



**HAL**  
open science

# Modulation de l'activité des canaux HCN : une stratégie thérapeutique innovante et bien tolérée contre la neuropathie induite par l'oxaliplatine

Margaux Morez

## ► To cite this version:

Margaux Morez. Modulation de l'activité des canaux HCN : une stratégie thérapeutique innovante et bien tolérée contre la neuropathie induite par l'oxaliplatine. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0045 . tel-04924810

**HAL Id: tel-04924810**

**<https://theses.hal.science/tel-04924810v1>**

Submitted on 1 Feb 2025

**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.

Année 2023



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé,  
Agronomie et Environnement

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université Clermont Auvergne**

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement à Clermont-Ferrand le 22 mai 2023 par

**Margaux MOREZ**

---

**Modulation de l'activité des canaux HCN : une stratégie  
thérapeutique innovante et bien tolérée contre la neuropathie  
induite par l'oxaliplatine**

---

**Président du jury** Pr. David BALAYSSAC, NeuroDol, CHU - UCA, Clermont-Ferrand

**Membres du jury** Dr. Claire DEMIOT, Université de Limoges, Limoges  
Dr. Lauriane ULMANN, Institut Génomique Fonctionnelle, Montpellier  
Dr. Emmanuel BOURINET, Institut Génomique Fonctionnelle, Montpellier  
Pr. Mathilde BONNET, M2iSH - UCA, Clermont-Ferrand

**Directeur de thèse** Dr. Jérôme BUSSEROLLES, NeuroDol - UCA, Clermont-Ferrand

**Co-encadrant** Dr. Eric WERSINGER, NeuroDol - UCA, Clermont-Ferrand

NeuroDol UMR1107 INSERM/UCA  
Équipe Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur



*« Ce n'est pas au plaisir que l'esprit avisé aspire, mais à l'absence de douleur »*

Aristote

# Remerciements

## Aux membres de mon Jury,

Je tiens premièrement à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Je remercie chaleureusement le **Dr Lauriane Ulmann**, le **Dr Claire Demiot** et le **Dr Emmanuel Bourinet** de m'avoir fait l'honneur de siéger à ce jury de thèse et d'évaluer ce manuscrit en qualité de rapporteur. Je remercie également le **Pr. David Balayssac** et la **Pr. Mathilde Bonnet** d'évaluer ce travail.

## Aux membres des comités de suivi de thèse,

Je (re)remercie le **Dr Emmanuel Bourinet** pour votre accompagnement pendant ces 3 ans et demi de thèse et pour ces nombreux conseils lors des comités de suivi de thèse. Je remercie également le **Dr Michèle Bastide** qui me suit depuis mon stage de master 1, merci pour votre précieuse aide durant nos échanges jusqu'en fin de thèse.

## A mes directeurs de thèse,

Merci à **Jérôme** et **Eric** de m'avoir accordé leur confiance. Merci **Jérôme**, bien que jonglant entre l'IUT et la faculté, tu as su être disponible quand il le fallait. Merci pour ces congrès que nous avons partagé jusqu'à Toronto. Quel honneur d'avoir un chef qui est devenu grand chef ! Merci **Eric** de m'avoir initié à l'électrophysiologie sur tranche, merci pour tes conseils avisés et ton expertise pharmacologique. Je vous remercie tous les deux pour votre patience et pour le temps que vous avez passé à corriger et me conseiller pour toutes mes rédactions d'abstract et surtout la rédaction de cette thèse. Merci chaleureusement à vous deux de m'avoir épaulé pendant les moments difficiles comme le confinement covid... Merci de m'avoir emmené quelques fois à Theix (je passe le permis bientôt !). Merci pour tous ces échanges stimulant et enrichissant. Merci de m'avoir écouté et finalement, merci de m'avoir accompagné tout le long de ce beau projet.

## Aux collaborateurs et partenaires de ce projet,

Merci à l'ensemble des collaborateurs du projet Pept'HCN avec qui j'ai pu interagir. Un grand merci au **Pr. Claude Taillefumier** et au **Dr. Olivier Roy** pour les explications très claires et précises sur les détails chimiques des peptoides. Je remercie le **Pr. David Balayssac** pour les précisions cliniques toujours très intéressantes qui m'ont permis de mieux comprendre la neuropathie chez le patient. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer à la rédaction de mon premier article de revue, ce fut une expérience enrichissante. Je remercie **Clermont Auvergne Innovation** qui suit le projet, de m'avoir proposé une formation bootcamp Start Up, qui m'a permis de sortir de ma zone de confort et de mettre un pied dans le domaine de l'entrepreneuriat.

Merci aux personnes qui ont participé de près ou de loin au projet. Je pense notamment aux plateformes de la faculté de médecine : **Caroline Vachias** de la plateforme **CLIC** qui m'a formé au microscope

confocale, les filles du **CICS** qui m'ont formé à l'utilisation du cryostat. Merci à **Pierre Soule** de NanoTemper pour sa patience et ses (innombrables) conseils qui nous ont permis d'avancer sur la bonne voie pour nos expérimentations avec le Monolith. Merci également au **personnel de l'animalerie** de la faculté, et félicitations bien sûr à **Laetitia** fraîchement arrivée dans la troupe, avec de grandes responsabilités et un joli bureau de cheffe !



# Contributions scientifiques

## Encadrements de stage

### 2021

Inès GUYONNET : 2<sup>ème</sup> année de DUT Génie Biologique, UCA

Candice INTERNICOLA : 1<sup>ère</sup> année de Master Biologie-Santé, UCA

### 2022

Kalidou ALIBOUBACAR : 2<sup>ème</sup> année de Master Sciences du médicament, UCA

Anne SALVAGE : 1<sup>ère</sup> année de Master Cancérologie, Université de Lyon

### 2023

Morgane LETE : 2<sup>ème</sup> année de Master Biologie-Santé, UCA

## Communications affichées



**M Morez**, Y Aissouni, L Prival, J Barbier, C Taillefumier, O Roy, E Bourinet, E Wersinger, J Busserolles

*Modulation of HCN channel activity in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy*

25<sup>ème</sup> année des Journées de l'École Doctorale

18-19 mai 2022, Clermont-Ferrand, France



IASP 2022 WORLD  
CONGRESS ON PAIN  
Toronto, Canada • 19-23 September

**M Morez**, L Prival, Y Aissouni, E Bourinet, O Roy, C Taillefumier, E Wersinger, J Busserolles

*Disrupting HCN Channels - TRIP8b Interaction Is an Efficient Strategy to Decrease Acute Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy Symptoms*

IASP World Congress on Pain

19-23 septembre 2022, Toronto, Canada



**M Morez**, L Prival, Y Aissouni, E Bourinet, O Roy, C Taillefumier, E Wersinger, J Busserolles

*Disrupting HCN Channels - TRIP8b Interaction Is an Efficient Strategy to Decrease Acute Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy Symptoms*

3<sup>ème</sup> Automnales du groupe Cancer Clermont Auvergne

9 novembre 2022, Clermont Ferrand, France

**M Morez**, L Prival, Y Aissouni, E Bourinet, O Roy, C Taillefumier, E Wersinger, J Busserolles

*Disrupting HCN Channels – TRIP8b interaction is an efficient strategy to decrease acute Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy symptoms*

Journée scientifique CIR3

21 novembre 2022, Clermont-Ferrand, France

## Communications orales



**M Morez**, Y Aissouni, L Prival, J Barbier, S Lolignier, D Balayssac, E Wersinger, J Busserolles

*Les canaux HCN dans la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine*

2ème Automnales du groupe Cancer Clermont Auvergne

14 décembre 2021, Clermont Ferrand, France



**M Morez**, Y Aissouni, L Prival, J Barbier, D Balayssac, C Taillefumier, O Roy, E Bourinet, E Wersinger, J Busserolles

*Modulation of HCN channel activity in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy*

Congrès SFPT

14-16 juin 2022, Lille, France



**M Morez**, Y Aissouni, L Prival, J Barbier, D Balayssac, C Taillefumier, O Roy, E Bourinet, E Wersinger, J Busserolles

*Disrupting HCN Channels – TRIP8b interaction is an efficient strategy to decrease acute Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy symptoms*

18<sup>ème</sup> Symposium du Réseau Français de Recherche sur la Douleur

24-25 mars 2023, Montpellier, France

## Prix

## Article

### EXPERT OPINION

#### ON DRUG SAFETY

Mélissa Cuménal, Marie Selvy, Nicolas Kerckhove, Célian Bertin, **Margaux Morez**, Christine Courteix, Jérôme Busserolles, David Balayssac

*The Safety of Medications used to Treat Peripheral Neuropathic Pain, Part 2 (Opioids, Cannabinoids and Other Drugs): review of Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trials.*

Expert Opinion on Drug Safety, Informa Healthcare, 2020, pp.1-18.

## Résumé

Les neuropathies périphériques, se manifestant par des troubles sensoriels des extrémités des membres et de la sphère oro-faciale, sont un effet indésirable quasi-systématique du traitement de tumeurs solides par l'oxaliplatine. Ces douleurs neuropathiques sont accompagnées de troubles moteurs et proprioceptifs qui s'installent au fur et à mesure des administrations et perdurent parfois après la fin des cures. Les comorbidités associées de type anxiété et dépression participent à l'altération de la qualité de vie du patient et mènent à une diminution ou l'arrêt du traitement, compromettant ainsi les chances de guérison face au cancer. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour les neuropathies périphériques chimio-induites. Seule la duloxétine est recommandée, avec un niveau de preuve d'efficacité modéré. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et le maintien de la douleur induite par l'oxaliplatine est nécessaire pour développer de nouvelles stratégies innovantes, efficaces et bien tolérées.

Les canaux HCN (*isoformes HCN1-4*), largement distribués dans les voies de la douleur et surexprimés dans des modèles précliniques de neuropathie périphérique induite par oxaliplatine (NPIO), sont une cible émergente. Le blocage pharmacologique de ces canaux par des molécules non sélectives diminue l'hypersensibilité thermique et mécanique des animaux NPIO. Cependant, la fenêtre thérapeutique est étroite en raison de l'expression et de la fonction de ces canaux dans les cellules du tissu nodal cardiaque.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à un partenaire protéique du canal HCN dont l'expression est exclusivement neuronale : la protéine TRIP8b, qui contrôle son adressage membranaire et sa fonction. Notre stratégie consiste à moduler les canaux HCN en perturbant pharmacologiquement l'interaction du canal avec TRIP8b et ainsi avoir un effet antalgique sans effet secondaire cardiaque. Dans des études *in vitro*, l'utilisation de la transcriptomique et de l'immunocytochimie, nous a permis de montrer une coexpression et colocalisation de ces deux cibles dans les neurones périphériques ganglionnaires lombaires (DRG) et trigéminaux (TG). Dans la NPIO aigüe chez la souris, nous avons observé une surexpression des canaux HCN1 et HCN2 et une augmentation du nombre de cellules positives pour *TRIP8b* dans ces tissus. Une surexpression des transcrits HCN1 et HCN4 est également observée dans le cortex insulaire (région impliquée dans les modalités sensorielle et émotionnelle de la douleur de ces animaux) après administrations répétées d'oxaliplatine, suggérant une implication potentielle de ces canaux dans la chronicisation de la neuropathie. Dans des études *in vivo*, nous avons utilisé une stratégie peptidomimétique pour rompre l'interaction HCN-TRIP8b. Un criblage de molécules synthétisés par l'équipe Chimie Organique Médicinale a mis en évidence un peptotide, le composé YC55, possédant une efficacité antalgique reproductible, dose-dépendante, supérieure à l'efficacité du composé de référence clinique (Duloxétine) et non observé chez l'animal délété pour *TRIP8b*. Enfin, nos études fonctionnelles ont permis de montrer une augmentation de la densité de courant  $I_h$  dans les DRG du modèle NPIO et un effet de YC55 suggérant une modulation de l'interaction HCN-TRIP8b et renforçant notre preuve de concept.

En conclusion, nos résultats expérimentaux participent à la compréhension de l'implication des canaux HCN et de leur protéine partenaire TRIP8b dans la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine. Notre stratégie pharmacologique innovante basée sur la modulation des canaux HCN neuronaux offre une perspective thérapeutique intéressante pour traiter les neuropathies chimio-induites, sans induire d'effet indésirable.

Mots clés : canaux HCN ; neuropathie périphérique ; peptoides ; oxaliplatine

## Abstract

Peripheral neuropathy induced by Oxaliplatin (OIPN) is a common adverse effect characterized by sensory disturbances of the hands, feet and the orofacial area. Neuropathic pain is associated with motor and proprioceptive disorders after cumulative dose and may persist after the end of the treatment. Associated comorbidities such as anxiety and depression contribute to the alteration of the patients' quality of life and lead to a reduction or cessation of chemotherapy, thus compromising the recovery from cancer. Currently, there is no treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy; only duloxetine is recommended with a moderate level of effectiveness. A better understanding of the mechanisms involved in the development and maintenance of neuropathic pain is needed to develop innovative, effective and well-tolerated strategies.

HCN channels (*HCN1-4 isoforms*), widely expressed through the pain pathways and overexpressed in preclinical models of OIPN are an emerging and promising target. Pharmacological blockade of HCN decreases thermal and mechanical hypersensitivity in animal models of acute OIPN. However, the therapeutic range is narrow due to the expression and function of these channels in cardiac nodal tissue.

In this study, we focused on the interaction of HCN channels with a neuron-specific partner protein: TRIP8b, controlling its membrane trafficking and function. Our strategy is to modulate HCN channels by disrupting its interaction with TRIP8b to obtain an analgesic effect without cardiac adverse events. In *in vitro* studies, using transcriptomics and immunocytochemistry, we have shown coexpression and colocalization of these two targets in dorsal root (DRG) and trigeminal (TG) ganglia. In acute OIPN mice, we have further observed an overexpression of HCN1 and HCN2 and an increase in *TRIP8b*-positive cells in these tissues. Interestingly, HCN1 and HCN4 transcripts are also overexpressed in the insular cortex (a region involved in the sensory and emotional modalities of pain) after repeated administration of oxaliplatin, suggesting a potential involvement of these channels in the chronicisation of the neuropathy. A low throughput screening of molecules synthesized by "Medicinal Organic Chemistry" detected a hit peptoid, the compound YC55, with a reproducible, dose-dependent analgesic effect, superior to the clinical reference Duloxetine. Importantly, this analgesic effect was absent in *TRIP8b*-deleted animals.

Finally, our functional studies showed an increased  $I_h$  current density in DRG neurons in the OIPN model and an effect of YC55 suggesting a modulation of HCN-TRIP8b interaction, hence reinforcing our proof of concept. In conclusion, our experimental results contribute to the understanding of the involvement of HCN channels and their partner protein TRIP8b in OIPN. Our pharmacological strategy aiming to modulate HCNs offers an interesting therapeutic perspective to treat chemo-induced neuropathies, without cardiac adverse effects.

Keywords : HCN channels, peripheral neuropathy, peptoids, oxaliplatin

# Abréviations

5-Fu : 5-Fluorouracile

## A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ACC : Cortex Cingulaire Antérieure  
Ach : Acétylcholine  
ARNm : Acide RiboNucléique Messenger  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
AVC : Accident Vasculaire Cérébral

## B

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

## C

CAPOX/XELOX : Capecitabine + Oxaliplatine  
CDME : Corne Dorsale de la Moelle Épinière  
CCI : Chronic Constriction Injury  
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptid  
CST : Complexe Sensitif du Trijumeau  
CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Events  
CTR1 : Copper TRansporter 1  
CNG : Cyclic Nucleotid-Gated ion channel

## D

DACH : DiAminoCycloHexane  
DD : Dépolarisation Diastolique  
DN4 : Douleur Neuropathique en 4 questions  
DRG : Ganglion de la Racine Dorsale

## E

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer

## F

FOLFOX : 5-FU + folinate + oxaliplatine

## G

GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GSTP1 : Glutathion-S-Transférase P1

## H

HAD : Hospital Anxiety and Depression scale  
HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide  
HCND : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide Domain  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HTMR : High Threshold MecanoReceptor

## I

IC50 : Concentration Inhibitrice 50%  
IPP : Interaction Protéine-Protéine  
IA/IP : Insula Antérieure/Postérieure  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
i.m. : injection intramusculaire

i.p. : injection intrapéritonéale  
i.pl. : injection intraplantaire  
i.t. : injection intrathécale  
i.v. : injection intraveineuse

## K

KO : Knock-Out

## L

LTMR : Low Threshold MecanoReceptor  
LTP : Long Term Potentiation

## N

NCI-CTC : National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria  
NK1 : neurokinine 1  
NMDA : N-méthyl-D-Aspartate  
NPCI : Neuropathie Périphérique Chimio-Induite  
NPIO : Neuropathie Périphérique Induite par Oxaliplatine  
NPPI : Neuropathie Périphérique Induite par Paclitaxel  
NSA : Noeud Sinuso-Atrial

## O

OCT1/2 : Organic Cation Transporter  
OXA : Oxaliplatine

## P

PA : Potentiel d'Action  
PAG : substance grise ériaqueducule  
PCR : Polymérase Chain Reaction  
PFA : ParaFormAldehyde

## Q

QST : Quantitative Sensory Test  
QLQ : Quality-of-Life Questionnaire

## S

S1/S2 : cortex Somatosensorial I/II  
SNL (domaine) : Sérine-Asparagine-Leucine  
SNL (modèle) : Spinal Nerve Ligation  
SNP : Single Nucleotid Polymorphism  
SNS : Sensory Neuron-Specific (Nav1.8)

## T

TG : Ganglion Trigeminal  
TRP : Transient Receptor Potential  
TPR (TRIP8b) : TetratricoPetide Repeat

## V

VEH : Vehicule  
VSD : Voltage Sensing Domain

## W

WDR : neurone Wide Dynamic Range

# Table des matières

Préambule.....	1
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>-CHAPITRE 1- LA CHIMIOThERAPIE ET SES ATTEINTES NEUROLOGIQUES. 5</b>	<b>5</b>
<b>1. Neuroanatomie du système sensoriel et encodage de l'information nociceptive .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.Système sensoriel périphérique.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Transducteurs thermiques .....	11
1.1.2. Transducteurs mécaniques .....	12
1.1.3. Transducteurs chimiques .....	13
<b>1.2.Projection vers le système nerveux central.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. Le relai spinal .....	13
1.2.2. L'intégration supra-spinale de l'information nociceptive .....	15
1.2.3. La contribution du cortex insulaire dans la douleur .....	16
1.2.4. Modulation du message nociceptif.....	18
<b>2. Les neuropathies périphériques induites par l'oxaliplatine .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.Généralités sur les douleurs neuropathiques .....</b>	<b>19</b>
2.1.1. Symptômes des douleurs neuropathiques .....	20
2.1.2. Origine et étiologie des douleurs neuropathiques .....	20
<b>2.2.Structure et indications cliniques de l'oxaliplatine.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.Données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.Toxicité de l'oxaliplatine.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.La neurotoxicité induite par l'oxaliplatine à l'origine de la douleur neuropathique ..</b>	<b>25</b>
2.5.1. Manifestations cliniques des NPIO .....	25
2.5.2. Diagnostic des NPIO .....	27
2.5.3. Facteurs de risques des NPIO .....	28
2.5.3.1. Des symptômes aigus NPIO chroniques.....	28
2.5.3.2. Facteurs génétiques et épigénétiques .....	28
2.5.4. Prise en charge des patients neuropathiques .....	29
<b>2.6.Modèles animaux de NPIO et exploration de la douleur .....</b>	<b>30</b>
2.6.1. NPIO avec suivi aigu .....	31
2.6.2. NPIO avec suivi chronique.....	33
<b>3. Mécanismes impliqués dans les NPIO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.La participation des canaux ioniques.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.Neurotoxicité lésionnelle et neuropathie centrale .....</b>	<b>38</b>
<b>-CHAPITRE 2- LES CANAUX HCN .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Du courant I<sub>f</sub> au canal HCN .....</b>	<b>41</b>
<b>2. Structure et activation des canaux HCN.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.Structure des canaux.....</b>	<b>42</b>

2.1.1. Domaine transmembranaire .....	43
2.1.2. Domaines intracellulaires .....	44
<b>2.2. Activation des canaux.....</b>	<b>45</b>
2.2.1. Propriétés biophysiques .....	45
2.2.2. Activation et modulation par les nucléotides cycliques .....	46
<b>3. Expressions et fonctions physiologiques des canaux HCN.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Présence des canaux HCN dans le cœur.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Distribution dans le système nerveux .....</b>	<b>47</b>
3.2.1. Les canaux HCN exprimés dans les neurones sensoriels périphériques .....	48
3.2.2. Expression des canaux HCN dans le système central somatosensoriel .....	50
<b>3.3. Expression dans d'autres cellules ou tissus.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Rôles physiologiques des canaux HCN .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Le potentiel d'action cardiaque .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Rôle du courant <math>I_h</math> dans les neurones .....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Maintien du potentiel de repos membranaire .....	52
4.2.2. Genèse du rythme neuronal.....	53
4.2.3. Plasticité synaptique.....	53
<b>4.3. Outils génétiques et identification de mutations chez l'Homme .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Pharmacologie des canaux HCN .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Régulation des canaux HCN .....</b>	<b>55</b>
<b>6.1. Régulation par les lipides.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2. Régulation par les protons (pH) .....</b>	<b>56</b>
<b>6.3. Protéines d'interaction.....</b>	<b>56</b>
6.3.1. Protéines membranaires .....	56
6.3.2. Protéines cytosoliques .....	57
6.3.2.1. Filamine A, Tamaline, S-SCAM, Mint2 et Nedd4-2 .....	57
6.3.2.2. TRIP8b .....	57
<b>- CHAPITRE 3 - LES CANAUX HCN DANS LA NEUROPATHIE .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Les canaux HCN : acteurs de la douleur neuropathique .....</b>	<b>61</b>
<b>1.1. HCN dans la douleur induite <i>in vivo</i> .....</b>	<b>61</b>
1.1.1. Douleur neuropathique d'origine traumatique (tableau 7) .....	61
1.1.2. Douleur neuropathique chimio-induite (tableau 8).....	63
1.1.3. Douleur inflammatoire .....	64
<b>1.2. HCN dans la douleur chez l'homme : utilisation de l'ivabradine.....</b>	<b>67</b>
<b>2. Stratégie pharmacologique innovante : cibler l'interaction HCN-TRIP8b ...</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Intérêt de la cible HCN-TRIP8b dans les troubles neurologiques.....</b>	<b>67</b>
<b>2.2. Notre stratégie dans la douleur neuropathique.....</b>	<b>70</b>
2.2.1. Preuve de concept .....	70
2.2.2. Les peptoïdes .....	70
<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>77</b>

<b>DONNÉES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>95</b>
<b>- CHAPITRE 1 - CONTRIBUTION DE HCN ET TRIP8B DANS LA NPIO AIGUE</b>	<b>97</b>
1. Expression et localisation dans les neurones périphériques .....	97
2. Quantification protéique et génique dans un modèle murin de NPIO aigue .....	103
<b>- CHAPITRE 2 - MODULATION PHARMACOLOGIQUE DES CANAUX HCN PAR APPROCHE PEPTIDOMIMETIQUE .....</b>	<b>106</b>
1. Screening in vivo des peptoïdes.....	106
2. Mise au point d'un test de screening <i>in vitro</i> .....	110
3. Étude pharmacologique par le peptoïde YC55 .....	113
3.1.Étude de la sensibilité périphérique .....	113
3.2.Données de biodistribution et pharmacocinétique du peptoïde YC55.....	117
4. Étude fonctionnelle du courant médié par les canaux HCN dans les DRG .....	118
5. Innocuité du peptoïde.....	123
<b>- CHAPITRE 3 - PARTICIPATION DE HCN ET TRIP8B DANS LA NPIO CHRONIQUE .....</b>	<b>125</b>
1. Expression des transcrits HCN-TRIP8b dans le cortex insulaire .....	127
2. Caractérisation phénotypique du modèle chronique.....	129
3. Stratégie de vectorisation du peptoïde.....	133
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>163</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>167</b>
Annexe 1 : synthèse détaillée du peptoïde YC55 .....	168
Annexe 2 : solutions préparation des tranches de cerveau .....	169
Annexe 3 : vecteurs d'expression TRIP8b tronqué et HCN <sub>C40</sub> .....	170
Annexe 4 : interaction <i>in silico</i> TRIP8b-YC55 .....	171
Annexe 5 : résultats supplémentaires.....	172
Annexe 6 : localisation de l'insula sur le cerveau de souris .....	173
Annexe 7 : article de revue .....	174
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>175</b>

# Table des illustrations

## **Figures**

Figure 1. Voies somatosensorielles principales .....	6
Figure 2. Neurone pseudo-unipolaire .....	7
Figure 3. Innervation céphalique et extra-céphalique.....	7
Figure 4. Proposition de classification des neurones sensoriels par transcriptomique .....	10
Figure 5. Canaux de la famille des TRP responsables de la perception thermique .....	11
Figure 6. Organisation laminaire des projections spinales des fibres sensibles .....	14
Figure 7. Projection du nerf trijumeau dans les noyaux du complexe sensitif du trijumeau .....	14
Figure 8. Régions corticales et sous-corticales impliquées dans la perception de la douleur et leur connectivité au sein de la voie ascendante .....	15
Figure 9. Le cortex insulaire chez l'homme et chez la souris .....	16
Figure 10. Connectivité de l'insula avec les régions corticales et limbiques .....	17
Figure 11. Formule de l'oxaliplatine .....	21
Figure 12. Moyenne des scores cliniques relatifs aux symptômes de NPIO aiguë .....	26
Figure 13. Proposition de tableau d'ajustement de posologie de l'oxaliplatine, selon le grade de sévérité de la neuropathie .....	30
Figure 14. Cinétique sur 6 jours de la sensibilité thermique et mécanique après injection d'oxaliplatine .....	32
Figure 15. Génération du rythme cardiaque du NSA aux ventricules .....	41
Figure 16. Séquences communes des isoformes HCN1, HCN2, HCN3, HCN4 .....	43
Figure 17. Les 3 grandes structures de la protéine-canal HCN.....	43
Figure 18. Interactions entre le domaine HCND et le C-linker du CNBD .....	44
Figure 19. Propriétés constitutives électrophysiologiques des canaux HCN1-4 exprimés dans les cellules HEK293 .....	45
Figure 20. Courbe d'activation HCN4 avec ou sans AMPc.....	46
Figure 21. Distribution de l'expression protéique des isoformes HCN dans les tissus nodaux .....	47
Figure 22. Distribution de l'expression des transcrits HCN1 HCN2 et HCN4 dans le cerveau de souris .....	48
Figure 23. Les canaux HCN dans les différents systèmes physiologiques du corps humain .....	51
Figure 24. Effet de l'activation des canaux HCN sur l'excitabilité neuronale hippocampale .....	53
Figure 25. Schéma du complexe HCN et sa protéine régulatrice TRIP8b.....	58
Figure 26. Représentation schématique des isoformes de TRIP8b et leurs fonctions associées .....	59
Figure 27. Schéma bilan du chapitre 2 sur les canaux HCN.....	60
Figure 28. Action du NUCC sur l'interaction HCN-TRIP8b .....	69
Figure 29. Effet dose dépendant d'un composé perturbateur de l'interaction HCN-TRIP8b (NUCC-5953), sur un modèle NPIO aiguë (injection i.t.) .....	70
Figure 30. Schéma bilan de la stratégie employée à la base de l'étude pharmacologique de mon projet de thèse .....	71
Figure 31. Construction génétique des souris TRIP8b <sup>-/-</sup> et TRIP8b <sup>f/f</sup> .....	79
Figure 32. Électrophorèse de produits PCR de génotypage .....	80

Figure 33. Formule de l'analogue peptoïde de SNL.....	81
Figure 34. Squelette du peptoïde .....	81
Figure 35. Les étapes de préparation des solutions pour le Monolith® .....	94
Figure 36. Distribution de l'ARNm dans les DRG lombaires de souris .....	98
Figure 37. Distribution de l'ARNm dans les TG de souris .....	99
Figure 38. Immunocytochimie sur culture primaire de DRG de souris naïve (p.99) .....	100
Figure 39. Immunocytochimie sur culture primaire de TG de souris naïve .....	102
Figure 40. Timeline d'expérimentation sur la souris NPIO aigue .....	103
Figure 41. Quantification des transcrits dans le DRG et TG par RT-qPCR .....	104
Figure 42. Quantification des cellules positives par RNAscope .....	105
Figure 43. Protocole suivi pour le screening <i>in vivo</i> des peptoïdes .....	106
Figure 44. Récapitulatif du criblage <i>in vivo</i> des peptoïdes.....	107
	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 45. Comparaison des effets pharmacologiques des peptoïdes .....	109
Figure 46. Étude par thermophorèse a microéchelle et spectral shift de l'interaction HCN TRIP8b <i>in vitro</i> et sa perturbation par YC55.....	111
Figure 47. Description des protocoles des tests d'efficacité pharmacologique du composé YC55.....	113
Figure 48. Effet pharmacologique du peptoïde YC55 sur les symptômes caractéristiques de la NPIO aigue. ....	114
Figure 49. Comparaison de l'effet pharmacologique du YC55 à la dose maximale par rapport au traitement recommandé en clinique, la duloxétine.....	115
Figure 50. Effet pharmacologique du peptoïde YC55 sur les souris TRIP8b <sup>-/-</sup> et SNS <sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> .....	116
Figure 51. Biodistribution de peptoïde conjugué biotine .....	117
Figure 52. Dosage pharmacocinétique de YC55 dans le sang et les tissus .....	118
Figure 53. Protocole de l'étude fonctionnelle.....	119
Figure 54. Fonctions du courant I <sub>h</sub> et du sag dans les neurones de DRG isolés de souris VEH et OXA ...	120
Figure 55. Effet pharmacologique du peptoïde YC55 sur la fonction du canal I <sub>h</sub> et sur les propriétés membranaires des nocicepteurs des DRG.....	122
Figure 56. Vérification de l'innocuité du peptoïde <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	123
Figure 57. Plan d'expérimentation du modèle NPIO chronique.....	125
Figure 58. Quantification transcriptionnelle des 4 isoformes HCN et TRIP8b.....	126
Figure 59. Distribution de l'ARNm dans le cortex insulaire de souris naïve.....	128
Figure 60. Tests évaluant la sensibilité périphérique et la proprioception au cours des 6 injections d'oxaliplatine à 3mg/kg.....	129
Figure 61. Batterie de tests d'évaluation de la locomotion et du comportement cognitivo-émotionnel à J21 avec une dose cumulée de 18mg/kg d'oxaliplatine.....	131
Figure 62. Effet de dose répétées d'oxaliplatine sur la sensibilité thermique et la dépression du modèle NPIO chronique.....	132
Figure 63. Protocole suivi pour l'essai pharmacologique du peptoïde vectorisé.....	133
Figure 64. Essai pharmacologique du peptoïde YC55 couplé Thr sur la NPIO aigue et chronique .....	134
Figure 65. Innervation de la face d'un rongeur par le nerf trigéminal .....	138
Figure 66. Une partie des isoformes de TRIP8b et leur effet sur la fonction (V <sub>1/2</sub> ) et l'expression <i>in vitro</i> de HCN1 et leur niveau d'expression dans le cerveau .....	141

Figure 67. Essai immunohistochimique HCN1-HCN2 sur coupes de DRG .....	144
Figure 68. Essai de Western Blot en extraction différentielle sur TG .....	145
Figure 69. Paramètres du potentiel d'action .....	146
Figure 70. Imagerie IRMf cérébrale pendant la stimulation au froid de la queue .....	149
Figure 71. Essai de marquage c-fos sur insula NPIO chronique J21 avec stimulation au froid des pattes arrière .....	150
Figure 72. Principe de la microdissection par laser d'un tissu.....	151
Figure 73. Données préliminaires de l'étude fonctionnelle du courant I <sub>h</sub> dans l'insula postérieure .....	152
Figure 74. Phénotype des souris SNS TRIP8b <sup>-/-</sup> .....	153
Figure 75. Données préliminaires de la courbe I/V sur courant I <sub>h</sub> chez des souris TRIP8b <sup>-/-</sup> par rapport aux souris WT.....	155
Figure 76. Dynamique moléculaire entre HCN (bleu) et YC55 (vert) .....	156
Figure 77. Tests YC55 en comparaison à la duloxétine sur animaux sains .....	156
Figure 78. Effet de YC55 sur la sensibilité mécanique du modèle PTX .....	157
Figure 79. Données préliminaires de quantification d'extrait protéique total sur DRG (n=1) de souris V=VEH ; O=NPIO ; N=NPIO+NUCC-5953(5nmol) .....	159
Figure 80. Modèle ADMET .....	160
Figure 81. Données préliminaires de la fréquence cardiaque d'un rat perfusé anesthésié par le peptoïde YC55 en comparaison avec l'ivabradine .....	161

### **Tableaux**

Tableau 1. Étiologie des douleurs neuropathiques périphériques et centrales .....	21
Tableau 2. Principaux protocoles d'utilisation de l'oxaliplatine dans le traitement du cancer .....	23
Tableau 3. Les cinq grades de sévérité des évènements indésirables selon les critères de terminologie commune de l'Institut National du Cancer.....	24
Tableau 4. Récapitulatif des différents tests utilisés pour mesurer les douleurs de type neuropathique chez les animaux, selon le territoire d'intérêt .....	31
Tableau 5. Principaux modèles NPIO aigus .....	35
Tableau 6. Principaux modèles NPIO chroniques.....	36
Tableau 7. Tableau regroupant le phénotype et la fonction I <sub>h</sub> des modèles neuropathiques traumatiques ..	65
Tableau 8. Tableau regroupant le phénotype et la fonction I <sub>h</sub> des modèles neuropathiques chimio-induite .	66
Tableau 9. Primers utilisés pour les RT-qPCR (Eurofins) .....	88
Tableau 10. Sondes (souris) utilisées pour le RNAscope® .....	89
Tableau 11. Anticorps utilisés pour les études biochimiques et les dilutions associées .....	89

## Préambule

Depuis 2010 en France, le nombre de décès par cancer diminue de 0.7% à 2% chaque année, chez les femmes et les hommes, respectivement<sup>1</sup>. Cette baisse considérable est liée à l'augmentation des sensibilisations aux dépistages qui conduit à la détection précoce de la maladie et à l'adaptation des stratégies thérapeutiques. Pour autant, la gestion des effets indésirables d'un traitement efficace reste une préoccupation majeure de la Santé Publique, du fait de l'impact négatif sur la qualité de vie du patient que peuvent avoir certaines molécules anti-cancéreuses.

Dans le cas d'un cancer où la chimiothérapie est indispensable en complément de la chirurgie, le traitement standard cytotoxique montre une efficacité redoutable sur la progression de la maladie, au détriment des cellules saines du corps. La toxicité hépatique et hématologique peut être contrôlée, cependant le développement d'une neurotoxicité peut imposer l'adaptation posologique ou l'arrêt du traitement. En effet, la toxicité neurologique atteint les nerfs périphériques, c'est ce qu'on appelle la Neuropathie Périphérique Chimio-Induite (NPCI). Il est estimé que plus de la moitié des patients sous chimiothérapie toutes molécules confondues développent une NPCI (Seretny et al. 2014). La prévalence est drastiquement augmentée (plus de 90%) en cas de traitement par oxaliplatine, employé dans le traitement de tumeurs solides notamment colorectales.

La NPCI conduit à une douleur neuropathique où les symptômes persistent et s'associent à des comorbidités comme des détresses émotionnelles (anxiété, dépression) et des troubles cognitifs. Seulement, les moyens actuels pour soulager ces malades sont pauvres, comme la prescription de la duloxétine modérément recommandée dans le traitement des NPCI.

Face aux limites thérapeutiques, la prévention et/ou le traitement de ces douleurs neuropathiques iatrogènes est un axe de recherche important. Les objectifs principaux sont l'exploration et la compréhension des NPCI, dans le but de pouvoir viser des mécanismes impliqués dans celles-ci, tout en évitant de moduler les fonctions physiologiques vitales de l'organisme. Les cibles qui répondent à ces caractéristiques sont les protéines présentes le long des voies de la douleur, en particulier les canaux ioniques et leurs protéines associées. Ce sont des complexes protéiques acteurs principaux de la transduction, transmission, modulation et perception du message nociceptif dans les NPCI. A l'heure actuelle, les études pré-cliniques sur les interactions protéine-protéine (IPP) dans la douleur chronique sont prometteuses (Rouvette et al. 2015) et

---

<sup>1</sup> Selon les données de l'Institut National du Cancer publiées en février 2022

l'utilisation clinique de modulateurs de ces interactions ont déjà fait leurs preuves dans divers domaines médicaux (exemple du Maraviroc, antiviral du VIH1).

C'est dans cet axe que s'inscrit mon projet de thèse. Mon travail a porté sur l'étude de l'interaction entre un canal ionique HCN et une protéine partenaire TRIP8b dans un contexte pré-clinique murin de neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine. Cette thèse décrira en premier lieu l'état de l'art sur les atteintes neurologiques de l'oxaliplatine, en second lieu les connaissances sur l'expression et la fonction des canaux HCN, et finalement leur implication dans la douleur neuropathique. Les objectifs des travaux de recherche seront détaillés avant de présenter les données expérimentales obtenues. La discussion des résultats clôturera le manuscrit.

# **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



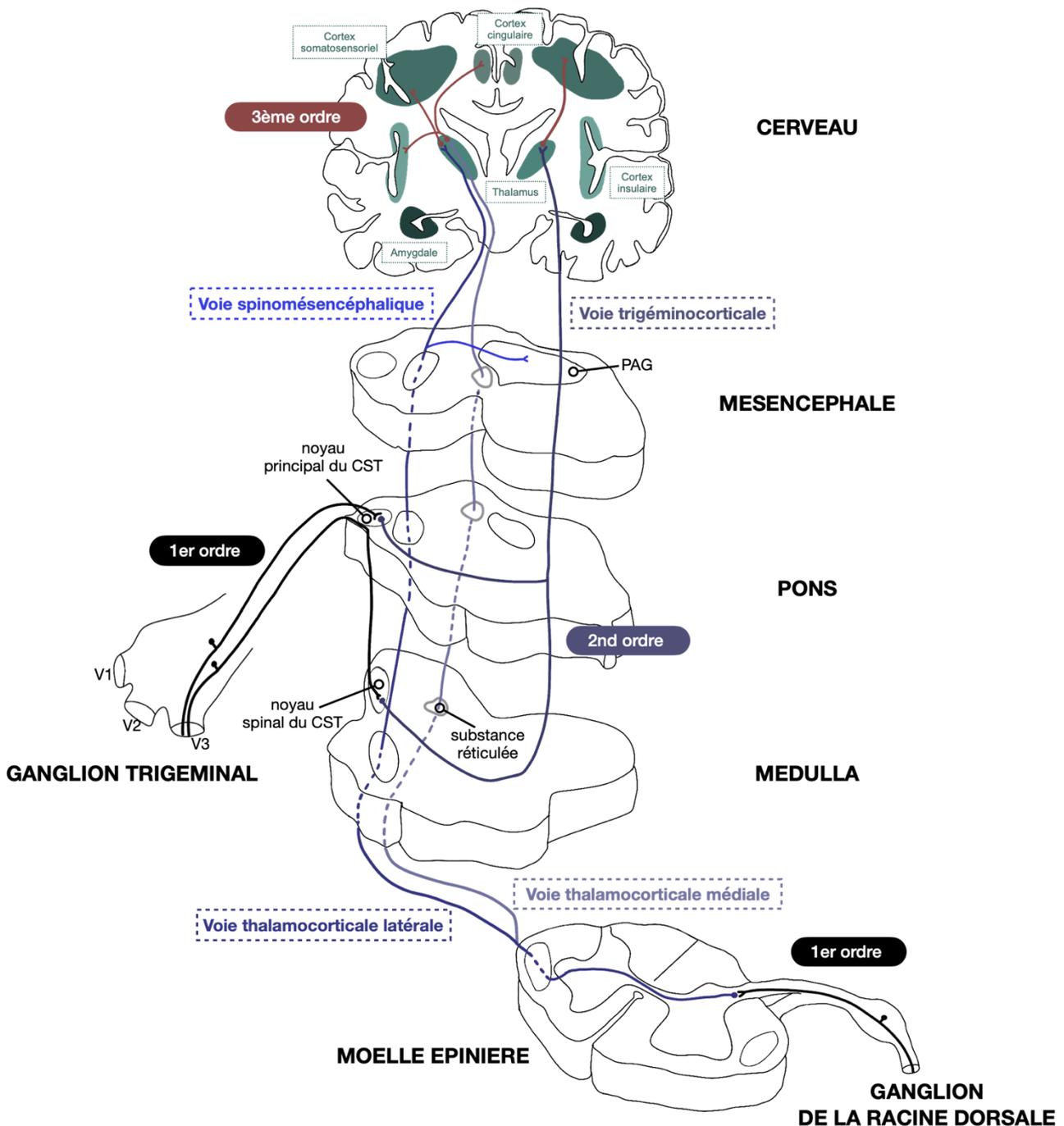
# - CHAPITRE 1 -

## La chimiothérapie et ses atteintes neurologiques

### 1. Neuroanatomie du système sensoriel et encodage de l'information nociceptive

La douleur est définie par l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) comme étant une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée ou ressemblant à celle associée à une lésion réelle ou potentielle ». C'est en réalité une perception subjective unique et individuelle d'un stimulus non nocif ou nocif, qui prend en compte ses dimensions discriminative (sensorielle), affective (émotionnelle) et exécutive (cognitive). La douleur est aiguë ou physiologique lorsqu'elle permet d'alerter l'organisme d'un danger permettant l'évitement ou le retrait, c'est un système de survie. Dans ce cas, elle disparaît rapidement après le traitement du signal. Toutefois, la douleur devient chronique lorsque la symptomatologie persiste plus de 3 mois, elle perd alors sa fonction d'alarme (Treede et al. 2019). Ce type de douleur, pouvant être qualifiée de pathologique, affecte entre 27.2% et 32.7% de la population française (Bouhassira et al. 2004; Chenaf et al. 2018) et plus de 30% de la population mondiale, selon les études (Cohen, Vase, et Hooten 2021). Il est possible de catégoriser la douleur selon son origine. La **douleur nociceptive** ou par excès de nociception fait suite à l'activation des nocicepteurs après agression (inflammation, stimulus mécanique, thermique ou chimique) ou lésion d'un tissu non nerveux. La **douleur neuropathique** par définition est une douleur provoquée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel. La douleur est dite **mixte** lorsque les composantes nociceptive et neuropathique sont associées. Finalement, il est possible aussi d'éprouver une douleur en l'absence de preuve de lésion tissulaire réelle ou potentielle, c'est alors une **douleur nociplastique ou dysfonctionnelle**, résultante d'une perturbation de la nociception.

La notion de douleur se différencie de celle de **la nociception**, qui est le processus sensoriel neuronal d'encodage du stimulus nocif et dans ce cas la notion de douleur n'est pas nécessairement présente. Le processus suit la voie somatosensorielle impliquant les fibres afférentes primaires, la moelle épinière et les centres nerveux supérieurs, permettant l'intégration, la transmission, la modulation et la perception du message nociceptif, qu'il soit de nature thermique (froid, chaud), mécanique (pression, pincement...) ou chimique (substance inflammatoire, venins...) (*figure 1*).



