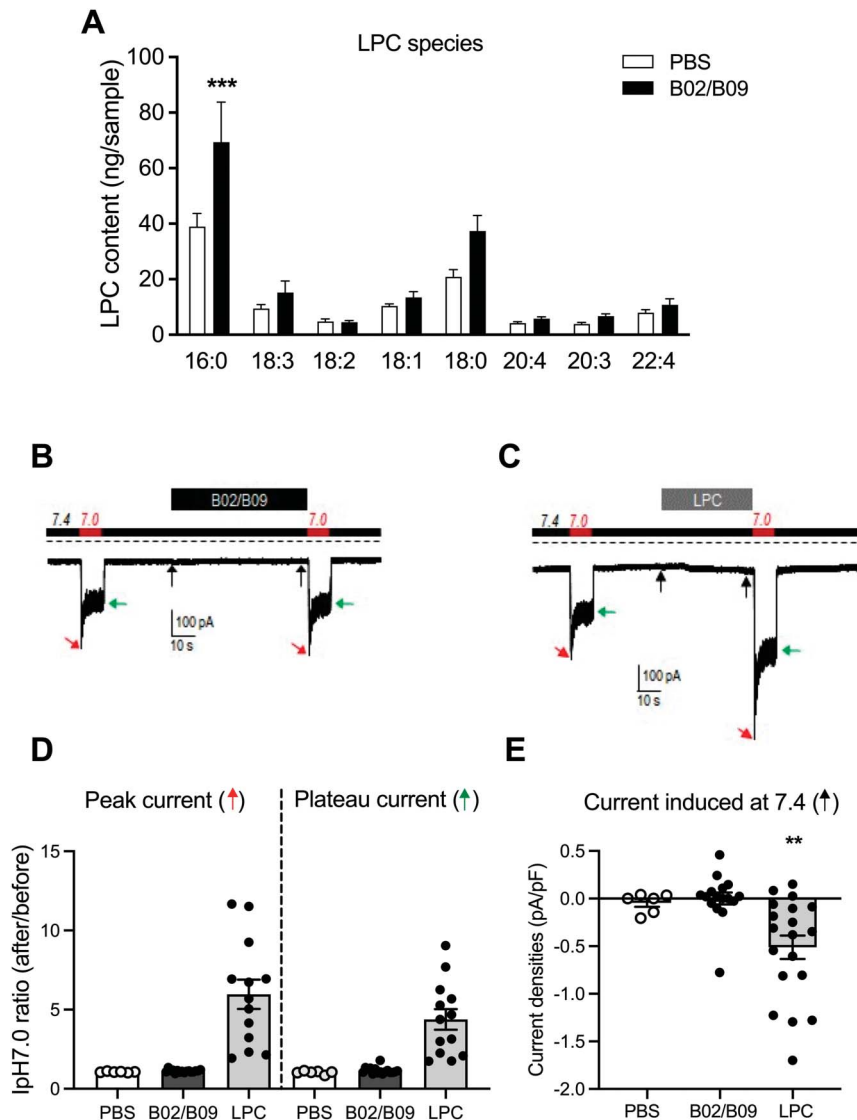
Lysophosphatidylcholine may serve as a substrate for autotaxin, the LPC to LPA converting enzyme that has been linked to nociception through the activation of LPA receptors (*Lpa1-6*).<sup>38,95</sup> To rule out the possible LPA involvement in this model, we assessed the expression of autotaxin (*Enpp2*) and LPA receptors (*Lpa1-6*) in the ankle joints from mice injected with B02/B09 (Fig. S1A–E, available as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/B542>); however, neither mRNA levels were elevated in the B02/B09 joints compared with control mice.

## 4. Discussion

In this study, we have linked bone erosion induced by 2 mAbs originally isolated from B cells of patients with RA to mechanical hypersensitivity in mice. The absence of edema and synovitis, lack of analgesic effect of naproxen, and modest change in inflammatory mediators suggest that B02/B09-induced pain-like behavior is independent of classical inflammatory processes. By contrast, we found that inhibiting osteoclast activity and ASIC3 signaling prevented the development of B02/B09-mediated pain-related behavior. Our data further suggest that sPLA<sub>2</sub> and LPC 16:0 contribute to sensitization, representing a potential novel link between increased osteoclast activity and ASIC3-mediated hypersensitivity.

Rheumatoid arthritis has a preclinical phase before diagnosis, where levels of circulating autoantibodies are increasing but clinical signs of disease are absent or sparse.<sup>84</sup> Autoantibodies, such as B09, that are reactive to antigens with different posttranslational modifications, such as citrullination, acetylation, and carbamylation, are detected during this period.<sup>8,26,43</sup> In vitro studies have shown that B09 lacks stimulatory effects on osteoclasts<sup>86</sup> but does bind nuclear antigens in activated neutrophils<sup>55</sup> and stimulates migration of stressed fibroblast-like synoviocytes.<sup>89</sup> Here, we show that after systemic administration to mice, B09 induces transient mechanical hypersensitivity in the absence of bone loss. The pronociceptive and osteoclast-activating actions of B02 are in line with our previous work.<sup>50,98</sup> However, at that time, we ascribed the actions of B02 to binding of citrullinated epitopes; extensive analysis with new optimized assays has demonstrated that it does not have any detectable citrulline specificity<sup>27,81</sup> and its antigen reactivity remains unknown. A potential caveat of our animal model is that the human-derived antibodies were developed against human posttranslational modifications and the exact same epitopes may not occur in mice. Although the lack of known B02 antigenicity, together with the use of only 2 patient-derived mAbs is a weakness of the study, we considered this RA synovial antibody combination to be a useful tool to study the pathogenic link between bone loss and pain in the absence of pronounced tissue inflammation.