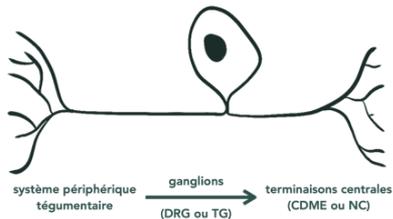
**Figure 1. Voies somatosensorielles principales**

Neurone de 1<sup>er</sup> ordre du DRG/TG à la CDME/CST - neurone de second ordre jusqu'au thalamus - neurone de troisième ordre jusqu'aux autres régions cérébrales

PAG : substance grise périaqueducal, CST : complexe sensitif du trijumeau

### 1.1. Système sensoriel périphérique

Les neurones sensoriels regroupés en fibres afférentes primaires sont les premiers relais de l'information sensitive après le stimulus. Ils sont qualifiés de neurones de premier ordre, en comparaison avec les neurones de second et troisième ordre qui transmettent à leur tour l'information au système nerveux central. Les neurones de premier ordre sont des neurones pseudo-

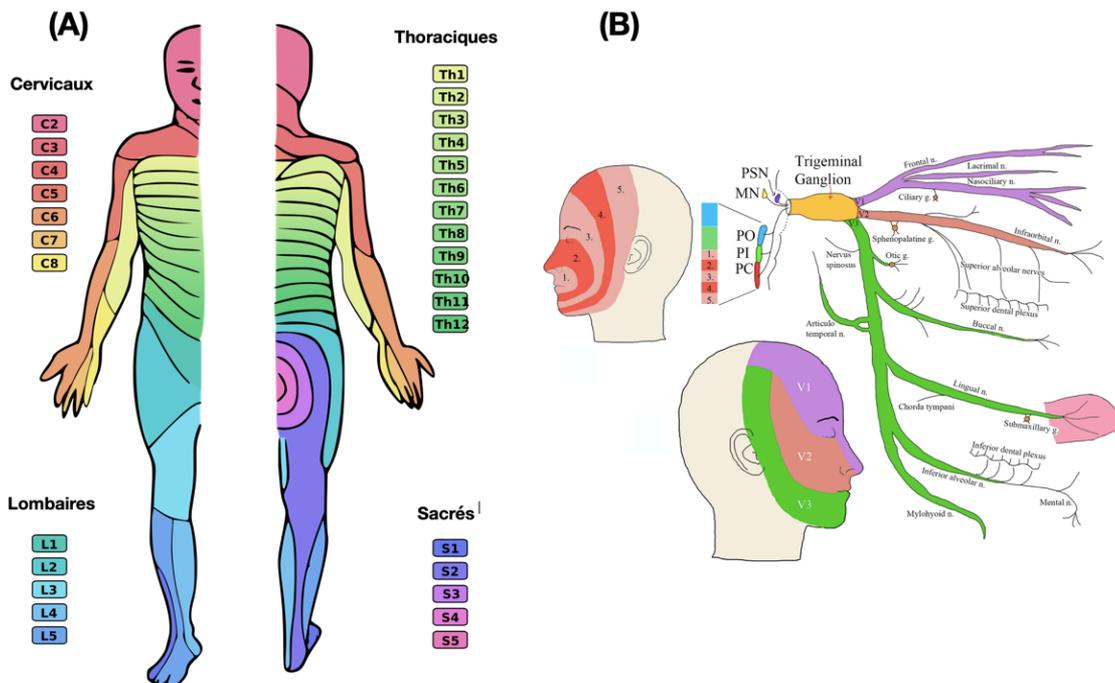


**Figure 2. Neurone pseudo-unipolaire**

unipolaires, avec un corps cellulaire et une seule projection de type axonale se bifurquant en deux branches (figure 2). Les neurones encodent le signal électrique reçu par les récepteurs de la branche longue du système périphérique et le transmettent par la branche centrale courte jusqu'aux terminaisons centrales.

Dans le cas où l'origine du stimulus sensoriel est au niveau **céphalique**, il est pris en charge par les neurones dont les corps cellulaires se situent dans les **ganglions trigéminaux (TG-Trigeminal Ganglion)** et qui se projettent au niveau du complexe sensitif du trijumeau (CST) du tronc cérébral. Si le stimulus sensoriel est **extra-céphalique**, le relais se fait dans les corps cellulaires des **ganglions de la racine dorsale (DRG-Dorsal Root Ganglion)** dont la branche se projette vers la corne dorsale de la moelle épinière (CDME).

Les DRG sont situés de part et d'autre de la moelle épinière. Il y a 29 paires de ganglions chez l'Homme, associées aux 31 nerfs : 8 nerfs cervicaux, 12 nerfs thoraciques, 5 nerfs lombaires, 5 nerfs sacrés et 1 nerf coccygien. Ces nerfs innervent des territoires cutanés précis des membres et du corps (figure 3.A). L'innervation du crâne est spécifique, il existe 12 paires de nerfs crâniens (I à XII) dont la branche axonale se projette dans les noyaux du tronc cérébral. Particulièrement, le nerf V ou trijumeau est dédié à l'innervation sensorielle de la sphère oro-faciale droite et gauche, via les branches ophtalmiques (V1), maxillaires (V2) et mandibulaires (V3). Leur corps cellulaire se situent dans les TG (figure 3.B).



**Figure 3. Innervation céphalique et extra-céphalique**

(A) Dermatome humain relatif aux territoires cutanés innervés par la paire de 31 nerfs cervicaux, thoraciques, sacrés et lombaires. (B) Innervation spécifique de la face par les branches V1, V2, V3 du nerf trijumeau. D'après Edvinson et al. 2020

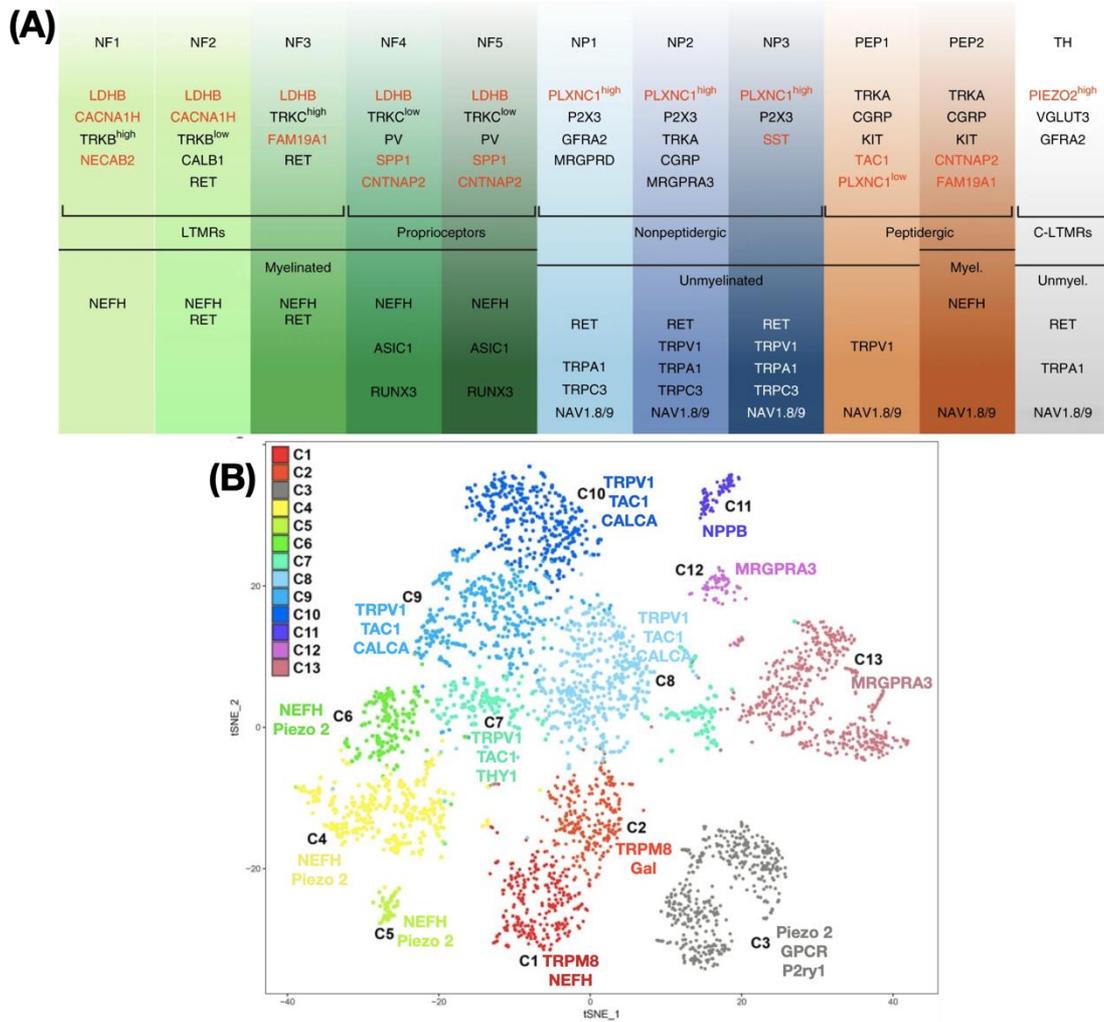
Historiquement, les fibres nerveuses ont été classées selon leurs différences fonctionnelles anatomiques, en particulier selon le diamètre de l'axone et son degré de myélinisation (Gasser et Erlanger 1927). Dans cette classification, nous retrouvons **les fibres A** (avec sous-types A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$ , A $\delta$ ), **les fibres B** et **les fibres C**. Parmi ces types de fibres, les fibres A $\alpha$  et A $\gamma$  innervent principalement les muscles et l'organe tendineux de Golgi, elles sont impliquées dans la proprioception. Les fibres B sont des fibres motrices efférentes, innervant le système nerveux autonome. Les fibres A $\beta$ , A $\delta$  et les fibres C sont responsables de la transmission de l'information somatosensorielle du système tégumentaire au système nerveux central, ce sont les fibres afférentes primaires.

Les **fibres A $\beta$**  possèdent un large diamètre axonal (6 à 12  $\mu\text{m}$ ) et sont myélinisées, leur conférant une vitesse de conduction rapide variant de 15 à 100  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Elles sont spécialisées, d'une part, dans la transmission de l'information proprioceptive des fuseaux neuromusculaires de type II et de quelques récepteurs articulaires. D'autre part, elles sont dédiées au toucher léger non douloureux cutané (le tact) *via* des récepteurs cutanés spécialisés dans la détection de la modalité mécanique à bas seuil d'activation, ou A $\beta$ -LTMRs (*Low-Threshold MechanoReceptors*). Ces récepteurs sont des corpuscules (terminaisons nerveuses encapsulées) situés dans le système tégumentaire de la peau glabre. Nous distinguons les corpuscules de Meissner impliqués dans les pressions mécaniques légères et précises, les disques de Merkel pour le tact fin, les corpuscules de Pacini détectant la vibration et les corpuscules de Ruffini sensibles à l'étirement de la peau. Dans une moindre mesure, les fibres A $\beta$  peuvent être impliquées dans la nociception par des mécanorécepteurs à haut seuil d'activation, ce sont les A $\beta$ -HTMR (*High-Threshold MechanoReceptors*) (Meltzer et al. 2021).

Les **fibres A $\delta$**  sont de petit diamètre (1 à 5  $\mu\text{m}$ ), faiblement myélinisées et avec une vitesse de conduction modérée de 4 à 30  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les terminaisons périphériques sont libres. Ces fibres correspondent majoritairement à des nocicepteurs générant la « première » douleur, décrite comme étant rapide et précise sur la localisation du signal. La population étant hétérogène, plusieurs classifications existent concernant les fibres A $\delta$ . Chez les primates non humains, environ 86% des fibres A $\delta$  sont polymodales avec une sensibilité pour les stimuli mécaniques et pour les températures chaudes (A-MH *A-mecanoheat*) (Djoughri et Lawson 2004). Parmi celles-ci, 2 grands types de fibres ont été décrits (Treede, Meyer, et Campbell 1998). Les fibres de type I présentent un seuil d'activation thermique très élevé (plus de 53°C) et les fibres de type II ont un seuil thermique plus bas (>46°C). Une sous-population des fibres A $\delta$  polymodales répondent à des stimulations au froid de 20°C à -8°C (A-MC *A-mecanocold*). Une majorité des fibres A $\delta$  sont nociceptives HTMR (71%), l'autre partie étant A $\delta$ -LTMR (Cain, Khasabov, et Simone 2001).

Les plus petits neurones sont les **fibres C** (0.2 à 1.5  $\mu\text{m}$ ) non myélinisées présentant une vitesse de conduction lente de 0.4 à 2  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et dont les terminaisons périphériques sont libres. Les fibres C génèrent la « seconde » douleur, plus tardive, diffuse et moins intense que la douleur transmise par les fibres A $\delta$ . Elles sont associées à des récepteurs impliqués dans la perception nocive mécanique ou thermique (froid et/ou chaud), ou les deux modalités à la fois : ce sont des récepteurs majoritairement polymodaux. Parmi les fibres C mécaniques, une petite population serait LTMR, représentant 15% des neurones des DRG (Larsson et Nagi 2022). De plus, nous pouvons distinguer deux types de fibres C selon leurs caractéristiques moléculaires. D'une part, les **C peptidergiques** exprimant le NGF (Nerve Growth Factor) qui, en se liant au récepteur TrkA (tyrosine kinase A), libèrent des neuropeptides (substance P et le CGRP). D'autre part, les fibres **C non-peptidergiques** qui lient l'isolectine B4 (IB4). Les fibres C peuvent également être **silencieuses**, ou mécano-insensibles, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas activées de manière physiologique par une stimulation mécanique, mais elles y sont sensibilisées lors d'une inflammation (Michaelis, Häbler, et Jäenig 1996).

Cette classification anatomique est encore utilisée aujourd'hui, mais les nombreuses **études transcriptomiques** réalisées ces dernières années ont affiné notre connaissance (Lechner 2017). En 2015, l'équipe de Patrick Ernfors a publié une classification de 11 types distincts de neurones sensoriels à partir d'analyse du transcriptome en séquençage sur cellule unique des DRG lombaires de souris (*figure 4.A*) (Usoskin et al. 2015). Plus récemment, une étude transcriptomique spatiale a été réalisée cette fois-ci sur neurones de DRG humains, où 12 clusters de neurones sensoriels ont été mis en évidence : 5 sont des fibres C nociceptives, un cluster de neurones C-LTMR, un de nocicepteur A $\beta$ , deux de A $\beta$ -LTMR, deux de A $\delta$  (LTMR et HTMR) et une population de neurones proprioceptifs (Tavares-Ferreira et al. 2022). Quelques études comparatives entre les expressions géniques des DRG et des TG émergent dans la littérature (Flegel et al. 2015; Kogelman et al. 2017). Les neurones de ces deux tissus présentent un degré élevé de similitude fonctionnelle, toutefois les différences dans l'origine embryonnaire et les territoires qu'ils innervent suggèrent une signature unique pour le TG (Megat et al. 2019). Ainsi, 13 clusters de neurones sensoriels du TG ont été identifiés par transcriptomique chez la souris (*figure 4.B*) (Nguyen et al. 2017). De manière générale, ces classifications objectives non biaisées mettent en relation le profil génique des cellules au type de signal somatosensoriel transduit et parfois même à la taille des neurones analysés (Tavares-Ferreira et al. 2022).



**Figure 4. Proposition de classification des neurones sensoriels par transcriptomique**

**(A)** 11 types de neurones sensoriels de DRG de souris, proposés selon une analyse du transcriptome. D'après Usoskin et al. 2015 **(B)** identification de 13 clusters en fonction de leur profil d'expression génique. Adaptée de Nguyen et al. 2017

Dans ces diverses classifications, nous pouvons discriminer les fibres selon leur seuil de réponses aux stimuli non nociceptifs ou nociceptifs. Les **fibres à bas seuil d'activation** (LT *low threshold*) répondent :

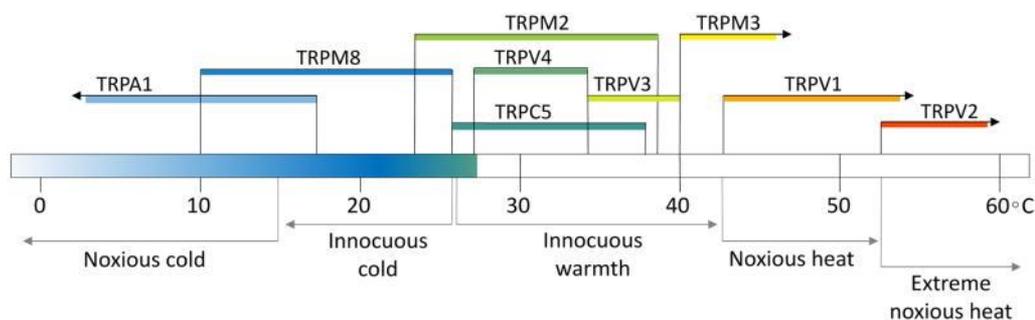
- à la perception du toucher discriminant (étirement, pression de la peau, mouvement des poils) *via* les mécanorécepteurs tactiles cutanés majoritairement de type A $\beta$ -LTMR mais nous avons vu qu'il y avait également des C-LTMR et A $\delta$ -LTMR.
- à la température non nocive par les thermorécepteurs portés par les fibres A $\delta$  ou C
- à la proprioception (mouvement et position des membres) grâce aux propriocepteurs des fibres à conduction rapide A $\alpha$ , A $\gamma$  dans les DRG (population NF4, NF5) mais inexistantes dans les TG.

Les **fibres à haut seuil d'activation** sont les **nocicepteurs**, majoritairement de petit calibre, à terminaisons libres, associés aux A $\delta$  et C et aux A $\beta$  à moindre mesure. Le profil moléculaire de ces nocicepteurs leur confère un rôle de transducteur du stimulus en fonction de sa modalité (thermique, mécanique, chimique) pour le convertir en signal électrique. Ce sont les récepteurs membranaires les premiers effecteurs de l'information nociceptive, la plupart étant polymodaux, ils répondent à des stimulations de plusieurs modalités (McNaughton 2006).

Une population spéciale de nocicepteurs est capable de générer la **pruriception**, définie par une sensation de démangeaisons (ou prurit) qui entraîne le besoin de se gratter, tous exprimant **MRGPR $\alpha$ 3** (récepteur de la chloroquine) (Sharif et al. 2020). Ils correspondent à la population NP2 dans le DRG et C12 dans le TG.

### 1.1.1. Transducteurs thermiques

En condition physiologique humaine, le seuil de perception de la douleur au froid est environ à 15°C. Les températures inférieures sont considérées comme nociceptives. A l'inverse, le seuil de perception de la douleur au chaud est environ à 45°C, les températures supérieures signalent la nociception. Les **canaux appartenant à la superfamille des TRP** « Transient Receptor Potential » sont responsables de la perception nociceptive du chaud ou du froid (*figure 5*) (Buijs et McNaughton 2020; Koivisto et al. 2022). Dans les années 2000 sont découverts le canal TRPM8 pour « Melastatin 8 » sensible au froid entre 10 et 25°C (Peier et al. 2002), le canal TRPA1 pour « Ankyrin A » sensible au froid en dessous de 15°C (Story et al. 2003) et le canal TRPV1 pour « vanilloïde 1 » sensible aux températures supérieures à 45°C. Le canal TRPC5 est également impliqué dans la perception nociceptive du frais, lors d'une chute de température (Zimmerman et al. 2011). L'inhibition de ces récepteurs est antinociceptive dans plusieurs modèles d'animaux de douleurs neuropathiques (Salat et Filipek 2015).



**Figure 5. Canaux de la famille des TRP responsables de la perception thermique**  
Proposition des gammes de températures associées à chaque canal TRP chez les mammifères.  
Hoffstaetter, Bagriantsev et Gracheva 2018

La contribution des **canaux Nav1.8** (gène *SCN10A*) est également évidente dans la perception nociceptive au froid (Zimmermann et al. 2007). Ce sont des canaux sodiques voltage-dépendants résistants à la tétródotoxine, ayant un rôle important dans la génération du potentiel d'action et de l'activité neuronale. Des études génétiques et optogénétiques qui ciblent ces canaux spécifiquement dans les fibres afférentes primaires ont rapporté que leur blocage soulage la douleur à modalité thermique (Lai et al. 2002; Daou et al. 2016).

Les **canaux TREK/TRAAK** de la famille des canaux potassiques K2p sont exprimés dans les cellules excitables et non excitables. TREK-1 et TRAAK sont impliqués dans la perception au chaud nocif, actifs pendant une augmentation drastique de la température et seraient également des régulateurs de l'activation nociceptive par le froid (Noel et al. 2009; Alloui et al. 2006; Pereira et al. 2014).

### 1.1.2. *Transducteurs mécaniques*

Les canaux ioniques sensibles à l'acide, ou **canaux ASIC** « Acid-Sensing Ionic Channels », participent à la mécano-sensibilité, en particulier l'isomère ASIC3. Ces canaux sont perméables aux cations et sont activés par un pH extracellulaire acide. Leur implication dans la sensation douloureuse mécanique est évidente puisque la délétion des gènes ASIC produit soit une augmentation soit une diminution de l'excitabilité neuronale (Price et al. 2001).

La transduction des signaux mécaniques fait intervenir également les **protéines Piezo** (Piezo 1 et 2). L'expression hétérologue de ces deux canaux suffit pour médier un courant activé mécaniquement et leur perte de fonction chez l'homme (mutations) ou chez l'animal (souris knockout) démontre leur rôle essentiel dans le toucher doux et à moindre mesure dans la perception nociceptive mécanique (Coste et al. 2010).

Les **récepteurs purinergiques P2X** activés par l'ATP extracellulaire sont des canaux cationiques perméables aux ions  $Ca^{2+}$ . Parmi les sept sous-unités (P2X1-P2X7) identifiées, les sous-unités P2X2 et P2X3 sont exprimées principalement dans le système périphérique et les sous-unités P2X2, P2X3, P2X4 et P2X6 sont exprimées dans le système nerveux central (Ulmann et al. 2008). De manière intéressante, la sous-unité P2X3 est spécifiquement exprimée dans les nocicepteurs de type C non peptidergiques, démontrant sa forte implication dans l'initiation de la douleur à caractère mécanosensoriel (North 2004).

Les **canaux TREK/TRAAK** contrôlent également la douleur produite par une stimulation mécanique (Noel et al. 2009). Les animaux knockout pour ces canaux présentent une sensibilité mécanique accrue.

Les fibres nociceptives silencieuses mécano-insensibles physiologiquement sont caractérisées par l'expression du **récepteur nicotinique CHRNA3** (Prato et al. 2017; Tavares-Ferreira et al. 2022). Ceux-ci sont décrits dans le DRG, mais pas dans le TG.

### 1.1.3. Transducteurs chimiques

La plupart des canaux précédemment cités sont également sensibles aux agents chimiques. Les canaux ASICs sont activés par les protons à pH acide, les canaux TRPV1 sont activés par des vanilloïdes (capsaïcine) et certains cannabinoïdes, les récepteurs TRPM8 sont activés par le menthol, les récepteurs TRPA1 sont activés par de nombreux composés algogènes irritants (wasabi). Les P2XR sont sensibles aux purines, en particulier l'ATP.

## 1.2. Projection vers le système nerveux central

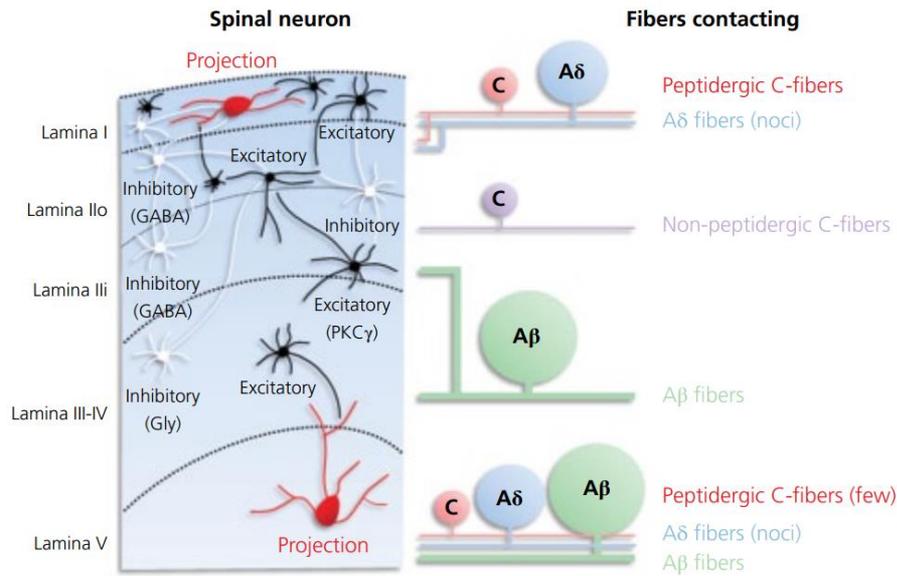
### 1.2.1. Le relai spinal

Une fois transduit, le message sensoriel est conduit du DRG vers la matière grise spinale (CDME) ou du TG vers le CST, puis vers les centres supérieurs par le neurone de second et troisième ordre (*figure 1*).

Dans les différentes couches laminaires de la CDME, ces neurones de premier ordre font synapses avec les neurones de second ordre (*figure 6*). Les projections diffèrent selon les catégories de fibres afférentes impliquées (Peirs et Seal 2016; Peirs, Dallel, et Todd 2020). La **lamina I** est contactée par les nocicepteurs A $\delta$  et les fibres C peptidergiques. La **lamina II** est divisée en deux régions. La lamina II externe (Ilo) reçoit les afférences des fibres C peptidergiques, tandis que la lamina II interne (Ili) reçoit les afférences des fibres C non peptidergiques. Une sous population d'interneurones qui expriment la protéine kinase C  $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) se localise dans la partie ventrale de la lamina Ili et est la cible des fibres non-nociceptives (A $\beta$  myélinisées LTMR). Les **laminas III et IV** sont également la cible des fibres A $\beta$ . Finalement, la **lamina V** contient des neurones WDR<sup>2</sup> (*wide dynamic range* ou neurones convergents) qui sont contactés par les fibres nociceptives A $\delta$  et A $\beta$ -LTMR et C peptidergiques en faible quantité (Basbaum et al. 2009; Latrémolière 2016; Peirs, Dallel, et Todd 2020).

---

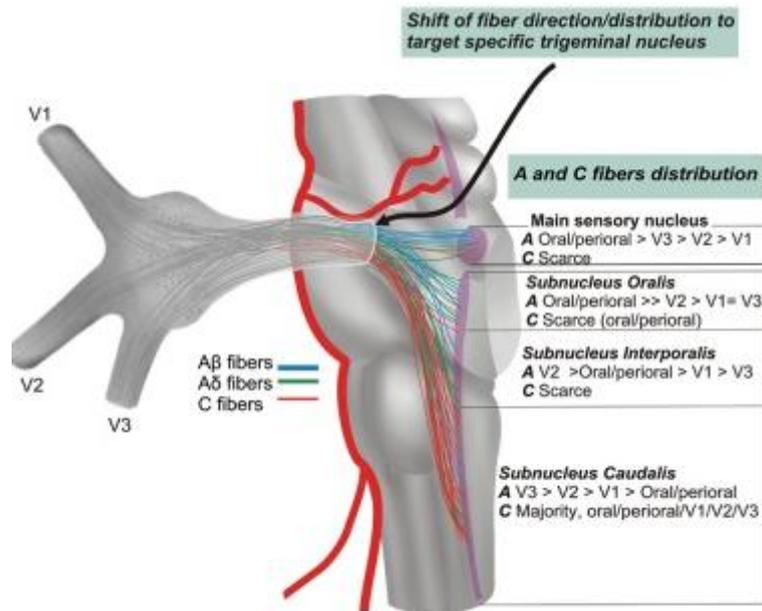
<sup>2</sup> Les neurones WDR en discriminant un stimulus nociceptif d'un stimulus non nociceptif entrainera une plus grande fréquence de décharge.



**Figure 6. Organisation laminaire des projections spinales des fibres sensibles**

D'après Latrémolière 2016

L'organisation laminaire des noyaux CST (noyau principal et noyau spinal) prolonge celle de la CDME. Les fibres Aβ non nociceptives font synapses dans le noyau principal (*figure 7*). Les fibres Aδ nociceptives projettent dans les sous-noyaux **oral** et **interpolaire** du noyau spinal. Les fibres C qui conduisent des informations nociceptives contactent majoritairement les neurones des couches superficielles du **sous-noyau caudal**. Ces fibres peuvent moduler l'activité des neurones WDR du sous-noyau oral par des interneurons (Dallel et al. 2003; DaSilva et DosSantos 2012).



**Figure 7. Projection du nerf trijumeau dans les noyaux du complexe sensitif du trijumeau**

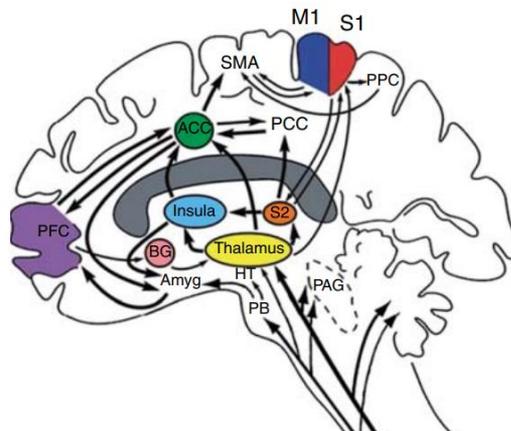
Les fibres Aβ, Aδ des trois branches du nerf V (V1, V2, V3) se projettent dans le noyau principal et les sous noyaux oral et interpolaire. Les fibres C se projettent dans le noyau caudal du CST.

D'après DaSilva et DosSantos 2012

La stimulation des afférences active les neurones de projection de la lamina I, III, IV et V (*figure 6*) afin de projeter l'information sensorielle vers les structures supra-spinales (Peirs et Seal 2016). Ces neurones de projections sont des neurones excitateurs. Dans la lamina I, ils expriment tous le récepteur NK1R (neurokinin 1), dans les couches profondes ce sont des neurones WDR, capables d'identifier l'intensité de la stimulation reçue. Selon l'implication de ces neurones dans la transmission de l'information, les différentes voies ascendantes véhiculent les informations sensorielles à modalité thermique, mécanique, chimique, nociceptive ou non.

### 1.2.2. L'intégration supra-spinale de l'information nociceptive

**La voie lemniscale** transmet l'information tactile (le tact) et proprioceptive. Les neurones de projections sont situés dans les couches III, IV et V. Ces informations sensori-discriminatives non nociceptives permettent l'intégration de la localisation et la temporalité du signal (Basbaum et al. 2009). La **voie extra-lemniscale** par le **tractus spinothalamique** est traditionnellement considérée comme essentielle dans le traitement de la douleur (*figure 1*). Provenant des fibres C et A $\delta$ , les neurones de projections des couches I et V de la CDME et ceux du noyau caudalis du CST acheminent le message nociceptif vers le thalamus (*figure 8*). Le thalamus est un des premiers centres d'intégration du message, en particulier de sa composante sensori-discriminative. C'est également le relais principal vers les régions corticales et limbiques grâce au neurone de troisième ordre.



**Figure 8. Régions corticales et sous-corticales impliquées dans la perception de la douleur et leur connectivité au sein de la voie ascendante**

S1/S2 : cortex somatosensoriel ; ACC : cortex cingulaire ; PFC : cortex préfrontal ; M1/SMA : cortex moteur primaire et supplémentaire ; PPC : cortex pariétal postérieur ; PCC : cortex cingulaire postérieur ; BG : ganglion basal ; HT : hypothalamus ; AMYG : amygdale ; PB : noyau parabrachial ; PAG : substance grise périaqueducal. Adaptée de Apkarian et al. 2005

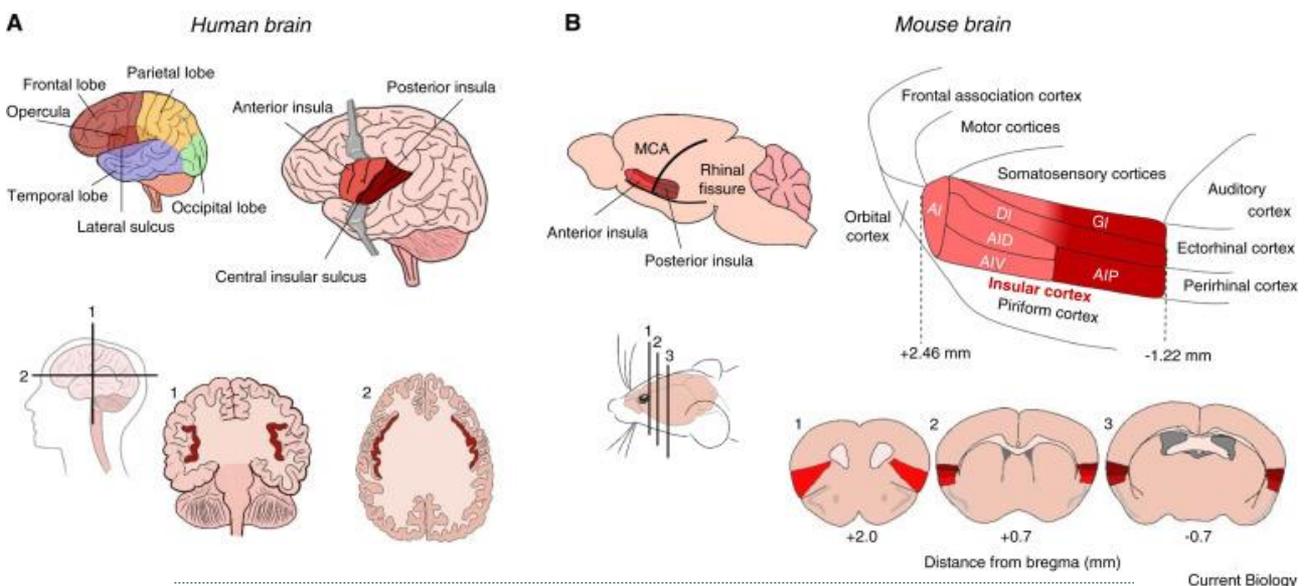
La voie thalamocorticale latérale transmet le signal sensoriel nociceptif du noyau ventro-postérieur latéral du thalamus jusqu'au cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2). Les **cortex S1 et S2** arborent une cartographie somatotopique spécifique puisque son organisation représente chaque partie du corps (théorie de l'homunculus). Le S1 est responsable de la

discrimination sensorielle, déterminant l'origine de la localisation du stimulus douloureux par l'analyse des textures. Le S2 est lui associé à la discrimination de l'intensité du stimulus. Il y a une co-activation de ces deux cortex.

Par ailleurs, la voie thalamocorticale médiale transitant préalablement par les noyaux de la formation réticulée du tronc cérébral transmet les composantes émotionnelles et affectives du signal nociceptif aux régions corticales limbiques comme le **cortex cingulaire antérieur (ACC)** et le **cortex insulaire (CI)**. L'ACC encode les aspects émotionnels et cognitifs du processus de la douleur. Il participe au processus d'apprentissage de l'évènement douloureux. Le CI a un rôle dans l'intégration de l'information nociceptive autant sensorielle qu'affective. Moins décrit, le **tractus spino-mésencéphalique (figure 1)** est constitué exclusivement d'axones de neurones de projection nociceptifs de la lamina I, qui forment des terminaisons synaptiques au niveau de la **substance grise périaqueducale (PAG)** ou le noyau parabrachial latéral du pont ; le neurone de troisième ordre se projette ensuite vers le S1 ou S2 (aspect sensori-discriminatif de la douleur) ou vers l'amygdale (aspect émotionnel de la douleur), respectivement. **L'amygdale** étant impliquée dans l'intégration sensorielle et cognitive de l'évènement douloureux et participe à l'évitement du signal.

### 1.2.3. La contribution du cortex insulaire dans la douleur

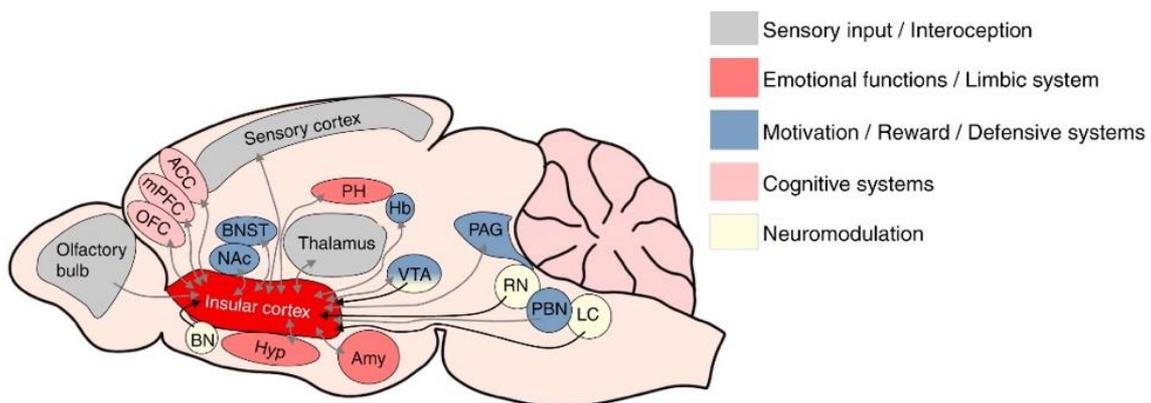
Anatomiquement, chez les primates l'insula est une structure profonde du cortex, cachée derrière le sillon latéral et l'opercule. Elle est séparée en **insula antérieure (IA)** et **postérieure (IP)** par le sillon insulaire central. Chez les rongeurs, l'insula est à la surface du cortex, proche de la scissure rhinale (*figure 9*).



**Figure 9. Le cortex insulaire chez l'homme et chez la souris**

Le cortex insulaire se divise en région antérieure et postérieure séparée (A) chez l'Homme par le sillon insulaire centra et (B) chez la souris par la scissure rhinale. AI : insula agranulaire ; DI : insula dysgranulaire, AID/V/P : insula agranulaire dorsal, ventral, ou postérieur ; GI : insula granulaire. D'après Gogolla 2017

Chez toutes les espèces, le CI est divisé en trois régions qui se différencient par leur architecture neuronale. Le **CI granulaire**, le **CI agranulaire** qui ne possède pas de couche 4 corticale et le **CI dysgranulaire** avec une fine couche corticale IV. De plus, chez certains mammifères, la couche 5 possède de larges neurones bipolaires (Gogolla 2017). L'insula joue un rôle clé dans de multiples fonctions cérébrales, comme dans le processus d'intégration des sensations internes et externes du corps, où son implication dans **l'intéroception** et sa fonction de cortex olfactif et **gustatif** sont aujourd'hui bien décrites, mais aussi dans la régulation de **l'émotion** et des sentiments (apathie, empathie). En réponse aux sensations perçues, l'insula détermine les priorités de traitement entre les modalités et exerce ainsi un contrôle autonome important (e.g. dans la régulation de la fréquence cardiaque). C'est une structure également fortement impliquée dans la gestion de la douleur et les états mentaux associés (anxiété, peur) (Gogolla 2017; Berret et al. 2019). Ces diverses fonctions sont facilitées par une connectivité importante du CI avec les régions corticales et sous-corticales où les afférences cholinergiques sont nombreuses (*figure 10*). Il est au centre d'un réseau de réception et d'envoi d'informations inhibitrices et excitatrices, où des connexions distinctes avec l'IA ou l'IP ont récemment été mises en lumière chez le rongeur par une équipe allemande à l'aide d'outils viraux (Gehrlach et al. 2020).



**Figure 10. Connectivité de l'insula avec les régions corticales et limbiques**

Le cortex insulaire des rongeurs communique avec les régions cérébrales en envoyant ou recevant des informations en fonction de leur modalité. Les flèches noires représentent les signaux cholinergiques. ACC : cortex cingulaire antérieur ; Amy : amygdale ; BNST : noyau du lit de la stria terminalis ; Hb : habenula ; Hyp : hypothalamus ; mPFC : cortex préfrontal médian ; NAc ; noyau accumbens ; OFC : cortex orbitofrontal ; PAG : substance grise périaqueducale ; PBN : noyau parabrachial ; PH : parahippocampe. D'après Gogolla 2017.

Le cortex granulaire de l'IP reçoit environ 40% des afférences du tractus spinothalamique. Ce sont particulièrement des informations **thermo-nociceptives (principalement le froid) et mécano-nociceptives** du noyau ventro-postérieur du thalamus qui ont été précédemment relayées au niveau de la lamina I de la CDME (Craig et al. 2000; Garcia-Larrea 2012; Liberati et al. 2020). Sa connectivité avec le cortex S1, S2 et le cortex cingulaire participe à sa fonction de perception de la douleur. L'imagerie fonctionnelle cérébrale IRMf a montré chez l'humain une activation de l'IP lors

d'un événement douloureux, étroitement corrélée avec l'intensité du stimulus nociceptif (Mazzola et al. 2012). De plus, un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) survenu dans la région de l'IP s'associe à des douleurs neuropathiques centrales et sa lésion peut entraîner une perte partielle ou totale de la sensation de froid par les mains (Garcia-Larrea et al. 2010; Birklein et al. 2005). Ces données cliniques sur les sensibilités thermiques sont confortées par des expérimentations sur l'animal qui montrent que l'IP présente une carte somatotopique de codage de l'information thermique du froid et du chaud perçue par la peau (Vestergaard et al. 2023). Aussi, la stimulation des pattes des souris par une application de menthol (activateur des récepteurs TRPM8, relatif au froid non nociceptif) induit une activation neuronale de l'IP, qui est absente chez les souris TRPM8 *knockout* (Beukema et al. 2018).

Ainsi, l'IP participe aux composantes somatosensorielles de la douleur, pendant que la partie antérieure de l'insula qui s'active plus tardivement lors d'un événement douloureux (quelques millisecondes après l'IP), participe à ces aspects affectifs. Nous pouvons parler **d'intégration consciente de la nociception**, qui apporte la valence émotionnelle de la douleur : la menace, la peur, l'anxiété et également l'empathie lorsqu'une tierce personne expérimente la douleur (Craig 2009; Gélébart, Garcia-Larrea, et Frot 2022). Celle-ci est en partie aidée par la connectivité importante de l'IA qui s'établit principalement entre la partie rostrale agranulaire et les régions limbiques du cerveau telles que l'amygdale et le striatum (Jasmin, Granato, et Ohara 2004; Lu et al. 2016; Gehrlach et al. 2020).

#### 1.2.4. Modulation du message nociceptif

C'est au niveau de l'ensemble de ces relais spinaux et supra-spinaux qu'ont lieu des modulations du signal nociceptif, par l'intermédiaire de messagers excitateurs ou inhibiteurs. **Dans la CDME**, elles reposent en partie sur la théorie du « portillon » ou gate control (Wall 1978). Le paradigme propose l'existence d'un mécanisme inhibiteur par lequel les afférences myélinisées non nociceptives spinales bloquent celles des fibres nociceptives A $\delta$  ou C, par des neurones inhibiteurs situés dans la lamina II. Ceci suggère l'importance de la balance excitation/inhibition dans la transmission du signal nociceptif puisqu'un déséquilibre contribuerait à l'étiologie de la douleur chronique. Récemment, un mécanisme semblable a été décrit dans le S1, où une perte d'inhibition des neurones pyramidaux de la couche V participe à la mise en place d'une douleur neuropathique chronique *in vivo* (Harding et Salter 2017).

Les contrôles supra-spinaux par **la voie descendante** (du cortex à la CDME) sont également impliqués dans la modulation du signal de douleur. Encore une fois, la balance excitateur/inhibiteur est au centre du paradigme. En effet, l'activation des voies inhibitrices descendantes impliquant des projections sérotoninergiques de la médulla rostro-ventrale et noradrénergiques du locus cœruleus

inhibe la transmission spinale du message. Tandis que l'activation des neurones de l'ACC potentialise les conséquences d'une stimulation nociceptive par les projections facilitatrices sérotoninergiques. La perturbation de l'ensemble de ces équilibres participe à l'initiation et/ou à la chronicisation de la douleur neuropathique (Mills, Keay, et Henderson 2021).

## 2. Les neuropathies périphériques induites par l'oxaliplatine

### 2.1. Généralités sur les douleurs neuropathiques

Aujourd'hui, jusqu'à 10% de la population mondiale déclare souffrir de douleur neuropathique (Scholz et al. 2019). La lésion ou maladie potentielle du système nerveux central ou périphérique fait partie de l'un des 5 objets de consultation en service de neurologie (Watson et Dyck 2015). Il est néanmoins difficile de délimiter les conditions du diagnostic car la douleur n'est parfois qu'une description subjective du patient. L'identification d'une douleur neuropathique est plus aisément posée lorsque la lésion du système nerveux central ou périphérique est évidente après observation par des techniques **d'imagerie et/ou de biopsie**. Par exemple, lors d'un diagnostic de douleur neuropathique centrale post-AVC), la lésion ischémique est observable par IRM.

Dans le cas où la lésion ou la maladie n'est pas préalablement diagnostiquée, des examens complémentaires sont nécessaires. La quantification de la perception sensorielle est possible à l'aide d'examen cliniques « Quantitative Sensory Test » (**QST**), qui permettent d'évaluer la sensibilité à la température ou la sensibilité mécanique, à l'aide d'objets thermostatés ou de filament de von Frey respectivement. Ces évaluations sont parfois accompagnées de techniques d'exploration électrophysiologique comme l'**électroneuromyogramme** qui permet de mesurer la conduction nerveuse suite à un stimulus et des questionnaires standardisés comme le « Douleur Neuropathique en quatre questions » (**DN4**) qui permettent d'apprécier et de classer les symptômes à caractère sensoriel (Bouhassira et al. 2004; Pfau et al. 2012). L'équipe de Finnerup et al, a mis en place une graduation de la douleur neuropathique pour la recherche clinique, qui permet de distinguer la douleur neuropathique possible, probable ou confirmée, en prenant en compte toutes ces données préalablement décrites : présence d'une lésion ou d'une maladie connue ? quels signes sensoriels ? (Finnerup, Kuner, et Jensen 2021). L'impact et l'incidence de la douleur neuropathique sont évalués plus subjectivement à l'aide d'outils facilement abordables pour le patient. Lors de la prise en charge par le corps médical, les patients sont invités à quantifier leur douleur de 0 (pas de douleur) à 10 (la pire douleur imaginable) sur l'échelle de notation numérique de la douleur (**NRS**) (Haanpää et al. 2011). L'utilisation d'une échelle visuelle analogique (**VAS**), ou d'une échelle de quantification verbale de la douleur (**VRS**) repose sur le même principe.