Subclinical joint inflammation<sup>9</sup> and the action of autoantibodies in a monomeric or immune complex form<sup>33,47</sup> have been suggested to be sufficient to trigger osteoclast differentiation and bone erosion. Interestingly, in our model, we did not detect



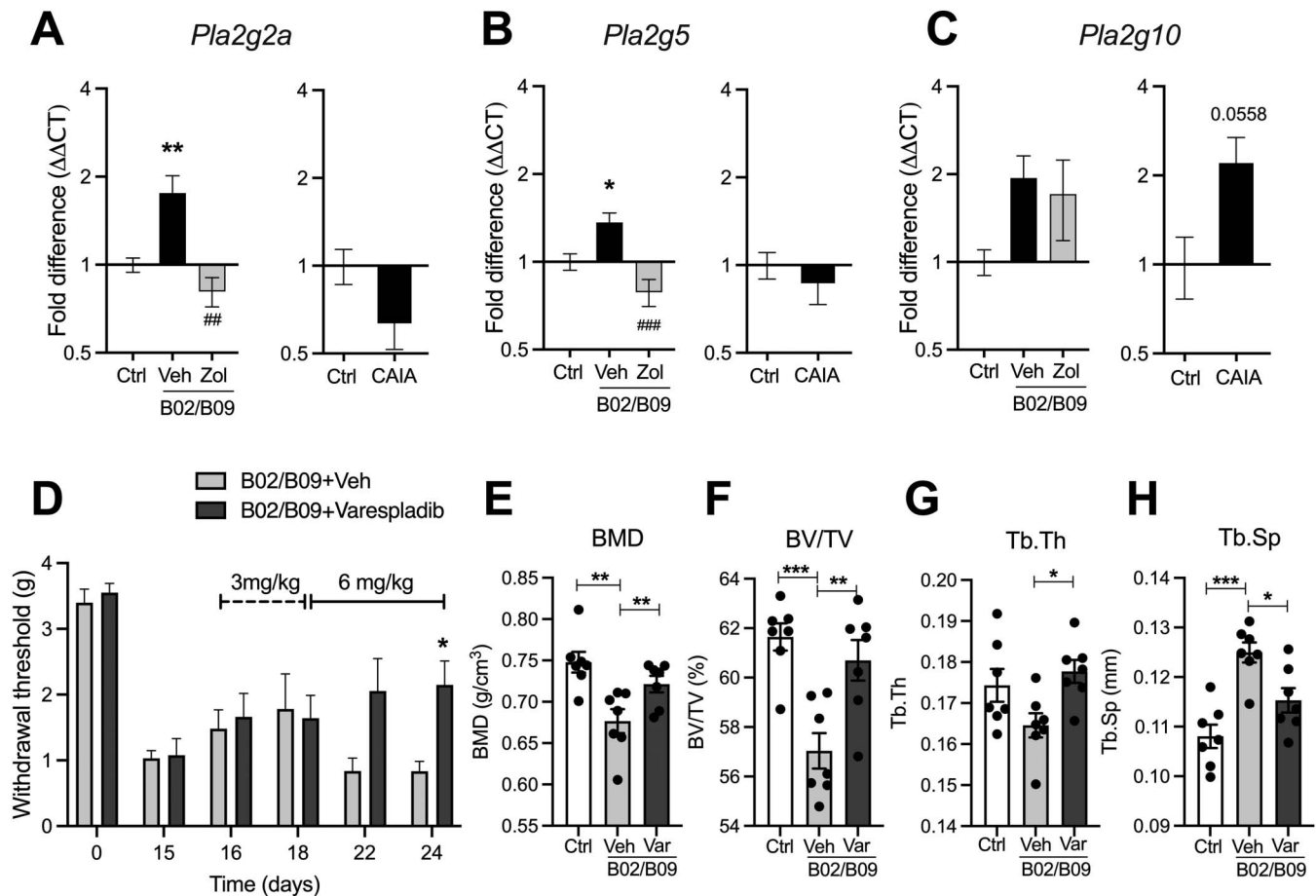
**Figure 7.** B02/B09-induced mechanical hypersensitivity is associated with increased levels of LPC 16:0. (A) Mass spectrometry analysis of total LPC concentration reveals that LPC 16:0 is the only LPC species significantly increased in bone marrow samples from B02/B09-injected mice, compared with PBS control ( $69.4 \pm 12.5$  ng/sample vs  $39.0 \pm 4.0$  ng/sample,  $n = 6-7$  mice/group,  $***P < 0.001$ ). (B–C) Typical ASIC3 currents recorded in patch clamp (HP -80 mV) from HEK293-transfected cells. Currents were elicited by extracellular pH drops from resting pH 7.4 to pH 7.0, before and after acute exposure of the cells to (B) B02/B09 (1  $\mu$ g/mL each for 1 minute) or to (C) LPC 16:0 (10  $\mu$ M for 25–50 seconds), as indicated by the timelines above current traces. Dotted lines indicate the zero-current level, and arrows show the effects of B02/B09 or LPC 16:0 on the basal current (black arrows), the pH 7.0-evoked peak current (red arrows), or the pH 7.0-evoked plateau current (green arrows). (D) Statistical analysis of the effects of B02/B09 and its vehicle (PBS) or LPC 16:0 on pH 7.0-evoked ASIC3 current. Data are presented as the peak and plateau current ratios after/before applications of B02/B09 and its vehicle (PBS) or LPC 16:0 ( $n = 6-16$ ),  $***P < 0.001$ . (E) Effects of B02/B09, its vehicle (PBS) or LPC 16:0 on the current densities recorded at resting pH 7.4 from ASIC3-expressing HEK cells ( $n = 6-19$ ,  $**P < 0.01$ ). ASIC3, acid-sensing ion channel 3; HEK, human embryonic kidney; LPC, lysophosphatidylcholine.

significant signs of synovitis or visible joint inflammation. Increased serum levels of TNF and IL-6 have been reported in the preclinical phase of RA<sup>87</sup> and together can stimulate osteoclastogenesis directly<sup>69</sup> and indirectly by upregulating RANKL in synovial fibroblasts.<sup>34,93</sup> Although we did not assess systemic cytokine levels, there was only a modest upregulation of *Tnf*, *Il-6*, and *Ptgs2* in the joint. Of note, morphine reversed the hypersensitivity in B02/B09 mice but naproxen was without effect, indicating a prostaglandin-independent mechanism. We have not assessed other pain modalities in B02/B09 mice, and although we predict that these analgesics would mount a similar effect in other behavioral readouts, future studies assessing spontaneous behavioral changes are important. Taken together, pronounced “classical” inflammatory processes are unlikely to

drive B02/B09-induced mechanical hypersensitivity indicating that other mechanisms, including osteoclast activity, have a more prominent role.