### 2.1.1. Symptômes des douleurs neuropathiques

La douleur neuropathique se manifeste chez le patient par des troubles sensoriels dits « positifs », caractérisés de manière générale par des fourmillements, des picotements, des sensations de décharge, en absence de stimulus identifié (Bouhassira et al. 2004; Devor 2018). Cette **douleur spontanée** fréquemment retrouvée pourrait être expliquée par la présence ectopique de potentiel d'action dans les voies nociceptives et particulièrement dans les DRG (Devor 2018). La **douleur évoquée** (i.e. provoquée par un stimulus) est un autre symptôme de la douleur neuropathique engageant la sensibilisation périphérique et centrale, où l'excitabilité des neurones du DRG est augmentée. Elle peut être évoquée par un stimulus mécanique ou thermique non nociceptif (**allodynie**), ou nociceptif (**hyperalgie**) (Costigan, Scholz, et Woolf 2009). Bien qu'il y ait un diagnostic de douleur neuropathique, dans certains cas le patient ne rapporte pas de douleur à proprement parler, mais uniquement une sensation anormale ou inattendue. Nous distinguons les sensations anormales qualifiées de désagréables dans le cas de **dysesthésies** et celles non désagréables dans le cas de **paresthésies**. L'ensemble de ces sensations sont majoritairement localisées dans le territoire nerveux atteint. A l'inverse, les signes cliniques peuvent être « négatifs » lorsque la sensibilité générale est perdue, nous parlons d'hypoesthésie. L'hypoalgésie apparaît quant à elle lorsqu'il y a une perte de la sensibilité à la douleur.

De plus, la douleur étant une expérience multidimensionnelle, la perturbation des aspects émotionnels s'ajoute à ces troubles sensoriels. Le développement de troubles de l'humeur et du sommeil participe à l'altération de la qualité de vie du patient douloureux neuropathique (Attal et al. 2011 ; Kerckhove et al. 2021). Il a également été rapporté une augmentation de la prévalence de trouble majeur de la **dépression** chez ces patients (Maletic et Raison 2009). Une étude clinique multicentrique sur cohorte de patients atteints de douleur neuropathique périphérique a estimé que la prévalence actuelle de comorbidités psychiatriques était de 20.3% pour les troubles anxieux et 29.7% pour les troubles de l'humeur (Radat, Margot-Duclot, et Attal 2013 ; Attal et al. 2011). De ce fait, l'évaluation de la santé mentale par le clinicien est un besoin primordial pour des patients en demande. Des outils existent, tels que des échelles déterminant l'état d'anxiété et de dépression (*Hospital Anxiety and Depression Scale* HADS) (Zigmond et Snaith 1983), ainsi qu'une classification des troubles mentaux selon des critères standardisés dans le DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of mental disorder*, American Psychiatric Association).

### 2.1.2. Origine et étiologie des douleurs neuropathiques

L'origine des douleurs neuropathiques est classée en fonction de la **localisation** de l'atteinte (système nerveux périphérique ou système nerveux central) et de la **maladie sous-jacente** (Finnerup, Kuner, et Jensen 2021). Par exemple, la névralgie post-zostérienne atteint le système nerveux périphérique et le plus souvent un nerf du thorax, la douleur neuropathique se manifeste

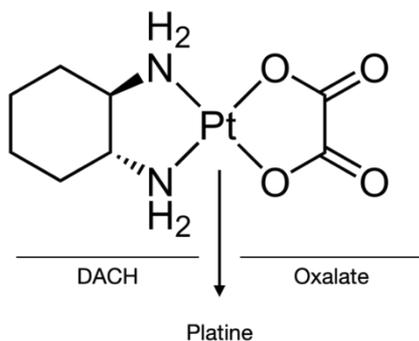
alors dans le territoire du nerf touché. Les douleurs neuropathiques des patients atteints de polyneuropathie (système nerveux périphérique) se manifestent de manière symétrique dans les mains et/ou les pieds (symptômes dits en « gants et chaussettes »). L'étiologie des maladies sous-jacentes à ces douleurs neuropathiques est multiple. Les dommages du système nerveux périphérique peuvent être d'origine toxique, métabolique, traumatique, compressive ou génétique. Alors que les atteintes du système nerveux central sont principalement d'origine traumatique, vasculaire, ou associées à des troubles neurologiques (*tableau 1*).

	Origine	Exemples	Manifestations neuropathiques associées
<b>Douleur neuropathique périphérique</b>	Toxique	Exposition à l'alcool, drogues (traitement par chimiothérapie)	Polyneuropathie douloureuse
	Métabolique	Diabète, carence en vitamine B	Polyneuropathie douloureuse
	Traumatique	Chirurgie (section du nerf), amputation	Douleur fantôme Radiculopathie
	Compressive	Compression d'un nerf périphérique	Névrалgie trigéminalе
	Génétique	Maladie de Charcot-Marie Tooth, maladie de Fabry	Polyneuropathie douloureuse
	Infectieuse	Zona (virus Herpes Zoster), SIDA (virus VIH)	Névrалgie post-herpétique
<b>Douleur neuropathique centrale</b>	Traumatique	Trauma cérébral, lésion de la moelle épinière	Douleur centrale post-traumatique
	Vasculaire	Accident Vasculaire Cérébral	Douleur centrale post-AVC
	Troubles neurologiques	Sclérose en plaque, maladie de Parkinson	Douleur centrale Névrалgie trigéminalе

**Tableau 1. Étiologie des douleurs neuropathiques périphériques et centrales**

## 2.2. Structure et indications cliniques de l'oxaliplatine

La molécule d'oxaliplatine appartient à la classe des antinéoplasiques, dans laquelle l'atome de platine central sous la forme oxydée (+II) est complexé avec le 1.2-diaminocyclohexane (**DACH**)



**Figure 11. Formule de l'oxaliplatine**

et un groupement **oxalate** (*figure 11*). Historiquement, l'oxaliplatine (à l'origine nommée 1-OHP) a été conçue en éliminant les deux groupes radicaux amines présents dans la molécule de cisplatine qui sont à l'origine de sa toxicité néphrétique. Les premiers essais cliniques du cisplatine ont débuté dans les années 1970 et l'autorisation de mise sur le marché des médicaments antitumoraux a suivi (Rosenberg et al. 1969). A l'origine, ce composé était celui qui avait la meilleure efficacité contre les cancers testiculaires et ovariens par la

formation d'adduits de platine sur l'ADN. Néanmoins, sa toxicité importante sur les fonctions rénales et l'existence d'une résistance ont provoqué dans les années 90 une limitation de son utilisation (Di Francesco, Ruggiero, et Riccardi 2002). De nombreuses études ont alors émergé avec l'utilisation de dérivés de platine dont certains groupements du cisplatine ont été modifiés, pour garder son efficacité sur les cellules tumorales tout en contournant les problèmes majeurs associés (Los et al. 1990 ; Di Francesco, Ruggiero, et Riccardi 2002).

Parmi les 3000 analogues du **cisplatine** synthétisés, deux composés de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération ont été distingués. Le sel de platine de 2<sup>ème</sup> génération, le **carboplatine**, montre une diminution des effets néphrotoxiques par rapport au cisplatine, mais est moins efficace dans la formation d'adduits (Harrap 1985). Les résultats cliniques prometteurs étaient avec l'utilisation de la molécule de 3<sup>ème</sup> génération, l'**oxaliplatine**, issue d'une substitution des deux groupements amines du cisplatine : le premier groupement a été remplacé par un ligand non hydrolysable en conformation trans (le DACH), qui a pour but de diminuer la résistance au traitement. Le deuxième groupement est l'ajout d'un groupe plus anionique, qui est l'oxalate (Tashiro et al. 1989).

Ces trois sels de platine sont aujourd'hui d'usage fréquent en oncologie. Depuis sa mise sur le marché en 2002, l'oxaliplatine dosée à 85 mg/kg a rapidement été utilisée en chimiothérapie adjuvante avec le 5-Fluorouracile (5-Fu) et la Leucovorine (acide folinique ou folinate) dans le cas de cancer du côlon au stade II et III, après résection chirurgicale de la tumeur (André et al. 2009). Cette combinaison thérapeutique de première ligne est prescrite dans le cadre du protocole nommé **FOLFOX** (André et al. 2004). D'autres protocoles existent associant l'oxaliplatine à d'autres cytotoxiques ou antimétabolites, pour s'étendre au traitement de cancer de la sphère digestive (rectum, pancréas) principalement lorsqu'ils sont métastatiques. Nous pouvons citer premièrement le protocole **XELOX** qui associe la Capecitabine, un antimétabolite de la famille des fluoropyrimidines, à l'Oxaliplatine dosée à 130 mg/m<sup>2</sup>, suivi par des patients atteints de cancer colorectal métastatique (Cassidy et al. 2004). Deuxièmement, les protocoles en trithérapie **FOLFIRINOX** ou **FOLFOXIRI** où l'irinotecan, un agent antinéoplasique qui inhibe l'ADN topoisomérase I, est ajouté aux deux composés cytotoxiques présents dans le protocole FOLFOX (Ychou et al. 2008 ; Vienot et al. 2020). Ils sont utilisés en traitement de référence dans le cancer du canal pancréatique (*tableau 2*).

Nom du protocole	Combinaison thérapeutique	Posologie de l'oxaliplatine	Type de cancer	Durée protocole
FOLFOX-4	5-Fu + Leucovorine	85 mg/m <sup>2</sup> Infusion i.v 2H00	Colon / Rectum	Toutes les deux semaines = 1 cycle pendant 12 cycles
XELOX/ CAPOX	Capecitabine	130 mg/m <sup>2</sup> Infusion i.v 2h00	Colon / Rectum métastatique	Toutes les trois semaines = 1 cycle pendant 12 cycles
FOLFIRINOX/ FOLFOXIRI	5-Fu + Leucovorine + Irinotecan	85 mg/m <sup>2</sup> Infusion i.v 2h00	Canal Pancréatique / Colon / Rectum métastatique	Toutes les deux semaines = 1 cycle pendant 12 cycles

**Tableau 2. Principaux protocoles d'utilisation de l'oxaliplatine dans le traitement du cancer**

### 2.3. Données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

En 2000, les équipes de Lévi et Graham ont étudié la pharmacocinétique de l'oxaliplatine chez l'humain, qui est particulière puisqu'elle est décrite par un modèle à trois compartiments. En effet, l'oxaliplatine passant rapidement les membranes cellulaires, environ 40% s'accumulent de **manière irréversible dans les érythrocytes**, avec une concentration maximale dans les 3 heures suivant l'administration (Lévi et al. 2000). La moitié de la proportion restante (33%) se fixe aux **protéines plasmatiques**, principalement l'albumine (Graham, Muhsin, et Kirkpatrick 2004). Ces deux localisations sont considérées comme pharmacologiquement inactives sur les cellules tumorales. Les propriétés antinéoplasiques sont permises grâce à la **fraction d'oxaliplatine dite « libre »** (i.e. non liée à des protéines), équivalente à 27% de la dose totale administrée. Le pic de concentration plasmatique de l'oxaliplatine est obtenu au bout de deux heures de perfusion. Quant à son élimination, elle se réalise de manière triphasique, avec des phases initiales **courtes  $\alpha$**  ( $t_{1/2} = 0.43h$ ) et  **$\beta$**  ( $t_{1/2} = 16.8h$ ) représentant la clearance de l'oxaliplatine « intacte » par la filtration glomérulaire, où 30 à 50% est retrouvée dans les urines 48h après administration, contre 3% dans les fèces. Ces phases courtes sont suivies par une phase **longue terminale  $\gamma$**  où le temps de demi-vie atteint 273 heures dans le cas d'une posologie d'oxaliplatine à 130 mg/kg (Graham, Muhsin, et Kirkpatrick 2004). Des concentrations plasmatiques élevées de platine à hauteur de 500 ng/L ont été mesurées encore jusqu'à 20 mois après l'arrêt du traitement chez des patients atteints de cancer ayant reçu une dose cumulée d'oxaliplatine d'environ 600 mg/m<sup>2</sup> (Brouwers et al. 2008).

Les études du mécanisme d'action de l'oxaliplatine à l'origine de son efficacité cytotoxique ont montré que des transporteurs avaient un rôle déterminant dans la pénétration cellulaire (Harrach et Ciarimboli 2015). En particulier, les transporteurs de cations organiques **OCT1 et 2** médient la diffusion de l'oxaliplatine dans les cellules tumorales, la surexpression de ces transporteurs induit une augmentation des concentrations intracellulaires de platine (S. Zhang et al. 2006). D'autres types de transporteurs sont également impliqués, notamment les transporteurs d'efflux du cuivre (Ctr1) et les transporteurs cuivre ATPase, ATP7A et ATP7B (Harrach et Ciarimboli 2015).

Une fois diffusée dans la cellule, l'oxaliplatine est **hydrolysée** entraînant la perte du groupement **oxalate** pour être libéré dans le plasma et le groupement **trans-DACH** vient se fixer sur l'ADN nucléaire et mitochondrial, afin de former des **adduits**. Précisément, des liaisons inter-brins (et intra-brins à moindre mesure), s'établissent avec le platine au niveau de deux résidus guanines adjacents ou sur une guanine et une adénine de l'ADN (Woynarowski et al. 1998 ; Faivre et al. 2003). Celles-ci provoquent une torsion de la double hélice, bloquent les ADN polymérases dans leur action de réplication et donc ne permet pas la transcription de l'ADN. C'est la mort de la cellule tumorale. L'encombrement stérique et l'hydrophobie du groupement trans-DACH apportent ce potentiel cytotoxique accru par rapport au cisplatine.

## 2.4. Toxicité de l'oxaliplatine

Si l'oxaliplatine montre une tolérance clinique plutôt améliorée chez les patients atteints de carcinomes colorectaux par rapport à d'autres composés antinéoplasiques, cette molécule induit des effets iatrogènes majeurs puisqu'elle altère, à court et long-terme, la qualité de vie des patients. Ces événements indésirables sont quantifiables selon les critères de terminologie commune (*Common Terminology Criteria for Adverse Events* ou **CTCAE**) de l'Institut National du Cancer (NCI). Cette échelle permet de déterminer leur grade de sévérité (*tableau 3*).

Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Asymptomatique ou légers symptômes ; observation clinique uniquement ; pas d'intervention nécessaire	Symptômes modérés ; limite les activités quotidiennes	Symptômes sévères ; limite l'autonomie ; besoin d'assistance	Mise en danger de la vie du patient ; intervention urgente indiquée	Mort

**Tableau 3. Les cinq grades de sévérité des événements indésirables selon les critères de terminologie commune de l'Institut National du Cancer**

L'oxaliplatine en association avec le 5-Fu provoque une toxicité hématologique dans plus de 20% des cas et atteint le grade 3 à 4 des événements indésirables. La toxicité est caractérisée par une anémie, une thrombopénie et une neutropénie (déficit en polynucléaire neutrophile). Chez plus de 25% des traités, une toxicité gastrointestinale (grade 3 et 4) se manifeste par des diarrhées, des nausées, des vomissements et une inflammation de la muqueuse gastrointestinale. De plus, une réaction allergique peut survenir lors de la perfusion avec des réactions cutanées voire un choc anaphylactique. Enfin, l'oxaliplatine induit une neurotoxicité principalement du **système nerveux périphérique** qui représente l'évènement indésirable dose-limitant le plus contraignant, puisqu'elle est à l'origine de symptômes caractéristiques de douleur neuropathique et conduit à l'adaptation de la posologie de départ, au risque de compromettre l'effet thérapeutique sur la progression du cancer (André et al. 2004; Ramanathan et al. 2003). De plus en plus d'études observent un effet

neurotoxique de l'oxaliplatine sur le **système nerveux central**, décrivant un nouveau syndrome nommé « **chemo-brain** » ou brouillard cognitif, caractérisé par des troubles de la mémoire, de l'apprentissage et des fonctions motrices (Ahles et al. 2010; Ahles 2012). La mémoire verbale serait la plus touchée (Cruzado et al. 2014). Enfin, **l'anxiété et la dépression** sont fréquemment diagnostiquées chez les patients sous traitement par oxaliplatine. Cet état de détresse émotionnelle ou psychologique est corrélé avec le développement de symptômes neuropathiques (Toftthagen et al. 2013; Kerckhove et al. 2021).

## **2.5. La neurotoxicité induite par l'oxaliplatine à l'origine de la douleur neuropathique**

L'absence d'une protection au système nerveux périphérique le rend vulnérable aux agents extérieurs (cytotoxiques). La présence dans l'organisme d'agents toxiques tel que l'oxaliplatine, induit des dommages irréversibles. La polyneuropathie périphérique est la conséquence la plus invalidante de la neurotoxicité induite par oxaliplatine (NPIO), diminuant drastiquement la qualité de vie des patients. Il en existe deux formes : **la NPIO aiguë et la NPIO chronique**. La NPIO aiguë ne se manifeste pas avec d'autres composés de platine. Cet événement indésirable est quasi-inévitable puisqu'il est observé chez **98% des patients** juste après l'administration de l'oxaliplatine selon le protocole FOLFOX et disparaît en quelques jours (Attal et al. 2009; Argyriou, Cavaletti, Briani, et al. 2013). Néanmoins, la NPIO réapparaît lors des perfusions suivantes, où les symptômes persistent et s'intensifient, c'est la NPIO chronique.

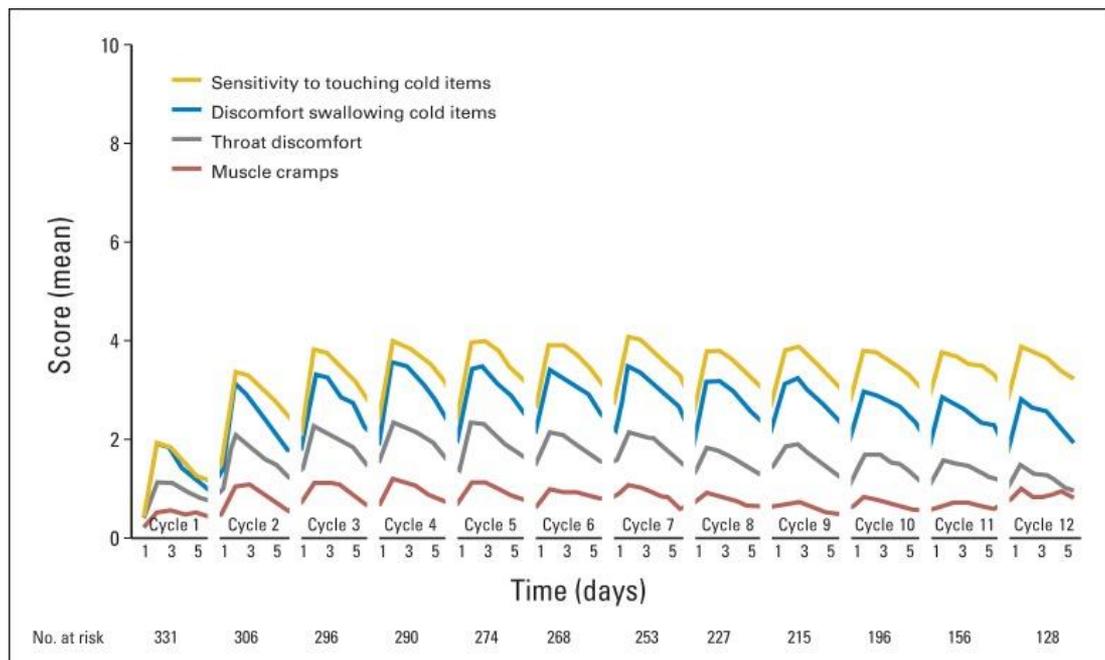
### *2.5.1. Manifestations cliniques des NPIO*

**Les symptômes aigus** les plus caractéristiques sont des **paresthésies** ou **dysesthésies** induites par le froid. Ce sont des fourmillements, des picotements et des engourdissements qui apparaissent au niveau de la sphère **péri-orale**, comme les lèvres, la bouche, la langue, le pharynx, le larynx, mais aussi au niveau des **mains** et des pieds (grade 1 à grade 2 des CTCAE). Ils sont souvent corrélés à des crampes musculaires (Argyriou, Cavaletti, Briani, et al. 2013). La qualité de vie de ces patients évaluée par des questionnaires spécifiques (**EORTC QLQ-C30** par exemple) est diminuée dès le premier cycle de traitement par oxaliplatine (van Haren et al. 2020).

Une étude clinique Américaine a suivi les patients pendant leurs 12 cycles de cure FOLFOX (85mg/kg<sup>2</sup> d'oxaliplatine, 5-Fu et Leucovorine), les 6 premiers jours après chaque administration (Pachman et al. 2015) (*figure 12*). Pour chaque symptôme, l'échelle d'évaluation de douleur NRS (0 à 10) a été utilisée pour les 346 patients de l'étude : la sensibilité au toucher par la main d'objets froids, l'inconfort à manger des mets froids, l'inconfort général ressenti dans la gorge et les crampes

musculaires. Le pic d'intensité des symptômes a été observé, entre le premier et le 3<sup>ème</sup> jour de chaque cycle après l'administration et diminue lors de l'évaluation au 5<sup>ème</sup> jour. La sensibilité induite par un stimulus froid était la plus élevée durant les 12 cycles.

Bien que les neuropathies aiguës soient retrouvées chez plus de 98% des patients, l'incidence est dépendante de la dose administrée (Gebremedhn, Shortland, et Mahns 2018). Pour exemple, une étude clinique de 1992 a permis de diagnostiquer une NPIO aiguë chez 58% des patients sous oxaliplatine dosée à 25mg/m<sup>2</sup>, contre 94% dans une étude de 2010 où l'oxaliplatine est dosée à 130mg/m<sup>2</sup> (Storey et al. 2010).



**Figure 12. Moyenne des scores cliniques relatifs aux symptômes de NPIO aiguë**

Les scores NRS de la sensibilité à toucher des objets froids, l'inconfort à avaler des mets froids, l'inconfort dans la gorge et les crampes musculaires ont été recueillis par questionnaires pour 346 patients sous protocole FOLFOX pendant 12 cycles. D'après Pachman et al. 2015.

L'augmentation de la sensibilité aiguë puis son installation est remarquable avec la progression des cycles. La perception nociceptive du froid ne se rétablit pas à un niveau basal et perdure jusqu'au 12<sup>ème</sup> cycle, que ce soit au niveau des mains ou de la bouche (André et al. 2004). Cette NPIO chronique intervient dans **50 à 70%** des cas et se rétablit en 13 semaines (Grothey 2003; Toftagen et al. 2013). Celle-ci est dépendante de la dose cumulée. En effet, il a été montré qu'une dose cumulée de 780-850 mg/m<sup>2</sup> était associée dans 15% des cas à une chronicisation des douleurs neuropathiques, ce qui correspond à l'entre-cycles 9 et 10, ou vers le 5<sup>ème</sup> mois après la première infusion d'oxaliplatine à 85mg/m<sup>2</sup> (Grothey 2005). Dans 50% des cas, c'est la dose cumulée de 1100 mg/m<sup>2</sup> qui serait à l'origine de la NPIO chronique (Beijers, Mols et Vreugdenhil 2014). Ainsi, **les symptômes chroniques** sont associés à une aggravation des perturbations sensorielles, les paresthésies et dysesthésies progressent en **déficits fonctionnels et moteurs**

des extrémités (mains, pieds et zone péri-orale) (grade 3 des CTCAE). Ceux-ci conduisent à une **ataxie sensitive**, où les voies proprioceptives sont atteintes. Par ailleurs, la dose cumulée d'oxaliplatine de plus de 1000 mg/m<sup>2</sup> a été corrélée chez une faible proportion de patients avec des symptômes d'un signe de Lhermitte, caractérisés par une sensation de décharges électriques lors de la flexion du cou (Taieb et al. 2002).

De manière générale, les patients rapportent des difficultés à entreprendre les tâches quotidiennes : s'habiller, écrire, marcher, manger. Une récente étude clinique étudiant l'impact sur la qualité de vie a démontré que les activités habituelles étaient altérées chez 30% des patients traités par oxaliplatine, dont 40% ont des difficultés à manipuler des objets (Prutianu et al. 2022). Ces déficits retentissent sur leur humeur et leur vie sociale. En effet, le traitement par oxaliplatine est étroitement corrélé à des comorbidités de types **anxiété** ou **dépression** et à une diminution de la **qualité et quantité de sommeil** (Tofthagen et al. 2013).

Finalement, un phénomène de "**coasting**" est observé chez les patients ayant été en traitement sous l'oxaliplatine, remettant en cause l'existence d'une réversion complète des symptômes de NPIO (Briani et al. 2014). En effet, de nombreuses études basées sur un suivi à long terme ont permis de mettre en évidence la persistance d'une neuropathie chez les patients après la fin de leur traitement par chimiothérapie. Les évaluations 29 mois après la dernière infusion d'oxaliplatine ont recensé 80% de patients avec une altération de la sensibilité qui semble être une hypoesthésie (Park et al. 2013). En outre, 30% continuent de manifester des symptômes de douleur neuropathique 5 ans après la fin de la thérapie (Pietrangeli et al. 2006). La sévérité des neurotoxicités sensorielles est par ailleurs toujours élevée puisque maintenue au grade 3, même 1 an après l'arrêt (André et al. 2004; Balayssac et al. 2015).

### 2.5.2. Diagnostic des NPIO

Il existe divers outils pour évaluer les effets des NPIO. La plupart sont similaires aux outils de diagnostic des douleurs neuropathiques (DN4 par exemple). Il existe toutefois un questionnaire spécifique aux neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie, le **QLQ-CIPN20**. Il permet aux patients de donner un score entre « pas du tout » et « beaucoup » pour chacune des 20 questions relatives à leurs symptômes sensoriels, moteurs et végétatifs. De plus, une échelle de sévérité de la neurotoxicité spécifique à l'oxaliplatine nommée **échelle de Lévi** a été développée (Levi et al. 1993). Le niveau 1 décrit des dysesthésies ou paresthésies qui sont complètement diminuées avant le prochain cycle, le niveau 2 des dysesthésies ou paresthésies persistantes entre les cycles et le niveau 3 des dysesthésies ou paresthésies causant des affaiblissements fonctionnels. Ces niveaux sont fréquemment pris en compte en parallèle des grades de CTCAE (*tableau 3*).

### 2.5.3. Facteurs de risques des NPIO

#### 2.5.3.1. Des symptômes aigus au NPIO chroniques

Il a été démontré que l'**intensité** des symptômes de la NPIO aiguë (paresthésies, dysesthésies) était un critère prédictif au développement des neuropathies chroniques (N. Attal et al. 2009; Argyriou, Cavaletti, Briani, et al. 2013; Velasco et al. 2021). Cette observation est le premier argument d'ajustement de la posologie, voire la demande d'arrêt du traitement par le clinicien. Si l'âge du patient lors du traitement n'interfère pas avec l'incidence ni la sévérité de la NPIO (Argyriou, Cavaletti, Briani, et al. 2013), la présence d'un diabète est un risque aggravant pour la progression de la maladie aiguë en NPIO chronique (Sprowl et al. 2013).

#### 2.5.3.2. Facteurs génétiques et épigénétiques

Les études pharmacogénétiques portées sur la susceptibilité de développer des neuropathies induites par la chimiothérapie ont été rassemblées dans une revue systémique en 2017 et démontre l'importance de l'exploration des mutations, en l'occurrence des **polymorphismes d'un nucléotide (SNP)**, dans la prédiction de ces risques (Cliff et al. 2017). L'implication des récepteurs situés sur les fibres afférentes primaires, premier relais de la douleur, est aujourd'hui évidente dans le développement des polyneuropathies. En effet, les canaux sodiques voltages dépendants (Nav) sont fondamentaux dans l'excitabilité des neurones. Ils sont encodés par plus de 10 gènes chez les mammifères. Leurs mutations génétiques sont associées à des pathologies du système nerveux et dans la perturbation de la perception nociceptive (Reimann et al. 2010). Dans le cas des patients atteints de neuropathies périphériques aiguës induites par oxaliplatine, la présence de SNP sur le gène *SCN4A* (Nav1.4) et *SCN10A* (Nav1.8) a été observée. Par ailleurs, le polymorphisme du gène *SCN4A* semble être prédictif de la progression de la maladie en neuropathie chronique (Argyriou, Cavaletti, Antonacopoulou, et al. 2013b). A l'inverse, une mutation SNP dans le gène *SCN9A* (Nav1.7) serait protecteur du développement d'une neuropathie sévère suite à l'exposition à l'oxaliplatine (Sereno et al. 2017). Le transport de l'oxaliplatine joue également un rôle important dans l'initiation de la NPIO (Sprowl et al. 2013). Les transporteurs utilisant de l'énergie dérivée de l'ATP (*ABC*), médient le trafic cellulaire de plusieurs médicaments (exemple de MRP2). Des polymorphismes de ces gènes (gènes *ABCC1* et *ABCC2*) ont été associés à la sévérité de la NPIO (grade 2 et 3) (Cecchin et al. 2013; Biswas et al. 2019). En 2006, une équipe française a mis en évidence le fait que la présence d'une isoleucine à la position 105 dans le gène *GSTP1* prédisposait à une neurotoxicité sévère (grade 3) due au traitement par oxaliplatine et que la mutation de ce nucléotide en valine était prédictive d'une diminution du risque de développement de cette neurotoxicité. Ce gène code pour les enzymes de la famille des Glutathion-S-Transférases impliqués dans la dégradation des composés pour prévenir les dommages de l'ADN (Lecomte et al.

2006). La GSTP1 participe quant à elle, à la détoxification des composés du platine dans l'organisme et médie la résistance à la cisplatine.

Par ailleurs, nous savons aujourd'hui que des modifications épigénétiques peuvent être déterminantes dans le développement de douleur neuropathique (Uchida, Ma, et Ueda 2010). Les études précliniques réalisées sur des modèles animaux permettent d'évaluer les modifications post-traductionnelles des histones liées à une exposition à l'oxaliplatine. Il a été montré qu'une injection d'oxaliplatine chez la souris augmentait significativement l'acétylation de l'histone H4 dans la région promotrice du gène CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>, qui le surexprime dans la moelle épinière. Ce gène codant pour la Fractalkine participe avec son récepteur CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> à la communication cellulaire entre la microglie et les neurones dans la douleur neuropathique (Huang et al. 2016). De plus, d'autres facteurs épigénétiques sont surexprimés chez des souris traitées avec une injection d'oxaliplatine, le facteur silencieux restrictif des neurones (NRSF) et son corépresseur l'histone désacétylase 3 de classe I (HDAC3), étant impliqués dans la régulation à la baisse de l'expression des canaux potassiques de la famille K2p retrouvée dans un modèle NPIO aigue (Pereira et al. 2021).

#### 2.5.4. Prise en charge des patients neuropathiques

A ce jour, aucun traitement n'est autorisé par les Hautes Autorité de Santé Françaises pour prévenir ou traiter la NPCI. La **duloxétine**, un antidépresseur inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), est recommandée par la Food and Drug Administration (FDA) dans le traitement des NPCI. En France, ce composé a obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour son utilisation dans les douleurs neuropathiques à étiologie métabolique induite par le diabète et est prescrit dans certains cas par le corps médical dans le cas de NPCI, néanmoins ceci ne semble pas être systématique (Selvy et al. 2021 ; Loprinzi et al. 2020). Si en préclinique l'antalgie de la duloxétine semble effective à 30mg/kg (W. Kim et al. 2017), elle ne soulage pas systématiquement les douleurs neuropathiques chez les patients sous oxaliplatine (Smith et al. 2013). En absence de traitement efficace, la première stratégie est de préconiser aux patients **d'éviter le contact avec des objets froids**. Puis, afin d'éviter la chronicisation des symptômes, un **ajustement de la posologie** est proposé (*figure 13*). En France, il est conseillé de réduire la dose à 75 mg/m<sup>2</sup> dans le cas de traitement adjuvant et 65 mg/m<sup>2</sup> en cas de métastase. La stratégie de **stop-and-go** est également proposée, correspondant à une pause dans l'administration de l'oxaliplatine en gardant un traitement à base de 5-Fu et de leucovorine dans le cas du protocole FOLFOX. Cette stratégie permet d'observer une amélioration par diminution de la sévérité des symptômes ou un rétablissement des fonctions sensorielles normales, avant de reprendre les cycles, jusqu'à 6 mois après le début de la pause (Grothey 2005; Beijers et al. 2015). Toutefois, ces adaptations peuvent compromettre les chances de guérison du cancer.

Tableau d'ajustement posologique de l'oxaliplatine selon la toxicité neurologique				
Toxicités neurologiques	Grade	Durée de la toxicité		
		1 à 7 jours	Plus de 7 jours	Persiste entre les cycles <sup>a</sup>
Paresthésies/dysesthésies <sup>b</sup> qui n'interfèrent pas avec la motricité fine	1	Pas de réduction de dose		
Paresthésies/dysesthésies <sup>b</sup> qui interfèrent avec la motricité fine mais n'affectent pas les activités de la vie quotidienne (AVQ)	2	Pas de réduction de dose		75 % de la dose
Paresthésies/dysesthésies <sup>b</sup> avec douleurs ou diminution de la motricité fine qui affectent les activités de la vie quotidienne (AVQ)	3	1 <sup>ère</sup> fois : 75 % de la dose 2 <sup>ème</sup> fois : 50 % de la dose		Cesser le traitement
Paresthésies/dysesthésies persistantes ou incapacitantes ou qui peuvent être mortelles	4	Cesser le traitement		
TOXICITÉ AIGUË : Dysesthésie laryngopharyngée <sup>b</sup> (durant ou dans les 2 heures suivant la perfusion)	Non applicable	Prolonger la perfusion de l'oxaliplatine à 6 heures au prochain traitement	Non applicable	
<p>a. Toxicité toujours présente au début du prochain cycle.</p> <p>b. Peuvent être provoquées par le froid.</p> <p>c. Les benzodiazépines peuvent aussi être utilisées en prémédication.</p>				

**Figure 13. Proposition de tableau d'ajustement de posologie de l'oxaliplatine, selon le grade de sévérité de la neuropathie**

Tableau d'ajustement proposée au Québec, Canada. D'après Bradley et al. 2014.

## 2.6. Modèles animaux de NPIO et exploration de la douleur

Dans le cas des neuropathies périphériques aiguës induites par l'oxaliplatine, les symptômes perçus sont principalement des paresthésies et dysesthésies au niveau des extrémités, exacerbées par le froid. Lorsque l'installation de la neuropathie chronique s'établit, les symptômes s'intensifient et une dysfonction sensorielle à long terme apparaît. Chez les rongeurs, il est possible de modéliser ces manifestations par une ou des injection(s) d'oxaliplatine puis de les explorer à l'aide de diverses méthodes expérimentales.

Avant tout, la neurotoxicité générale d'un animal peut être évaluée à l'aide d'un **suivi de poids** pendant la durée du traitement, une baisse significative du poids étant corrélée à l'installation d'une toxicité. Il est également possible d'évaluer la **conduction nerveuse** chez les animaux, à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques *in vivo* réalisés au niveau du nerf sciatique ou caudal de l'animal anesthésié. Finalement, des **dispositifs** permettent d'apprécier et d'évaluer les sensibilités thermiques et mécaniques des animaux au niveau des membres ou du territoire oro-facial (Deuis, Dvorakova, et Vetter 2017). Dans le **tableau 4** sont regroupés les différents tests fréquemment utilisés quantifiant les symptômes douloureux neuropathiques évoqués ou spontanés chez les animaux NPIO.

Les modèles animaux des NPIO sont nombreux. Ils sont développés ou choisis en fonction du sujet de l'étude : NPIO aiguë et/ou NPIO chronique. Le protocole d'intérêt influence le nombre d'injection d'oxaliplatine, la dose administrée et cumulée et le suivi temporel de l'animal. Le choix du sexe, de l'âge et du fond génétique de l'animal est également déterminant. Les données de la littérature montrent une hétérogénéité dans ces différents paramètres, résumées dans le **tableau 5** pour les modèles de NPIO aiguë et le **tableau 6** pour les modèles de NPIO chronique (p.35-36).

Comportement	Stimulus	Membres	Aire oro-faciale
Douleur évoquée	Thermique (froid)	- Plaque thermique froide ou immersion patte/queue dans un bain froid - Test à l'acétone	- Test à l'acétone sur le territoire des vibrisses - Dispositif commercial
	Mécanique dynamique	Test du pinceau	Test du pinceau
	Mécanique statique	- Von Frey - Randall Selitto	Von Frey
Douleur spontanée	Sans stimulus	Expressions faciales : échelle de grimace souris / rats	
		Comportement spontané : toilettage, léchage, niche	
		Analyse de la marche et positionnement des pattes	

**Tableau 4. Récapitulatif des différents tests utilisés pour mesurer les douleurs de type neuropathique chez les animaux, selon le territoire d'intérêt**

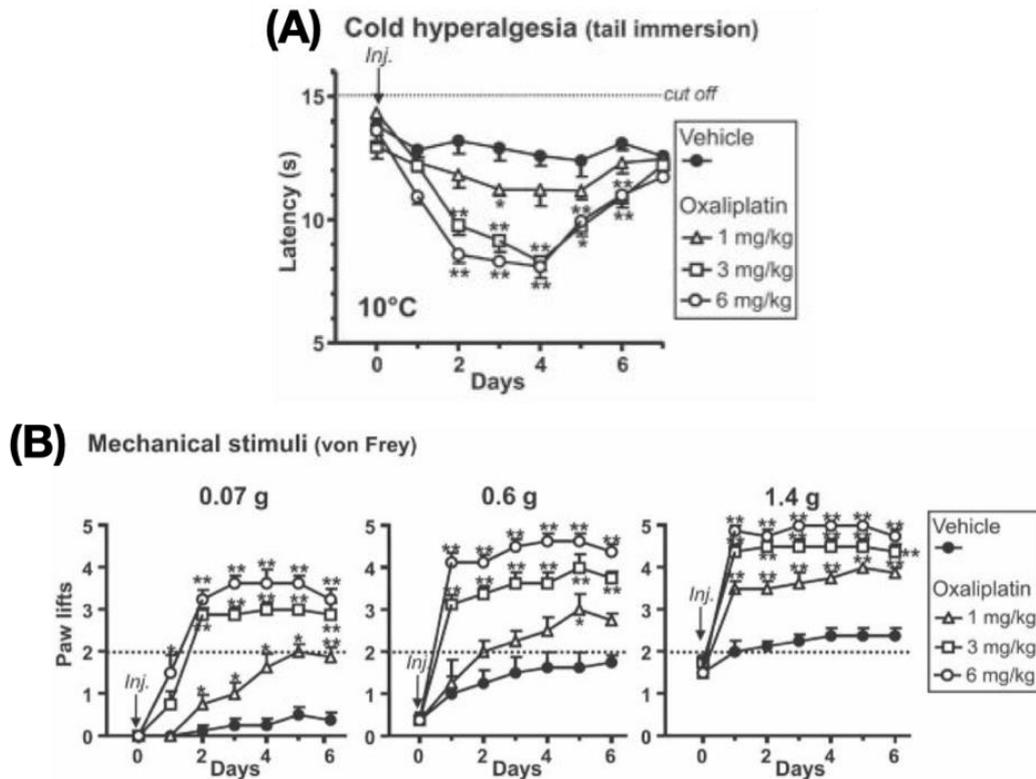
Il est important de préciser que chez l'animal, dans la grande majorité des études, la neuropathie est induite en absence d'un terrain cancéreux. Quelques rares études, récentes, évaluant le potentiel neuroprotecteur de molécules contre l'oxaliplatine, utilisent des animaux porteurs de tumeurs (Poupon et al. 2018; Shigematsu et al. 2020; Agnes et al. 2021).

#### 2.6.1. NPIO avec suivi aigu

Une **injection unique** d'oxaliplatine suffit pour induire la neurotoxicité caractéristique d'une NPIO aiguë (*tableau 5*). La difficulté pour les expérimentateurs est de sélectionner la dose équivalente à la dose prescrite en clinique (Nair et Jacob 2016). L'utilisation de la formule de Dubois [ $0.007184 * Taille^{0.725} * Poids^{0.425}$ ] permet d'estimer la surface corporelle de l'animal pour établir cette équivalence. Pour corréliser avec la dose par cycle de 85mg/m<sup>2</sup> (FOLFOX) ou 130mg/m<sup>2</sup> (XELOX), l'injection chez les animaux devrait être de 2.3mg/kg ou 3.5mg/kg, respectivement. Toutefois, ce calcul est controversé puisqu'il ne tient pas compte de l'activité pharmacologique de la molécule, qui dépend de divers facteurs intrinsèques à l'animal, comme son métabolisme.

De manière générale, les doses injectées chez l'animal varient de **1 à 40mg/kg**. Des études évaluant les effets doses de l'oxaliplatine sur les paramètres comportementaux des animaux, montrent que la neurotoxicité est dose-dépendante (Descoeur et al. 2011; Deuis et al. 2013; Makker et al. 2020). En effet, une hypersensibilité au froid nocif évaluée par un test d'immersion de la queue à 10°C et mécanique évaluée par le test du von Frey est significativement plus élevée pour le dosage à 6mg/kg par rapport au dosage à 1mg/kg (*figure 14*). D'ailleurs, ce modèle de 6mg/kg est celui utilisé au laboratoire Neurodol et celui que j'ai utilisé dans ce projet de thèse, en cohérence avec les données phénotypiques observées. L'oxaliplatine est injectée le plus souvent en **intra-péritonéale** (i.p.) (Tsubota et al. 2019 ; Reis et al. 2022 ; Pereira et al. 2021 ; Salat, Furgala, et Malikowska-Racia 2019). Toutefois, certaines équipes injectent l'oxaliplatine directement en sous-cutanée dans la patte (**intraplantaire** ou i.pl.) ou en **intramusculaire** (i.m.) à la base de la queue (Deuis et al.

2014; Starobova et al. 2020; Makker et al. 2020). L'administration i.pl. permet d'induire un phénotype de type douloureux significatif rapidement, avec une hypersensibilité au froid et mécanique observée dès 1 heure post-injection, de manière dose-dépendante. Quant à l'injection i.m., son avantage est d'évaluer directement l'effet de l'oxaliplatine sur l'activité du nerf caudal, celle-ci étant altérée après une injection à 7,5 et 15mg/kg.



**Figure 14. Cinétique sur 6 jours de la sensibilité thermique et mécanique après injection d'oxaliplatine**

**(A)** La sensibilité thermique a été évaluée par l'immersion de la queue dans un bain à 10°C et **(B)** la sensibilité mécanique a été évaluée par le test de von Frey par filaments, après une injection d'oxaliplatine i.p. à 1mg/kg, 3mg/kg et 6mg/kg chez des souris C57Bl6/J. D'après Descoeur et al. 2011.

Globalement, les **souris** sont privilégiées dans ces études. Une seule évaluation comportementale a été réalisée chez le rat et a révélé qu'une injection de 3, 6 ou 12mg/kg permettait d'induire un phénotype de type allodynie mécanique dès le deuxième jour et thermique au froid 24h après l'injection (B. Ling, Coudoré-Civiale, et al. 2007a). Les souris sont majoritairement de souches C57Bl/6, âgées de 8 semaines en moyenne. Une étude a évalué l'**effet de l'âge** des souris de souche Swiss sur la NPIO. Les souris catégorisées « âgées » de 20 mois étaient significativement plus sensibles au test d'acétone sur la patte et au test mécanique de von Frey suite à l'injection d'oxaliplatine en i.p. à 10mg/kg, par rapport aux souris « jeunes » de 8 semaines (Reis et al. 2022).

Le suivi post-injection varie souvent entre 1 et 7 jours. Dans le cas du modèle par injection intra-plantaire ou intra-musculaire, le suivi est court car l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine est rapide et transitoire. Concernant les modèles en injection i.p., une étude a été menée sur le suivi

phénotypique des souris tous les jours pendant 7 jours post-injection (doses à 1, 3 ou 6mg/kg). Une hypersensibilité au froid nocif évaluée par un test d'immersion de la queue à 10°C s'installe rapidement, le **pic d'effet se situe au 4<sup>ème</sup> jour et se réverse le 7<sup>ème</sup>** (Descoeur et al. 2011) (*figure 14*).