Accumulating data suggest that bone erosion does not only correlate with disease activity and synovial inflammation<sup>56,101</sup> but may also occur before onset of joint inflammation.<sup>47</sup> Considering this, we were intrigued that the B02 and B09 combination induced pain-related behaviors and bone erosion in the absence of synovitis. Interestingly, significant *in vivo* bone erosion in mice was detected only with the B02/B09 combination suggesting that these 2 antibodies initiate a combination of processes that are needed to significantly alter bone morphology. Consequently, 2 osteoclast inhibitors, zoledronate and T06,<sup>71</sup> completely prevented the development of B02/B09-induced mechanical hypersensitivity. A



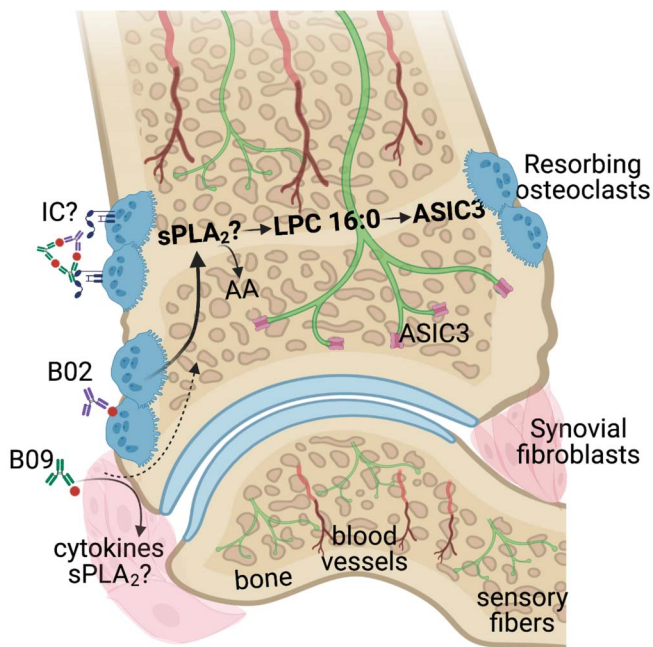


**Figure 8.** B02/B09-induced pain-like behavior and bone erosion are associated with increased sPLA<sub>2</sub> activity. (A) *Pla2g2a* and (B) *Pla2g5*, but not (C) *Pla2g10*, mRNA levels are significantly elevated in the ankle joints of B02/B09-injected mice compared with PBS-injected mice. Treatment with zoledronate prevents the increase in gene expression of *Pla2g2a* and *Pla2g5* but not *Pla2g10* ( $n = 6$  mice/group). (A) *Pla2g2a*, (B) *Pla2g5*, and (C) *Pla2g10* mRNA levels are not elevated in the ankle joints from mice subjected to CAIA collected during the inflammatory phase (day 16), compared with joints from control mice ( $n = 5$ /group). mRNA data were normalized to *Rplp2* mRNA levels and are presented as fold changes. Statistical significance (1-way ANOVA) between B02/B09 and control is marked by \*, and difference between B02/B09 and B02/B09+Zol is marked by #. (D) An escalation-dose study with varespladib (3 mg/kg on days 16–18 and 6 mg/kg on days 19–24 post-B02/B09 administration) attenuates pain-like behavior in mice injected with human B02/B09 compared with B02/B09 mice treated with vehicle (20% DMSO in PBS) ( $n = 6$ –7/group). The dashed line indicates dosing period with 3 mg/kg varespladib and the solid line indicates the dosing period with 6 mg/kg varespladib. Statistical significance (2-way ANOVA) between B02/B09 group treated with varespladib and B02/B09 group treated with vehicle is marked by \*. Micro-CT analysis of talus bone shows that varespladib significantly reverses B02/B09-induced bone erosion increasing (E) BMD, (F) BV/TV, and (G) Tb.Th and decreasing (H) Tb.Sp. compared with B02/B09 mice treated with the vehicle ( $n = 7$ /group). Data presented as mean  $\pm$  SEM, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $##P < 0.01$ , \*\*\*,  $###P < 0.001$ . ANOVA, analysis of variance; BMD, bone mineral density; CAIA, collagen antibody-induced arthritis; Ctrl, control; sPLA<sub>2</sub>, secretory phospholipase A<sub>2</sub>; Veh, vehicle; Var, varespladib; Zol, zoledronate.

potential weakness of our pharmacology studies is that zoledronate also alters microglia and macrophage activity, which can reduce pain.<sup>77</sup> However, our findings are likely independent of these cells because the role of microglia in nociception is coupled to male mice<sup>65</sup> and female mice were used in our study. Zoledronate's actions on macrophages in vivo are linked to cytokine release<sup>45</sup>; however, in our model, it did not reduce expression of the upregulated cytokines (*Tnf*, *Il-6*, or *Ptgs2*) in the joint. Although we cannot exclude that off-target effects may contribute to our observations, 2 osteoclast inhibitors with different mechanisms of action yielded similar antinociceptive results, which supports previous findings showing efficacy of osteoclast inhibitors in models of several difficult-to-treat pain states.<sup>94</sup>

Increased resorptive activity of osteoclasts is associated with acidification of the extracellular compartment.<sup>80</sup> Acid-sensing ion channel 3, expressed by peripheral nociceptors, becomes activated at pH  $\approx 7.2$  and is likely important in the nonadapting pain caused by tissue acidosis, particularly because it has the ability to sensitize nociceptors to other types of stimuli.<sup>18</sup> As

preclinical evidence suggests a key role of ASIC3 in inflammatory<sup>36,65,100</sup> and noninflammatory pain with bone pathology, such as osteoarthritis<sup>39</sup> and osteoporosis,<sup>20,31</sup> we examined whether B02/B09-induced mechanical hypersensitivity was dependent on ASIC3 activation. Using APETx2, an inhibitor of ASIC3-containing channels, as well as a global, functional ASIC3 knockout, we identified ASIC3 signaling as a critical component of B02/B09-induced hypersensitivity. A potential caveat of the pharmacological approach is that APETx2 was demonstrated to block Na<sub>v</sub>1.8 currents<sup>6</sup>; however, by complementing it with a genetic approach, we have excluded the potential off-target involvement. We also saw an upregulation of ASIC3 protein in DRG neurons 2 weeks after injection of B02/B09, suggesting either a feed-forward regulation and/or induction through subclinical inflammation, as suggested previously.<sup>66,73,97,103</sup> To investigate whether resorbing osteoclasts contribute to B02/B09-induced hypersensitivity through the release of protons, we used bafilomycin A1, an inhibitor of V-ATPase, which is the primary cellular mechanism responsible for osteoclast acidification.<sup>80</sup> Surprisingly, although