### 2.6.2. NPIO avec suivi chronique

La chronicisation se modélise chez les animaux à l'aide d'injections répétées d'oxaliplatine. Il existe **différents schémas et calendrier d'administrations**. Tous se réfèrent principalement aux doses cumulées à partir desquelles la NPIO chronique apparaît chez les humains (entre 800mg/m<sup>2</sup> et 1100mg/m<sup>2</sup> environ). La dose animale équivalente à l'humain (130mg/m<sup>2</sup>) de 3,5mg/kg est la dose qu'ont utilisée plusieurs équipes en administrant 8 fois en intraveineux (i.v.) dans la queue des souris, à raison de deux injections par semaine pendant 4 semaines. La dose cumulée atteinte est de 28mg/kg, soit 1040mg par m<sup>2</sup> de surface de souris (Renn et al. 2011; Marmioli et al. 2017; Riva et al. 2018). Une autre stratégie observée dans la littérature est de réaliser des cycles d'injection entrecoupés de cycles de repos. Un schéma a été proposé en 2009 où une injection en i.p. d'oxaliplatine à 3mg/kg est réalisée tous les jours pendant 5 jours suivis de 5 jours de repos ; ce cycle est répété à l'issue de la période de repos et permet d'obtenir une dose cumulée approximative de 1040mg/m<sup>2</sup> (Ta, Low, et Windebank 2009). Ce protocole a été adapté d'une part, en ajoutant des cycles pour réaliser un suivi à long terme sur 60 jours (Park et al. 2015) et d'autre part, en comparant l'effet d'une dose plus faible (0.3mg/kg) à la dose originelle de 3mg/kg, chez des souris femelles et mâles de 2 souches différentes. Ceci a permis de mettre en évidence le fait que l'hypersensibilité au froid se maintenait à plus long terme (4 semaines contre 3 semaines) lorsque la dose était plus élevée, tant chez les femelles que chez les mâles (Warncke et al. 2021). Enfin, des études ont évalué les effets de différents schémas d'administrations chez le rat (Cavaletti et al. 2001; B. Ling, Authier, et al. 2007). La dose cumulée de 48mg/kg conduit à une neurotoxicité générale plus sévère en termes de perte de poids et d'altération de la conduction nerveuse, par rapport aux administrations atteignant la dose cumulée de 36mg/kg (Cavaletti et al. 2001). Chez des rats de souche Sprague-Dawley, une allodynie mécanique est développée dès la 4<sup>ème</sup> injection i.v. d'oxaliplatine dosée à 1mg/kg, 2mg/kg et 4mg/kg, alors qu'une hyperalgie n'est observée qu'à la 5<sup>ème</sup> injection d'oxaliplatine à 4mg/kg uniquement. De plus, ces rats ne sont pas sensibles aux températures chaudes (42 et 46°C), mais développent tous une allodynie au froid (10°C) dès la 4<sup>ème</sup> injection et une hyperalgie (40°C) dès la 7<sup>ème</sup> injection, peu importe la dose (B. Ling, Authier, et al. 2007b).

**L'hypersensibilité céphalique** n'est que très peu évaluée chez les modèles NPIO. A notre connaissance, aucune étude mesurant ce paramètre n'a été réalisée sur modèle aigue. Quelques études relatent toutefois l'effet de l'oxaliplatine sur la zone oro-faciale après des injections répétées.

Chez la souris, deux injections successives de 10mg/kg n'induisent pas d'hypersensibilité de la face à une température de 18°C (Caudle et Neubert 2022), mais le dépôt d'acétone sur le territoire cutané à la base des vibrisses entraîne quant à lui une hypersensibilité reflétée par une augmentation du grattage de la face, persistant jusqu'à 15 jours après l'injection (Michot et al. 2014). Chez le rat, cinq injections successives de 2mg/kg (i.p.) induisent une hypersensibilité à 17°C, évaluée par un paradigme de récompense suite au contact d'une paroi froide (Abd-Elsayed et al. 2015).

En outre, l'utilisation de modèle NPIO chronique permet d'évaluer les **troubles fonctionnels et moteurs**, ainsi que les comorbidités associées comme **l'anxiété** et la **dépression** diagnostiquées chez les patients. Des troubles de la locomotion, des altérations de la coordination et un déficit de la motricité fine sont retrouvés avec une dose cumulée d'oxaliplatine de 36mg/kg chez le rat et chez la souris et persiste jusqu'à 24 jours après la dernière injection (B. Ling, Authier, et al. 2007b; Poupon et al. 2018). Des comportements de type anxieux et dépressif sont également observés les derniers jours des administrations d'oxaliplatine chez ces modèles animaux (Poupon et al. 2018; Hache et al. 2015). De plus, un évitement social, caractéristique d'une anxiété, s'installe chez les rats ayant été traités avec une dose cumulée de 18mg/kg d'oxaliplatine (Ferrier et al. 2015).

Certains modèles sont associés à une altération de la **conduction nerveuse** et des modifications structurales des neurones sensoriels des DRG (Marmioli et al. 2017; Poupon et al. 2018). Une étude comparative de la souche et du sexe sur l'effet de l'oxaliplatine administrée en cycle alterné injection/repos (dose cumulée 30mg/kg) a montré que les femelles de souche BalB/cJ sont les plus susceptibles de développer une altération de la conduction nerveuse, manifestée par une réduction de l'amplitude des potentiels d'actions du nerf caudal, par rapport à la souche C57Bl/6J, alors que les deux souches et les deux sexes ont une altération similaire de la densité des fibres nerveuses intraépidermiques (Warncke et al. 2021). Toutefois, ce paramètre morphologique est largement dépendant de la posologie et de la voie d'administration car à l'inverse, une autre étude (dose cumulée 28mg/kg en injection i.v.) n'a pas montré d'effet de l'oxaliplatine sur l'intégrité des fibres caudales et digitales chez la souris C57Bl/6J (Marmioli et al. 2017). Quant à l'intégrité des fibres de la zone oro-faciale et principalement celle du territoire des vibrisses, une unique étude a montré les dommages de l'oxaliplatine sur les afférences des neurones du TG qui expriment *TRPM8* (Caudle et Neubert 2022).

L'ensemble de ces données montrent l'importance dans le choix du calendrier d'injection et de la dose cumulée d'oxaliplatine résultante pour l'évaluation du développement *in vivo* de la neurotoxicité (Cavaletti et al. 2001). Les observations comportementales sur les rongeurs reflètent de manière intéressante la symptomatologie humaine de la NPIO et les similitudes cliniques dans la physiopathologie sont un avantage majeur pour l'utilisation de ces modèles NPIO dans l'investigation des mécanismes impliqués dans la maladie.

MODÈLES AIGUS	Animal			Administration oxaliplatine		Neurotoxicité				
	Souche	Sexe	Age / poids	Posologie	Voie	Froid		Mécanique		Électrophysiologie
Reis et al, 2022	Swiss	♂	2 mois	10mg/kg	i.p.	Acétone (patte)	✓ à J2	Von frey	✓ à J2	
			20 mois				✓ à J2		✓ à J2	
Salat et al, 2019 Salat et al, 2014	CD-1	♂	18-22g	10mg/kg	i.p.	✓ jusqu'à J7 plaque à 2,5°C				
Descœur et al, 2011	C57BI/6J	♂	20-25g	1 ; 3 ; 6 mg/kg	i.p.	✓ de J2 à J6 immersion 10 & 21°C		✓ de J1 à J6 Von frey		
Pereira et al, 2022 Poupon et al, 2018 Micov et al, 2020 Kim et al, 2017	C57BI/6J	♂	20-25g	6mg/kg	i.p.	✓ à J4		✓ à J4		
Sprowl et al, 2013	FVB	♂	NC	5 ; 40 mg/kg	i.p.	✓ à J1 et J2 plaque à -4°C		✓ à J1 et J2 Von frey		
Deuis et al, 2014 Starobova et al, 2020	C57BI/6J	♂	8 semaines	40µg	i.pl.	✓ plaque à 10°C		✓ Von frey		
Makker et al, 2020	C57BI/6J	♂	> 18 semaines	7,5 ; 15 mg/kg	i.m (base de la queue)					✓ Perturbation excitabilité axones moteur (J1) et sensoriel (J4 et J8)
Ling et al, 2007 a Martin et al, 2020	Sprague Dawley	♂	150-175g	3 ; 6 ; 12 mg/kg	i.p.	✓ de J1 à J5 immersion 10°C		✓ de J2 à J7 Von frey ✗ Rendall-Selitto		

Tableau 5. Principaux modèles de la NPIO aigue

✓ neurotoxicité démontrée ✗ pas de neurotoxicité - NC : non connu - J = jour - cellules grisées : paramètres non évalués

MODELES CHRONIQUES	Animal		Administration oxaliplatine			Neurotoxicité						
	Souche	Sexe	Posologie	Calendrier	Voie	Froid	Mécanique	Electrophysiologie	Morphologie			
Marmioli et al, 2017	BalB-c	♂	8 x 3.5mg/kg	2x/s pendant 4s	i.v.	plaque 4°C	✓ J13 & J26	Von frey	conduction	✓ caudale/digitale	✓ DRG & IENF	
	C57Bl/6J						✗			✗		
	DBA/2J						✗			✓ J13 & J26	✓ caudale	✓ DRG & IENF
	AJ						✓ J26			✓ J26	✗	✓ DRG & IENF
	FVB						✓ J26			✓ J26	✓ caudale/digitale	✓ DRG
	CD1						✗			✓ J13 & J26	✓ digitale	✓ DRG
Ta et al, 2009 Park et al, 2015 Warncke et al, 2021	C57Bl/6J	♂+♀	10 x 0.3 ; 3 mg/kg	- 1/j pendant 5j - 5j de pause=S1 - 1/j pendant 5j - 5j de pause=S3	i.p.	acétone	✓ S1-S3/S4	Von frey	conduction	✗ caudale	✓ IENF	
	BalB-c						♀♂ 0.3/3mg/kg			✓ S1-S10	♀♂ 2 doses	✓ caudale
Michot et al, 2013	C57Bl/6J	♂	2 x 10mg/kg	J0 et J3	i.p.	acétone	✓ jusqu'à J15 patte & vibrisse	Von frey				
	Sprague Dawley		3 x 10mg/kg	J0, J4 et J7			✗					✓ jusqu'à J25
Hache et al, 2014	C57Bl/6J	♂	4 x 7mg/kg	J0, J1, J4 et J5	i.p.	✓ J12 Plaques -4°C	✓ J12 Von frey					
Poupon et al, 2018	C57Bl/6J	♂	8 x 6mg/kg	2x/s pendant 4s	i.p.	✓ de J7 à J28 immersion pattes 10°C et acétone vibrisse	✓ de J7 à J28 Von frey et pinceau vibrisse	✓ conduction caudale à J7 et J28		✓ DRG		
Makker et al, 2020	C57Bl/6J	♂	4 x 5mg/kg 12 x 2.5mg/kg	J0, J2, J4 et J6 1/j pendant 12j	i.p.				✗ conduction			
Cavaletti et al, 2001	Wistar	♀	15 x 2.4mg/kg	5x/s pendant 3s	i.p.				conduction	✓ caudale	✓ DRG	
			16 x 2.25mg/kg	1/j pendant 16s						✓ caudale	✓ DRG	
			16 x 3mg/kg	1/j pendant 16j						✓ caudale	✓ DRG	
			9 x 4mg/kg	2x/s pendant 4s						✓ caudale	✓ DRG	
Ling et al, 2007b	Sprague Dawley	♂	8 x 1 ; 2 ; 4 mg/kg	2x/s pendant 4s	i.v.	✓ J20 Immersion 10°C ✓ J12 Immersion 4°C	✓ J12 Von frey					
Martinez et al, 2020 Kawashiri et al, 2020 Mine et al, 2022	Sprague Dawley	♂	8 x 4mg/kg	2x/s pendant 4s	i.p.	✓ J21 et J28	✓ J17 et J24					

Tableau 6. Principaux modèles de la NPIO chronique

✓ neurotoxicité démontrée ✗ pas de neurotoxicité - S = semaine - J = jour - cellules grisées : paramètres non évalués  
IENF : densité de la fibre nerveuse intra-épidermale

### 3. Mécanismes impliqués dans les NPIO

Il est dorénavant établi que les mécanismes mis en jeu dans la NPIO aigue et/ou chronique sont différents. L'action neurotoxique de l'oxaliplatine se localise principalement au niveau des neurones ganglionnaires, confortant l'apparition de paresthésies des extrémités des membres et de la bouche chez les patients traités à l'oxaliplatine. En revanche, si les données sur les mécanismes identifiés dans les DRG sont nombreuses, il n'existe que très peu d'études évaluant les effets de l'oxaliplatine sur les TG et ses mécanismes impliqués dans la sensibilité oro-faciale.

Les canaux ioniques périphériques situés dans les DRG et les TG sont des transducteurs sensoriels de l'information nociceptive, la perturbation de leur fonctionnement et la modification de leur expression participeraient au développement des symptômes aigus majoritairement exacerbés par le froid (Descoeur et al. 2011). C'est le mécanisme le plus décrit et documenté à ce jour, nous pouvons parler de canalopathie (Lehky et al. 2004). Pour autant, la mise en place de la NPIO chronique semble être causée par des mécanismes multiples et complexes, impliquant le stress oxydatif et la neuroinflammation.

#### 3.1. La participation des canaux ioniques

Les **canaux sodiques dépendants du voltage** génèrent et propagent le potentiel d'action. Le rôle majeur de ces canaux est évident dans le développement de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine (Lolignier et al. 2015; Sittl et al. 2012). L'oxaliplatine induit une surexpression de l'isoforme Nav1.8 dans les DRG de souris traitées à l'oxaliplatine. De manière fonctionnelle, elle augmente la taille et la durée des potentiels d'action, l'amplitude du courant sodique et ralentit l'inactivation des canaux (Descoeur et al. 2011). L'hypothèse majeure repose sur l'action de l'oxalate, chélateur de cations et métabolite de l'oxaliplatine. Ce composé provoquerait une chélation du calcium extracellulaire, augmenterait la conductance sodique et ainsi l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels. Cette hypothèse est soutenue d'une part par l'induction d'une hypersensibilité au froid et non mécanique suite à l'injection d'oxalate chez le rat et d'autre part par le soulagement de l'hypersensibilité au froid par des bloqueurs non spécifiques de ces canaux Nav<sup>v+</sup> comme la lidocaïne, commercialisée comme anesthésique local (B. Ling, Authier, et al. 2007b; Egashira et al. 2010). Aussi, l'infusion intraveineuse de Calcium et de Magnésium ciblant notamment l'activité des récepteurs sodiques est une stratégie de prévention utilisée par 25% des oncologues, bien qu'inefficace sur les symptômes (Selvy et al. 2021).

Les **canaux potassiques** jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'excitabilité neuronale sensorielle. Une diminution de l'expression des transcrits des canaux TREK2 et TRAAK et Kv1.1 a été observée dans les DRG de souris NPIO par Descoeur et al. en 2011, à

l'acmé des symptômes et corrélée avec la sensibilité au froid accrue chez des animaux double knockout TREK1-TRAAK (Descoeur et al. 2011). À l'inverse, le canal HCN1, activé par l'hyperpolarisation et perméable aux sodium et potassium, est surexprimé par rapport à des souris contrôle. De plus, un bloqueur de ce canal, l'ivabradine, est capable de reverser l'hypersensibilité au froid du modèle NPIO. Dans le TG de rats NPIO, le canal KCNQ2 potassique voltage dépendant est sous-exprimé et l'utilisation d'un activateur de ces canaux, la retigabine, diminue l'hypersensibilité oro-faciale (Abd-Elsayed et al. 2015; J. Ling et al. 2017).

Finalement, il a été montré que l'oxaliplatine provoque la surexpression des ARNm de TRPA1, membre des **canaux TRP** sensibles aux stimuli nociceptifs d'origine thermique (Descoeur et al. 2011). La surexpression de TRPM8 dans les DRG en condition NPIO est controversée. Alors que certains auteurs n'observent pas de modulation de son expression (Descoeur et al. 2011), d'autres montrent une augmentation des transcrits (Gauchan et al. 2009). Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation transitoire de l'expression et de l'activité des canaux TRPM8 par l'oxaliplatine, qui reviendrait à un état basal quelques jours après l'injection (Rimola et al. 2021; Gauchan et al. 2009). Par ailleurs, dans les neurones isolés de TG de souris ayant été traitées par oxaliplatine, le courant entrant médié par les récepteurs TRPM8 et activé par le menthol est significativement augmenté par rapport à des TG de souris contrôles (Caudle et Neubert 2022).

### 3.2. Neurotoxicité lésionnelle et neuropathie centrale

Il a été montré que les protéines responsables du **transport de l'oxaliplatine** seraient à l'origine de l'accumulation de platine dans les ganglions périphériques (DRG) et de l'installation de la neuropathie à long terme (Fujita et al. 2019; Ta et al. 2006). En particulier, un *knockdown* par siRNA du transporteur *OCT1* ou un *knockout* *OCT1/2* diminuent l'hypersensibilité induite par l'oxaliplatine. Dans le même sens, des cellules exprimant ces récepteurs ont une augmentation de l'entrée cellulaire de l'oxaliplatine (Fujita et al. 2019; Sprowl et al. 2013). Les conséquences premières sont des dommages morphologiques et notamment une atrophie des corps cellulaires (Jamieson et al. 2005). Aussi, en raison de l'absence d'un système de réparation de **l'ADN mitochondrial**, l'accumulation de platine dans les neurones sensoriels périphériques conduit la formation d'adduits dans les molécules d'ADN des mitochondries, provoquant une altération fonctionnelle de la chaîne respiratoire. Ce phénomène est à l'origine d'une augmentation considérable de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi des dommages oxydatifs cellulaires. Des agents antioxydants réduisent d'ailleurs la toxicité chronique induite par l'oxaliplatine chez l'animal, sans pour autant interférer avec son effet antitumoral (Di Cesare Mannelli et al. 2012) (Agnes et al. 2021).

Il a été originellement décrit que la **BHE** limitait la pénétration de l'oxaliplatine dans le liquide céphalo-rachidien. La présence d'altération centrale dans la cognition et les processus émotionnels, remettent en question cette hypothèse. En effet, après une injection i.p. à 4mg/kg chez le rat, l'oxaliplatine a été dosée à 6,6nM dans le liquide cébrospinal (Huang et al. 2016). Ainsi, des auteurs ont démontré que l'oxaliplatine perturbe *in vitro* l'intégrité d'une lignée de cellules endothéliales (RBE4, utilisée comme modèle d'étude pour la BHE) par l'altération des protéines de jonctions et l'augmentation des ROS (Branca et al. 2018). Ce phénomène pourrait favoriser le passage de composés oxydatifs, inflammatoires et immunitaires de la périphérie vers le cerveau.

Le **stress oxydatif** mène à la libération de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL6, IL8 ou le  $TNF\alpha$ , ce qui provoque une **neuro-inflammation**, à la source de la **sensibilisation centrale** par l'hyperexcitabilité des cellules WDR de la moelle épinière (Brandolini 2019). Au niveau supra-spinal, la présence d'une neuro-inflammation serait également associée à une perturbation de la balance excitateur/inhibiteur des neurotransmetteurs. En effet, une **diminution du GABA** dans le thalamus et le PAG a été rapportée après un traitement à l'oxaliplatine chez le rat et une injection directement dans le PAG d'antagonistes de récepteurs de cytokines pro-inflammatoires a restauré son niveau (Xu et al. 2018). Dans le même sens, l'oxaliplatine **augmente les niveaux l'acétylcholine** dans l'insula postérieure ainsi que l'expression des récepteurs muscariniques M2 dans un modèle rat NPIO chronique (Ferrier et al. 2015).

La communication de la **glie** avec les neurones participe au bon fonctionnement du système neurosensoriel. En condition pathologique, une communication anormale promeut l'activité ectopique neuronale. Dans un système *in vitro* de TG en culture, il a été montré en présence d'oxaliplatine (60 $\mu$ M) que le couplage neurone-glie médié par les jonctions gap était renforcé (Poulsen et al. 2015). Un bloqueur de ces jonctions reverse ce couplage *in vitro* et réduit l' hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine *in vivo* (Poulsen et al. 2015; Warwick et Hanani 2012). Ce mécanisme est retrouvé également dans le système central d'animaux NPIO chronique, premièrement dans la CDME, dans laquelle la protéine d'acides fibrillaires gliales GFAP est surexprimée et deuxièmement dans l'ACC où un accroissement de la densité astrocytaires est remarqué par rapport aux animaux contrôles (Mannelli et al. 2014; Yoon et al. 2013).

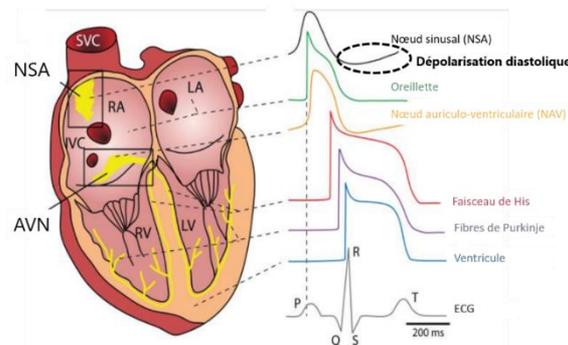


## - CHAPITRE 2 - Les canaux HCN

Pendant 50 ans, un courant dépolarisant surnommé « courant amusant » ou « étrange » a été l'objet de multiples études et de nombreuses discussions en raison de ses propriétés étonnantes. Effectivement, les canaux qui le génère sont activés par une hyperpolarisation de la membrane, contrairement à la majorité des canaux voltages dépendants qui s'ouvrent en réponse à une dépolarisation. Il est impliqué dans de grandes fonctions physiologiques telles que la génération du rythme cardiaque et dans l'excitabilité membranaire des cellules neuronales. Ceci fait de lui une cible importante lors de manifestations pathologiques cardiaques ou neurologiques.

### 1. Du courant $I_f$ au canal HCN

Chez les mammifères, le potentiel d'action cardiaque est généré par les cellules musculaires dites « cellules pacemaker » dans le **nœud sinusal (NSA)**, où la dépolarisation de la membrane pendant la diastole (dépolarisation diastolique ou DD) permet d'amener le potentiel au seuil de déclenchement du potentiel d'action suivant. Ainsi l'activité électrique est propagée jusqu'au nœud atrio-ventriculaire (NAV), puis vers les fibres de Purkinje pour atteindre les ventricules (*figure 15*). C'est la sommation de toutes ces activités qui permet de générer un rythme cardiaque.



**Figure 15. Génération du rythme cardiaque du NSA aux ventricules**

Sommation des activités des tissus nodaux pour générer un signal ECG. Plus la pente de dépolarisation diastolique est importante, plus la fréquence cardiaque sera élevée. Figure adaptée de Bartos, Grandi, et Ripplinger 2015.

La DD a été initialement expliquée par la désactivation d'un courant potassique sortant «  $I_{K2}$  » dans les fibres de Purkinje (Noble et Tsien 1968). Plus tard, cette hypothèse a été remise en question par la mise en évidence d'un courant entrant rectifiant, activé en réponse à une hyperpolarisation des membranes des cellules isolées de NSA de lapin (Noma et Irisawa 1976). Une étude de Brown et ses collaborateurs a permis de caractériser ce courant qu'ils nommèrent  $I_f$ , « **f** » pour « **funny** ». Ils ont montré à l'aide de la technique de voltage clamp

sur cellules isolées de NSA de lapin que c'est un courant entrant à cinétique lente qui ne semble finalement pas être purement potassique (Brown, DiFrancesco, et Noble 1979). Ceci a valu la réinterprétation de la participation d' $I_{K2}$  dans la DD (DiFrancesco 1993). Les travaux qui ont suivi cette découverte ont permis d'éclaircir ses fonctionnalités. Il a été démontré qu'il s'agissait d'un **courant mixte bi-cationique perméable aux ions  $K^+$  et  $Na^+$**  ; ceci vérifié par son potentiel de réversion qui est proche de -20 mV dans le nœud sinusal (DiFrancesco 1981) et qu'il est activé à des niveaux de potentiel à -50mV et en dessous (Brown, DiFrancesco, et Noble 1979). De plus, ce courant peut être **modulé pharmacologiquement par l'adrénaline ou l'acétylcholine**, par l'intermédiaire de leurs récepteurs couplés aux protéines G stimulant la synthèse de l'AMPc. Un courant  $I_q$  similaire à  $I_f$  a été mis en évidence dans le système nerveux périphérique (Mayer et Westbrook 1983) et central (Halliwell et Adams 1982) et un **courant  $I_h$**  (h pour hyperpolarisation) dans les cellules de bâtonnets de la rétine (Attwell et Wilson 1980). Appelés originellement  $I_{K2}$ , puis  $I_f$  et enfin  $I_h$  ou  $I_q$ , ces courants sont en réalité le même (Pape 1996). Dorénavant, le terme  $I_h$  sera préféré lorsque l'on parle de **système nerveux**, et  $I_f$  pour son enregistrement dans les **cellules cardiaques**. L'ensemble de ces données suggèrent que le courant est doublement régulé : par le voltage et par la liaison aux nucléotides cycliques

Dès la fin des années 1990, les études moléculaires ont permis d'identifier trois ADNc dans le cerveau de souris et un dans le cœur humain (Ludwig et al. 1998) codant pour les quatre isoformes d'un canal ionique pour lequel D.E. Clapham a proposé l'abréviation « **HCN** » et dont la dénomination démontre ses deux caractéristiques principales : **Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated**, i.e. activé par l'hyperpolarisation et modulé par des nucléotides cycliques (Clapham 1998). Nous verrons dans ce chapitre que la structure de ces canaux HCN1, HCN2, HCN3 et HCN4 contribue à leurs particularités fonctionnelles, en fonction du territoire d'expression. Nous verrons également que leur activité est dépendante de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

## 2. Structure et activation des canaux HCN

### 2.1. Structure des canaux

Les quatre isoformes des canaux HCN sont structurellement bien caractérisées. La similitude dans leurs séquences est d'environ 80%, ce qui leur confère leur propriété générale commune (*figure 16*). Récemment, la structure complète et entière de la protéine **HCN1 humaine** a été déterminée à l'aide de la technique de cryo-microscopie électronique à 3.5Å de résolution (C.-H. Lee et MacKinnon 2017). La structure des protéines HCN est similaire à celle des canaux cationiques contrôlés par les nucléotides cycliques (CNG), ainsi qu'à celle des canaux potassiques (Kv). Ces protéines font partie de la super famille des canaux ioniques avec 6 segments transmembranaires, dont un sensible au voltage (S4). Elles s'arrangent en

4 sous-unités de manière homo- ou hétéro-tétramérique, afin de former un pore central (entre S5 et S6).



Figure 16. Séquences communes des isoformes HCN1, HCN2, HCN3, HCN4

Les trois grandes structures de la protéine HCN sont ① la première partie cytosolique NH<sub>2</sub> terminale avec le domaine HCND, ② la partie transmembranaire dont le rôle principal est la conduction ionique, et ③ la deuxième partie cytosolique COOH terminal, comprenant un domaine de liaison aux nucléotides cycliques CNBD étant la cible de modulateurs d'activité et d'expression (figure 17)

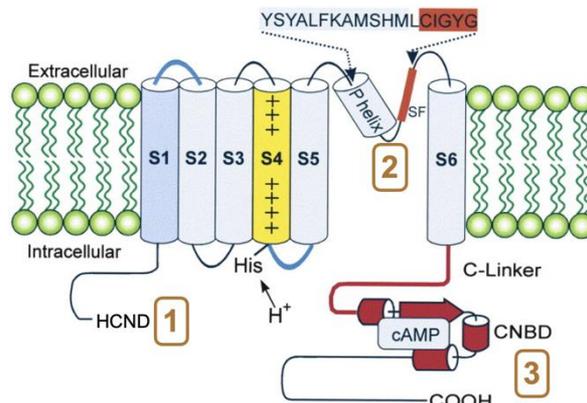


Figure 17. Les 3 grandes structures de la protéine-canal HCN

Figure adaptée de Biel 2002

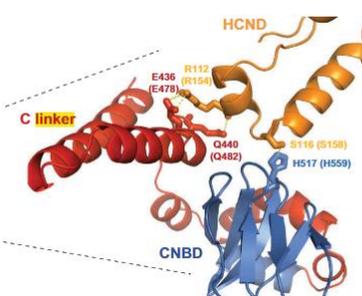
### 2.1.1. Domaine transmembranaire

**La partie transmembranaire** des canaux est constituée de six hélices  $\alpha$  (Z.-J. Wang et al. 2020) nommés S1 à S6 (figure). **Les segments S1 à S4** forment le domaine de sensibilité au voltage VSD. Le segment S4 portant 8 à 10 résidus arginine ou lysine chargés positivement, régulièrement espacés toutes les trois positions, est sensible au voltage (C.-H. Lee et MacKinnon 2017). Le principe de ce motif est de se déplacer lors d'une variation de tension transmembranaire, provoquant alors le changement de conformation du pore ionique formé par les **segments S5 et S6** conduisant à l'ouverture ou fermeture du canal. Ce pore, similaire à celui des canaux Kv (Giorgetti et al. 2005), possède un filtre de sélectivité porté par la séquence cystéine-isoleucine-glycine-tyrosine-glycine (CI-GYG), qui participe à la **perméabilité aux ions potassiques et sodiques**.

Alors que la structure du motif S4 des canaux HCN est sensiblement similaire à celle retrouvée chez les autres canaux dépendants du voltage (potassiques, sodiques ou calciques), son action est opposée puisque sa polarité est inversée : la dépolarisation ferme le canal tandis que l'hyperpolarisation l'ouvre. Les récentes études sur le canal humain HCN1 démontrent que l'hélice S4 contient 2 hélices additionnelles dans la partie cytoplasmique, ce qui est particulier par rapport à d'autres canaux contenant S4 (C.-H. Lee et MacKinnon 2017). Ces deux hélices permettent au senseur de rentrer en contact avec (1) le segment S5 voisin pour stabiliser le pore S5-S6 en conformation fermée lors d'une dépolarisation, et (2) la partie C-terminale d'une sous-unité S4 voisine afin de stabiliser le pore en conformation ouverte.

### 2.1.2. Domaines intracellulaires

La partie transmembranaire est connectée à la **partie cytosolique** du côté C-terminal par le segment S6 qui interagit avec le domaine **CNBD** via un domaine appelé « **C-linker** ». Ce domaine en 6 hélices  $\alpha$  (A' à F') a une conformation particulière dite « coudes sur épaules » où l'hélice A' suit le segment S6 transmembranaire. Le CNBD est un domaine composé de 4 hélices  $\alpha$  (A, B, C et P), avec un rouleau  $\beta$  entre les hélices A et B. Les nucléotides cycliques (AMPc ou GMPc) se fixent par l'interaction avec l'hélice C et le tonneau  $\beta$ , afin d'induire le changement de conformation du CNBD, qui se répercute sur le C-linker où ses hélices se déplacent et conduisent à un élargissement du pore du canal (Zagotta et al. 2003; Gross et al. 2018; Z.-J. Wang et al. 2020).



**Figure 18. Interactions entre le domaine HCND et le C-linker du CNBD**

D'après Wang et al. 2020

Cette machinerie serait soutenue par le domaine N-terminal cytosolique identifié il y a peu, le **HCND** (pour HCN domaine), qui est conservé pour les 4 isoformes. Ce domaine consiste en 3 hélices  $\alpha$  nommées HCNa, HCNb et HCNC. (C.-H. Lee et MacKinnon 2017; Z.-J. Wang et al. 2020). Son rôle proposé est d'interagir avec la partie cytosolique et transmembranaire afin de déplacer le CNBD et le C-linker vers le S2, afin de faciliter l'ouverture du canal lors de la fixation des nucléotides. Ceci est confirmé par la délétion du HCND qui abolit les courants  $I_h$  médié par HCN2, l'activation des canaux en fonction de l'AMPc et leur adressage membranaire (Porro et al. 2019; Z.-J. Wang et al. 2020).

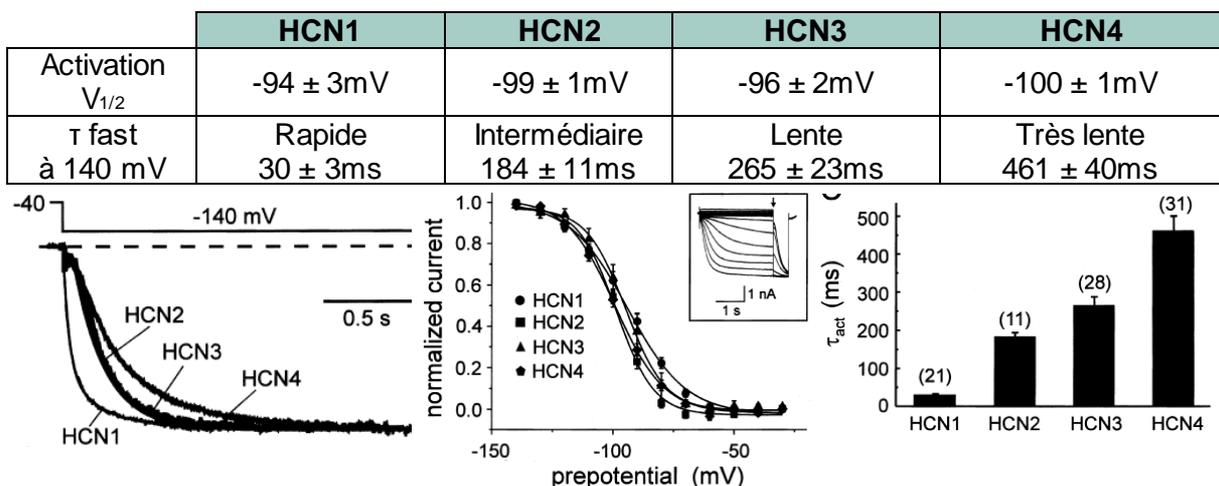
Ces différentes interactions sont primordiales dans la transmission du signal obtenu lors de la liaison de nucléotides cycliques, jusqu'aux domaines transmembranaires S4-S5-S6, et dans la modulation de l'activité du canal (plus de détails dans la partie « activation des canaux HCN »).

Finalement, ont été mises en évidence deux séquences en C-terminal très conservées, ayant pour rôle principal la liaison de protéines régulatrices. La première est une cassette de 11 acides aminés nommée SAS. La seconde, commune aux isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 correspond aux trois derniers acides-aminés « **SNL** » (Sérine-Asparagine-Leucine). Concernant l'isoforme HCN3, les 3 derniers acides-aminés sont « **ANM** » (Alanine-Asparagine-Méthionine) (Bina Santoro, Wainger, et Siegelbaum 2004).

## 2.2. Activation des canaux

### 2.2.1. Propriétés biophysiques

Les éléments structuraux des canaux HCN contribuent à des **propriétés biophysiques** bien précises qui diffèrent selon les isoformes (*figure 19*). Bien qu'elles soient toutes activées par l'hyperpolarisation de la membrane, leur cinétique d'activation diffère. Dans un système d'expression hétérologue, le monomère HCN1 présente la cinétique d'activation la plus rapide, et HCN4 la plus lente. L'activation des monomères HCN2 et HCN3 est intermédiaire. Par conséquent, l'ouverture des canaux HCN4 est effective à des potentiels très polarisés, pendant que les canaux HCN1 s'ouvrent à des potentiels plus dépolarisés. Il est important de préciser qu'en condition native, **l'hétéromérisation** de ces canaux leur attribue une cinétique d'activation différente, suggérant une diversité fonctionnelle plus large. A titre d'exemple, l'expression *in vitro* de l'hétéromère HCN1/HCN2 permet une constante d'activation  $\tau$  plus rapide ( $99.8 \pm 7.7$ ms) que le monomère HCN2 et plus lent que HCN1 (Ulens et Tytgat 2001). D'ailleurs, les propriétés du courant  $I_h$  natif enregistré au sein des neurones de l'hippocampe ( $V_{1/2} = -84.3 \pm 0.5$ mV ;  $\tau = 64.4 \pm 2.9$ ms) et des neurones périphériques sensibles au froid ( $V_{1/2} = -90 \pm 2.1$ mV) se rapprochent des propriétés de l'hétérotétramère HCN1/HCN2 (Ulens et Tytgat 2001; Orio et al. 2009).



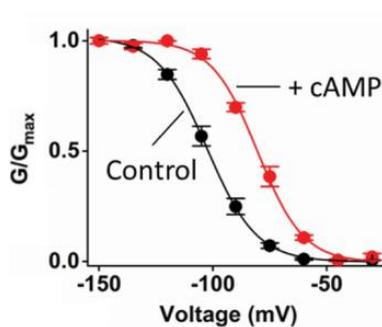
**Figure 19. Propriétés constitutives électrophysiologiques des canaux HCN1-4 exprimés dans les cellules HEK293**

Traces représentatives d'un courant évoqué de 3s à -140mV, des courants normalisés et de la constante d'activation des 4 isoformes. Adaptée de Moosmang et al. 2001

**Le filtre de sélectivité CI-GYG** du pore central discrimine une préférence de **4 K<sup>+</sup> pour 1 Na<sup>+</sup>**, alors que sa sélectivité est exclusive pour le potassium dans les canaux Kv, à raison d'un ratio sodium/potassium de 1:1000 (Bauer et al. 2022). A moindre mesure, le canal HCN serait aussi perméable à un influx d'ions calciques (Yu et al. 2004). L'explication du passage favorable à d'autres cations reste indéterminée.

### 2.2.2. Activation et modulation par les nucléotides cycliques

L'ouverture des canaux HCN est modulée par la fixation de **nucléotides cycliques** au niveau du site CNBD. La fixation de **l'AMPc** (Adenosine Monophosphate Cyclique) ou du GMPc (Guanosine Monophosphate Cyclique) permet de décaler l'ouverture du canal à des potentiels plus dépolarisés. Autrement dit, la liaison favorise l'ouverture du canal en stabilisant la transition entre la conformation fermée et ouverte du canal (*figure 20*) (Porro et al. 2020). L'affinité pour l'AMPc étant différente selon l'isoforme, l'effet de la liaison sera différent, malgré la similitude entre les régions CNBD. En effet, le décalage de la  $V_{1/2}$  pour HCN1 est plus faible



**Figure 20. Courbe d'activation HCN4 avec ou sans AMPc**

D'après Porro et al. 2020

(3mV) que lors de la liaison sur HCN2 et HCN4 (10 à 25 mV de décalage), alors que HCN3 ne semble pas répondre ni être sensible à l'AMPc. Par ailleurs, il a été montré que l'AMPc et le GMPc se fixait de la même manière, mais à des stœchiométries différentes, l'affinité pour le GMPc étant plus faible, estimée à des concentrations 10 à 100 fois supérieures (Zagotta et al. 2003). Bien que faibles modulateurs, le CMPc, le PMPc, l'UMPc et le IMPc sont aussi connus pour agir sur la conductance des canaux HCN, principalement en augmentant l'activation du courant.

Un modèle **d'allostérie cyclique** a été proposé : la liaison des nucléotides au CNBD serait plus favorable lorsque les canaux sont ouverts que lorsqu'ils sont fermés (Chen et al. 2007). De plus, la liaison conduirait à une dimérisation du C-linker et du CNBD, puis une nouvelle dimérisation pour former un tétramère (Zagotta et al. 2003). Des auteurs émettent l'hypothèse que le domaine CNBD est constamment en état d'inhibition, la liaison des nucléotides permet une levée de cette inhibition. Ceci est conforté par le fait que la délétion du domaine entraîne des effets similaires à la fixation de nucléotides (Wainger et al. 2001) (Weißgraeber et al. 2017).

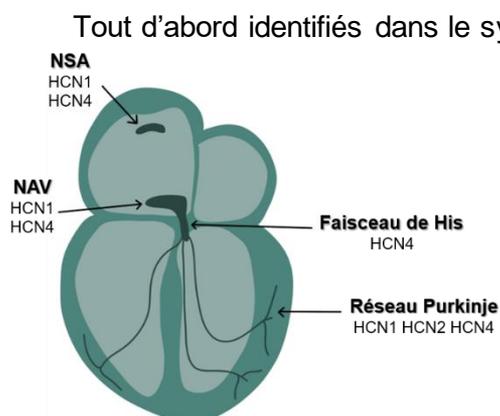
Dans le cœur, la régulation par les nucléotides cycliques contribue à moduler la fréquence cardiaque. Les agonistes  $\beta$ -adrénergiques augmentent le niveau d'AMPc et accélèrent le rythme cardiaque, alors que la présence d'agonistes des récepteurs muscariniques réduit le niveau d'AMPc et diminue le rythme cardiaque. Dans les neurones, la modulation par l'AMPc est corrélée à la modulation du processus d'inflammation et de douleur,

via des médiateurs pro-inflammatoires comme la prostaglandine E2 (PGE2) qui stimule l'activation de l'AMPc (Emery, Young, et McNaughton 2012). De plus, la délétion génétique de l'adénylate cyclase 5, enzyme impliqué dans la réaction d'hydrolyse de l'ATP en AMPc, prévient le développement de la douleur neuropathique (Kim et al. 2007).

### 3. Expressions et fonctions physiologiques des canaux HCN

Les canaux sont principalement exprimés dans le cœur et le cerveau. Toutefois, nous verrons qu'ils sont aussi présents dans d'autres organes où, bien que moins documentés, ils exercent un rôle dans de grandes fonctions physiologiques.

#### 3.1. Présence des canaux HCN dans le cœur



**Figure 21. Distribution de l'expression protéique des isoformes HCN dans les tissus nodaux**

NSA : nœud sinusal - NAV : noeud auriculo-ventriculaire

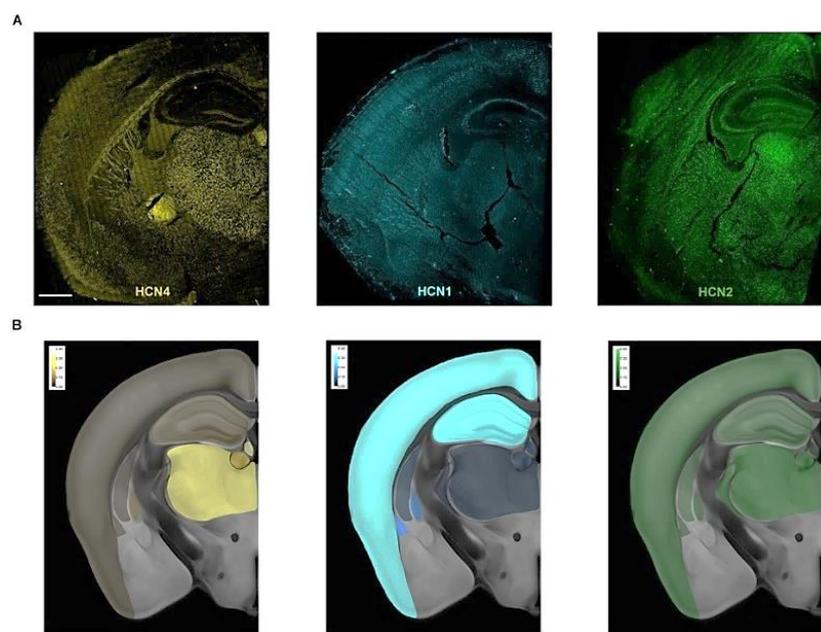
Tout d'abord identifiés dans le système cardiaque, les canaux HCN sont exprimés en grande quantité dans le tissu nodal (figure 21), à l'exception de l'isoforme HCN3 qui ne semble être exprimée que dans les myocytes ventriculaires (Li et al. 2015). Dans le cœur entier de rat, les taux d'ARNm des transcrits HCN2 et HCN4 sont les plus présents. Le taux protéique de l'isoforme HCN4 quantifié par Western Blot est également le plus élevé par rapport aux isoformes HCN1, HCN2 et HCN3, dont le niveau d'expression semble similaire (Calejo et al. 2014).

#### 3.2. Distribution dans le système nerveux

La distribution des canaux HCN dans le système nerveux a été largement étudiée depuis sa découverte dans les neurones des mammifères, tant chez les humains que chez les animaux. Les études transcriptomiques et protéiques sont nombreuses (Santoro et al. 2000; Notomi et Shigemoto 2004; Moosmang et al. 1999; Biel et al. 2009; Oyrer et al. 2019). **Les quatre isoformes sont exprimées dans le système nerveux central et périphérique**, et le plus souvent, les hétérotétramères retrouvés sont HCN1/HCN2 et HCN2/HCN4 (Novella Romanelli et al. 2016).