**Figure 9.** Proposed mechanism for B02/B09-induced bone erosion and mechanical hypersensitivity in the mouse joint. B02 and B09 mAbs bind their epitopes on osteoclasts and fibroblasts and/or form immune complexes (ICs) that stimulate Fc $\gamma$  receptors on osteoclasts and drive osteoclastogenesis. As a result of B02 and B09 binding, several pronociceptive factors are released including sPLA<sub>2</sub> which catalyzes the formation of LPC 16:0 that further activates ASIC3 located on the sensory nerve endings innervating the bone, inducing mechanical hypersensitivity. The exact cellular source of sPLA<sub>2</sub> remains to be elucidated. ASIC3, acid-sensing ion channel 3; LPC, lysophosphatidylcholine; mAb, monoclonal antibody; sPLA<sub>2</sub>, secretory phospholipase A2.

bafilomycin A1 attenuates osteoclast-mediated pain-related behaviors in cancer models,<sup>35,66</sup> it did not diminish B02/B09-induced mechanical hypersensitivity in mice. We speculate that alternative osteoclast-derived ligands couple osteoclast activity with ASIC3 sensitization and protons are not required for induction of B02/B09-induced hypersensitivity.

Importantly, ASIC3 acid-induced currents are potentiated by lipids such as LPC, which can also<sup>18,58</sup> directly activate ASIC3, even in the absence of extracellular acidification.<sup>58</sup> Intraplantar injection of LPC 18:1<sup>78</sup> and LPC 16:0<sup>28</sup> induces mechanical and cold hypersensitivity, respectively. Although the exact mechanisms behind LPC-induced pain-like behavior are still under investigation, some studies point towards ASIC3 as the main mediator of LPC-induced hypersensitivity.<sup>37,58</sup> Of note, elevated levels of LPC and sPLA<sub>2</sub>, an enzyme family needed for LPC production, have been reported in plasma and synovial fluid of patients with RA and osteoarthritis and individuals with painful joints,<sup>30,49,58,102</sup> suggesting that LPC may also contribute to pain in humans. Furthermore, injection of sPLA<sub>2</sub> induces hypersensitivity,<sup>12,13</sup> and several studies indicate a role of sPLA<sub>2</sub> in several different models of persistent pain.<sup>46,74,90,92</sup> Of note, we found (1) elevated levels of LPC 16:0 in bone marrow, (2) direct activation and potentiation of ASIC3 by LPC 16:0 and not B02/B09 in vitro, (3) increased mRNA levels for 2 sPLA<sub>2</sub> isoforms (*Pla2g2* and *Pla2g5*) in the ankle joints of B02/B09-injected mice, and (4) that inhibition of sPLA<sub>2</sub> reversed both mechanical hypersensitivity and bone erosion induced by B02/B09 mAbs. Thus, our data point to a role of sPLA<sub>2</sub> and LPC in pain behavior in our model.

We have not yet determined the cellular source of sPLA<sub>2</sub> that contributes to B02/B09-induced hypersensitivity, but intriguingly, in specific conditions, osteoclasts, chondrocytes, and fibroblasts-like synoviocytes can generate sPLA.<sup>2,10,53,61,76</sup> Thus, we speculate that either B02-activated osteoclasts or fibroblasts, activated by B09, release sPLA<sub>2</sub> followed by the subsequent formation of extracellular LPC, particularly LPC 16:0, that ultimately activates ASIC3 on nociceptors and osteoclasts. Because LPC 16:0, unlike acid, activates ASIC3 in a noninactivating manner it is likely that it will sensitize primary afferent neurons to mechanical stimuli.<sup>18,79,96</sup> Alternatively, LPC 16:0 can directly sensitize ASIC3 to mechanical stimuli, leading to alterations of mechanical neuronal response of primary afferent neurons. Finally, LPC could be converted to LPA and act through LPA receptors present on nociceptors and osteoclasts, although we did not find any indications of increased expression of the LPC to LPA converting enzyme autotaxin or LPA receptors in the B02/B09 joints. Furthermore, low levels of cytokines released from joint cells and changes in pH in response to B02/B09, together with the presence of sPLA<sub>2</sub>-mediated products, may sensitize the nociceptors.

In summary, our work presents a novel mechanism on how RA autoantibodies can drive mechanical hypersensitivity. Our findings couple bone erosion to pain during stages of subclinical inflammatory activity and thus offer a step forward in understanding the mechanisms of arthralgia in individuals with “preclinical RA”. This is important because although the inflammatory component of joint pain has been extensively studied in arthritis, we still lack understanding on how pain is induced and sustained in the early phase of arthritis, when joint swelling cannot be identified through physical examination, but bone erosion and pain are already present. Pinpointing the interactions between activated osteoclasts and sensory nerve fibers innervating the joints will allow for better treatment of arthralgia but also other pain conditions characterized by altered bone metabolism.

### Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Acknowledgements

This work was supported by Swedish Research Council (2013-8373 and 2015-02776), Knut and Alice Wallenberg Foundation, Ragnar Söderberg Foundation, William K. Bowes Foundation, Family Lundblad Foundation, and the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 602919 (GLORIA), and the EU/EFPIA Innovative Medicines Initiative (IMI) 2 Joint Undertaking project RTCure 777357. A. Jurczak is funded by the European Union Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 642720 (BonePain). L. Delay was funded by the Conseil Régional Auvergne-Rhône-Alpes (project Ressourcement S3, Arth-Innov). This work was also supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE16-0018), the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25), and the Association Française contre les Myopathies (AFM, grant #19618). E. Krock was funded by the John J. Bonica fellowship from the International Association for the Study of Pain. This work was partially supported by the CONACYT-316211 for J.M. Jiménez-Andrade. The authors also acknowledge Azar Baharpoor for her technical assistance and thank Lena Israelsson, Ragnhild