La distribution **de HCN1** dans le cerveau est largement répandue dans les régions corticales et sous-corticales (hippocampe) (figure 22), dans le cortex cérébelleux, le tronc cérébral et la moelle épinière. Il est également largement exprimé dans les nerfs périphériques, les DRG et dans les TG (Chaplan et al. 2003; Acosta et al. 2012). **L'isoforme**

**HCN2** est la plus représentée dans le cerveau (cortex, hippocampe, thalamus, *figure 22*). Elle est retrouvée aussi dans la moelle épinière, les DRG et les TG (Poolos 2010). Nous ne retrouvons que de faible niveau d'expression de l'**isoforme HCN3** dans le cerveau. Elle a tout de même été observée dans le bulbe olfactif, et les noyaux de l'hypothalamus (Notomi et Shigemoto 2004), et en grande quantité dans les DRG (Lainez et al. 2019). Finalement, l'**isoforme HCN4** est présente particulièrement dans le système limbique (thalamus, amygdale) (*figure 22*) (Notomi et Shigemoto 2004). Les expressions protéiques et transcriptomiques de chaque isoformes dans une région et/ou population neuronale particulière sont détaillées dans les deux prochains paragraphes au sein des neurones sensoriels dans un premier temps puis des régions supra-spinales impliqués dans le système somatosensoriel dans un second temps.



**Figure 22. Distribution de l'expression des transcrits HCN1 (bleu) HCN2 (vert) et HCN4 (jaune) dans le cerveau de souris**

(A) Représentation des résultats de RNAscope obtenus par Oyrer et al. 2019 dans le cerveau de souris adulte, et (B) leur intensité d'expression pour chaque transcrits (% du nombre total de cellules)

### 3.2.1. Les canaux HCN exprimés dans les neurones sensoriels périphériques

Dans les **DRG** des rongeurs, les isoformes HCN1 et HCN2 prédominent sur l'expression de HCN3 et HCN4, de telle sorte que les niveaux d'ARNm totaux suivent l'ordre HCN2>HCN1>HCN3>HCN4 (Moosmang et al. 2001; Kouranova et al. 2008; Momin et al. 2008; Acosta et al. 2012).

**Les ARNm HCN1 et HCN2** sont détectés par ISH à 100% et 80% dans les neurones moyens et larges et 80% et 60% dans les petits neurones de souris, respectivement (Moosmang et al. 2001). Ceci est observé également chez le rat par RT-qPCR où les taux d'ARNm étaient significativement plus hauts pour HCN1 et HCN2 dans les neurones larges (55-80µM) par rapport aux petits (20-30µM) (Kouranova et al. 2008).

De récentes analyses transcriptomiques très sensibles réalisées par la technique de **RNAscope** ont permis de déterminer précisément la colocalisation des transcrits de HCN1 et HCN2 avec des marqueurs phénotypiques caractéristiques, en comparant l'expression **humaine et murine** (Shiers, Klein, et Price 2020). **L'isoforme HCN1** est exprimée à hauteur de 70% dans les neurones des DRG de souris, contre 95% dans les DRG humains. Cette étude confirme sa forte expression dans les neurones larges des souris (NF200 positifs). Toutefois, dans les neurones de DRG humain, HCN1 est fortement coexprimé avec le CGRP (fibre C peptidergique) et P2X3 (fibre C non peptidergique), tous deux marqueurs de petits neurones amyélinisés nocicepteurs. **Concernant HCN2**, l'ARNm a été retrouvé à 75% dans les neurones sensoriels de souris et 44% chez les humains. Chez les souris, HCN2 est dans les neurones de petits et moyens diamètres, qui coexpriment P2X3, et également dans les neurones larges qui expriment NF200. Chez les humains, HCN2 est autant exprimé dans les neurones qui coexpriment CGRP et P2X3 que dans les neurones négatifs pour ces deux marqueurs (Shiers, Klein, et Price 2020).

**En immunohistochimie** dans les DRG de rats, **l'isoforme HCN1** marque majoritairement la membrane des nocicepteurs A $\beta$  (100%) et A $\delta$  (75%), et n'est que faiblement marquée dans les fibres C (Acosta et al. 2012; Dini et al. 2018). De plus, l'électrophysiologie sur DRG de souris WT et HCN1<sup>-/-</sup>, a permis de déduire que HCN1 était exprimé dans les neurones larges et moyens de souris (>25 $\mu$ M) à conduction rapide et il semble également présent dans les petits neurones (<25 $\mu$ M) sensibles au froid qui expriment TRPM8 (Momin et al. 2008). Par ailleurs, l'isoforme HCN1 est retrouvée au niveau des nœuds de Ranvier (Acosta et al. 2012). Quant à la **protéine HCN2**, le marquage dans les DRG de rats est intense dans les membranes et cytosols des A $\beta$  non nocicepteurs, dans les afférences du fuseau musculaire, et dans les membranes des A $\delta$ -nocicepteurs. De plus, HCN2 est spécifiquement exprimée dans les neurones qui n'expriment pas IB4 (fibres nociceptives de type C) (Kouranova et al. 2008; Acosta et al. 2012).

La présence des canaux HCN1 et HCN2 (protéines et transcrits) dans les **ganglions trigéminaux** a été rapportée (Cho et al. 2009; Cho, Furness, et Jennings 2011), mais il n'existe pour le moment aucune étude évaluant la quantification de son expression.

Concernant **HCN3**, une unique étude évalue son expression protéique sur DRG lombaires de souris par immunohistochimie et détecte un marquage dans 61 $\pm$ 1% des neurones totaux, et autant dans les petits neurones (<20 $\mu$ M) que dans les moyens-larges (>20 $\mu$ M). La caractérisation avec des marqueurs phénotypiques a mis en évidence son expression dans les petits neurones non myélinisés, dans les neurones myélinisés moyens-larges et dans les neurones nociceptifs positifs pour Nav1.8 (Lainez et al. 2019). Enfin,

l'expression de l'isoforme **HCN4** n'est que peu documentée dans les DRG de rongeurs, mais il semblerait qu'elle soit davantage située dans le cytoplasme (Dini et al. 2018).

### 3.2.2. Expression des canaux HCN dans le système central somatosensoriel

Des études transcriptomiques dans la **moelle épinière de souris** a montré la présence des isoformes HCN1-2-4, et une absence de l'isoforme HCN3, ce qui a été confirmé par des études protéiques (Santoro et al. 2000; Notomi et Shigemoto 2004; Hughes et al. 2012). Chez le rat, la protéine HCN1 prédomine dans la lamina III et co-localisent exclusivement avec NF200 (Milligan, Edwards, et Deuchars 2006), alors que HCN2 est marqué dans les terminaisons centrales (lamina I et II) des fibres C. Dans la moelle épinière de souris, le marquage protéique HCN1 et HCN2 est retrouvé dans ces mêmes terminaisons de la couche I et II. Enfin, HCN4 est majoritairement présent dans les interneurons parvalbumine positifs de la moelle épinière de souris et rats (Hughes et al. 2012; Ma et al. 2021).

**Dans le thalamus**, première région réceptrice des informations du tractus trigéminal et spinothalamique, les quatre isoformes sont exprimées chez la souris (Zobeiri et al. 2019; Santoro et Shah 2020). Particulièrement les transcrits de **HCN2** (67% des cellules totales du thalamus, quantifié par RNAscope®) sont retrouvés dans la formation réticulée, et les noyaux thalamiques : le noyau postérieur, le complexe basoventral, le noyau médiocentral (Oyrer et al. 2019). L'ARNm de **HCN4** est mesuré à hauteur de 34% dans les cellules totales du thalamus, particulièrement dans le complexe basoventral. De manière intéressante il est exprimé uniquement dans les neurones excitateurs (Vglut2 positifs) et est toujours coexprimé avec HCN2 (RNAscope, Oyrer et al. 2019). L'expression des 4 isoformes des canaux a été détectée **dans le cortex somatosensoriel**, les niveaux protéiques par intensité de marquage protéiques de HCN4 étant significativement plus faibles que les trois autres isoformes (Zobeiri et al. 2019). Aucune étude quantitative n'a mesuré les taux protéiques et transcriptionnels des différents isoformes HCN dans **l'ACC, le PAG, l'amygdale, et le cortex insulaire** mais de multiples données pharmacologiques et électrophysiologiques démontrent leur présence dans ces territoires au centre de l'intégration sensorielle (Dickinson et al, 2015 ; Munos et al, 2022).

La **localisation subcellulaire** des protéines HCNs est globalement concentrée dans le compartiment somatodendritique, mais celle-ci reste dépendante de la région cérébrale. Dans le cortex et l'hippocampe, un marquage immunohistochimie **HCN1** a montré l'expression de la protéine dans la portion distale des dendrites apicales de neurones pyramidaux, et dans les terminaisons axoniques des interneurons parvalbumine positifs (Notomi et Shigemoto 2004; Santoro et Shah 2020). La protéine **HCN2** est localisée principalement dans le soma et les dendrites des neurones corticales et thalamiques. Dans le thalamus, la protéine **HCN4** est exclusivement localisée dans les dendrites (Hammelman et al. 2019).

### 3.3. Expression dans d'autres cellules ou tissus

Bien caractérisés dans les cellules neuronales, les canaux HCN sont également exprimés par leur cellules satellites : **les cellules gliales**. L'expression des canaux HCN dans les astrocytes est évidente dans les étapes d'embryogenèses des tissus nerveux, mais est perdue dans le cerveau adulte, suggérant un rôle important des canaux dans la gliogenèse. Ceci est conforté par l'augmentation de l'expression astrocytaire des canaux en condition d'ischémie dans les tissus cérébraux du rat et de la souris (Benzoni et al, 2021). La microglie exprime toutes les isoformes HCN, mais seules les expressions de HCN2 et HCN3 sont modifiés lors d'un stimulus inflammatoire (Vay et al, 2020).

Aussi, les canaux HCN ont été très tôt caractérisés dans les **testicules** (figure 23). HCN4 serait notamment impliqué dans les mouvements flagellaires des spermatozoïdes (Seifert et al. 1999). Dans la **vessie**, les isoformes HCN1 et HCN4 sont préférentiellement exprimées autant dans la muqueuse que dans le muscle du rat ou de l'humain (Kashyap et al. 2015). Les canaux HCN3 sont abondamment retrouvés dans les **reins** (localisation mitochondriale) chez le rat et l'Homme, leur activité permettrait l'entrée de  $K^+$  pour faciliter l'activité de la chaîne respiratoire (León-Aparicio et al. 2019). Les canaux HCN sont également présents dans le **système gastro-intestinal**, où ils sont principalement impliqués dans le péristaltisme et la motilité intestinale. Dans le **système endocrinien**, les canaux HCN sont exprimés dans l'hypophyse et dans la glande surrénale. Enfin, les 4 isoformes sont exprimées dans des organes sensoriels, comme la rétine des rongeurs et des Hommes, particulièrement dans les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires, les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Müller et al. 2003; Stradleigh et al. 2011) ; et la bouche où le courant  $I_h$  joue un rôle de transducteur du goût acide (Stevens 2001).

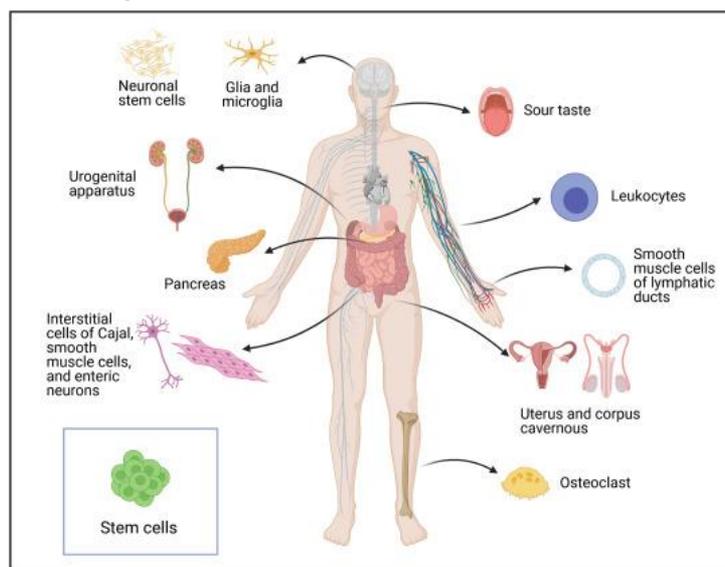


Figure 23. Les canaux HCN dans les différents systèmes physiologiques du corps humain

D'après Benzoni et al. 2021

## 4. Rôles physiologiques des canaux HCN

### 4.1. Le potentiel d'action cardiaque

Le courant  $I_f$  joue un rôle majeur dans la génération du rythme cardiaque et dans sa modulation. La phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action conduit à un courant entrant potassique et sodique, et ainsi à la **dépolarisation diastolique** dans les cellules du tissu nodal jusqu'au seuil d'activation des canaux calciques voltage-dépendant (de type L et T), qui permettent l'entrée de  $Ca^{2+}$  et le déclenchement du prochain potentiel d'action, corrélée à la systole (Mangoni, Marger, et Nargeot 2006).

La **modulation de la fréquence cardiaque** par le canal HCN est bien documentée aujourd'hui. Observée pour la première fois en 1979, la perfusion d'adrénaline dans la préparation de cellules isolées de NSA de lapin a induit une augmentation de l'amplitude du courant  $I_f$  (Brown, DiFrancesco, et Noble 1979). La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques agit en tant que potentialisateur de  $I_f$  entraînant une augmentation du rythme sinusal par la modulation de la pente de dépolarisation diastolique (DiFrancesco et al. 1986). Tandis que l'acétylcholine inhibe le courant  $I_f$  (DiFrancesco et Tromba 1988). Ces effets sont médiés par l'augmentation ou la diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc dont la synthèse est stimulée ou inhibée par ces récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans la modulation autonome de la fréquence cardiaque (DiFrancesco et Tortora 1991).

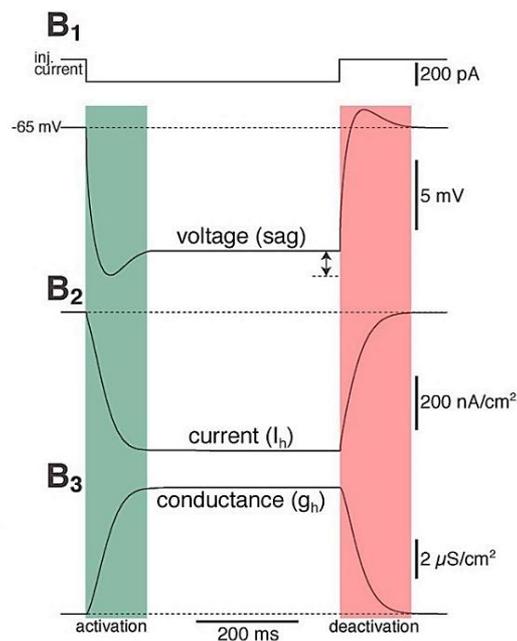
### 4.2. Rôle du courant $I_h$ dans les neurones

Semblable à leur fonction dans les cellules cardiaques, les canaux HCN ont également un rôle de pacemaker dans les neurones. De par son action de canal rectifiant entrant,  $I_h$  a la capacité de réguler l'excitabilité neuronale et de moduler l'activité des réseaux synaptiques.

#### 4.2.1. *Maintien du potentiel de repos membranaire*

La particularité du courant  $I_h$  contribue à l'**excitabilité du neurone** et ainsi, à la régulation du potentiel de repos membranaire. En effet, son activation à des potentiels hyperpolarisés conduit à l'ouverture d'une fraction des canaux HCN à un voltage avoisinant -70mV. L'étape d'hyperpolarisation de la membrane à partir du potentiel de repos membranaire amène les membranes des neurones exprimant HCN à un potentiel d'affaissement appelé « **sag** » (*figure 24*). L'ouverture des canaux HCN génère un **courant net entrant dépolarisant** qui s'oppose à l'hyperpolarisation. Le potentiel membranaire augmente, provoque la désactivation des canaux et remet en marche le processus d'hyperpolarisation (et ramène le potentiel de membrane au potentiel de repos). Ce cycle permet à la cellule de maintenir un potentiel membranaire près de son potentiel d'activation. Le blocage des canaux HCN par des

molécules comme le ZD7288 (voir partie pharmacologie des canaux HCN), provoque l'hyperpolarisation de la membrane et une réduction de l'excitabilité neuronale.



**Figure 24. Effet de l'activation des canaux HCN sur l'excitabilité neuronale hippocampale**

Changement du voltage, du courant, de la conductance  $I_h$  dans un neurone pyramidal de la région CA1 de l'hippocampe durant une étape d'hyperpolarisation membranaire à  $-200\text{pA}$  (500ms).

D'après Combe et Gasparini 2021

#### 4.2.2. Genèse du rythme neuronal

Ce cycle précédemment cité est à l'origine **d'activité oscillatoire membranaire** permise par la génération de potentiel d'action. En effet, un dépassement du potentiel membranaire suite à la dépolarisation peut générer un ou plusieurs potentiels d'action. De manière physiologique, cette activité spécifique est retrouvée dans les neurones thalamo-corticaux pendant **l'éveil** ou le sommeil **REM** (*rapid eye movement*), qui émettent des signaux par potentiel d'action unique, pour permettre la transmission normale du message. Au contraire, pendant le sommeil **non REM**, les neurones émettent par rafale de potentiels d'action, bloquant la transmission du message. Encore une fois, le blocage des canaux ou la perturbation de sa régulation provoque une inhibition de l'oscillation neuronale.

#### 4.2.3. Plasticité synaptique

La localisation dendritique de HCN permet au courant  $I_h$  de contrôler la temporalité des potentiels post-synaptiques excitateurs ou PPSE. La fermeture lente des canaux conduisant à l'hyperpolarisation lente raccourcit la durée des PPSE.

### 4.3. Outils génétiques et identification de mutations chez l'Homme

Les études de **modifications génétiques chez les animaux** ont montré que la délétion par knockout du gène **HCN4** était létale pour l'embryon et conduit au développement d'arythmie et de perturbation de l'action oscillatoire thalamocorticale à l'âge adulte lorsque le gène est délété exclusivement dans le système nerveux central (Stieber et al. 2003; Zobeiri et al. 2019). Les animaux mutants pour **HCN2** ont montré une durée de vie réduite, une ataxie sensitive et motrice grave, des déficits cardiaques (arythmies, bradycardies) avec une réduction significative du courant  $I_f$  dans le tissu nodal, et des crises d'absences spontanées (Fisher et al. 2018). S'il n'a pas été rapporté un phénotype cardiaque particulier des souris KO pour **HCN1**, des altérations des processus moteurs et une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsies sont observées (Poolos 2010). Le peu d'études évaluant les effets *in vivo* de délétion du gène **HCN3** ne montrent pas d'effet majeur délétère, mais des perturbations dans certains processus émotionnels notamment ceux relatifs à la peur (Stieglitz et al. 2017).

Des **mutations humaines** des gènes codants pour les canaux HCN1, HCN2 et HCN4 ont été découverts à l'origine de pathologies cardiaques et épileptiques. La plupart étant des polymorphismes d'un seul nucléotide dans le gène. Une mutation dans **HCN4** est corrélée à une bradycardie et une prolongation de l'onde Qt (Milanesi et al. 2006) et une mutation dans les gènes **HCN1** et **HCN2** est associée à l'apparition de crises d'épilepsies (Marini et al. 2018).

## 5. Pharmacologie des canaux HCN

Dû au degré élevé de similitudes entre les séquences des isoformes, il n'existe actuellement aucun bloqueur spécifique d'une isoforme particulière. Pour autant, de multiples ligands exogènes en phase d'étude pré-clinique, clinique ou même déjà commercialisés ont été mis en évidence.

Originellement nommé S-16257 et utilisé pour la première fois en 1994, **l'ivabradine** bloque de manière dose-dépendante les canaux HCN avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire pour les 4 isoformes (IC<sub>50</sub> : 2.25µM) (Stieber et al. 2006). Grâce à sa fixation au niveau du pore intracellulaire, il évite le flux de K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>, retarde la dépolarisation des cellules du tissu nodal (SNA) et la génération du potentiel suivant. Ainsi, l'ivabradine exerce un effet bradycardisant. Aujourd'hui cette molécule est la molécule active du Procoralan® ou du Corlanor® (posologie recommandée 10mg par jour), prescrit en cas de symptômes d'angine de poitrine chez des patients avec un rythme cardiaque supérieur à 70 battements par minute (bpm) au repos mais ayant une contre-indication aux bêtabloquants, ou en association avec ces bêtabloquants. Il est également utilisé dans le cas d'insuffisance cardiaque chronique diagnostiquée chez le patient ayant un rythme cardiaque supérieur à 75 bpm (Balducci et al. 2021). Le manque de sélectivité de l'ivabradine produit des réactions indésirables notamment

au niveau de la rétine où le blocage du courant  $I_h$  par l'administration de l'ivabradine conduit à une altération de la vision comme le développement de phosphènes. Même s'il a été démontré que cette molécule ne passait pas la BHE, des auteurs ont observé un effet antiépileptique de l'ivabradine dans un modèle préclinique d'épilepsie (Cavalcante et al, 2019).

Les projets de développement de médicaments bloqueurs des canaux HCN sont nombreux. Des dérivés de l'ivabradine, la **zatébradine** et la **cilobradine** sont actuellement testés en essais cliniques. De manière intéressante, les auteurs cherchent à rendre sélectif leur composé, en criblant des dérivés de ces molécules. Par exemple, **EC18** a une affinité plus élevée pour HCN4 (4 $\mu$ M) que pour HCN1 et HCN2 (20 $\mu$ M) dans un système HEK. Alors que d'autres dérivés, le **MEL55A** est onze fois plus affiné pour HCN2 que pour HCN1 et HCN4, et le **MEL57A** a plus d'affinité pour HCN1 (1 $\mu$ M) (Del Lungo 2011; Melchiorre 2010). Il est important de préciser que l'ensemble des bloqueurs présentés ci-dessus sont capables d'interagir avec d'autres canaux potassiques ou sodiques, rendant leur utilisation clinique complexe.

Le composé **ZD7288** dérivé de la pyrimidine a été conçu principalement pour son utilisation en tant qu'outil pharmacologique, sans but de valorisation clinique. C'est un ligand bloqueur largement utilisé par les chercheurs qui étudient les canaux HCN. Dans les DRG de neurones, il n'a pas d'effet sur les courants purement potassiques, bloque les canaux sodiques selon l'IC50 1,17 $\mu$ M et semble être moins affiné aux HCNs (IC50 : 15 $\mu$ M) (Wu et al. 2012). Pour autant, son affinité est similaire pour les 4 isoformes HCN (Bucchi et al. 2013)

Plus fréquemment utilisé, le **chlorure de césium** (CICs), bloqueur connu des canaux potassiques est utilisé pour bloquer les canaux HCN (Denyer et Brown 1990; Negrini et al. 2016). Enfin, le blocage des canaux par des composés exogènes ciblant le **système de synthèse des nucléotides cycliques** est également utilisé. En effet, des agonistes des récepteurs couplés aux protéines  $G_i$  (inhibitrices) contribuent à la diminution de la synthèse d'AMPc, et par conséquent au blocage du courant  $I_h$ , avec l'exemple de la Clonidine, un anesthésique, antalgique et anti-hypertenseur, qui diminue le courant  $I_h$  *in vitro* (Yang 2014).

## 6. Régulation des canaux HCN

Outre la modulation endogène par les nucléotides cycliques qui définit la particularité des canaux HCN, la régulation est également possible au niveau intracellulaire, extracellulaire et transmembranaire. Elle permet de réguler le courant médié par les canaux et la localisation subcellulaire de HCN.

## 6.1. Régulation par les lipides

Les canaux ioniques transmembranaires sont généralement régulés par les lipides membranaires. L'activité des canaux HCN est modulée par le cholestérol, les lipopolysaccharides et les phospholipides. Parmi les phospholipides, les phosphoinositides (PIPs) dont **PIP<sub>2</sub>** sont ceux les plus étudiés en association avec tous les isoformes des canaux HCN. Le PIP<sub>2</sub> agit comme un ligand allostérique en déplaçant l'activation des canaux vers des potentiels plus positifs (20 mV environ), accélérant l'activation et ralentissant la désactivation (Zolles et al. 2006; Claveras Cabezudo, Ferial Khoualdi, et D'Avanzo 2022). D'autres messagers lipidiques membranaires facilitent l'activation du courant I<sub>h</sub>, en particulier l'acide phosphatidique et l'**acide arachidonique** (Fogle et al. 2007). Les mécanismes sous-jacents de l'interaction entre les domaines transmembranaires et ces différents lipides sont pour le moment encore inexplicables.

## 6.2. Régulation par les protons (pH)

L'activité des canaux HCN est étroitement corrélée aux concentrations intracellulaires et extracellulaires des **protons**. Immédiatement après sa découverte, il a été montré qu'un pH acide (pHi 6.0) active le canal HCN à des potentiels plus hyperpolarisés. À l'inverse, un pH basique (pHi 9.0) décale l'activation à des potentiels plus dépolarisés. La sensibilité aux protons est permise grâce au résidu histidine au niveau du domaine transmembranaire S4 (*figure 17*). Cette régulation par le pH d'une part intracellulaire a un rôle important dans les oscillations thalamocorticales du cerveau, et d'autre part extracellulaire (alimentation acide) a un rôle dans la transduction du goût (Zong et al. 2001; Wahl-Schott et Biel 2009).

## 6.3. Protéines d'interaction

En plus des petites molécules, de nombreuses protéines dites auxiliaires interagissent avec les segments transmembranaires des canaux ou les domaines intracellulaires afin de former des complexes macromoléculaires.

### 6.3.1. Protéines membranaires

Un composant de la membrane lipidique du sarcolemme, la **cavéoline-3**, est colocalisée avec le canal HCN4 dans les cellules du NSA de lapin, dans l'oreillette du cœur humain et dans des cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines. La cavéoline-3 en modifiant la cinétique du courant I<sub>h</sub> pour accélérer sa désactivation, pourrait avoir un rôle dans le processus d'arythmies (Bosman et al. 2013).

Le domaine transmembranaire du canal HCN interagit avec d'autres domaines présents dans la membrane. Nous pouvons donner l'exemple de **MiRP1** (MinK-related protein), une protéine avec un seul domaine transmembranaire exprimée majoritairement

dans le cœur et le système nerveux. Son activité est débattue mais elle semble moduler l'activité du canal sans modifier son expression. Lorsqu'elle est associée à HCN1 et HCN2, la cinétique d'activation est accélérée, alors qu'elle est déplacée vers des potentiels plus négatifs avec HCN4 (Peters et al. 2022). Enfin, en 2008 a été mise en évidence une interaction entre une protéine régulatrice des canaux potassiques (**KCR1**), retrouvée dans le cœur et dans le cervelet. Elle décale l'activation de  $I_h$  à des potentiels plus négatifs (Michels et al. 2008). De même que la Cavéoline-3, la régulation par MiRP1 ou par KCR1 suppose un lien dans le développement de pathologies cardiaques (Barbuti et DiFrancesco 2014). La protéine MiRP1 aurait un rôle également dans le développement de douleur neuropathique (Resta et al. 2018).

### 6.3.2. Protéines cytosoliques

#### 6.3.2.1. *Filamine A, Tamaline, S-SCAM, Mint2 et Nedd4-2*

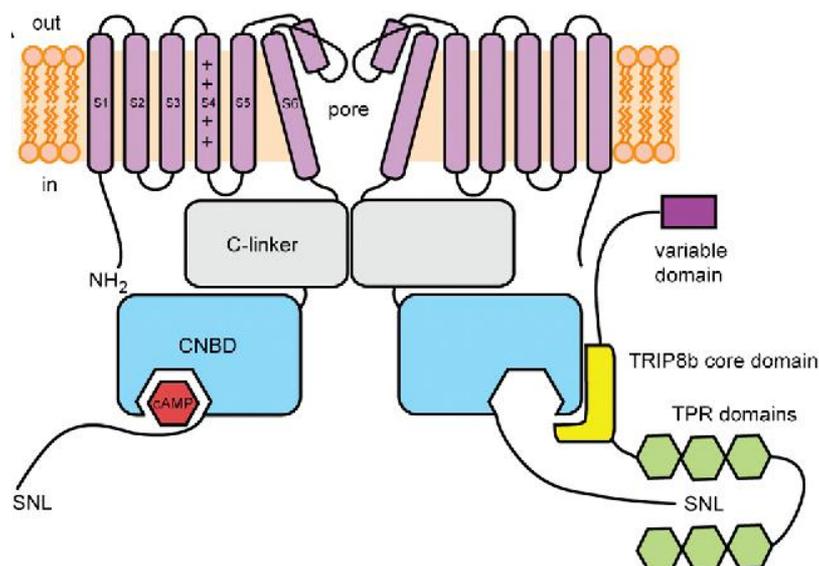
La **Filamine A** est une protéine du cytosquelette, isoforme des filamines, qui se fixe normalement sur l'actine afin de stabiliser sa structure. Elle interagit avec plusieurs canaux ioniques, et exclusivement avec l'isoforme HCN1 des canaux HCN. Son interaction permet l'internalisation réversible du canal à l'aide de la dynamine, et sa redistribution à la membrane des endosomes. La Filamine A se lie spécifiquement à une région de 22 acides aminés en aval du CNBD, présente uniquement dans la séquence de l'isoforme HCN1 (Noam et al. 2014). D'autres protéines d'échafaudages situées dans le cerveau interagissent avec l'isoforme HCN2, la **Tamaline** et le **S-SCAM** via leur domaine PDZ. La protéine **Mint2**, adaptatrice neuronale, se lie habituellement aux protéines précurseurs de l'amyloïde et est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Elle interagit également avec HCN2, par son domaine « Munc-18 », permettant son expression à la membrane (Lewis, Estep, et Chetkovich 2010). Le précurseur protéique **Nedd4-2** est une ubiquitine ligase. Il a été observé que sa co-expression avec HCN1 dans les cellules HEK réduit l'expression à la surface du canal, et dans les ovocytes de Xénope réduit l'amplitude du courant  $I_h$ . La protéine Nedd4-2 médie l'ubiquitinylation du canal HCN1 au niveau du motif PY (riche en prolines) situé à l'extrémité C-terminale du canal (Wilkars et al. 2014). De manière intéressante, Nedd4-2 participe à la mise en place de la douleur neuropathique, puisque des souris dont le gène est délété dans les nocicepteurs expose à un phénotype caractéristique des douleurs neuropathiques, avec une hypersensibilité au froid accrue (Laedermann et al. 2013).

#### 6.3.2.2. *TRIP8b*

En 2004 a été découvert à l'aide d'un criblage double-hybride en levure, une interaction entre la partie C-terminale du canal HCN et une protéine nommée « Tetratricopeptide Repeat-containing, Rab8-interacting » ou **TRIP8b** (gène *PEX5*) (Bina Santoro, Wainger, et Siegelbaum 2004). Les premières expériences ont montré une interaction entre les 3 derniers acides-aminés SNL des isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 et le domaine TPR de TRIP8b. Dans

les souris délétées pour le gène *HCN1* en *knockout* global, ou *knockout* partiel uniquement dans les neurones excitateurs CamKII positifs, une remarquable redistribution des protéines TRIP8b a été retrouvée dans le cerveau, avec une diminution du marquage immunohistochimique dans les couches superficielles du cortex. L'expression dendritique de TRIP8b est réduite alors que l'expression somatique est plus marquée chez ces souris, par rapport à des souris sauvages, et ce, au même titre que l'expression de HCN1, suggérant une colocalisation importante entre les deux protéines. La protéine TRIP8b a été originellement décrite dans un système d'expression hétérologue et natif (culture de neurones d'hippocampe), comme régulateur à la baisse de l'expression à la membrane du canal HCN, en augmentant son internalisation (Bina Santoro, Wainger, et Siegelbaum 2004). Dans le même sens, la délétion génétique de TRIP8b altère le trafic neuronal de HCN et sa fonction (Lewis et al. 2011).

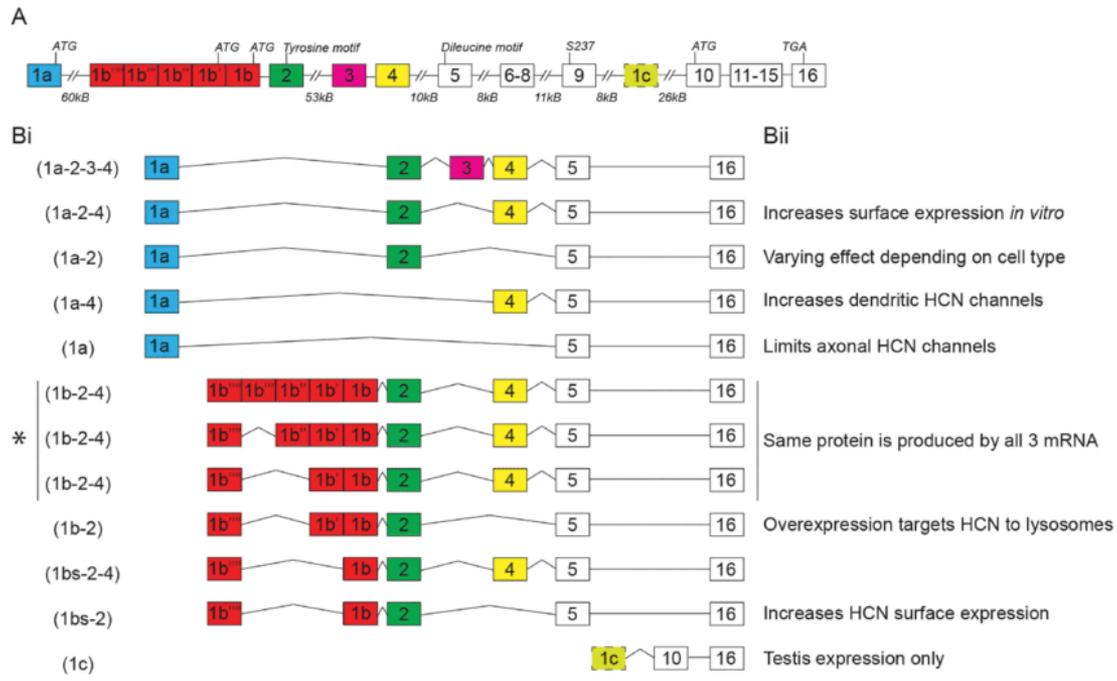
A la suite de ces recherches, un grand nombre d'études ont porté sur la caractérisation de ce complexe protéique (*figure 25*). La structure du site d'interaction TRP-SNL a été clairement identifiée : TRIP8b contient six domaines TPR, organisés en 2 groupes de trois domaines séparés par 45 acides aminés. Ce sont ces 2 groupes qui forment le complexe avec le peptide -RLSSNL terminal de HCN. Par ailleurs, 40 autres acides aminés de TRIP8b interagissent avec le domaine CNBD de HCN. Les deux interactions finalement décrites ont deux fonctions différentes, puisque le premier participe au trafic cellulaire du canal, tandis que la seconde médie l'ouverture/fermeture du canal. En présence de TRIP8b, HCN s'ouvre à des potentiels plus hyperpolarisés et serait en compétition avec l'AMPc pour la liaison au domaine CNBD (Porro et al. 2019).



**Figure 25. Schéma du complexe HCN et sa protéine régulatrice TRIP8b**

D'après DeBerg et al. 2015

Les **12 isoformes** connus de TRIP8b (par épissages alternatifs) interagissent différemment avec HCN dans les neurones, l'isoforme TRIP8b(1a-4) étant la plus abondante dans le cerveau. De façon intéressante, l'ensemble des isoformes n'est exprimé qu'au niveau du système nerveux (sauf l'isoforme 1c spécifique aux testicules) avec une très faible quantité de transcrits et une absence protéique dans les tissus cardionecteurs du cœur (Scherschel et al. 2021) (*figure 26*). Enfin, la liaison entre TRIP8b et HCN suit une stœchiométrie de 1 pour 1. Cette caractéristique a été observée par photométrie de masse où 4 sous-unités de HCN4 se lient à 4 molécules de TRIP8b (Saponaro et al. 2022).



**Figure 26. Représentation schématique des isoformes de TRIP8b et leurs fonctions associées**

D'après Lewis et al. 2011

Finalement, l'ensemble de ces interactions nous renseigne sur l'importance de la régulation du canal dans (1) son trafic cellulaire puisque certains complexes promeuvent l'internalisation pendant que d'autres augmentent l'adressage à la membrane et (2) l'activité du courant qu'il médie, par des décalages de courbe d'activation.

La régulation du canal HCN participe à sa fonction physiologique. Une absence ou altération de ces mécanismes contribue au développement de troubles neurologiques majeurs, tels que l'anxiété, la dépression, l'épilepsie, ou la douleur notamment neuropathique.

## RÉSUMÉ CHAPITRE 2

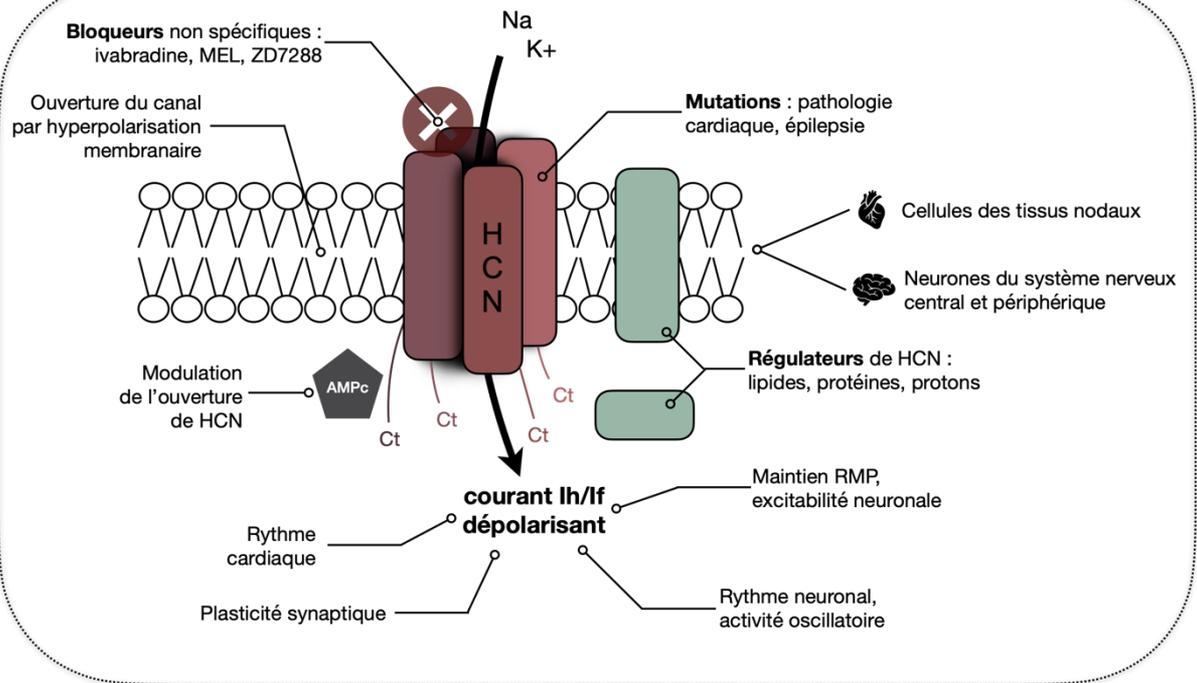


Figure 27. Schéma bilan du CHAPITRE 2 sur les canaux HCN

## - CHAPITRE 3 -

# Le canal HCN comme cible pharmacologique pour traiter la douleur

Pour rappel, la nociception est le processus d'encodage de l'information à caractère nociceptif. Les étapes clés sont la transduction du message sensoriel convertis en signal électrique, sa transmission périphérique, sa modulation et sa perception centrale. Lorsque la douleur est neuropathique, cette voie présente une hyperexcitabilité et produit des décharges ectopiques entraînant les symptômes caractéristiques détaillés en première partie. La contribution des canaux HCN dans ces décharges peut être expliquée par son rôle majeur dans l'excitabilité membranaire. Ainsi, les publications des vingt dernières années convergent vers un rôle des canaux HCN dans le processus de douleur.

## 1. Les canaux HCN : acteurs de la douleur neuropathique

### 1.1. HCN dans la douleur induite *in vivo*

#### 1.1.1. Douleur neuropathique d'origine traumatique (tableau 7)

L'implication des **canaux HCN périphériques** dans la douleur neuropathique d'origine traumatique a été exploré *in vivo* pour la première fois par l'équipe de Chaplan et ses collaborateurs en 2003 qui a montré une baisse significative des transcrits et des protéines HCN1 et HCN2 dans les neurones larges de DRG d'un modèle de rat avec ligature du nerf sciatique (**SNL**), alors qu'à l'inverse, la densité de courant  $I_h$  dans ces neurones est augmentée (Chaplan et al. 2003). Plus tard, c'est une surexpression des canaux HCN qui a été rapportée dans les DRG dans ce modèle, où les niveaux protéiques de HCN2 sont significativement augmentés dans les petits neurones nocicepteurs, alors que les niveaux de HCN1 et HCN3 sont inchangées (Smith et al. 2015). Dans un autre modèle animal de douleur neuropathique, cette fois-ci par constriction chronique du nerf (**CCI**), la densité des canaux HCN1/2 augmente dans les axones tandis qu'elle a tendance à diminuer dans les corps cellulaires du DRG lésé (Jiang et al. 2008). De plus, une étude n'a montré aucun changement dans l'expression de HCN1 et HCN2 dans le DRG de ce modèle (H. Liu et al. 2017). La CCI du nerf infra-orbitale qui modélise une neuropathie trigéminal a conduit à l'augmentation protéique de HCN1 et HCN2 dans le TG (Ding et al. 2018).

Au **niveau central**, les changements d'expressions des canaux HCN dans les modèles traumatiques ont également fait l'objet de multiples études quantitatives. Dans la moelle épinière d'animaux CCI, aucun changement n'a été retrouvé (H. Liu et al. 2017). Au niveau supra-spinal, les quantités des canaux HCN sont augmentées par rapport à des animaux

contrôles. En effet, HCN1 et HCN2 sont significativement plus élevées dans le thalamus et l'hippocampe (Yang et al. 2019; Ding et al. 2016), dans le PAG (Du et al. 2013) et dans le cortex préfrontal médian (CPFm) (Cordeiro Matos, Zhang, et Séguéla 2015). De façon intéressante, une diminution de l'expression de la protéine auxiliaire TRIP8b a été mesurée dans l'hippocampe d'animaux SNL, région limbique du cerveau ayant un rôle dans la dépression et la mémorisation (Vasic et Schmidt 2017; Yang et al. 2019).

Ces changements d'expressions sont associés aux **perturbations fonctionnelles du courant  $I_h$**  et de l'excitabilité membranaire des territoires au cœur des voies de la nociception. Dans les DRG d'animaux neuropathiques traumatiques, la densité de courant  $I_h$  est augmentée et les décharges spontanées de potentiels d'action sont significativement plus importantes au niveau périphérique, et notamment des neurones larges de DRG (Chaplan et al. 2003) et au niveau central (Du et al. 2013). L'injection systémique du bloqueur non sélectif des canaux HCN, ZD7288, diminue à la fois l'excitabilité des nocicepteurs  $A\delta$ , observable par la diminution de décharge ectopique *in vitro*, et **l'hypersensibilité** douloureuse chez ce modèle de douleur neuropathique (Chaplan et al. 2003). Le blocage du courant  $I_h$  associée à un effet antalgique du ZD7288 a été observée dans plusieurs études suite à une injection intraplantaire (Luo et al. 2007; Smith et al. 2015), dans le TG (Ding et al. 2018), en intrathécale (Takasu, Ono, et Tanabe 2010), dans le PAG (Du et al. 2013), le thalamus (Ding et al. 2016), et en intra-corticale (Cordeiro Matos, Zhang, et Séguéla 2015). Une infusion du ZD7288 dans le ventricule latéral du modèle SNL atténue également les comorbidités existantes à la douleur neuropathique, en particulier le comportement de type dépressif (Yang et al, 2019). Enfin, l'ivabradine reverse également la douleur évoquée et spontanée des modèles CCI (Noh et al. 2014; Ding et al. 2018; Young et al. 2014).

Les mécanismes d'actions à l'origine de l'effet antalgique du blocage de HCN ne sont que peu étudiés. L'utilisation d'un bloqueur de HCN dans les ganglions sensoriels du nerf vague conduit à une augmentation de la résistance d'accès et de la fréquence de décharge (Doan 2004). Ceci va dans le sens d'une étude canadienne qui montre dans le CPFm de rat neuropathique une diminution de la densité et de l'amplitude de  $I_h$  à un potentiel imposé de -70 mV, et une augmentation de l'excitabilité membranaire qui est potentialisée par l'application du ZD7288 (Cordeiro Matos, Zhang, et Séguéla 2015). Le potentiel de demi-activation ( $V_{1/2}$ ) étant décalé vers des potentiels plus hyperpolarisés dans le modèle neuropathique traumatique, l'hypothèse est qu'une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux HCN intervient dans l'hyperexcitabilité corticale.

L'utilisation d'outils génétiques permet d'étudier plus précisément l'implication des isoformes HCN1 et HCN2 dans la mise en place de la douleur neuropathique traumatique. L'équipe de McNaughton a été percussive dans ces études. La délétion du gène HCN1

(HCN1<sup>-/-</sup>) entraîne une hypersensibilité mécanique persistante chez la souris (Momin et al. 2008). La participation de l'isoforme HCN2 est explorée chez des souris grâce à une délétion du gène HCN2 uniquement dans les nocicepteurs exprimant le canal Nav1.8, par un système Cre-Lox. La chirurgie CCI n'a pas induit d'hypersensibilité thermique ni mécanique chez ces souris génétiquement modifiées (Emery et al. 2011; Schnorr et al. 2014). La contribution de l'isoforme HCN3 dans la pathologie n'est que très peu documentée. Une unique étude expérimentale a montré son rôle minimal dans la douleur neuropathique (modèle SNL) par l'utilisation d'une souris HCN3<sup>-/-</sup> qui ne présente qu'une faible réduction de l'hypersensibilité mécanique, par rapport à des souris sauvages (Lainez et al. 2019; Dewar 2019). A notre connaissance, aucune étude ne rapporte l'implication de l'isoforme HCN4 dans la douleur neuropathique.

### 1.1.2. Douleur neuropathique chimio-induite (tableau 8)

Une surexpression des canaux **HCN1 périphériques** dans un contexte de douleur neuropathique d'origine toxique a été mesurée dans les modèles de neuropathie induite par oxaliplatine (NPIO) (Descoeur et al. 2011) et paclitaxel (NPIP) (i.e. chimiothérapie utilisée dans le cancer du sein) (H. Zhang et Dougherty 2014). Dans un modèle NPIO chronique chez le rat, Resta et al. montre à l'inverse une sous-expression de la protéine HCN2 dans les DRG, et une quantité inchangée de HCN1 (Resta et al. 2018). Pour autant, ces auteurs ont constaté une surexpression de la protéine auxiliaire MiRP1 des canaux HCN et un gain de fonction de  $I_h$  dans les DRG exclusivement dans les petits et moyens neurones des DRG, en l'occurrence une augmentation de la densité du courant et un décalage dans la  $V_{1/2}$  suggérant une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux sous oxaliplatine. L'ivabradine et le MEL57A qui possède une meilleure sélectivité pour HCN1, reverse l'hyperexcitabilité des DRG lombaires du modèle NPIO, en même temps que la densité du courant  $I_h$  (Resta et al. 2018; Yongning et al. 2021). Dans les neurones du TG exprimant TRPM8, le traitement des souris au paclitaxel et l'oxaliplatine conduit *in vitro* à l'augmentation de l'amplitude de  $I_h$  mais pas de sa conductance (Caudle et Neubert 2022).

Dans la **CDME** de souris NPIO chronique, une surexpression de l'ARNm et des protéines HCN2 a été observée, et le traitement par ZD7288 a diminué significativement cette surexpression, en même temps que le ratio protéique pCaMKII/CaMKII et pCREB/CREB. De plus, un inhibiteur de la CaMKII reverse l'hypersensibilité au froid. Les auteurs émettent ainsi l'implication de cette cascade qui est dépendante de l'AMPc dans ces mécanismes induit par l'oxaliplatine (X. Liu et al. 2018). **Aucune donnée sur l'implication des canaux HCN dans les régions supra-spinales** dans la neuropathie chimioinduite n'a été retrouvée dans la littérature.

Finalement, le traitement par des bloqueurs HCN (ivabradine, ZD7288, MEL55A, MEL57A) permet de diminuer l'hypersensibilité mécanique et thermique au froid induite par les modèles NPIO aigue et chronique (Descoeur et al. 2011; Young et al. 2014; Dini et al. 2018; Resta et al. 2018; Yongning et al. 2021). L'exigence principale dans l'utilisation de ces bloqueurs est d'éviter ou de minimiser les effets indésirables cardiaques résultats de l'inhibition des HCN exprimés dans les tissus nodaux. Le rythme cardiaque des animaux NPIO chronique sous ivabradine (s.c. 5 mg/kg) a été comparé à celui sous MEL57A (s.c. 10 mg/kg). Pour un effet antalgique similaire, seule l'ivabradine est bradycardisant chez les animaux contrôles et NPIO (Resta et al. 2018). Particulièrement, la prise orale d'ivabradine a conduit, en même temps qu'une antalgie, à une diminution à hauteur de 15% de la fréquence cardiaque des animaux, mais pas à une altération de la pression sanguine (Noh et al. 2014).

### 1.1.3. Douleur inflammatoire

Outre l'exploration dans la neuropathie, les modèles de **douleur inflammatoire** représentent un terrain d'étude important pour comprendre l'implication des canaux HCN dans la genèse et le maintien de la douleur. Étudiée pour la première fois par une équipe hongroise en 2010 (Papp et al. 2010), l'injection de CFA (Complete Freund's Adjuvant, modèle de douleur inflammatoire) dans la patte arrière induit une augmentation significative de l'expression de la protéine HCN2 dans la lamina I-IIo de la moelle épinière, et celle-ci était corrélée à une augmentation et une co-localisation avec la substance P. Dans le même sens, une inflammation (modèle CFA et modèle formaline) n'a pas induit de sensibilité périphérique chez des animaux avec délétion génétique du gène HCN2 (Emery et al. 2011 ; Young et al. 2014). Enfin, l'ivabradine évite le comportement de grattage en réponse à une injection intraplantaire de formaline (Young et al. 2014). Dans ce même modèle, l'effet-dose de l'ivabradine a induit une nette bradycardie de manière dose-dépendante (IC50 :  $2.71 \pm 1.2$  mg/kg), dans le même ordre que son effet antalgique (IC50 :  $2.03 \pm 1.3$  mg/kg) (Young et al. 2014).

Ces effets indésirables sur la fréquence cardiaque, peu importe le modèle utilisé et peu importe le type de douleur évalué, démontrent une **fenêtre thérapeutique étroite** dans l'utilisation de bloqueurs HCN.

Modèle	Expression HCN	Fonction I <sub>h</sub>	Activité Membrane	Effet pharmaco <i>in vivo</i>	Effet pharmaco <i>in vitro</i>	Réf
CCI	Nerf sciatique ↑ HCN1 ↑ HCN2		↑ fPA	ZD - perfusion Effet antalgique sur mécanique mais pas thermique	ZD - NERF ↓ PA	Jiang et al, 2008
CCI	PAG ↑ HCN1	↑ Densité ↑ V <sub>1/2</sub>	↑ fPA		ZD - PAG ↓ PA	Du et al, 2013
CCI				Ivabradine - oral Effet antalgique	Ivabradine - DRG ↓ Amp ↓ sag ↓ PA	Noh et al, 2014
CCI				Ivabradine - i.p Effet antalgique		Young et al, 2014
CCI	Thalamus ↑ HCN1 ↑ HCN2			ZD - thalamus Effet antalgique		Ding et al, 2016
CCI	Nerf sciatique ↓ HCN1 ↓ HCN2					Liu et al, 2017
CCI nerf infraorbital	TG ↑ HCN1 ↑ HCN2			ZD - TG Effet antalgique zone oro-faciale		Ding et al, 2018
SNL	DRG ↓ HCN1 ↓ HCN2	↑ Densité ↑ V <sub>1/2</sub>	↑ fPA ↑ PA	ZD - i.p Effet antalgique ZD - i.t Pas d'effet	ZD - NERF ↓ PA	Chaplan et al, 2003
SNL				ZD - i.t Effet antalgique ZD - i.pl Effet antalgique		Luo et al, 2007
SNL		↓ Amp ↓ V <sub>1/2</sub>	↑ R ↑ fPA	ZD - CPFm Effet antalgique	ZD - CPFm ↑ PA	Matos et al, 2015
SNL	DRG ↑ HCN2			ZD - i.pl Effet antalgique sur mécanique mais pas thermique		Smith et al, 2015
SNL	Thalamus ↑ HCN2 Hippocampe ↑ HCN1 ↓ TRIP8b			ZD - ventricule latérale Effet antalgique + de type anti-dépresseur	ZD - hippocampe Pas d'effet	Yang et al, 2019

**Tableau 7. Tableau regroupant le phénotype et la fonction I<sub>h</sub> des modèles neuropathiques traumatiques**

fPA : fréquence potentiel d'action - PA : nombre potentiel d'action - Amp : amplitude du courant I<sub>h</sub> – R : résistance - V<sub>1/2</sub> : potentiel de 1/2 activation - ↑ augmentation ↓ diminution – PAG : substance grise périaqueducule - CPFm : cortex préfrontal médian – ZD : bloqueur ZD7288

Modèle	Expression HCN	Fonction I <sub>h</sub>	Activité Membrane	Effet pharmaco <i>in vivo</i>	Effet pharmaco <i>in vitro</i>	Réf
NPIO aiguë	DRG ↑ HCN1			Ivabradine – i.p Effet antalgique (mécanique et froid)		Descoeur et al, 2018
NPIO chronique	DRG ↓ HCN2 ↑ MIRP1	↑ Densité ↑ V <sub>1/2</sub>		Ivabradine - i.p Effet antalgique (mécanique) ZD7288 - i.p Effet antalgique (mécanique) MEL57A - i.p Effet antalgique (mécanique)	MEL57A - DRG ↓ V <sub>1/2</sub>	Resta et al, 2018
NPIO chronique				MEL55A - i.p Effet antalgique (froid) EC18 - i.p Pas d'effet		Dini et al, 2018
NPIO aiguë				Ivabradine - i.p Effet antalgique (mécanique et froid)	Ivabradine - i.p ↓ fPA ↓ Densité	Yongning et al, 2021
DRG naïf + oxaliplatine		↑ Densité	↑ fPA		Ivabradine - DRG ↓ fPA	Yongning et al, 2021
NPIP	DRG ↑ HCN1		↑ AS			Zhang et Dougherty, 2014
NPIO chronique	CDME ↑ HCN2					Liu et al, 2018
NPIO aiguë				Ivabradine – i.p. Effet antalgique		Young et al, 2014

**Tableau 8. Tableau regroupant le phénotype et la fonction I<sub>h</sub> des modèles neuropathiques chimio-induite**

fPA : fréquence potentiel d'action - PA : nombre potentiel d'action - Amp : amplitude du courant I<sub>h</sub> -  
R : résistance – V<sub>1/2</sub> : potentiel de 1/2 activation - ↑ augmentation ↓ diminution

## 1.2. HCN dans la douleur chez l'homme : utilisation de l'ivabradine

Des études cliniques ont été menées ces dernières années afin d'investiguer l'implication des canaux HCN dans la douleur chronique. Pour ce faire, l'ivabradine a été utilisée sur des douleurs induites chez des sujets sains volontaires (Lee et al, 2019 ; Tanaka 2022) et des sujets douloureux neuropathiques d'étiologies diverses (Healey et al. 2021)

La douleur non invasive des **sujets sains** a été induite par l'application topique de capsaïcine (activateur TRPV1), qui provoque une sensation de brûlure et une hyperalgie thermique et mécanique. Si une prise unique de 15 mg d'ivabradine après l'application de capsaïcine n'a pas eu d'effet analgésique (Lee et al. 2019), un traitement préventif de deux prises (30 mg en deux jours) a montré une diminution significative de l'aire sensible mécaniquement, par rapport au groupe placebo (Tanaka 2022).

Dans une autre étude, parmi une population de patients **avec neuropathie périphérique** (origine diabétique, traumatique, idiopathique, ou par chimiothérapie), le traitement par dose croissante d'ivabradine n'a pas eu d'effet antalgique sur les douleurs évaluées par l'échelle NRS. Seulement deux participants montrent une légère diminution du score NRS pendant le traitement ; tous les deux étant diagnostiqués neuropathique d'étiologie diabétique (Healey et al. 2021).

L'ensemble de ces études ont été réalisées en contrôlant systématiquement le rythme cardiaque des sujets. Une diminution du rythme cardiaque est observée de manière dose dépendante de l'ivabradine. Celle-ci concorde avec les données précliniques et confirme la limite de l'utilisation de ce bloqueur dans les manifestations cliniques de douleurs neuropathiques.

## 2. Stratégie pharmacologique innovante : cibler l'interaction HCN-TRIP8b

Les interactions protéines-protéines ont un rôle central dans la majorité des processus cellulaires par la régulation des fonctions protéiques individuelles. Elles représentent alors une cible intéressante pour les interventions thérapeutiques. Particulièrement, l'interaction TRIP8b-HCN est au centre de nombreuses recherches fondamentales et pharmacologiques, en raison de la contribution maintenant reconnue de HCN dans la genèse de divers troubles neurologiques et l'expression exclusivement neuronale de TRIP8b, qui pourrait être un atout dans l'utilisation clinique de composés perturbateurs de l'interaction protéine-protéine.

### 2.1. Intérêt de la cible HCN-TRIP8b dans les troubles neurologiques

La délétion génétique de TRIP8b produit une diminution du courant  $I_h$  dans le soma et les dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe, et une diminution de l'expression à

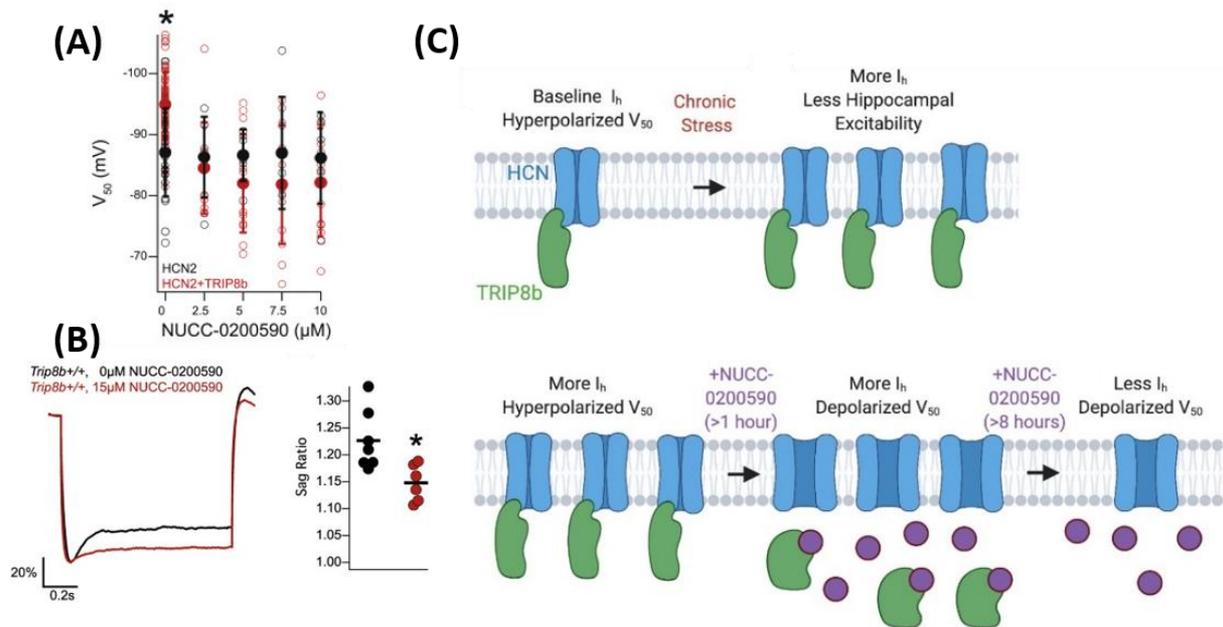
la membrane neuronale de HCN1, expliquée par une augmentation de la dégradation des canaux par les lysosomes. La caractérisation phénotypique des souris *knock out* pour TRIP8b n'a pas montré d'anomalies flagrantes du comportement, seulement une légère altération de l'apprentissage moteur, du comportement associé à la construction de nid ainsi qu'une augmentation de la réaction de sursaut en réponse à un son (Lewis et al. 2011). Toutefois, en accord avec la participation des canaux HCN dans le **trouble majeur dépressif (TMD)**, la délétion génétique de TRIP8b produit de manière importante un effet de type antidépressif mesurable par une diminution significative du temps passé immobile lors d'un test de nage forcée et lors d'un test de suspension de la queue, par rapport à des souris *littermate* TRIP8b<sup>+/+</sup>. Une augmentation de l'expression de TRIP8b dans l'hippocampe est d'ailleurs caractéristique des modèles d'animaux avec TMD (Lewis et al. 2011; Han et al. 2017; Lyman et al. 2021).

Cette observation a été à l'origine d'une stratégie innovante par le laboratoire de Dane Chetkovitch aux Etats-Unis dans le contexte du traitement des TMD : cibler l'interaction HCN-TRIP8b pour moduler l'adressage membranaire des canaux HCN et le courant  $I_h$  et ainsi éviter l'altération du rythme cardiaque régulé par le courant  $I_f$  (Han et al. 2015). Cette équipe a donc cherché à mettre au point un test de screening de molécules ayant la capacité de perturber l'interaction HCN-TRIP8b. Avant tout, ils ont caractérisé l'interaction *in vitro* entre le peptide SNL de HCN1 et la protéine recombinante TRIP8b entière ou tronquée (comprenant uniquement les domaines impliqués dans l'interaction) par polarisation de fluorescence<sup>3</sup>, l'affinité étant respectivement de 1,03 $\mu$ M ou 0,8 $\mu$ M. Ils ont alors réalisé un premier criblage de plus de 20 000 composés sur cette seconde interaction (SNL-TRIP8b tronquée). Ils ont confirmé par AlphaScreen<sup>4</sup> la découverte d'un composé inhibant l'interaction qu'ils ont appelé NUCC-5953, avec un IC<sub>50</sub> de 2.5 $\mu$ M. Dernièrement, la même équipe a réalisé une nouvelle étude de criblage *in silico* qui a permis d'obtenir un nouveau composé qui perturbe l'interaction avec un IC<sub>50</sub> de 7 $\mu$ M. Le NUCC-0200590 permet *in vitro* une diminution significative du potentiel de demi-activation ( $V_{1/2}$ , [figure 28.A](#)) de  $I_h$  en présence de TRIP8b dans les cellules HEK, ainsi que la dépolarisation membranaire induite par  $I_h$  dans un système natif (sag, [figure 28.B](#)) et *in vivo* une réduction de l'expression dendritique de HCN dans l'hippocampe de la souris (Ye Han et al. 2022) ([figure 28.C](#)).

---

<sup>3</sup> Technique suivant la polarisation de la lumière émise d'une protéine marquée et excitée en présence d'une seconde protéine

<sup>4</sup> Chimie étudiant les interactions par des transferts d'énergies entre deux protéines associées à des billes générant un signal chimio-luminescent



**Figure 28. Action du NUCC sur l'interaction HCN-TRIP8b**

Effet du NUCC-0200590 sur **(A)** le potentiel  $V_{1/2}$  dans les cellules transfectées HEK et **(B)** du sag dans les neurones pyramidaux. **(C)** Proposition d'action du NUCC dans les neurones et l'effet sur l'interaction HCN-TRIP8b. D'après Ye Han et al. 2022

En raison de leur rôle dans la régulation de l'excitabilité neuronale, l'implication des canaux HCN et TRIP8b dans l'épilepsie a également été étudiée. Il a été montré qu'une phosphorylation de TRIP8b sur le résidu sérine 237 contribue à une augmentation de l'affinité entre HCN et TRIP8b et qui, dans un modèle de rat épileptique (modèle Kainate), est altérée dans l'hippocampe, entraînant une hyperexcitabilité neuronale à l'origine des symptômes épileptiques (Foote et al. 2019). Par ailleurs, les souris  $\text{TRIP8b}^{-/-}$  pourraient être un modèle d'absence épileptique, puisqu'elles développent des crises d'absence corrélées avec une diminution de l'expression de HCN2 dans les neurones corticaux de projections thalamiques, et dans les neurones de relais thalamique (Heuermann et al. 2016). Ceci suggère l'intérêt de contrôler cette interaction dans le traitement des troubles épileptiques.

## 2.2. Notre stratégie dans la douleur neuropathique (figure 30)

### 2.2.1. Preuve de concept

L'implication de HCN et de TRIP8b dans les troubles neurologiques est émergent dans la littérature ; et compte-tenu des modifications d'expressions du canal HCN dans différents modèles de douleurs neuropathiques, nous émettons l'implication du complexe HCN-TRIP8b dans cette pathologie. Pour vérifier cette hypothèse, l'équipe Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur de Neurodol a collaboré avec l'équipe de Chetkovich dont les travaux ont été détaillés plus tôt (Han et al. 2015), afin d'obtenir le composé NUCC-5953 au sein du laboratoire. Lorsqu'injectée en intrathécale dans un modèle de souris NPIO aigue, le composé a démontré un effet bénéfique sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine chez la souris, de manière dose-dépendante (figure 29). Ces résultats préliminaires à ma thèse ont attesté l'efficacité d'une stratégie modulatrice de l'interaction HCN-TRIP8b dans le traitement des symptômes douloureux induit par l'oxaliplatine.

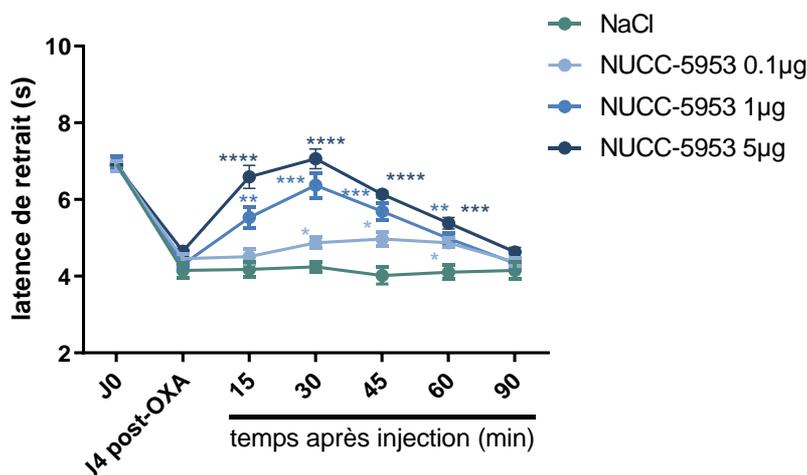


Figure 29. Effet dose dépendant d'un composé perturbateur de l'interaction HCN-TRIP8b (NUCC-5953 en injection i.t.) à J4 d'un modèle NPIO aigue (6mg/kg i.p.)

### 2.2.2. Les peptoides

C'est ainsi que le laboratoire s'est tourné vers l'équipe Chimie Organique Médicinale (COM) dirigée par le Pr **Claude Taillefumier** de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, spécialiste de la peptidomimétique, et en particulier des **peptoides**.

Les peptoides sont des peptides synthétisés oligomères de glycine N-substituée, dont le squelette est conservé, mais avec des chaînes latérales situées sur les atomes d'azote des liaisons amide et non pas sur les carbones : ce sont des mimes peptidiques. Ils offrent une meilleure résistance protéolytique, une meilleure perméabilité cellulaire et une diminution de l'immunogénicité, par rapport à des peptides. Outre les avantages biologiques, la facilité de la

synthèse en phase solide par approche « sous-monomère » est un atout pour l'utilisation thérapeutique (Pypec et al. 2022).

La collaboration avec les chimistes a été à l'origine de la synthèse d'une série de peptoides, aujourd'hui brevetés, analogues de la partie SNL du canal HCN qui interagit normalement avec la partie TPR de TRIP8b. Le peptotide, en se liant au domaine TPR, perturbera l'interaction HCN-TRIP8b et perturbera la localisation membranaire de HCN. En relation avec les données précliniques de la littérature, ce phénomène pourrait être à l'origine d'un effet antalgique. L'effet pharmacologique de ces peptoides a donc été évalué sur le modèle NPIO aigue et fait l'objet de la seconde partie des données expérimentales (- CHAPITRE 2 -).

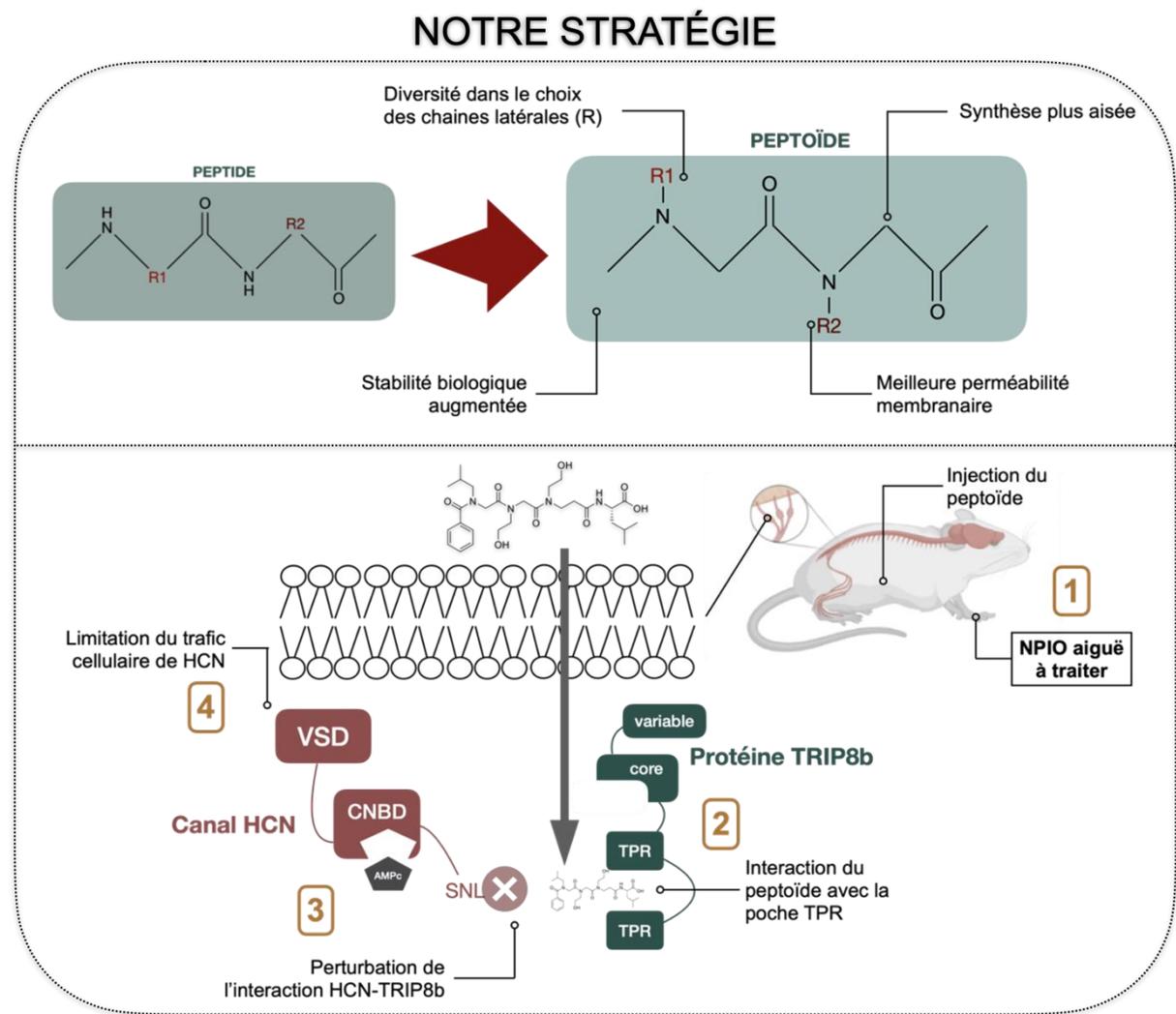


Figure 30. Schéma bilan de la stratégie employée à la base de l'étude pharmacologique de mon projet de thèse



# OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE



Les données préliminaires aux travaux de ma thèse présentées ici sont le fruit de plusieurs collaborations. **La première avec l'équipe du Dr Emmanuel Bourinet**, de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, a permis de mettre en avant les canaux HCN comme cible potentielle dans le développement des NPIO, puisqu'il a été observé une surexpression de l'isoforme HCN1 et un effet antalgique d'un bloqueur non sélectif de ces canaux, l'ivabradine, dans un modèle de NPIO aigue chez la souris (Descoeur et al. 2011). Toutefois, les canaux HCN sont également exprimés et ont un rôle fonctionnel important dans le tissu cardiaque. En tant que tel, cibler directement HCN est susceptible de provoquer une bradycardie. Des données non publiées, fournies par le Dr Bourinet, démontraient pour la première fois que TRIP8b, protéine partenaire des canaux HCN non exprimée dans le cœur et que l'on pensait exclusivement exprimée dans le SNC, était également exprimée dans les neurones périphériques. Nous nous sommes ainsi intéressés **aux travaux du Dr. Chetkovich** (Nashville, USA) qui portent sur l'interaction entre le canal HCN et TRIP8b, son rôle dans la régulation de l'activité et l'adressage membranaire du canal et l'implication de ces protéines dans la physiopathologie de la dépression. Cette collaboration a permis de mettre en avant la pertinence de la modulation pharmacologique de l'interaction HCN-TRIP8b, par la petite molécule NUCC-5953 dans le traitement de la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine chez la souris. Enfin, les synthèses chimiques des peptoïdes mimant la partie SNL de HCN réalisées par **nos collaborateurs de l'équipe COM du Pr. Taillefumier** et visant à perturber l'adresse membranaire des canaux HCN ont été systématiquement destinées à être testées *in vivo* au sein du laboratoire Neurodol.

(1) Dès lors, le premier objectif de ma thèse a été **d'évaluer le potentiel pharmacologique de ces peptoïdes**. Nous avons choisi de mesurer leur effet vis-à-vis de l'hypersensibilité au froid dans un modèle NPIO aigue. Nous avons également cherché à mettre en place un test de screening *in vitro* afin de vérifier que ces molécules interagissent bien avec la cible TRIP8b.

(2) Le deuxième objectif de ma thèse était de **mieux comprendre l'implication des isoformes HCN1 et HCN2 et la protéine TRIP8b** dans le développement de la neuropathie aigue induite par l'oxaliplatine.

(3) Le troisième objectif était de rechercher si ces protéines pouvaient être impliquées dans la **chronicisation de la neuropathie** induite par l'oxaliplatine et le développement des comorbidités associées. Compte tenu des résultats obtenus précédemment au laboratoire (Ferrier et al. 2015), nous avons focalisé notre travail sur le cortex insulaire, une région cérébrale impliquée dans le traitement sensoriel, notamment du froid, et émotionnel de la douleur



# **MATÉRIELS & MÉTHODES**



# - CHAPITRE 1 - Animaux et éthique

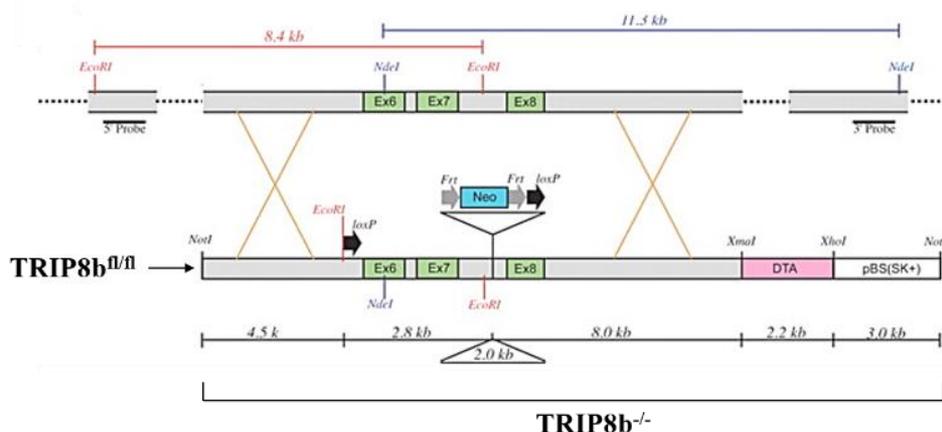
Des souris mâles et femelles de fond génétique C57Bl/6J âgées de deux mois ont été utilisées pour les expérimentations. Les animaux sont hébergés dans une animalerie EOPS de l'Université Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France), dans une salle de stabulation gardée à 21-22°C avec un cycle jour/nuit de 12h. Les souris sont nourries par un régime alimentaire standard et ont accès à l'eau *ad libitum*. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale d'Auvergne (APAFIS #22072) et suivent les recommandations du comité de recherche et d'éthique de l'association internationale pour l'étude sur la douleur.

## 1. Souris Wild Type (WT)

Les souris sauvages ou **WT** utilisées proviennent de la société Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France).

## 2. Souris TRIP8b<sup>-/-</sup> et TRIP8b<sup>fl/fl</sup>

Par soucis de clarté, le génotype des souris impliquant le gène *PEX5l* sera nommé TRIP8b tout au long des résultats. Les souris **TRIP8b<sup>-/-</sup>** et **TRIP8b<sup>fl/fl</sup>** issues d'un mélange C57Bl/6J et C57Bl/6N ont été gracieusement données par le laboratoire de D. Chetkovitch. Ces souris « *knock-out global* » sont générées par recombinaison homologe afin d'éliminer les exons 6 et 7 qui sont présents dans tous les isoformes du gène *PEX5l*, (*construction génétique en figure 31*). Les souris TRIP8b<sup>fl/fl</sup> ont été générées par insertion de sites LoxP autour des exons 6 et 7 du gène *PEX5l*.



**Figure 31. Construction génétique des souris TRIP8b<sup>-/-</sup> et TRIP8b<sup>fl/fl</sup>**

D'après Lewis et al. 2011

### 3. Souris SNS<sup>TRIP8b-/-</sup>

Les souris « *knock-out périphérique* » SNS<sup>TRIP8b-/-</sup> ont été obtenues par croisement entre les lignées TRIP8b<sup>fl/fl</sup> homozygotes et Nav1.8<sup>Cre</sup> hétérozygotes (Stirling et al. 2005), afin de déléter *PEX5* spécifiquement dans les neurones sensoriels périphériques Nav1.8 positifs.

### 4. Génotypage

Le génotype des souris est vérifié par électrophorèse (*figure 32*) des produits PCR obtenus de l'hybridation de l'ADN génomique extrait des poils des souris.

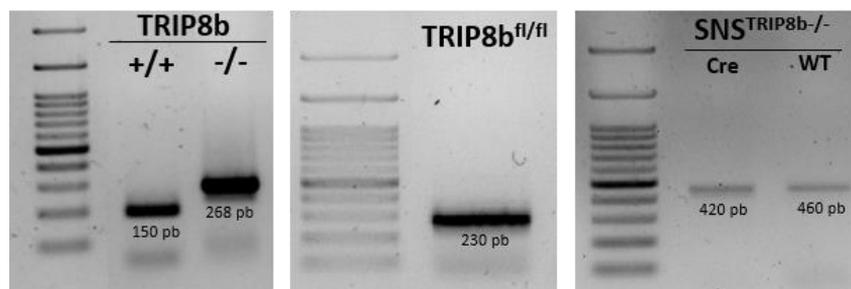


Figure 32. Électrophorèse de produits PCR de génotypage

Pour les tests comportementaux, les souris TRIP8b<sup>+/+</sup> ont été utilisées comme *littermate* des souris TRIP8b<sup>-/-</sup>, et les souris TRIP8b<sup>fl/fl</sup> comme *littermate* des SNS<sup>TRIP8b-/-</sup>.

## - CHAPITRE 2 - Modèles et traitements de souris

### 1. Neuropathie périphérique induite par oxaliplatine

#### 1.1. NPIO aigue

Les souris traitées ont reçu une injection i.p. d'oxaliplatine à 6 mg/kg (Leancare). L'oxaliplatine (OXA) est dissoute dans une solution glucosée à 5% (véhicule). Les animaux « contrôles » ont reçu un volume équivalent du véhicule (VEH).

#### 1.2. NPIO chronique

Le modèle chronique consiste en six injections à raison de deux injections par semaine pendant trois semaines (J0, J4, J7, J11, J14, J18). L'oxaliplatine (OXA chronique) est administrée en i.p. à la dose de 3 mg/kg. La dose cumulée injectée d'oxaliplatine étant de 18 mg/kg. Les souris VEH ont reçu un volume équivalent de véhicule.

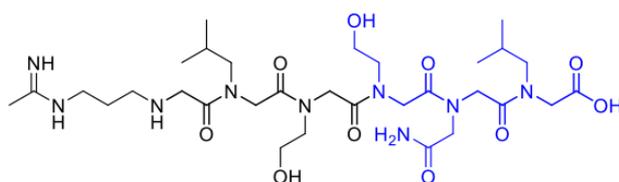
## 2. Traitements de la souris

### 2.1. Duloxétine

La duloxétine (Dochem, Hong Kong, Chine) a été administrée en s.c. dosée à 30mg/kg dans du NaCl 0.9%, chez des souris WT. La condition contrôle consiste en un volume équivalent de NaCl 0.9%.

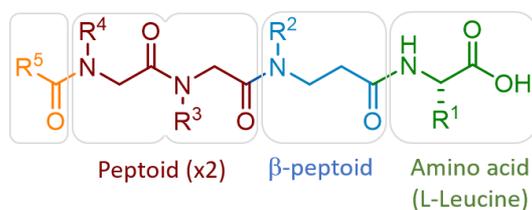
### 2.2. Peptoïdes

En collaboration sur le projet de thèse, des chimistes de synthèse de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) (thématique « Peptoid », équipe COM) ont synthétisé des mimes peptidiques de l'extrémité C-terminale du canal HCN, en particulier des mimes de l'hexapeptide SNL qui est capable physiologiquement d'interagir avec le domaine TPR de TRIP8b. C'est à partir d'une étude de modélisation moléculaire de la structure co-cristallisée (PDB : 4EQF) de la protéine TRIP8b en interaction avec SNL qu'un premier analogue peptoïde de SNL a été synthétisé (*figure 33*).



**Figure 33. Formule de l'analogue peptoïde de SNL**

Ensuite des modifications du squelette ont conduit à la structure générique présentée *figure 34* sur la base de laquelle des composés ont été synthétisés en apportant des modifications sur les chaînes latérales. Cette structure est constituée d'un résidu de L-leucine ( $R^1$  = isobutyl) à l'extrémité C-terminale (comme dans le peptide SNL), suivi d'une unité  $\beta$ -peptoïde ( $\beta$ -alanine N-substituée) et de deux unités  $\alpha$ -peptoïde (glycine N-substituée). L'extrémité N-terminale est acylée, dans la majorité des cas par un groupe benzoyle ( $R^5$  = Ph). Les peptoïdes ont été synthétisés sur support en utilisant une résine de type 2-chlorotriyl de façon à obtenir les oligomères sous forme d'acide carboxylique à l'extrémité C-terminale après clivage. L'unité  $\beta$  a été préparée en solution avec sa fonction amine protégée par un groupe Fmoc. Celle-ci a été couplée à la leucine initialement ancrée à la résine. Pour l'incorporation des deux unités suivantes ( $\alpha$ -peptoïdes) un protocole de synthèse dit « submonomer » a été



**Figure 34. Squelette du peptoïde**

mis en œuvre. Ce protocole se distingue de la synthèse des peptides dont l'allongement consiste à coupler un à un des acides aminés protégés à l'extrémité N-terminale de l'oligomère. Dans ce type de synthèse, chaque nouvelle unité est construite en deux étapes : une étape d'acylation de l'extrémité N-terminale par de l'acide bromoacétique, une seconde étape de substitution de l'atome de brome par une amine primaire dont le choix est dicté par la nature de la chaîne latérale que l'on souhaite incorporer. Ce cycle acylation-substitution est répété jusqu'à obtention de la longueur d'oligomère souhaitée. Les dernières étapes consistent à décrocher la molécule de la résine (clivage) et à déprotéger les chaînes latérales fonctionnelles de l'oligomère. L'identité des peptoides est ensuite contrôlée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et une purification est réalisée par chromatographie en phase inverse suivie d'une lyophilisation. La synthèse détaillée sur phase solide du peptoïde « tête de série » nommé YC55 est en annexe 1 de ce manuscrit.

Des peptoïdes conjugués à de la biotine et à un peptide de passage de la BHE (peptide C-THR) ont également été synthétisés pour être exploités comme molécules outils dans le projet. Leur particularité et utilisation seront détaillées dans la partie résultats. Une fois les composés en poudre réceptionnés au laboratoire, ils ont été dilués dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%). Afin de réaliser le screening *in vivo*, les peptoïdes sont injectés en intrathécale (5ng/5µL). L'injection du NaCl seul est considérée comme condition contrôle. Concernant les expérimentations sur notre peptoïde « tête de série », l'injection a été réalisée soit en intrathécale (5µL) selon trois quantités diluées dans le NaCl : 0.1ng, 1ng, 5ng, soit en sous-cutanée à trois doses diluées dans le NaCl 0.9% : 2.5mg/kg, 5mg/kg et 10mg/kg.

## - CHAPITRE 3 - Tests comportementaux

L'ensemble des études comportementales détaillées ci-après sont réalisées en conditions optimales pour l'animal. Une habitude dans la salle d'expérimentation est systématiquement réalisée une heure avant le test réalisé, où la lumière, la température et l'hydrométrie sont contrôlées. Le matériel utilisé est lavé à l'alcool après chaque animal et après chaque session. Les logiciels Ethovision XT (Noldus, Pays-Bas) et VideoTrack (ViewPoint, France) ont été utilisés pour le suivi des animaux filmés par une caméra dans les arènes afin de générer les mesures sous-jacentes à chaque comportement étudié.

## 1. Tests évaluant la sensibilité extra-céphalique

### 1.1. Test de von Frey

La sensibilité mécanique des souris est évaluée par le test de von Frey (Deuis, Dvorakova, et Vetter 2017). Ce test est inspiré d'une pratique clinique destinée à évaluer l'allodynie mécanique chez les patients atteints de douleurs neuropathiques. Chez l'animal, c'est le seuil du retrait de la patte qui est mesuré lors de stimulations successives par un filament de von Frey sur la surface plantaire des pattes arrière. Nous avons utilisé la méthode en fréquence (Kiguchi et al. 2008), qui consiste à mesurer le nombre de réponse sur cinq stimulations avec un filament de 0.6g. Pour le test, la souris est placée dans une boîte individuelle posée sur un plancher grillagé. Pour une bonne habitude à ce nouvel environnement, l'animal est déposé 1 heure la veille du test et 1 heure avant le début du test. Le filament est appliqué à travers le grillage sur chacune des pattes arrière. La réponse est caractérisée par un retrait vif de la patte. Les résultats sont exprimés en moyenne du score (i.e. nombre de retrait) de la patte droite et de la patte gauche.

### 1.2. Test de l'immersion de la patte

La sensibilité thermique au froid de type allodynie des souris est évaluée par l'immersion de la patte arrière gauche dans un bain d'eau thermostatée à 10°C (Deuis, Dvorakova, et Vetter 2017). Les souris ont été habituées préalablement aux différentes conditions du test, notamment au bruit du bac à immersion, aux passages sous un torchon qui permet de minimiser le stress de la souris et à l'immersion en tant que telle, dans une eau à température ambiante. Lors du test, la patte de la souris est dégagée et immergée dans l'eau froide en constante agitation afin de garantir une température homogène. Le temps nécessaire à la souris pour retirer sa patte de l'eau est relevé. Cette mesure est répétée deux fois, ou trois si l'écart entre les deux valeurs est supérieur à 1 seconde. Si la mesure relevée est de plus de 30 secondes, l'animal est exclu de l'étude. Les résultats représentent la moyenne des deux ou trois latences de retrait (exprimés en secondes).

## 2. Test évaluant la sensibilité céphalique : test à l'acétone

La sensibilité thermique oro-faciale de type allodynie est évaluée par une réaction au dépôt d'acétone sur le territoire cutané des vibrisses (Michot et al. 2014). Les souris sont préalablement habituées aux cages transparentes dans lesquelles elles seront placées lors du test. Un volume de 20µl d'acétone est déposé au niveau des vibrisses de la souris en contention, puis celle-ci est posée dans la cage afin d'observer pendant 1 minute le comportement de grattage/toiletage de la zone oro-faciale par les pattes avant. Ce test est réalisé sur le côté droit puis sur le côté gauche de la face, afin de représenter le temps moyen de grattage (en secondes).