Stålesen, Johanna Steen, and Khaled Amara for generation, expression, and validation of monoclonal antibodies. Author contributions: A. Jurczak, L. Delay, F. Marchand, and C.I. Svensson designed the study, analyzed the data, discussed the outcome of experiments, and wrote the manuscript. A. Jurczak, L. Delay, J. Barbier, K. Sandor, N.M. Agalave, G. Wigerblad, and K. Rogóż performed behavioral experiments. A. Jurczak, E. Krock, and N. Simon performed cell culture experiments and gene expression analysis. A. Jurczak, J. Barbier, and L. Delay performed immunoassays and histological studies. J.M. Jiménez-Andrade and A. Martínez-Martínez performed  $\mu$ CT analysis. R. Rudjito assisted in cell culture and histology experiments. E. Deval and B. Labrum performed patch-clamp experiments. S. Khoury and T. Ferreira performed the lipidomics analysis. A. Briat and E. Miot-Noirault performed in vivo scintigraphic and fluorescence analysis. C. Grönwall, V. Malmström, and L. Klareskog provided and characterized mAbs. D. Brömme provided T06 compound. All coauthors provided critical feedback. The raw data that support the findings of this study are available from the corresponding author (C.I. Svensson) on request.

## Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B542> and <http://links.lww.com/PAIN/B543>.

## Supplemental video content

A video abstract associated with this article can be found at <http://links.lww.com/PAIN/B543>.

## Article history:

Received 12 June 2021

Received in revised form 28 September 2021

Accepted 30 September 2021

Available online 19 November 2021

## References

- [1] Abe Y, Iba K, Takada J, Wada T, Yamashita T. Improvement of pain and regional osteoporotic changes in the foot and ankle by low-dose bisphosphonate therapy for complex regional pain syndrome type I: a case series. *J Med Case Rep* 2011;5:349.
- [2] Allard-Chamard H, Haroun S, De Brum-Fernandes AJ. Secreted phospholipase A2 type II is present in Paget's disease of bone and modulates osteoclastogenesis, apoptosis and bone resorption of human osteoclasts independently of its catalytic activity in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2014;90:39–45.
- [3] Altawil R, Saevarsdottir S, Wedrén S, Alfredsson L, Klareskog L, Lampa J. Remaining pain in early rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Care Res* 2016;68:1061–8.
- [4] Amara khaled, Israelsson L, Stålesen R, Sahlström P, Steen J, Malmström V, Grönwall C. A refined protocol for identifying citrulline-specific monoclonal antibodies from single human B cells from rheumatoid. *Arthritis Patient Mater Bio-Protocol* 2019;9:e3347.
- [5] Bas DB, Su J, Sandor K, Agalave NM, Lundberg J, Codeluppi S, Baharpoor A, Nandakumar KS, Holmdahl R, Svensson CI. Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency. *Arthritis Rheum* 2012;64:3886–96.
- [6] Blanchard MG, Rash LD, Kellenberger S. Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br J Pharmacol* 2012;165:2167–77.
- [7] Boyden SD, Hossain IN, Wohlfahrt A, Lee YC. Non-inflammatory causes of pain in patients with rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2016;18:30.
- [8] Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes REM, Klareskog L, Trouw LA, Rantapää-Dahlqvist S. Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res Ther* 2015;17:25.
- [9] Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, Peterfy CG, Hensor E, Wakefield RJ, O'Connor PJ, Emery P. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2958–67.
- [10] Bryant KJ, Bidgood MJ, Lei PW, Taberner M, Salom C, Kumar V, Lee L, Church WB, Courtenay B, Smart BP, Gelb MH, Cahill MA, Graham GG, McNeil HP, Scott KF. A bifunctional role for group IIA secreted phospholipase A2 in human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 2011;286:2492–502.
- [11] Catrina AI, Svensson CI, Malmström V, Schett G, Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:79–86.
- [12] Chacur M, Gutiérrez JM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Britto LRG, Maier SF, Watkins LR, Cury Y. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. *PAIN* 2004;111:65–76.
- [13] Chacur M, Milligan ED, Sloan EM, Wieseler-Frank J, Barrientos RM, Martin D, Poole S, Lomonte B, Gutiérrez JM, Maier SF, Cury Y, Watkins LR. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *PAIN* 2004;108:180–91.
- [14] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55–63.
- [15] Christianson CA, Corr M, Firestein GS, Mobargha A, Yaksh TL, Svensson CI. Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *PAIN* 2010;151:394–403.
- [16] de Clauser L, Santana-Varela S, Wood JN, Sikandar S. Physiologic osteoclasts are not sufficient to induce skeletal pain in mice. *Eur J Pain* 2021;25:199–212.
- [17] Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, Yogendran G, Sukovic T, Wong BYL, Verma S, Pritchard KI, Trudeau M, Cole DEC. Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:4895–900.
- [18] Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diocot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Languuglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 2008;27:3047–55.
- [19] Diocot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 2004;23:1516–25.
- [20] Dohke T, Iba K, Hanaka M, Kanaya K, Abe Y, Okazaki S, Yamashita T. Regional osteoporosis due to osteoclast activation as a trigger for the pain-like behaviors in tail-suspended mice. *J Orthop Res* 2017;35:1226–36.
- [21] Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008;83:1032–45.
- [22] Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, Voilley N. Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 2006;26:5800–9.
- [23] Farinotti AB, Wigerblad G, Nascimento D, Bas DB, Urbina CM, Nandakumar KS, Sandor K, Xu B, Abdelmoaty S, Hunt MA, Möller KÄ, Baharpoor A, Sinclair J, Jardemark K, Lanner JT, Khmaladze I, Borm LE, Zhang L, Wermeling F, Cragg MS, Lengqvist J, Chabot-Doré AJ, Diatchenko L, Belfer I, Collin M, Kultima K, Heyman B, Jimenez-Andrade JM, Codeluppi S, Holmdahl R, Svensson CI. Cartilage-binding antibodies induce pain through immune complex-mediated activation of neurons. *J Exp Med* 2019;216:1904–24.
- [24] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- [25] Fuseya S, Yamamoto K, Minemura H, Yamaori S, Kawamata T, Kawamata M. Systemic QX-314 reduces bone cancer pain through selective inhibition of transient receptor potential vanilloid subfamily 1-expressing primary afferents in mice. *Anesthesiology* 2016;125:204–18.
- [26] Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes REM, Huizinga TWJ, Demoruelle MK, Kolfenbach JR, Zerbe GO, Deane KD, Edison JD, Gilliland WR, Norris JM, Holers VM. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *J Rheumatol* 2015;42:572–9.



- [27] Ge C, Xu B, Liang B, Lönnblom E, Lundström SL, Zubarev RA, Ayoglu B, Nilsson P, Skogh T, Kastbom A, Malmström V, Klareskog L, Toes REM, Rispen T, Dobritzsch D, Holmdahl R. Structural basis of cross-reactivity of anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:210–21.
- [28] Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 2010;6:4.
- [29] Ghilardi JR, Röhrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, Kubota K, Halvorson KG, Poblete J, Chaplan SR, Dubin AE, Carruthers NI, Swanson D, Kuskowski M, Flores CM, Julius D, Mantyh PW. Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci* 2005;25:3126–31.
- [30] Gonzalez-Burítica H, Smith DM, Turner RA. Characterisation of soluble and cell associated phospholipase A2 from rheumatoid synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1989;48:557–64.
- [31] Hanaka M, Iba K, Dohke T, Kanaya K, Okazaki S, Yamashita T. Antagonists to TRPV1, ASICs and P2X have a potential role to prevent the triggering of regional bone metabolic disorder and pain-like behavior in tail-suspended mice. *Bone* 2018;110:284–94.
- [32] Hansson M, Mathsson L, Schleder T, Israelsson L, Matsson P, Nogueira L, Jakobsson PJ, Lundberg K, Malmström V, Serre G, Holmdahl R, Nystrand M, Klareskog L, Rönnelid J. Validation of a multiplex chip-based assay for the detection of autoantibodies against citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R201.
- [33] Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012;122:1791–802.
- [34] Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- $\alpha$  and IL-17. *Rheumatology* 2008;47:1635–40.
- [35] Hiasa M, Okui T, Allette YM, Ripsch MS, Sun-Wada GH, Wakabayashi H, Roodman GD, White FA, Yoneda T. Bone pain induced by multiple myeloma is reduced by targeting V-ATPase and ASIC3. *Cancer Res* 2017;77:1283–95.
- [36] Hsieh WS, Kung CC, Huang SL, Lin SC, Sun WH. TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 2017;7:8870.
- [37] Hung CH, Lee CH, Tsai MH, Chen CH, Lin HF, Hsu CY, Lai CL, Chen CC. Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Ann Rheum Dis* 2020;79:1644–56.
- [38] Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJA, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 2004;10:712–18.
- [39] Izumi M, Ikeuchi M, Ji Q, Tani T. Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci* 2012;19:77.
- [40] Jacquot F, Khoury S, Labrum B, Delanoe K, Pidoux L, Barbier J, Delay L, Bayle A, Aissouni Y, Barriere DA, Kultima K, Freyhult E, Hugo A, Kosek E, Ahmed AS, Jurczak A, Lingueglia E, Svensson CI, Breuil V, Ferreira T, Marchand F, Deval E. Lysophosphatidyl-choline 16:0 mediates persistent joint pain through Acid-Sensing Ion Channel 3: preclinical and clinical evidences. *bioRxiv* 2021.
- [41] Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Ferng AS, Geffre CP, Mantyh PW. Bone cancer pain. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1198:173–81.
- [42] Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 2004;24:10974–9.
- [43] Juarez M, Bang H, Hammar F, Reimer U, Dyke B, Sahbudin I, Buckley CD, Fisher B, Filer A, Raza K. Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1099–107.
- [44] Kadri L, Ferru-Clément R, Bacle A, Payet LA, Cantereau A, Hélye R, Becq F, Jayle C, Vandebrouck C, Ferreira T. Modulation of cellular membrane properties as a potential therapeutic strategy to counter lipointoxication in obstructive pulmonary diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864:3069–84.
- [45] Kaneko J, Okinaga T, Hikiji H, Ariyoshi W, Yoshiga D, Habu M, Tominaga K, Nishihara T. Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. *Inflamm Regen* 2018;38:16.
- [46] Kartha S, Yan L, Ita ME, Amirshaghghi A, Luo L, Wei Y, Tsourkas A, Winkelstein BA, Cheng Z. Phospholipase A2inhibitor-loaded phospholipid micelles abolish neuropathic pain. *ACS Nano* 2020;14:8103–15.
- [47] Kleyer A, Finzel S, Rech J, Manger B, Krieter M, Faustini F, Araujo E, Hueber AJ, Harre U, Engelke K, Schett G. Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:854–60.
- [48] Koop SMW, ten Klooster PM, Vonkeman HE, Steunebrink LMM, van de Laar MAFJ. Neuropathic-like pain features and cross-sectional associations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:237.
- [49] Kosinska MK, Liebisch G, Lochnit G, Wilhelm J, Klein H, Kaesser U, Laszczkowski G, Rickert M, Schmitz G, Steinmeyer J. A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2013;65:2323–33.
- [50] Krishnamurthy A, Joshua V, Hensvold AH, Jin T, Sun M, Vivar N, Ytterberg AJ, Engström M, Fernandes-Cerqueira C, Amara K, Magnusson M, Wigerblad G, Kato J, Jiménez-Andrade JM, Tyson K, Rapecki S, Lundberg K, Catrina SB, Jakobsson PJ, Svensson C, Malmström V, Klareskog L, Wähämaa H, Catrina AI. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying Rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis* 2016;75:721–9.
- [51] Krzeszinski JY, Schwaid AG, Cheng WY, Jin Z, Gallegos ZR, Saghatelian A, Wan Y. Lipid osteoclastokines regulate breast cancer bone metastasis. *Endocrinology* 2017;158:477–89.
- [52] Lee YC, Cui J, Lu B, Frits ML, Iannaccone CK, Shadick NA, Weinblatt ME, Solomon DH. Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R83.
- [53] Leistad L, Feuerherm AJ, Østensen M, Faxvaag A, Johansen B. Presence of secretory group IIa and V phospholipase A2 and cytosolic group IV $\alpha$  phospholipase A2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:602–10.
- [54] Lloyd KA, Steen J, Amara K, Titcombe PJ, Israelsson L, Lundström SL, Zhou D, Zubarev RA, Reed E, Piccoli L, Gabay C, Lanzavecchia A, Baeten D, Lundberg K, Mueller DL, Klareskog L, Malmström V, Grönwall C. Variable domain N-linked glycosylation and negative surface charge are key features of monoclonal ACPA: implications for B-cell selection. *Eur J Immunol* 2018;48:1030–45.
- [55] Lloyd KA, Wigerblad G, Sahlström P, Garimella MG, Chemin K, Steen J, Titcombe PJ, Marklein B, Zhou D, Stålesen R, Ossipova E, Lundqvist C, Ekwall O, Rönnelid J, Mueller DL, Karlsson MCI, Kaplan MJ, Skinner K, Klareskog L, Wermeling F, Malmström V, Grönwall C. Differential ACPA binding to nuclear antigens reveals a PAD-independent pathway and a distinct subset of acetylation cross-reactive autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2019;10:3033.
- [56] Lodder MC, De Jong Z, Kostense PJ, Molenaar ETH, Staal K, Voskuyl AE, Hazes JMW, Dijkmans BAC, Lems WF. Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: relation between disease severity and low bone mineral density. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1576–80.
- [57] Mantyh PW. Mechanisms that drive bone pain across the lifespan. *Br J Clin Pharmacol* 2019;85:1103–13.
- [58] Marra S, Ferru-Clément R, Breuil V, Delaunay A, Christin M, Friend V, Sebille S, Cognard C, Ferreira T, Roux C, Euler-Ziegler L, Noel J, Lingueglia E, Deval E. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* 2016;35:414–28.
- [59] Martin-Broto J, Cleeland CS, Glare PA, Engellau J, Skubitz KM, Blum RH, Ganjoo KN, Staddon A, Dominkus M, Feng A, Qian Y, Braun A, Jacobs I, Chung K, Atchison C. Effects of denosumab on pain and analgesic use in giant cell tumor of bone: interim results from a phase II study. *Acta Oncol (Madr)* 2014;53:1173–9.
- [60] Di Matteo A, Di Matteo A, Mankia K, Duquenne L, Duquenne L, Cipolletta E, Wakefield RJ, Wakefield RJ, Garcia-Montoya L, Garcia-Montoya L, Nam JL, Nam JL, Emery P, Emery P. Ultrasound erosions in the feet best predict progression to inflammatory arthritis in anti-CCP positive at-risk individuals without clinical synovitis. *Ann Rheum Dis* 2020;79:901–7.
- [61] Mebarek S, Abousalham A, Magne D, Do LD, Bendorowicz-Pikula J, Pikula S, Buchet R. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations. *Int J Mol Sci* 2013;14:5036–129.
- [62] Miot-Noirault E, Vidal A, Auzeloux P, Madelmont JC, Maublant J, Moins N. First in vivo SPECT imaging of mouse femorotibial cartilage using 99mTc-NTP 15-5. *Mol Imaging* 2008;7:263–71.
- [63] Mitchell SAT, Majuta LA, Mantyh PW. New insights in understanding and treating bone fracture pain. *Curr Osteoporos Rep* 2018;16:325–32.
- [64] Morado-Urbina CE, Alvarado-Vázquez PA, Montiel-Ruiz RM, Acosta-González RI, Castañeda-Corral G, Jiménez-Andrade JM. Early, middle, or late administration of zoledronate alleviates spontaneous nociceptive behavior and restores functional outcomes in a mouse model of CFA-induced arthritis. *Drug Dev Res* 2014;75:438–48.