### 3. Évaluation des fonctions motrices, cognitives et émotionnelles

#### 3.1. Beam Walk

La fonction vestibulo-motrice de la souris est évaluée avec le test du beam walk (i.e. marche sur poutre). Ce test consiste à faire déplacer l'animal sur une fine poutre jusqu'à un abris en carton, considéré comme un outil de motivation (Poupon et al. 2018). La poutre en bois suspendue dans le vide mesure 12mm de largeur lors de l'habituation et 5 mm de largeur pour le test. Les mesures relevées sont le nombre de décrochage de la patte lors de son passage sur la poutre sur 80 cm de longueur et le temps en secondes qu'elle a passé pour la traverser.

#### 3.2. Test de la gommette

Le test de la gommette analyse la motricité fine de la souris (Bouet et al. 2009). Un adhésif de 5x5mm est collé sur une des pattes avant (droite ou gauche, de manière aléatoire). Une fois la souris reposée dans une cage transparente, deux paramètres sont mesurés (1) le temps de détection de l'adhésif « temps de contact » qui manifeste la sensibilité et (2) le temps que met la souris pour retirer l'adhésif une fois détecté, c'est le « temps de retrait » qui évalue la dextérité.

#### 3.3. Rotarod

Le rotarod évalue l'équilibre et la coordination motrice des animaux déposés sur un cylindre qui tourne à une vitesse donnée (Hamm et al. 1994). L'habituation le jour du test consiste à poser l'animal sur le rotarod sans vitesse, puis à activer le système pour atteindre une vitesse de 4rpm pendant 1 minute et finalement le test est réalisé avec des accélérations de rotation de façon graduelle (4 à 40rpm) sur 5 minutes. L'expérimentateur comptabilise le temps qu'à mis la souris à chuter de son cylindre. Plus le temps est faible, plus l'animal présente des déficits moteurs.

#### 3.4. Test de l'open field (OF)

Le test de l'arène est utilisé ici pour évaluer la locomotion et le comportement de type anxieux (Seibenhener et Wooten 2015). La souris est placée au centre de l'arène (50x50cm) et pendant quinze minutes la caméra vidéo reliée au logiciel VideoTrack suit le trajet des souris. La distance totale parcourue pendant la session représente la locomotion. La séparation en zone centrale et zone périphérique de l'arène permet d'apprécier l'état d'anxiété de la souris grâce à la distance (en centimètres) et/ou au temps parcouru (en secondes) dans la zone centrale qui représente un lieu anxiogène pour le rongeur.

### 3.5. Labyrinthe en croix surélevée (EPM)

Le comportement de type anxieux est également évalué par un test utilisant un labyrinthe en forme de croix à 4 bras dont 2 sont dits « fermés » avec des parois latérales de 17 cm de hauteur, et 2 sont dits « ouverts » sans paroi, correspondant à une zone anxieuse pour l'animal (Walf et Frye 2007). La souris est placée au centre de l'arène et son parcours dans les bras est filmé pendant 5 minutes. Le temps passé en secondes et la fréquence d'entrée dans les bras ouverts et fermés sont analysés par le logiciel Ethovision.

### 3.6. Test de reconnaissance d'objet (NOR)

La mémoire de reconnaissance visuelle à court terme est évaluée par le test de reconnaissance d'un nouvel objet, basé sur le paradigme selon lequel la souris a tendance à explorer un nouvel objet plutôt qu'un objet familier (Antunes and Biala, 2012). Le test est réparti en trois étapes (1) une habituation de cinq minutes dans une arène (50x50cm) vide, effectuée la veille de l'évaluation (2) la souris est ensuite mise en présence de deux objets identiques (2 Lego® en plastique ou 2 gobelets en plastique) pendant 10 minutes dans l'arène, c'est la « phase d'acquisition » et une heure après, c'est l'étape (3) dite de restitution, d'une durée de 5 minutes au cours desquelles la souris est replacé dans l'arène où un objet sur les deux précédents a été changé par un nouvel objet (un Lego® a été remplacé par un gobelet, et inversement). La souris est filmée lors des étapes 2 et 3. Pour l'analyse des résultats, nous avons considéré que l'animal explore les objets « ancien » et « nouveau » à condition que son museau soit à au moins 2cm de celui-ci, et qu'il ne monte pas dessus. Les souris sont exclues de l'analyse si lors de la phase 2, les objets ont été explorés moins de 15 secondes. La performance des souris est mesurée pendant la phase de restitution, selon un index considérant le temps que passe les souris à explorer le nouvel objet et l'ancien :

$$\text{index NOR} = \frac{\text{temps sur le nouvel objet} - \text{temps sur l'ancien objet}}{\text{temps sur le nouvel objet} + \text{temps sur l'ancien objet}} \times 100$$

### 3.7. L'alternance spontanée (AS)

La mémoire de travail spatiale est évaluée à l'aide d'un labyrinthe en plastique en forme de Y dont les trois bras mesurent 30cm et les angles entre les bras sont égaux (Kraeuter, Guest, et Sarnyai 2019). Aucun repère spatial n'est affiché et les trois bras sont notés A, B, C pour l'expérimentateur. La souris est placée au centre du labyrinthe et les visites des bras sont filmées pendant 8 minutes par caméra. La succession des bras visités est notée afin de calculer un score d'alternance :

$$\text{score d'alternance} = \frac{\text{nombre d'alternance}}{\text{nombre total de visite} - 2} \times 100$$

### **3.8. Test de suspension de la queue (SQ)**

Le test de suspension de la queue chez la souris permet d'étudier un comportement de type dépressif (Steru et al. 1985). Les souris sont suspendues à 50cm du sol à l'aide d'un adhésif collé sur la queue. Le temps total d'immobilité de la souris est mesuré sur une période de 6 minutes, après la première phase d'immobilité de plus de 3 secondes.

### **3.9. Test de Porsolt (NF)**

Dans le test de la nage forcée, l'immobilité de la souris dans l'eau représente un comportement de type dépressif (Porsolt et al. 1977). Pour cette évaluation, la souris est placée dans un cylindre (type bécher de 5L) rempli d'eau thermostatée à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  et le temps total d'immobilité est mesuré sur 6 minutes de test.

## **- CHAPITRE 4 - Préparation des tissus et cellules**

### **1. Prélèvement de tissus fixés**

Les souris sont anesthésiées avec une injection i.p. d'un cocktail de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (10mg/kg). Les souris reçoivent une perfusion intracardiaque de PBS 1X autoclavé puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4% afin d'obtenir une bonne fixation des tissus. Les organes d'intérêts sont prélevés, post-fixés dans le PFA 4% pendant 8h pour les DRG et TG, et 24h pour les cerveaux entiers et cryo-protégés pendant 48h dans du sucrose 30% avant d'être congelés à l'azote liquide dans le gel OCT (TFM™ Tissue Freezing Medium), puis conservés à  $-80^\circ\text{C}$ . Les tissus sont coupés au cryostat (Leica, CM1950 UV) à  $12\mu\text{m}$  d'épaisseur et conservés sur lames Superfrost Plus à  $-20^\circ\text{C}$  avant d'être traités pour l'immunohistochimie ou le RNAscope.

### **2. Prélèvement de tissus frais**

Pour les techniques d'électrophysiologie et de biochimie, les tissus des souris sont prélevés immédiatement après la mise à mort. Celle-ci se fait par injection intrapéritonéale d'une dose létale de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (10mg/kg). Les DRG lombaires L4-L5-L6 droites et gauches, les TG droite et gauche et les cortex insulaire une fois prélevés sont conservés à  $-80^\circ\text{C}$  en attendant les études protéiques et géniques, ou directement utilisés pour réaliser les cultures cellulaires ou les marquages immunocytochimiques.

### 3. Culture primaire DRG et TG

Les DRG (L4-L6) et TG ont été rapidement disséqués et placés dans un milieu HBSS froid sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (Corning) complété par 10 mM de glucose et 5 mM d'HEPES, pH 7,5 avec NaOH). Après avoir retiré les prolongements, les tissus ont été dissociés par voie enzymatique à 37°C deux fois pendant 20 minutes dans la solution HBSS supplémentée en calcium ( $\text{CaCl}_2$  5 mM) et contenant de la collagénase de type III (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France) et de la dispase (Gibco). Les tissus ont ensuite été triturés mécaniquement et lavés dans un milieu complet neurobasal A (NBA) (Gibco Invitrogen complété par 2% de B27, 2 mM de L-glutamine et 1% d'antibiotiques : pénicilline + streptomycine, Lonza BioWhittaker), avant d'être placés dans des boîtes de Pétri de 35 mm ou sur lamelle 13mm préalablement traitées à la poly-L-lysine et à la laminine. Les neurones ont ensuite été maintenus en culture à 37°C pendant 1 semaine avec la moitié du milieu de culture renouvelé tous les 2 jours (NBA complet supplémenté avec 50ng/mL facteur de croissance nerveuse (NGF) et ont été utilisés pour des expériences de patch clamp ou d'immunocytochimie 24h après l'ensemencement.

### 4. Cellules HT29

Des cellules d'adénocarcinomes colorectal humain HT29 (ATCC® HTB38™), stockées dans l'azote liquide sont décongelées et remises en culture dans du milieu DMEM 1X (Gibco) supplémenté avec 1% de vitamines, 1% de glutamine, 1% d'antibiotiques, 1% de NEEA 100X, 1% de Sodium pyruvate 100mM et 10% de SVF (Sigma). Les cellules sont passées tous les 3 jours en éliminant le milieu de culture et en décollant les cellules par la trypsine (1X) après les avoir lavées avec du PBS 1X. La trypsine est ensuite éliminée par centrifugation puis les cellules sont remises en suspension et ensemencées dans des nouvelles flasques T75 contenant 20mL de milieu de culture.

## - CHAPITRE 5 - Études biochimiques

### 1. RT-qPCR

L'extraction de l'ARN totale sur les 6 DRG lombaires, les deux TG et le cortex insulaire droite et gauche a été réalisée sur colonne de silice avec le kit RNAeasy Micro Kit (QIAGEN®, GmBH) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont lysés, homogénéisés ( $\beta$ -mercaptoéthanol) et traités avec de la DNase I. L'ARN est éluée dans de l' $\text{H}_2\text{O}$  RNase free, dosée au Nanodrop (BioTek Instruments®), et rétro-transcrits par le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher). Les réactions de qPCR sont réalisées sur plaques 96 puits avec dans chacun une quantité d'ADNc de 5ng dans 5 $\mu\text{L}$

(1ng/μl) puis 5μL de mix contenant les primers reverse et forward à 5μM (tableau 10) et le SYBR green (Roche®). Chaque réaction est réalisée en triplicat. La lecture est faite par le CFX96™ Real-Time System (BioRad®), afin d'obtenir les valeurs des cycles PCR appelées Ct. Les résultats sont normalisés par l'expression du gène de référence 18S, pour obtenir une quantification relative égale à  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  du gène d'intérêt.

Gène	Primer Forward	Primer Reverse	Taille (pb)
mmHCN1	GCTGACAGATGGCTCTTACT	GAAATTGTCCACCGAAAGGG	115
mmHCN2	ATCGCATAGGCAAGAAGAACTC	CAATCTCCTGGATGATGGCATT	102
mmHCN3	CGTCCTCTCTCCCATCTCC	CCAGTCAGAGGGTCGATGTT	105
mmHCN4	CGCTACCAAGGCAAGATGTTTG	AAGTTGATGATCTCCTCTCGAAGTG	80
mmPEX5I	GCTGAGGAGTATCTGGAGCAGT	CCTGGACACAAAGTCACTGG	139

**Tableau 9. Primers utilisés pour les RT-qPCR (Eurofins)**

## 2. RNAscope® Fluorescent Multiplex

### 2.1. Hybridation *in situ* ARNm

Les hybridations *in situ* en utilisant la technologie RNAscope ont été réalisées conformément au protocole proposé par le fournisseur du kit RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (#323100, ACD™ Bio-technie). En premier lieu, les lames des DRG, TG ou cerveau coupés au cryostat sont incubées dans du PFA 4% pendant 1 heure à 4°C. Les tissus sont déshydratés par trois bains d'éthanol de concentration croissante 50%, 70% et 100% pendant 5 minutes chacun, séchés à 60°C pendant 30 min et traités au peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  pendant 10 min. L'étape de démasquage est réalisée à 98°C -99°C pendant 15 min dans une solution de démasquage 'Target Retrieval Reagent'. Après avoir été lavées puis séchées, les coupes sont entourées d'une barrière hydrophobe et maintenues à température ambiante pendant une nuit. Le deuxième jour, les tissus sont traités à la protéase fournie dans le kit pendant 15 minutes dans le four d'hybridation RNAscope® à 40°C. Après lavage, les coupes sont incubées avec les sondes d'intérêts (tableau 10) préalablement pendant 2 heures à 40°C. Après lavage, les lames sont incubées dans du SSC 5X une nuit à température ambiante. Le troisième jour, les canaux des sondes utilisées sont séquentiellement amplifiés avec Amp1, Amp2 et Amp3. Après l'étape d'amplification, les lames sont traitées séquentiellement avec HRP, TSA-Fluorophore, HRP-bloker pour chacun des 3 trois canaux. Ces traitements sont espacés de 2 lavages Enfin, une coloration DAPI est réalisée avant de monter les lames avec le milieu ProLong Gold Antifade (Thermofisher).

Gène mm	HCN1	HCN2	HCN4	TRIP8b	TRPA1	TRPM8	Scn10A
Canal	C1	C1	C1	C2	C3	C3	C3
Ref #	423651	427001	421279	551531	400211	420451	426011
Dye	Cy3 570	Cy3 570	Cy3 570	FITC 520	Cy5 650	Cy5 650	Cy5 650

**Tableau 10. Sondes (souris) utilisées pour le RNAscope®**

## 2.2. Photos et quantification

Les photos des coupes ont été réalisées avec le microscope Nikon Eclipse Ni-E à l'objectif 10X ou 20X. La quantification qui permet de déterminer un nombre de cellules positives pour un marqueur d'intérêt a été réalisée manuellement à l'aide du logiciel NIS-Elements (Nikon). Nous avons considéré qu'une cellule est positive pour le marqueur d'intérêt à condition qu'elle présente au minimum 3 dots, comme décrit précédemment par (Oyler et al. 2019). Afin de garantir une reproductibilité et une rigueur dans la quantification, les paramètres d'acquisition ont été identiques pour chacune des photos et 2 à 4 photos ont été utilisées pour la quantification, par condition et par souris. Le nombre total de neurones sur la coupe de DRG ou TG a été déterminé après une surexposition du vert (filtre FITC) pour mettre en évidence l'auto-fluorescence et faciliter le comptage (Shiers, Klein, et Price 2020). Au total 14165 cellules ont été comptées dans le TG, et 10009 cellules ont été comptées dans le DRG.

## 3. Anticorps

L'ensemble des anticorps utilisés pour les Western Blot et les immunofluorescences ont été répertoriés dans le [tableau 11](#).

Protéine	Hôte	Fournisseur Référence #	Classe	Dilution IF
HCN1	Lapin	Alomone APC056	Polyclonale	1/250
HCN2	Lapin	Alomone APC030	Polyconale	1/250
HCN4	Lapin	Alomone APC052	Polyclonale	1/500
TRIP8b clone N212/7	Souris	Neuromab AB_10675329	Monoclonale	1/250
TRPA1	Lapin	Alomone ACC-037	Polyclonale	1/200
TRPM8	Chèvre	ABIN572229	Polyclonale	1/500

**Tableau 11. Anticorps utilisés pour les études biochimiques et les dilutions associées**

## 4. Immunofluorescence

### 4.1. Immunocytochimie

Dans un premier temps, les cellules de DRG et/ou TG ont été fixées pendant 15 minutes avec du PFA 4%. Les cellules sont ensuite lavées trois fois au PBS 1X, puis

perméabilisées avec du PBS Triton 0.2% pendant 10 minutes. Après 3 lavages de 5 min., la saturation des sites aspécifiques a été réalisée dans du PBS BSA 2% pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2h à température ambiante avec les anticorps primaires (*tableau 11*) dilués dans la solution de saturation (500µL par lamelles). Après 3 lavages au PBS de 5 minutes, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires (Alexa Fluor, 488 et 546 nm) pendant 45 minutes, à l'abri de la lumière. Enfin, un marquage du noyau est réalisé en incubant les cellules avec du DAPI (1/400, PBS) pendant 4 minutes. Les lamelles sont retournées puis montées sur lames avec du milieu de montage Dako. Après séchage à température ambiante, les lames sont gardées à 4°C. Les acquisitions sont réalisées sur microscope confocale (Zeiss LSM 800 du plateau technique CLIC de Clermont-Ferrand), par le logiciel ZEN.

### 4.2. Immunohistochimie

Les coupes de cerveau sont décongelées et chauffées à 80°C dans un tampon à base de citrate pour le démasquage des antigènes (tampon citrate 10mM, pH6) pendant 10 minutes. Les coupes sont entourées d'une barrière hydrophobe (DakoPen) puis rincées au PBS à température ambiante. La saturation des sites aspécifiques et la perméabilisation ont été réalisées dans une solution PBS 1X/Triton 0.2%/sérum 5% (PBST/S) durant 1h. Les anticorps primaires (*tableau 11*) dilués dans la solution de PBST/S ont été incubés dans une chambre humide durant une nuit à 4°C. Le jour suivant, les coupes ont été lavées 3 fois 5 minutes au PBS. Les anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome (Alexa Fluor, 488 et 546 nm) sont dilués dans la solution PBST/S au 1/1000<sup>ème</sup> et incubés durant 2 heures à température ambiante. Les coupes sont à nouveau lavées 3 fois pendant 5 minutes au PBS. Le montage par le milieu Dako Fluorescence Mounting Medium™ est réalisé entre lame et lamelle puis les clichés sont réalisés au microscope à fluorescence Nikon Eclipse Ni-E à l'aide du logiciel NIS-Element. Systématiquement, un contrôle négatif sur une lame est réalisé en omettant l'anticorps primaire dans la solution d'incubation PBST/S.

### 5. Test de viabilité cellulaire par MTT

Les cellules HT29 sontensemencées dans des plaques 96 puits (75000 cellules/puits) et incubées à 37°C pendant 24h. Le traitement par YC55 (100µM, 10µM, 1µM, 0.1µM et 0.01µM) seul ou avec 10µM d'oxaliplatine (Leancare) est ajouté dans le milieu de culture des cellules pendant 48h. Après élimination, le test de viabilité cellulaire est réalisé par le Thiazole Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Invitrogen®) à 1.2mM dans le milieu de culture à 37°C pendant 2h. Les cristaux formés par le MTT sont dissous par agitation dans du DMSO (Sigma Aldrich®) avant de procéder à la lecture de l'absorbance à 562nm (Epoch, BioTek Instruments).

## - CHAPITRE 6 - Électrophysiologie

L'ensemble des produits chimiques contenus dans les solutions de patch clamp (extracellulaire, intracellulaire) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 1. Patch clamp sur culture primaire de DRG et TG

Le patch clamp en configuration cellule entière a été utilisée pour enregistrer soit des courants membranaires (voltage clamp), soit des potentiels membranaires (current clamp). Les pipettes de patch ont été fabriquées en chauffant et en tirant des tubes en verre borosilicate avec une étireuse verticale PC-100 (Narishige), de manière à ce que les résistances de la pipette soient comprises entre 4 et 6M $\Omega$ . Les pipettes ont été remplies d'une solution intracellulaire contenant en mM : 120 K-Gluconate, 15 KCl, 2,5 ATP-Na<sub>2</sub>, 2,1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (pH 7,3 avec KOH). Les neurones ont été enregistré dans une solution extracellulaire composée de (en mM) : 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES et 10 glucose (pH7,4 NaOH). Les signaux électrophysiologiques générés par les neurones enregistrés ont été amplifiés et filtrés à 2kHz à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices), numérisés avec un convertisseur 1440A (Molecular Devices), échantillonnés à 20 kHz et stockés sur un ordinateur à l'aide du logiciel pCLAMP10 (Clampex, V10.7, Molecular Devices). Les analyses de ces signaux électrophysiologiques ont ensuite été réalisées hors ligne à l'aide du logiciel Clampfit (V10.7, Molecular Devices). Le YC55 (ICCF) et l'inhibiteur des canaux HCN, le ZD7288 (Tocris, Bio-Techne brand, Noyal Châtillon sur Seiche, France) ont été repris dans la solution extracellulaire à pH7,4 et sont appliqués sur les neurones à 100 $\mu$ M en bolus durant 10 minutes, et 30 $\mu$ M durant 3 minutes respectivement.

### 2. Patch clamp sur tranches de cerveaux (dans la discussion)

#### 2.1. Préparation des tranches

Le protocole détaillé ci-après est inspiré de celui publié par l'équipe de Ting, qui se base sur une méthode de protection et rétablissement des tissus par le N-Methyl-D-Glucamine ou NMDG, dont les solutions utilisées sont répertoriées dans l'annexe 2 (Ting et al. 2018). Une fois le cerveau sorti de la boîte crânienne, il est immédiatement placé dans la solution d'aCSF-NMDG/HEPES (pH 7.4 et 300mOsm) très froide et coupé en tranches coronales de 250 $\mu$ m d'épaisseur, à l'aide d'un vibratome VT1000 S (Leica Biosystem). Les tranches obtenues sont laissées 1 heure dans une chambre contenant de l'aCSF-HEPES (pH 7.4 et 300mOsm) chauffée au bain-marie à 32°C et équilibrée avec du carbogène 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Enfin, les

tranches sont immergées dans l'aCSF-standard (contenant en mM : 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 2 CaCl<sub>2</sub> et 1.2 MgCl<sub>2</sub>) à température ambiante dans un Brain Slice Keeper (4-Quad, Automate Scientific) avec perfusion continue de carbogène, jusqu'à leur utilisation pour le patch.

### 2.2. Protocoles de patch clamp

Les tranches ont été observées sous microscope à l'aide d'un objectif 40X, d'un filtre infra-rouge à contraste différentielle (DIC) et d'une caméra Hamamatsu C8484 monté sur microscope Olympus AxioScope A. La préparation a été perfusée en continu (~2 ml/min) avec la solution aCSF-HEPES oxygénée. Les pipettes d'enregistrement (résistance 6-8 MΩ) ont été extraites de capillaires en verre par l'intermédiaire d'une étireuse verticale PC-100 (Narishige) et remplies avec une solution intracellulaire contenant (en mM) : 138 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 3 ATP-Na<sub>2</sub>, 0.5 GTP-Na<sub>3</sub>, 0.5 EGTA-Na (potentiel de jonction de ~3,9 mV). La solution contenait 10μM d'Alexa Fluor (488 ou 594) hydrazide (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) et le pH a été ajusté à 7,2 avec du KOH.

Les potentiels ont été corrigés après enregistrement pour le potentiel de jonction. Pour simplifier, les potentiels indiqués dans le texte est arrondi à des valeurs entières. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante (20–25°C). Les données ont été acquises à l'aide d'un amplificateur Multiclamp 700B, d'une Interface Digidata 1440 et le logiciel pCLAMP10 (Clampex V10.7) de Molecular Devices France (Scope Pro, Ballancourt-sur-Essonne, France). Les données ont été filtrées avant numérisation à une fréquence de 1/2 ou 1/5<sup>ème</sup> de la fréquence d'acquisition (10kHz). Pour bloquer le courant I<sub>h</sub>, des antagonistes (2mM CsCl, 100μM ZD7288) (Tocris, Bio-Techne brand, Noyal Châtillon sur Seiche, France) ont été appliqués directement dans le bain.

## - CHAPITRE 7 - Pharmacodynamie et affinité de liaison

### 1. Purification des protéines recombinantes

Pour produire les protéines recombinantes His-TRIP8b<sub>241-602</sub> et GST-HCN<sub>c40</sub>, les bactéries (*E. coli*) BL21(DE3) compétentes (BioLabs) ont été transformées par choc thermique pour intégrer les vecteurs d'expression fournis par le D. Chetkovich (*annexe 3*). L'induction de l'expression a été réalisée par l'IPTG 1mM, et les cultures ont été incubées la nuit à 18°C sous agitation. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation, lysées par sonication pendant 10 cycles de 30 secondes à l'amplitude maximale de l'appareil avec des temps de pause de 30 secondes après chaque sonication. Après centrifugation à 12000rpm pendant 15 min, les surnageants ont été récupérés pour la purification sur colonnes His-Trap HP (Cytiva) pour His-

TRIP8b<sub>241-602</sub> et GST-GraviTrap (GE Healthcare) pour GST-HCN<sub>C40</sub>, équilibrées respectivement avec 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10% glycérol et 5mM imidazole et PBS 1X. Après les étapes de lavages avec les mêmes solutions que citées précédemment, TRIP8b<sub>241-602</sub> et HCN<sub>C40</sub> ont été éluées avec une solution, contenant 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10% glycérol et 200mM imidazole et 50mM TrisHCl, 10mM Glutathion, respectivement. Enfin, les protéines ont été dialysées dans des cassettes de dialyse 'Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette' (Thermoscientific) avec des cut-off de 10KDa TRIP8b<sub>241-602</sub> et un cut-off de 2KDa pour GST-HCN<sub>C40</sub> dans du PBS 1X. La concentration des protéines a été déterminée par le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermoscientific), en utilisant la BSA comme standard. La pureté de la protéine a été vérifiée par SDS-PAGE.

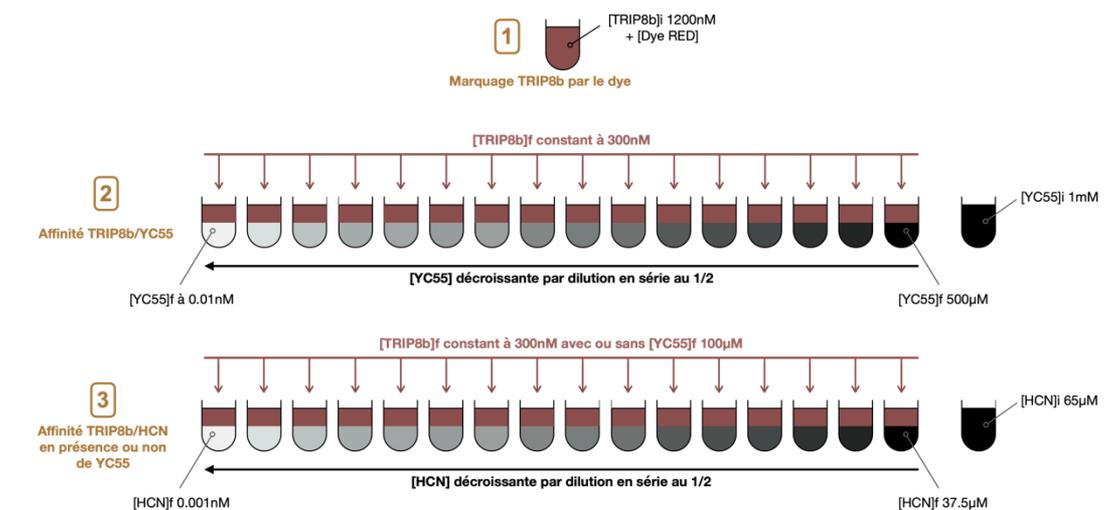
## 2. Thermophorèse à micro-échelle et spectral shift (Monolith)

La technique de thermophorèse à micro-échelle (Monolith, Nanotemper, Allemagne) mesure le mouvement thermophorétique des molécules grâce à des gradients de températures microscopiques optiques, permettant l'analyse des interactions biomoléculaires. Cette technique est couplée à une technologie complémentaire, appelée Spectral Shift, dont les événements de liaison entre une protéine et son ligand sont détectés par des décalages (shift) de spectres à des longueurs d'ondes de détection de 650nm et 670nm dans un environnement isothermique. Le principe général consiste à mettre en solution des concentrations croissantes de la protéine ligand (dans notre cas HCN<sub>C40</sub> ou YC55) avec une concentration fixe de la cible marquée, qui est dans notre étude TRIP8b<sub>241-602</sub>. Les différentes étapes de la préparation sont présentées en *figure 35*.

① Le marquage de TRIP8b a été réalisé selon les recommandations du fabricant avec le kit His-Tag RED-Tris-NTA (Nanotemper, Allemagne). La protéine TRIP8b<sub>241-602</sub> (1200nM) a été mis en solution avec le dye RED-tris NTA dans le tampon du kit PBS/Tween20 0.05%. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, une centrifugation de 10 minutes à 15000rpm permet d'enlever le dye non fixé sur les histidines. Le surnageant (600nM) contenant ainsi TRIP8b-marqué [concentration finale de 300nM] est ajouté à 16 tubes contenant :

② une concentration croissante de YC55 [concentration maximale de 500µM]

③ une concentration croissante de HCN<sub>C40</sub> seule [concentration maxime de 37.5µM] ou en présence du peptoïde YC55 (100µM)



**Figure 35. Les étapes de préparation des solutions pour le Monolith®**

Après 3 heures d'incubation de ces protéines recombinantes à température ambiante dans des tubes Eppendorf, la lecture du spectral shift correspondant au ratio 650/670nm et la variation de fluorescence émise par la thermophorèse à micro-échelle est réalisée par le Monolith NT.115 en utilisant les capillaires MST. Chaque mesure a été réalisée en triplicat, et analysée avec le logiciel MO Affinity Analysis (Nanotemper) en utilisant le modèle d'affinité K<sub>d</sub>, afin de représenter la liaison des protéines recombinantes grâce au ratio 650/670nm, en fonction du log de la concentration de HCN<sub>C40</sub> ou YC55. Afin de normaliser les résultats, nous avons également exprimé en fonction de la fraction liée, selon la formule f(c):

$$f(c) = \frac{c + c_T + K_d - \sqrt{(c + c_T + K_d)^2 + 4 c c_T}}{2 c_T}$$

où « c » est la concentration du ligand, « c<sub>T</sub> » est la concentration de la cible marquée, et K<sub>d</sub> est la constante de dissociation.

## - CHAPITRE 8 - Analyses statistiques

L'ensemble des graphiques et des statistiques ont été générés par le logiciel GraphPad Prism (version 9.0.2). Les données entre deux groupes ont été considérées comme statistiquement différentes par le t test non appariés pour des données paramétriques ou par le test Mann-Whitney pour des données non paramétriques. Afin de comparer plus de deux groupes, le test one-way Anova a été exécuté. Dans le cas où plusieurs facteurs de comparaisons sont impliqués, un test post-hoc (précisé pour chaque comparaison) est utilisé en complément d'un test two-way Anova. Les valeurs sont affichées en moyenne ± SEM.

# **DONNÉES EXPÉRIMENTALES**



## - CHAPITRE 1 - Contribution du complexe HCN-TRIP8b dans la NPIO aigue

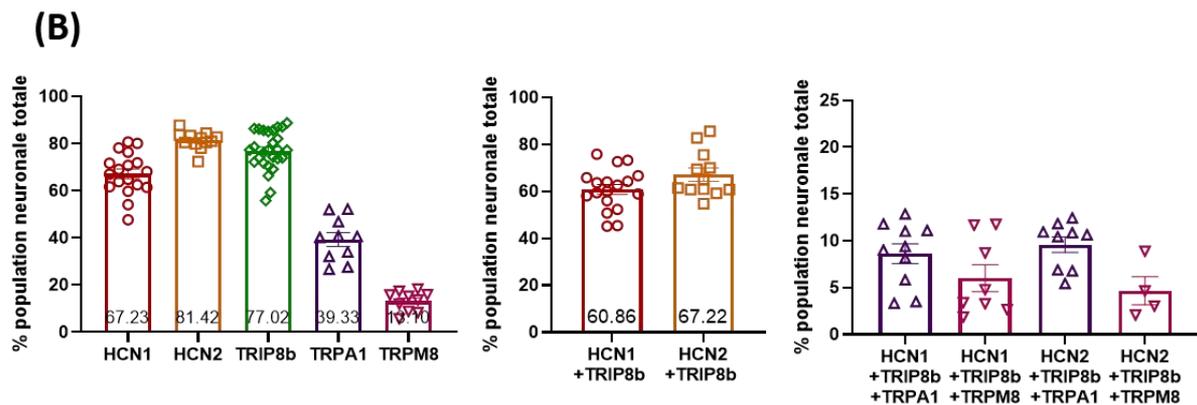
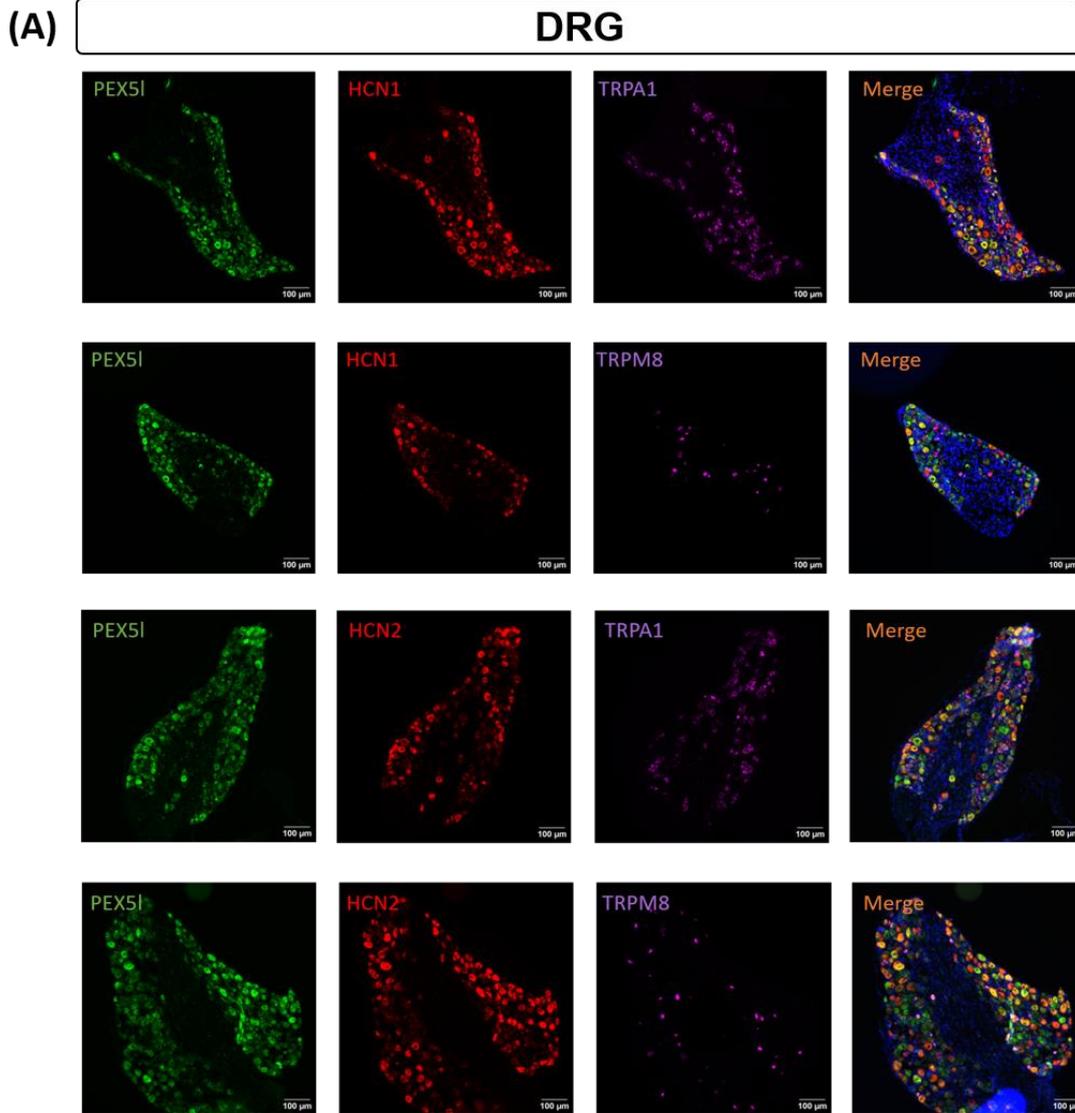
### 1. Expression et localisation dans les neurones périphériques

La caractérisation *in vitro* du complexe HCN-TRIP8b est dorénavant bien décrite (Bankston et al. 2012). Toutefois, aucune donnée n'existe quant à cette interaction protéine-protéine au sein des neurones périphériques ganglionnaires. Nous avons eu pour objectif de caractériser la coexpression et la colocalisation de HCN1-TRIP8b et HCN2-TRIP8b dans le DRG et le TG chez la souris naïve et rechercher si ces protéines et/ou leurs transcrits sont exprimés dans les neurones exprimant les récepteurs transducteurs du froid nociceptif TRPA1 et non nociceptif TRPM8.

Dans cet optique, nous avons utilisé la technique d'hybridation *in situ* par RNAscope® sur tissus de DRG lombaires (n=1-4 DRG pour n=4 souris) et TG de souris (n=1-4 TG pour n=4 souris) (*figure 36* et *figure 37*). Une quantification manuelle des cellules a permis de déterminer un pourcentage de cellules qui expriment nos transcrits d'intérêts, par rapport au nombre total de cellules comptabilisées sur la coupe.

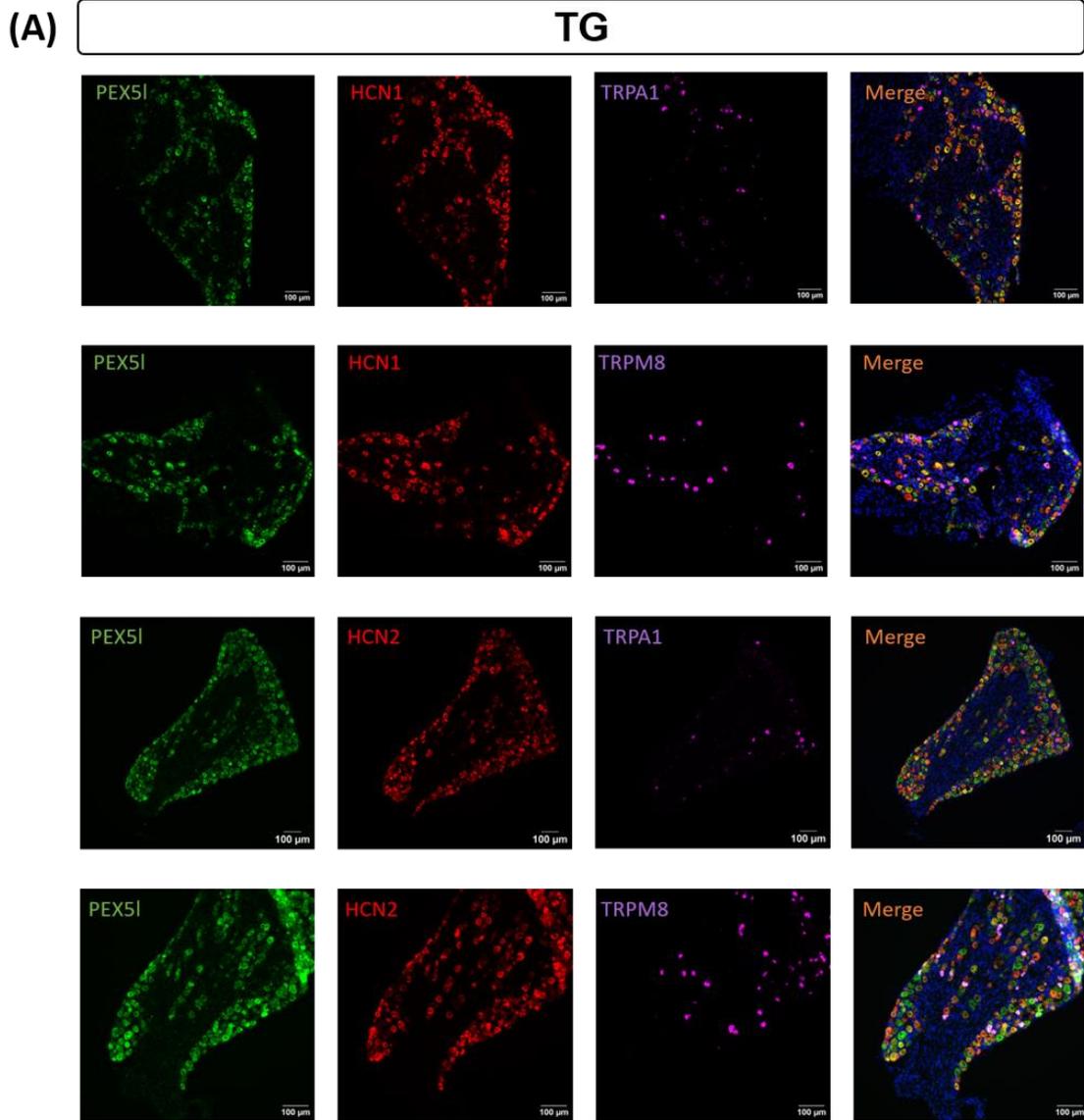
Les transcrits de *TRIP8b* sont exprimés dans  $77.0 \pm 2.1\%$  des cellules du DRG et  $69.7 \pm 1.3\%$  des cellules du TG (*figure 36.A*, *figure 36.B*). Les neurones positifs pour *HCN1* et *HCN2* sont respectivement de  $67.2 \pm 2.1\%$  et  $81.4 \pm 1.1\%$  dans le DRG, et  $69.7 \pm 1.4\%$  et  $69.1 \pm 1.6\%$  dans le TG. La distribution de l'ARNm de *TRPA1* est de  $39.3 \pm 2.9\%$  dans le DRG et  $16.4 \pm 2.1\%$  dans le TG. En outre, l'ARNm de *TRPM8* est retrouvé dans  $18.10\%$  des cellules du DRG et  $17.9 \pm 1.3\%$  des cellules du TG.

Les comptages des coexpressions par rapport à la population neuronale totale montre dans le DRG que  $60.9 \pm 2\%$  des cellules coexpriment *HCN1* et *TRIP8b* et  $67.2 \pm 2.8\%$  coexpriment *HCN2* et *TRIP8b* (*figure 36.B*). Dans le TG, les coexpressions sont similaires entre *HCN1* et *TRIP8b* ( $50.1 \pm 1.3\%$ ) et *HCN2* et *TRIP8b* ( $50.7 \pm 2.5\%$ ) (*figure 37.B*). Nous avons compté également les triples coexpressions de HCN-TRIP8b avec les marqueurs du froid. Nous observons dans le DRG davantage de coexpression *HCN1/2 + TRIP8b* avec *TRPA1* (*HCN1*  $8.6 \pm 1.1\%$  ; *HCN2*  $9.5 \pm 0.8\%$ ) qu'avec *TRPM8* (*HCN1*  $6 \pm 1.4\%$  ; *HCN2*  $4.6 \pm 1.5\%$ ) (*figure 36.B*), tandis que dans le TG, la coexpression est plus importante pour *HCN2-TRIP8b* et *TRPM8* ( $7.8 \pm 0.8\%$ ) qu'avec *TRPA1* ( $1.9 \pm 0.3\%$ ) (*figure 37.B*).

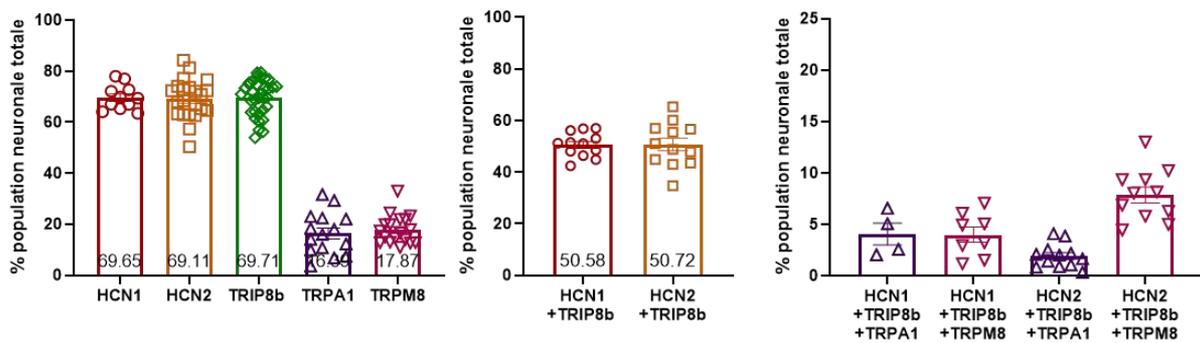


**Figure 36. Distribution de l'ARNm dans les DRG lombaires de souris**

**(A)** Photos (10x) représentatives de l'hybridation *in situ* par RNAscope sur coupes de DRG, pour les gènes TRIP8b en vert, HCN1 ou HCN2 en rouge, TRPA1 ou TRPM8 en violet et comarqué avec le DAPI en bleu. **(B)** Expression de chaque marqueur seul ou en co-expression par rapport à la population neuronale totale du DRG. La moyenne des valeurs est inscrite en % et les barres d'erreur représentent les SEM. Les barres d'échelle correspondent à 100  $\mu$ m.