- [65] Morgan M, Thai J, Trinh P, Habib M, Effendi KN, Ivanusic JJ. ASIC3 inhibition modulates inflammation-induced changes in the activity and sensitivity of A $\delta$  and C fiber sensory neurons that innervate bone. *Mol Pain* 2020;16.
- [66] Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone* 2006;39:1107–15.
- [67] Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am J Pathol* 2003;163:1827–37.
- [68] Nencini S, Ivanusic JJ. The physiology of bone pain. How much do we really know?. *Front Physiol* 2016;7:157.
- [69] O'Brien W, Fissel BM, Maeda Y, Yan J, Ge X, Gravalles EM, Aliprantis AO, Charles JF. RANK-independent osteoclast formation and bone erosion in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2889–900.
- [70] Panwar P, Law S, Jamroz A, Azizi P, Zhang D, Ciufolini M, Brömme D. Tanshinones that selectively block the collagenase activity of cathepsin K provide a novel class of ectosteric antiresorptive agents for bone. *Br J Pharmacol* 2018;175:902–23.
- [71] Panwar P, Xue L, Sør K, Srivastava K, Law S, Delaisse JM, Brömme D. An ectosteric inhibitor of cathepsin K inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2017;32:2415–30.
- [72] Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001;32:1071–83.
- [73] Qiu F, Wei X, Zhang S, Yuan W, Mi W. Increased expression of acid-sensing ion channel 3 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. *Neuroreport* 2014;25:887–93.
- [74] Quindlen-Hotek JC, Kartha S, Winkelstein BA. Immediate inhibition of spinal secretory phospholipase A2 prevents the pain and elevated spinal neuronal hyperexcitability and neuroimmune regulatory genes that develop with nerve root compression. *Neuroreport* 2020;31:1084–9.
- [75] Rakieh C, Nam J, Hunt L, Hensor EMA, Das S, Bissell LA, Villeneuve E, McGonagle D, Hodgson R, Grainger A, Wakefield RJ, Conaghan PG, Emery P. Predicting the development of clinical arthritis in anti-CCP positive individuals with non-specific musculoskeletal symptoms: a prospective observational cohort study. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1659–66.
- [76] Recklies AD, White C. Phospholipase A2 is a major component of the salt-extractable pool of matrix proteins in adult human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1991;34:1106–15.
- [77] Rietkötter E, Menck K, Bleckmann A, Farhat K, Schaffrinski M, Schulz M, Hanisch U-K, Binder C, Pukrop T. Zoledronic acid inhibits macrophage/microglia-assisted breast cancer cell invasion. *Oncotarget* 2013;4:1449–60.
- [78] Rimola V, Hahnefeld L, Zhao J, Jiang C, Angioni C, Schreiber Y, Osthus T, Pierre S, Geisslinger G, Ji RR, Scholich K, Sisignano M. Lysophospholipids contribute to oxaliplatin-induced acute peripheral pain. *J Neurosci* 2020;40:9519–32.
- [79] Ross JL, Queme LF, Cohen ER, Green KJ, Lu P, Shank AT, An S, Hudgins RC, Jankowski MP. Muscle IL1 $\beta$  drives ischemic myalgia via ASIC3-mediated sensory neuron sensitization. *J Neurosci* 2016;36:6857 LP–6871.
- [80] Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 2002;30:533–40.
- [81] Sahlström P, Hansson M, Steen J, Amara K, Titcombe PJ, Forsström B, Stålesen R, Israelsson L, Piccoli L, Lundberg K, Klareskog L, Mueller DL, Catrina AI, Skriner K, Malmström V, Grönwall C. Different hierarchies of anti-modified protein autoantibody reactivities in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2020;72:1643–57.
- [82] Satkunanathan PB, Anderson MJ, De Jesus NM, Haudenschild DR, Ripplinger CM, Christiansen BA. In vivo fluorescence reflectance imaging of protease activity in a mouse model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil* 2014;22:1461–9.
- [83] Sluka KA, Rasmussen LA, Edgar MM, O'Donnell JM, Walder RY, Kolker SJ, Boyle DL, Firestein GS. Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:1194–202.
- [84] Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, Edison JD, Gilliland WR, Tibshirani RJ, Norris JM, Holers VM, Robinson WH. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7:e35296.
- [85] Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, Martin LJ, Austin JS, Sotocinal SG, Chen D, Yang M, Shi XQ, Huang H, Pillion NJ, Bilan PJ, Tu Y, Klip A, Ji RR, Zhang J, Salter MW, Mogil JS. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 2015;18:1081–3.
- [86] Steen J, Forsström B, Sahlström P, Odowd V, Israelsson L, Krishnamurthy A, Badreh S, Mathsson Alm L, Compson J, Ramsköld D, Ndlovu W, Rapecki S, Hansson M, Titcombe PJ, Bang H, Mueller DL, Catrina AI, Grönwall C, Skriner K, Nilsson P, Lightwood D, Klareskog L, Malmström V. Recognition of amino acid motifs, rather than specific proteins, by human plasma cell-derived monoclonal antibodies to posttranslationally modified proteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:196–209.
- [87] Van Steenberg HW, Huizinga TWJ, Van Der Helm-Van Mil AHM. Review: the preclinical phase of rheumatoid arthritis: what is acknowledged and what needs to be assessed? *Arthritis Rheum* 2013;65:2219–32.
- [88] Strassle BW, Mark L, Leventhal L, Piesla MJ, Jian Li X, Kennedy JD, Glasson SS, Whiteside GT. Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthritis Cartil* 2010;18:1319–28.
- [89] Sun M, Rethi B, Krishnamurthy A, Joshua V, Circiumaru A, Hensvold AH, Ossipova E, Grönwall C, Liu Y, Engstrom M, Catrina SB, Steen J, Malmström V, Klareskog L, Svensson C, Ospelt C, Wähämaa H, Catrina AI. Anticitrullinated protein antibodies facilitate migration of synovial tissue-derived fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1621–31.
- [90] Svensson CI, Lucas KK, Hua XY, Powell HC, Dennis EA, Yaksh TL. Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of the small, secretory phospholipase A2. *Neuroscience* 2005;133:543–53.
- [91] Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638–49.
- [92] Titsworth WL, Cheng X, Ke Y, Deng L, Burckardt KA, Pendleton C, Liu NK, Shao H, Cao QIL, Xu XM. Differential expression of sPLA2 following spinal cord injury and a functional role for sPLA2-IIA in mediating oligodendrocyte death. *Glia* 2009;57:1521–37.
- [93] Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K, Giant TT. Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption. *Arthritis Rheum* 2008;58:2397–408.
- [94] Tzschentke TM. Pharmacology of bisphosphonates in pain. *Br J Pharmacol* 2019;178:1973–94.
- [95] Velasco M, O'Sullivan C, Sheridan GK. Lysophosphatidic acid receptors (LPARs): potential targets for the treatment of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2017;113:608–17.
- [96] Walder RY, Gautam M, Wilson SP, Benson CJ, Sluka KA. Selective targeting of ASIC3 using artificial miRNAs inhibits primary and secondary hyperalgesia after muscle inflammation. *PAIN* 2011;152:2348–56.
- [97] Wang D, Pan H, Zhu H, Zhu L, He YJ, Wang J, Jia GY. Upregulation of nuclear factor- $\kappa$ B and acid sensing ion channel 3 in dorsal root ganglion following application of nucleus pulposus onto the nerve root in rats. *Mol Med Rep* 2017;16:4309–14.
- [98] Wigerblad G, Bas DB, Fernades-Cerqueira C, Krishnamurthy A, Nandakumar KS, Rogoz K, Kato J, Sandor K, Su J, Jimenez-Andrade JM, Finn A, Bersellini Farinotti A, Amara K, Lundberg K, Holmdahl R, Jakobsson P-J, Malmström V, Catrina AI, Klareskog L, Svensson CI. Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. *Ann Rheum Dis* 2016;75:730–8.
- [99] Wultsch T, Painsipp E, Shahbazian A, Mitrovic M, Edelsbrunner M, Lazdunski M, Waldmann R, Holzer P. Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *PAIN* 2008;134:245–53.
- [100] Yen YT, Tu PH, Chen CJ, Lin YW, Hsieh ST, Chen CC. Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol Pain* 2009;5:1.
- [101] Yoshii I, Chijiwa T, Sawada N. Rheumatoid arthritis in tight disease control is no longer risk of bone mineral density loss. *Osteoporos Sarcopenia* 2020;6:75–81.
- [102] Zhai G, Pelletier JP, Liu M, Aitken D, Randell E, Rahman P, Jones G, Martel-Pelletier J. Activation of the phosphatidylcholine to lysophosphatidylcholine pathway is associated with osteoarthritis knee cartilage volume loss over time. *Sci Rep* 2019;9:9648.
- [103] Zhu H, Ding J, Wu J, Liu T, Liang J, Tang Q, Jiao M. Resveratrol attenuates bone cancer pain through regulating the expression levels of ASIC3 and activating cell autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin* 2017;49:1008–14.
- [104] Zhu S, Zhu J, Zhen G, Hu Y, An S, Li Y, Zheng Q, Chen Z, Yang Y, Wan M, Skolasky RL, Cao Y, Wu T, Gao B, Yang M, Gao M, Kuliwaba J, Ni S, Wang L, Wu C, Findlay D, Eltzschig HK, Ouyang HW, Crane J, Zhou FQ, Guan Y, Dong X, Cao X. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. *J Clin Invest* 2019;129:1076–93.