(B)



**Figure 37. Distribution de l'ARNm dans les TG de souris**

**A)** Photos (10x) représentatives de l'hybridation *in situ* par RNAscope sur coupes de TG, pour les gènes TRIP8b en vert, HCN1 ou HCN2 en rouge, TRPA1 ou TRPM8 en violet et comarqué avec le DAPI en bleu. **(B)** Expression de chaque marqueur seul ou en co-expression, par rapport à la population neuronale totale du TG. La moyenne des valeurs est inscrite en % et les barres d'erreur représentent les SEM. Les barres d'échelle correspondent à 100 µm

Dans un second temps, nous avons étudié la localisation cellulaire et subcellulaire du complexe HCN-TRIP8b par immunocytochimie. Nous avons fait le choix de faire ces expériences à partir de cultures primaires de neurones de DRG et de TG en raison de problèmes persistants de reproductibilité des marquages obtenus sur tissus (*figure 38*).

Sur les neurones de DRG de souris WT naïves, nous observons un immunomarquage de l'isoforme HCN1 membranaire (en forme d'anneau), principalement dans les neurones de moyen (25-35µm) et gros diamètre (>35µm) (*figure 38.B*). La localisation de l'isoforme HCN2 semble autant membranaire que cytosolique et est observable principalement dans les petits (<25µm) et moyens neurones. Dans certains neurones du DRG, un marquage de HCN1 sur les prolongements a également été constaté (*figure 38.B*). L'immunomarquage de TRIP8b est péri-membranaire et cytosolique. Il est retrouvé dans la majorité des cellules du DRG observables en culture, quel que soit leur taille. La superposition des images HCN1 et TRIP8b puis HCN2 et TRIP8b montrent une forte colocalisation du complexe. Par ailleurs, un marquage de TRIP8b est également observable au niveau des prolongements neuronaux (*figure 38.D*). Afin de caractériser plus précisément l'expression de TRIP8b dans les neurones sensoriels sensibles au froid, nous avons réalisé un comarquage avec les transducteurs du froid TRPA1 et TRPM8. Nous observons un marquage membranaire de TRPA1 dans les neurones de petite taille (environ 17µm) qui est colocalisé avec le marquage de TRIP8b (*figure 38.C*). Toutefois, aucun neurone positif au marquage TRPM8 n'a été retrouvé sur les cultures de cellules isolées, faute de densité cellulaire suffisamment importante.

Les comarquages HCN1-TRIP8b et HCN2-TRIP8b ont également été réalisés sur des cellules en culture de TG (*figure 39*). Nous observons, comme dans les DRG, un marquage de TRIP8b membranaire et cytosolique. L'immunomarquage de HCN1 est membranaire et semble également cytosolique dans certains neurones (indépendamment de la taille), quant à HCN2, le marquage des membranes des petites-moyennes cellules (<35µm) formant un anneau est bien visible. Là encore, la superposition des photos dévoile une colocalisation importante des complexes HCN1-TRIP8b et HCN2-TRIP8b.

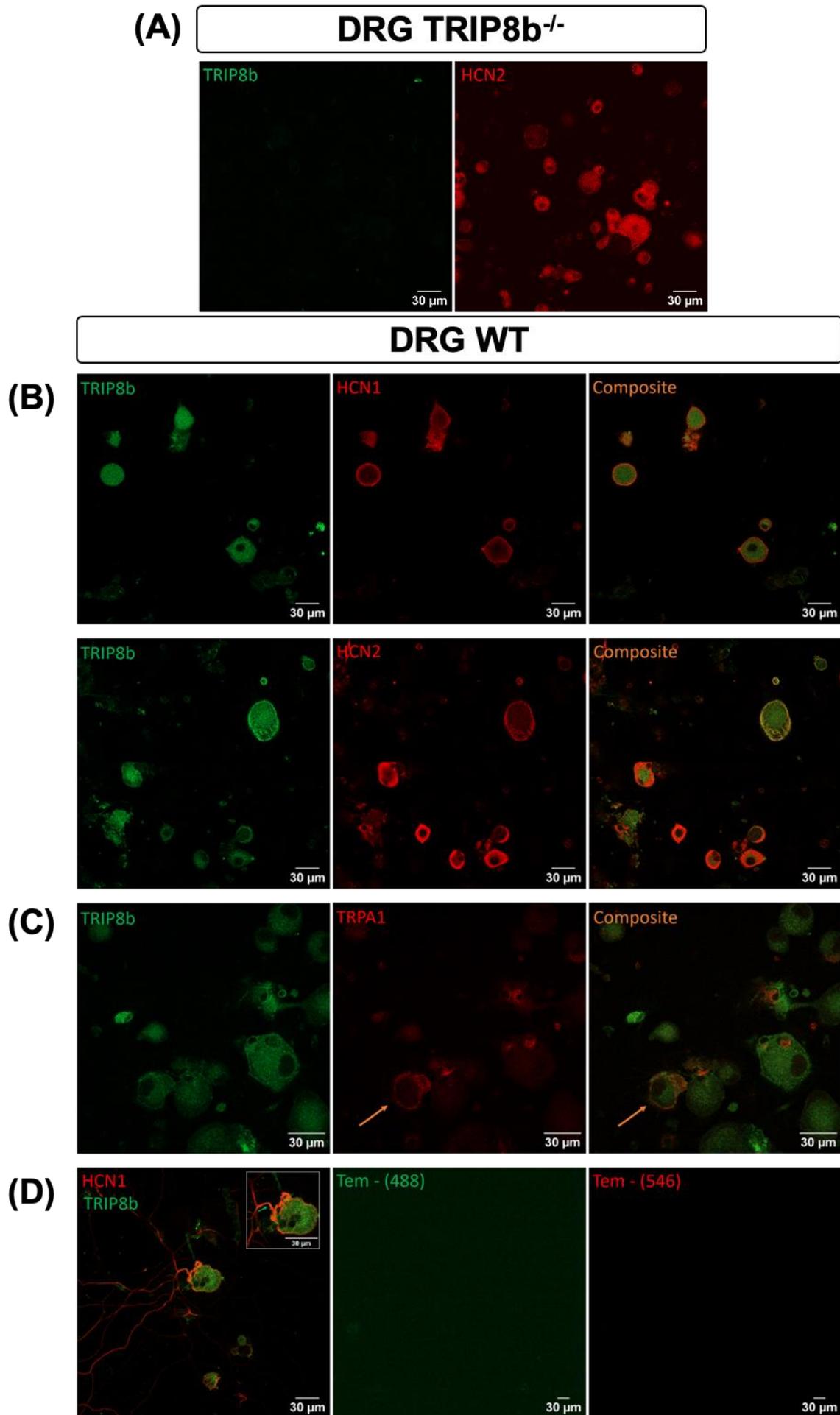
---

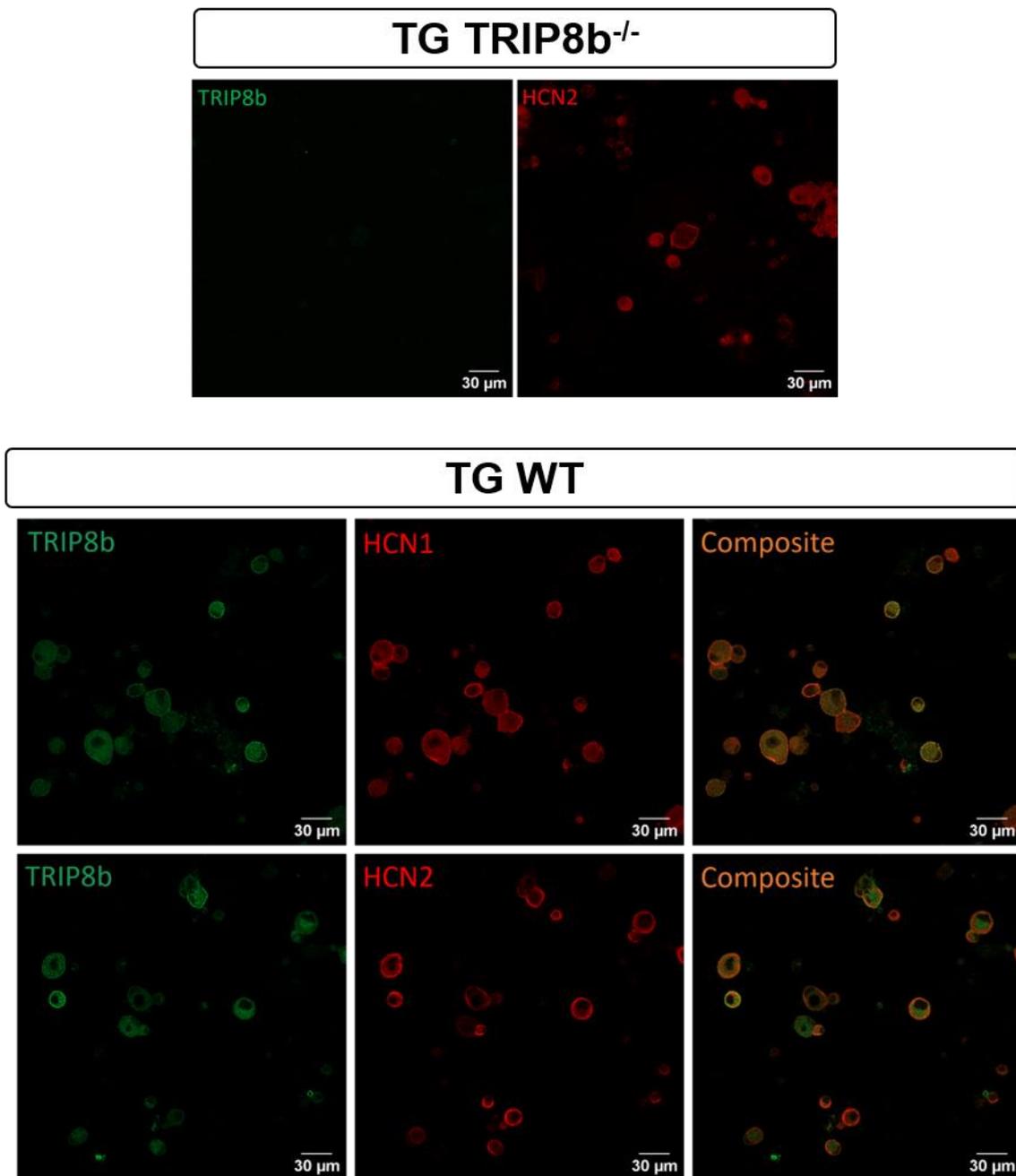
#### Figure 38. Immunocytochimie sur culture primaire de DRG de souris (p.99)

Photos (40x) du marquage fluorescent par immunocytochimie sur culture primaire de **(A)** cellules de DRG de souris TRIP8b<sup>-/-</sup> **(B)** cellules de DRG de souris WT, pour les protéines TRIP8b en vert, HCN1 ou HCN2 en rouge et le composite pour la colocalisation des deux. En **(C)** TRIP8b en vert a été comarqué avec le marqueur TRPA1 en rouge (objectif 63x). En **(D)** marquage HCN1 et TRIP8b présent au niveau du somat et des prolongements ; contrôles négatifs pour les secondaires couplés 488 et 546.

Les barres d'échelle correspondent à 30 µm.

---





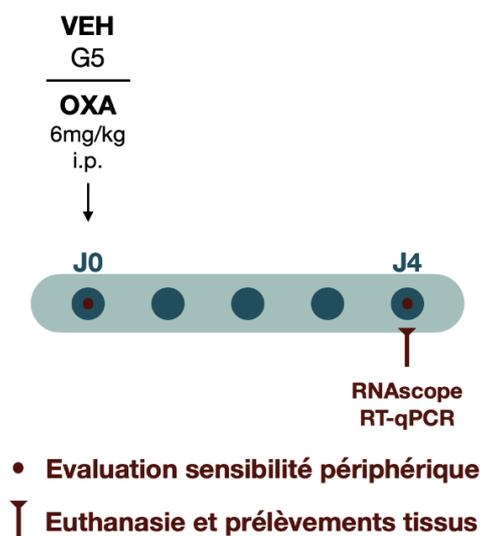
**Figure 39. Immunocytochimie sur culture primaire de TG de souris**

Photos (40x) du marquage fluorescent par immunocytochimie sur culture primaire de (A) cellules de TG de souris TRIP8b<sup>-/-</sup> (B) cellules de TG de souris WT, pour les protéines TRIP8b en vert, HCN1 ou HCN2 en rouge et le composite pour la colocalisation des deux.

Les barres d'échelle correspondent à 30 μm.

## 2. Quantification protéique et génique de HCN-TRIP8b dans un modèle murin de NPIO aigue

Le modèle murin NPIO aigue utilisé pour ce projet a été décrit dans la publication de Descoeur et al. en 2011. Brièvement, ce modèle consiste en une injection unique intrapéritonéale d'oxaliplatine à 6mg/kg. Au 2<sup>ème</sup> jour post-injection, une hypersensibilité au froid ainsi qu'une hypersensibilité mécanique se développent au niveau des extrémités. Le pic de ces symptômes est observable au 4<sup>ème</sup> jour post-injection (*figure 14*) et a été corrélé à une surexpression des transcrits de *HCN1* dans les DRG. L'objectif ici a été de caractériser davantage l'expression et la fonction du canal HCN et de son partenaire protéique TRIP8b dans les neurones ganglionnaires au pic des symptômes douloureux (J4), selon le protocole de la *figure 40*.

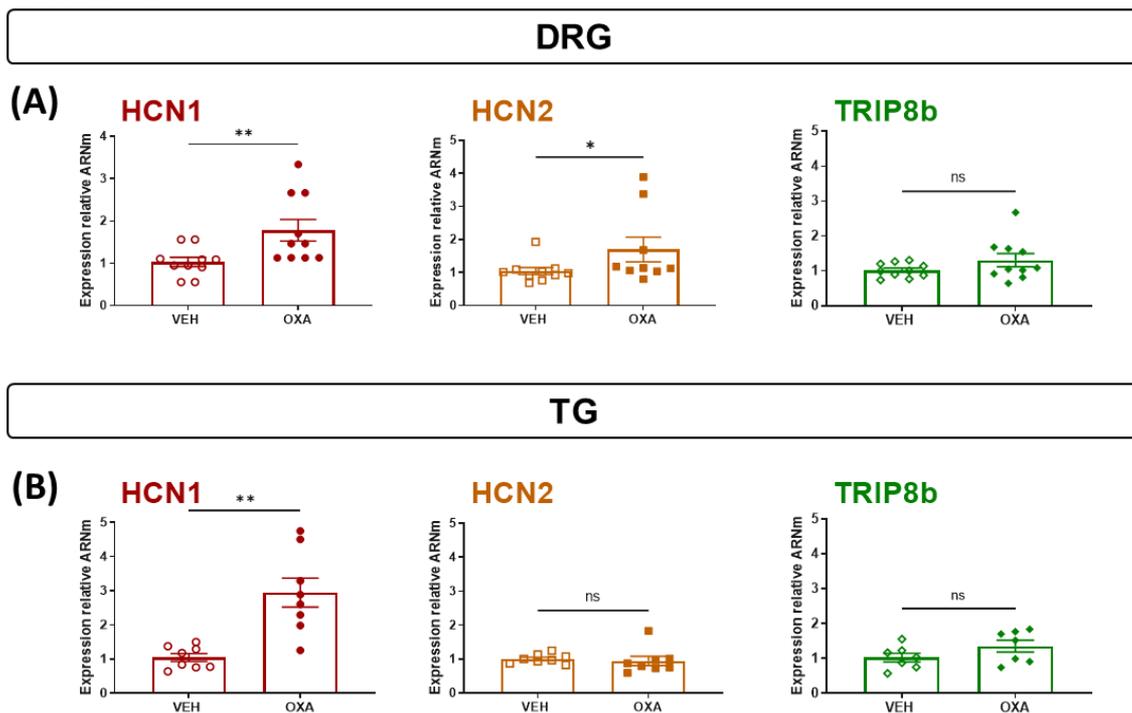


**Figure 40. Timeline d'expérimentation sur la souris NPIO aigue**

Nous avons testé la sensibilité périphérique de la souris par les tests d'immersion de la patte dans un bain à 10°C et de von Frey à J0 avant l'injection de l'oxaliplatine (OXA) ou du véhicule (VEH) afin d'obtenir les seuils de base ; et à J4 après l'injection afin de confirmer l'installation d'une hypersensibilité caractéristique de la neuropathie périphérique chez l'animal injecté OXA, en comparaison avec l'animal injecté VEH (données non montrées).

Une fois l'hypersensibilité thermique et mécanique attestée à J4, les souris ont été mises à mort afin de prélever les DRG lombaires (n=10) et TG (n=7-8). Premièrement, nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression relative de *HCN1*, *HCN2* et *TRIP8b* dans ces tissus chez les souris VEH par rapport aux souris OXA (*figure 41*). Chez les souris OXA, nous avons mis en évidence une surexpression des transcrits *HCN1* (VEH  $1.03 \pm 0.1$  ; OXA  $1.78 \pm 0.2$  ;  $p=0.0024$ ) et *HCN2* (VEH  $1.04 \pm 0.1$  ; OXA  $1.7 \pm 0.4$  ;  $p=0.035$ ) dans les DRG (*figure 41.A*). Dans les TG, les taux de *HCN1* ont triplé chez les souris OXA ( $p=0.001$ , test Mann-Whitney, *figure*

41.B). Aucune différence significative n'a été observée pour les niveaux de *TRIP8b* dans les DRG et les TG.



**Figure 41. Quantification des transcrits dans le DRG et TG par RT-qPCR**

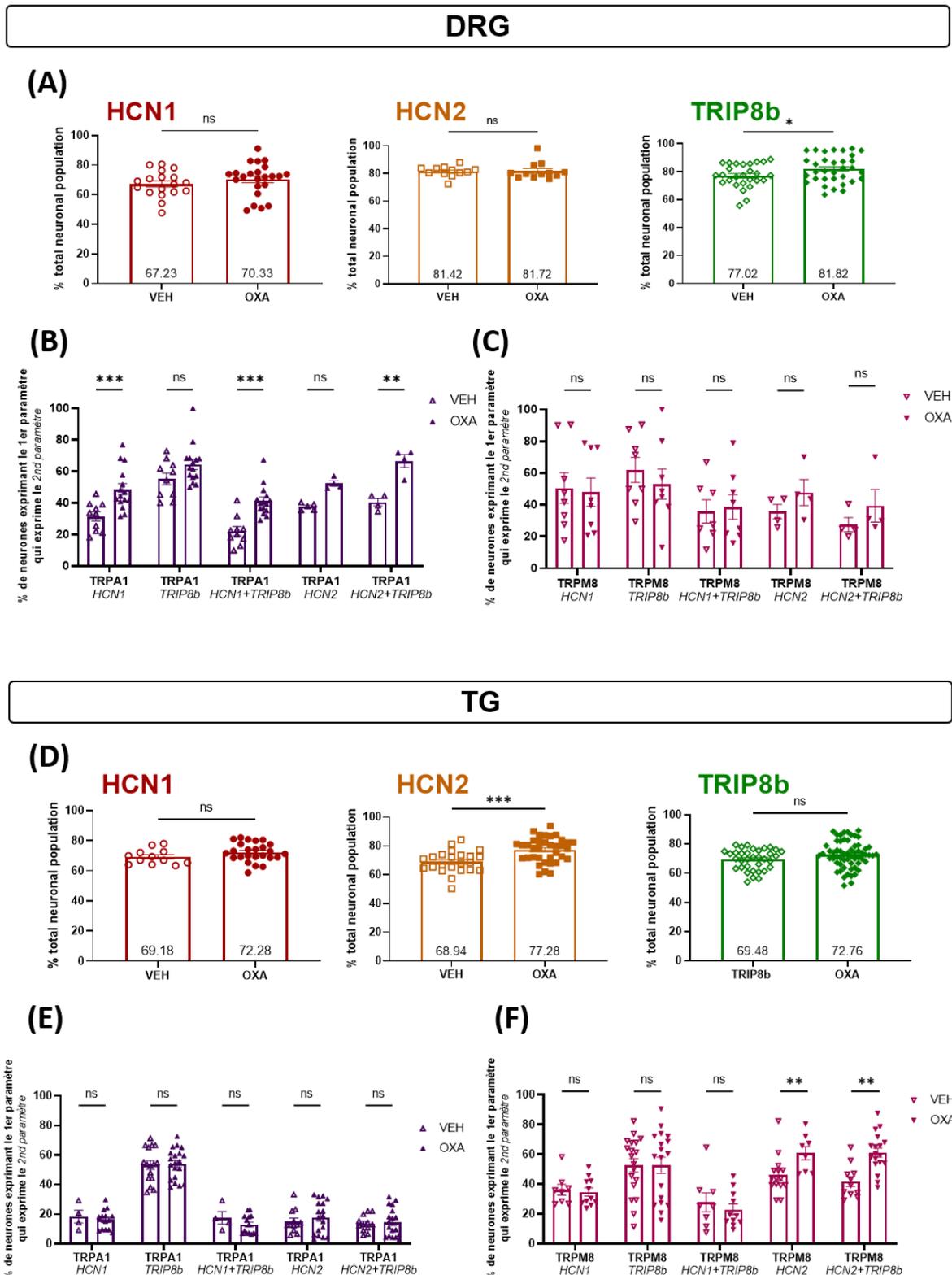
Les transcrits de *HCN1*, *HCN2* et *TRIP8b* dans les DRG lombaires et TG ont été quantifiés par RT-qPCR quatre jours après injection d'oxaliplatine (OXA) ou de véhicule (VEH) ( $* < 0.05$  ;  $** < 0.01$  ; test Mann-Whitney,  $n=10$  pour les DRG ;  $n=7-8$  pour les TG)

Des expériences d'hybridation *in situ* RNAscope® sur DRG et TG présentées ci-contre ont également été réalisées chez les souris OXA à J4 ( $n=6$  souris), afin de pouvoir comparer les pourcentages de cellules exprimant les transcrits *HCN1* et 2 et de *TRIP8b* aux résultats obtenus chez les souris VEH ( $n=4$ ). Dans les DRG, nous n'avons pas observé de changement dans le nombre de cellules positives pour *HCN1* et *HCN2*, ni *TRPA1* et *TRPM8* en condition OXA ; en revanche, il y a une augmentation significative du nombre de cellules positives pour *TRIP8b* dans les DRG OXA (VEH  $77 \pm 1.6\%$  ; OXA  $81.8 \pm 1.7\%$  ;  $p=0.0380$ , unpaired *t*-test) (figure 42.A). Dans les TG, une augmentation de la population *HCN2* a été observée (VEH  $68.8 \pm 1.2\%$  ; OXA  $70.3 \pm 1.2\%$  ;  $p=0.003$  ; unpaired *t*-test).

De manière intéressante, les comptages des coexpressions avec les marqueurs du froid en condition OXA ont révélé une redistribution des cellules positives *TRPA1* dans les DRG et des cellules positives *TRPM8* dans les TG. En effet, nous avons observé dans les DRG OXA une augmentation du nombre de cellules positives pour *TRPA1* qui expriment *HCN1* (VEH  $31.5 \pm 2.9\%$  ; OXA  $48.7 \pm 3.5\%$ ,  $p=0.0007$ ) (figure 42.B), et dans le même sens, le nombre de cellules *TRPA1* positives qui expriment *HCN1* et *TRIP8b* ( $p=0.0001$ ), et *HCN2* et *TRIP8b* ( $p=0.038$ ). En revanche, aucun changement dans l'expression *TRPM8* n'a été mesurée (figure 42.C). Dans les TG OXA, nous avons montré une augmentation du nombre

## DONNÉES EXPÉRIMENTALES

de cellules positives *TRPM8* qui expriment *HCN2* et *TRIP8b*, à savoir  $41.8 \pm 3.3\%$  chez les souris VEH, et  $54.9 \pm 4.3\%$  chez les souris OXA ( $p=0.008$ ).



**Figure 42. Quantification des cellules positives par RNAscope**

Le nombre de cellules positives pour *HCN1*, *HCN2* et *TRIP8b* a été quantifié par rapport au nombre total de cellules dans le tissu de souris VEH par rapport au souris OXA dans **(A)** le DRG et **(D)** le TG.

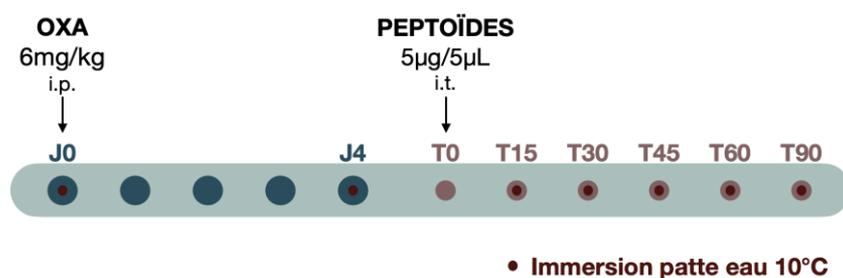
Pourcentage dans le DRG de neurones exprimant **(B)** *TRPA1* ou **(C)** *TRPM8* qui expriment le 2<sup>nd</sup> paramètre (en italique) chez les souris VEH et OXA. Pourcentage dans le TG de neurones exprimant **(E)** *TRPA1* ou **(F)** *TRPM8* qui expriment le 2<sup>nd</sup> paramètre (en italique) chez les souris VEH et OXA ( $* < 0.05$ , test Mann-Whitney et  $* < 0.05$   $** < 0.01$   $*** < 0.001$ , two way Anova, Sidak post-hoc)

## - CHAPITRE 2 -

# Modulation pharmacologique des canaux HCN par approche peptidomimétique

### 1. Screening *in vivo* des peptoides

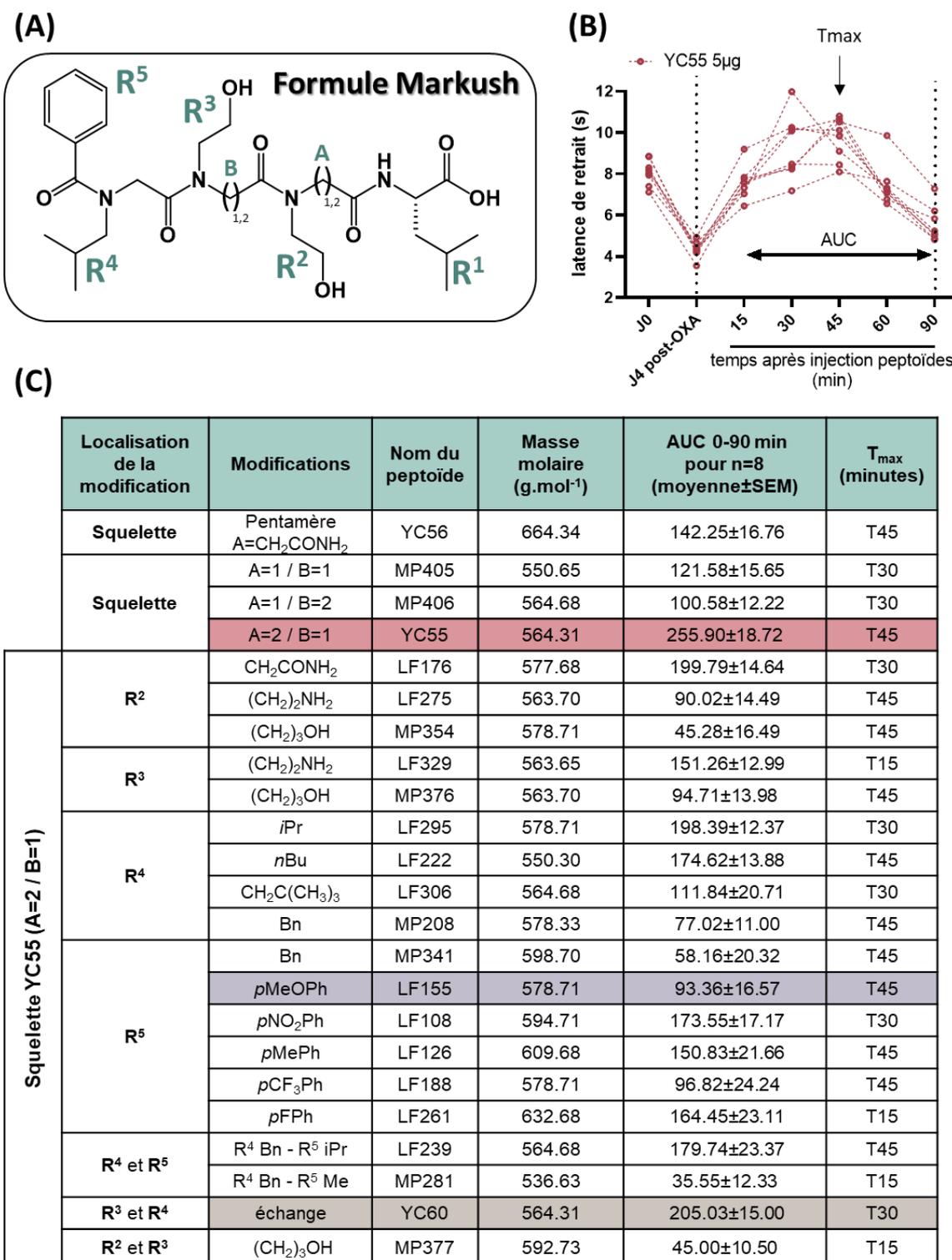
Nous avons mis en place une étude pharmacologique de screening de composés (mimes peptidiques) ciblant l'interaction protéine-protéine HCN-TRIP8b en collaboration avec l'ICCF. Vingt-trois peptoides ont été testés, injectés par voie intrathécale (5µg/5µL) dans le modèle NPIO aigue (souris OXA n=8 pour chaque peptoïde), le quatrième jour post-injection (J4 post-OXA), suivant le protocole présenté en [Figure 43](#). L'immersion de la patte arrière gauche dans un bain à 10°C a été le test de référence pour ce screening, afin d'évaluer l'effet de chaque composé sur l'hypersensibilité thermique induite par l'oxaliplatine. Pour cela, le test a été réalisé à J0 pour connaître les niveaux de sensibilité de base des souris, à J4 après injection d'oxaliplatine pour s'assurer de l'installation de l'hypersensibilité au froid chez ces animaux, puis à 15, 30, 45, 60 et 90 minutes après injection du peptoïde.



**Figure 43. Protocole suivi pour le screening *in vivo* des peptoides**

Le squelette breveté des peptoides se base sur la formule de Markush relative à l'analogue peptidique du domaine SNL de HCN ([figure 44.A](#)). A partir de cette structure, les chimistes ont tout d'abord produit des peptoides dont le squelette a été modifié, correspondant pour YC56 à un pentamère (C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>), ou pour YC55, MP405 et MP406 à un changement dans la longueur du mime grâce à l'ajout ou la suppression de groupements CH<sub>2</sub> ([figure 44.A-C](#)). Nous avons testé ces premiers peptoides chez la souris NPIO aigue, et nous avons calculé l'aire sous les courbes obtenues pour chaque souris entre 0 et 90 minutes après l'injection (AUC, *Area Under the Curve*), tel que détaillé en [figure 44.B](#) où nous présentons l'effet de YC55 évalué pour 8 souris. Nous avons également observé le temps pour lequel nous avons un effet antalgique maximal (T<sub>max</sub>). Les résultats issus du screening de ces 4 peptoides sont résumés en début de [figure 44.C](#). C'est le composé YC55 qui semble avoir une meilleure efficacité sur l'hypersensibilité au froid, ceci est en accord avec la modélisation moléculaire dynamique réalisée par les chimistes qui représentent les interactions *in silico* entre YC55 et TRIP8b ([annexe 4](#)) et montrent que ce squelette permet un positionnement optimal des

chaines latérales au sein de la poche TPR. Ces résultats ont été à l'origine de la synthèse de 19 autres peptoides dérivés de la structure de YC55 ayant des modifications des chaines latérales ( $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ), tout en conservant la leucine à l'extrémité C-terminal ( $R^1$ ) puisque la modélisation a confirmé son importance dans l'interaction avec TRIP8b (*figure 44.A*).

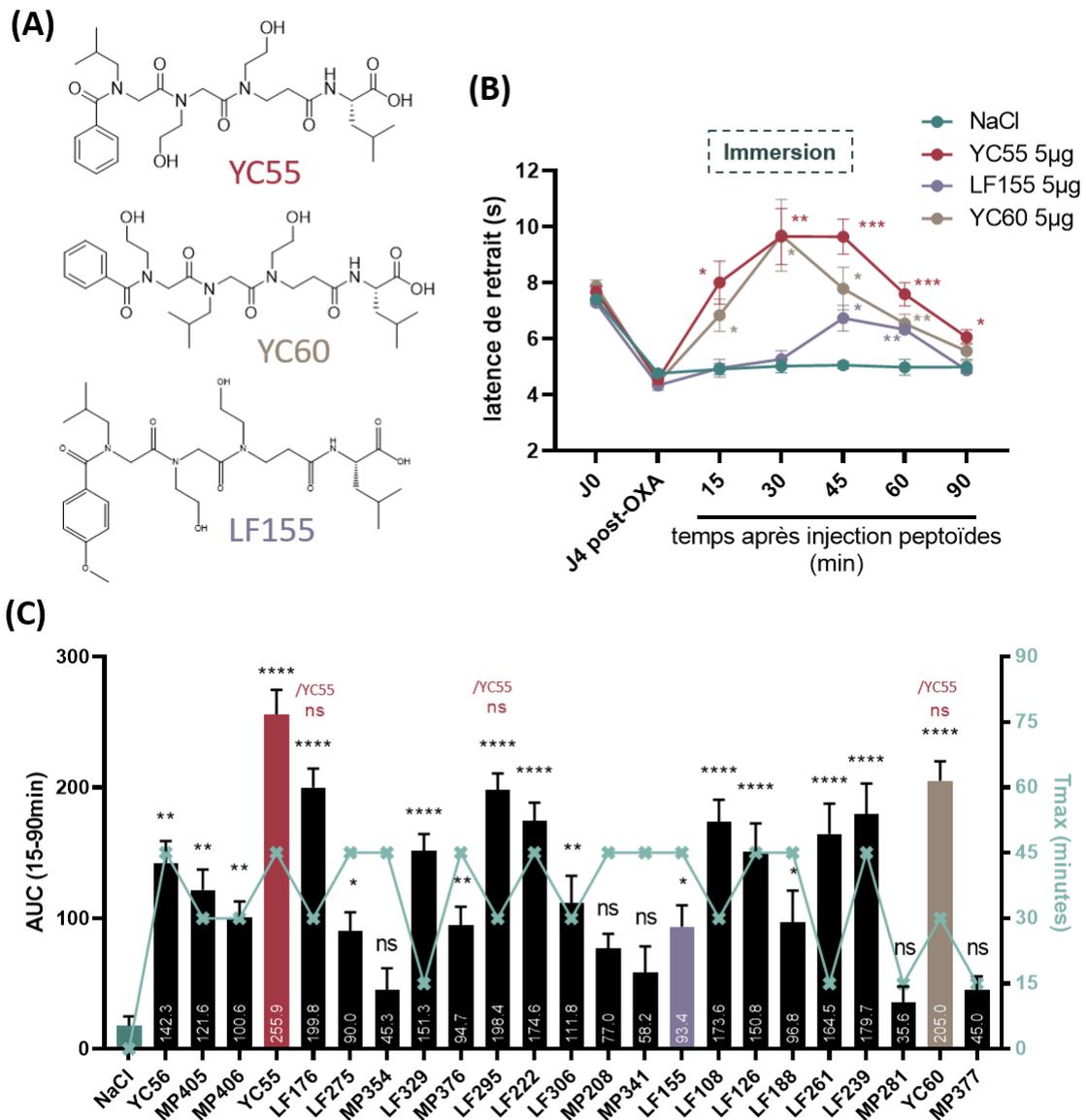


**Figure 44. Récapitulatif du criblage *in vivo* des peptoides**

(A) formule de Markush brevetée avec les chaines latérales ou le squelette sujets à modifications (B) latences de retrait de 8 souris obtenues après injection du composé YC55 (C) Récapitulatif des données de chaque peptoides synthétisés et testés *in vivo*.

Ces peptoides ont été testés *in vivo* et l'effet de chacun est répertorié dans le tableau de la [figure 44.C](#). Nous avons ainsi détaillé la modification des groupements, la dénomination du peptoïde proposée par les chimistes, sa masse molaire et la quantification de l'effet sur le modèle NPIO représentée par la valeur moyenne  $\pm$  SEM de l'AUC, et le  $T_{max}$  en minutes. Afin d'illustrer les différences d'effet pharmacodynamique pour les peptoides dérivés de YC55, nous avons sélectionné deux exemples le LF155 (en violet) et le YC60 (en beige) en plus de YC55 (en rouge) pour lesquels les modifications des chaînes latérales sont précisées en [figure 44.C](#) et leur formule chimique en [figure 45.A](#). Les latences de retrait moyennes à J0 (avant OXA), à J4 (post-OXA) et aux différents temps après l'injection de ces 3 composés sont représentés en [figure 45.B](#). Le peptoïde YC55 reverse l'hypersensibilité au froid dès 15 minutes après son injection, avec des niveaux de latence similaires à ceux mesurés à J0. Nous constatons un pic d'effet 45 minutes après l'injection avec un temps de latence moyen qui dépasse les seuils de base. À T90, la latence de retrait moyenne est toujours significativement différente par rapport à l'effet du NaCl ( $p=0.04$ ). Le peptoïde LF155 montre quant à lui un léger effet sur l'hypersensibilité au froid sur les temps 45 et 60 minutes après injection, puis retourne à un état basal à T90. Le peptoïde YC60 témoigne d'une cinétique rapide, avec une efficacité sur l'hypersensibilité au froid dès T15 et un pic d'activité à T30 suivi d'une diminution très rapide mais néanmoins significative jusqu'à T60.

Pour comparer les effets pharmacologiques des 23 composés testés, nous avons représenté, sur un même graphique, la moyenne des aires sous la courbe entre 15 et 90 minutes post-injection et la valeur de  $T_{max}$  pour chaque composé ([figure 45.C](#)). Nous avons tout d'abord comparé les effets de chacun des composés par rapport à l'effet contrôle du NaCl. Nous observons un AUC maximum pour le peptoïde YC55 ( $255.9 \pm 18.8$ ), significativement supérieur à l'AUC obtenu avec un traitement au NaCl ( $17.9 \pm 7.0$ ;  $p < 0.0001$ ). À l'inverse, les peptoides qui possèdent les AUC les plus faibles ne se distinguant pas de l'effet pharmacologique du NaCl sont : MP354 ( $p=0.9696$ ), MP208 ( $p=0.1573$ ), MP341 ( $p=0.6450$ ), MP281 ( $p=0.9988$ ) et MP377 ( $p=0.9110$ ) (*1Way Anova, Dunnet post-hoc*). Au total, 18 peptoides sur les 23 testés montrent un effet significatif par rapport à l'effet du NaCl. Nous avons, dans un second temps, comparé les effets de chacun des composés par rapport à celui qui possède l'effet le plus intéressant, le peptoïde YC55. Sur les 22 peptoides, trois ont des effets statistiquement similaires à YC55 : LF176 ( $p=0.2073$ ), LF295 ( $p=0.1824$ ), YC60 ( $p=0.3208$ ). Toutefois, leur cinétique similaire à celle de YC60 ([figure 45.B](#)) suggère une efficacité moindre par rapport à YC55. De plus, nous avons remarqué que leur effet pharmacologique n'était pas reproductible d'une expérimentation à l'autre contrairement à YC55, qui a été choisi comme notre peptoïde tête de série pour la suite du projet.



**Figure 45. Comparaison des effets pharmacologiques des peptoides**

**(A)** La latence de retrait de la patte dans l'eau à 10°C a été mesurée en cinétique à T15, T30, T45, T60 et T90 post-injection i.t. (5µg) des peptoides YC55 (rouge), LF155 (beige) et YC60 (violet) à J4 post-injection OXA avec **(B)** leur formule chimique associée. **(C)** Représentation de l'effet antalgique des peptoides testés selon les AUC des courbes et le T<sub>max</sub> entre J4 post-OXA et 90 minutes (\*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.001, \*\*\*\*<0.0001 ; n=8♂ ; 2way Anova pour (B) et 1way Anova pour (C))

## 2. Mise au point d'un test de screening *in vitro*

Nous disposons au sein de l'université de Clermont Auvergne d'un appareil Monolith X commercialisé par Nanotemper qui utilise la technique du *Spectral Shift* couplée à la thermophorèse à micro-échelle (MST), permettant d'étudier les affinités biomoléculaires dans de petits volumes (5 à 10 $\mu$ L). Nous avons eu pour projet d'évaluer l'interaction HCN-TRIP8b ainsi que son blocage par les peptoïdes synthétisés par les chimistes. Le Monolith se basant sur les variations de fluorescence d'une protéine pour suivre son interaction avec son ligand, nous devons avoir une protéine marquée par fluorescence (ici TRITC) et la seconde, considérée comme ligand, non marquée. Ainsi, la production de protéines recombinantes a été indispensable. Nous nous sommes inspirés de la publication de 2012 de Ye Han et notre collaboration a permis d'obtenir les vecteurs d'expression de nos deux protéines d'intérêts HCN et TRIP8b (*annexe 3*).

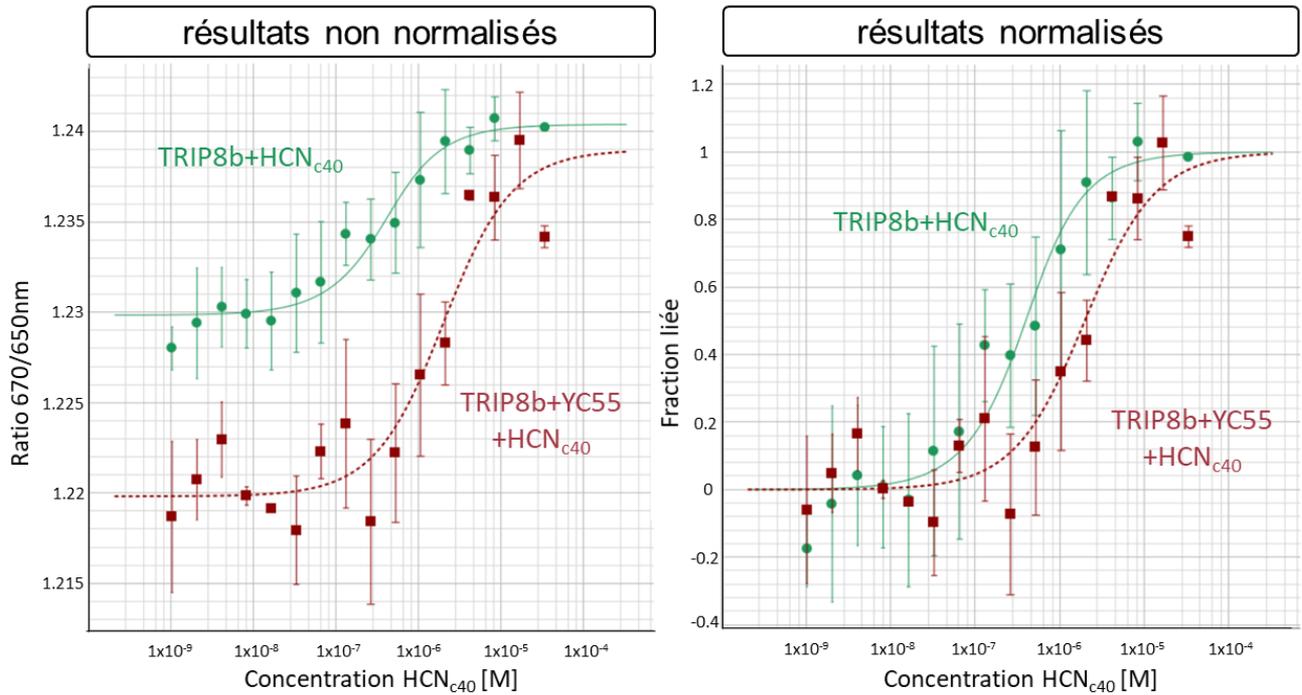
Notre stratégie a été premièrement de sélectionner le vecteur d'expression de la protéine tronquée TRIP8b<sub>241-602</sub> qui contient la partie TPR de TRIP8b et une étiquette poly-histidine (6HIS tag) pour permettre sa purification sur colonne. Ce tag est un avantage puisque nous l'avons utilisé comme substrat pour le marquage dans le rouge permis par le dye RED-tris-NTA, qui se lie par liaison non covalente selon le ratio stœchiométrique de 1:1 sur les 6 histidines. Deuxièmement, nous avons sélectionné le vecteur d'expression de la protéine GST-HCN<sub>C40</sub> qui contient les 40 derniers résidus C-terminaux, incluant le domaine SNL. La production de chacune de ces protéines est détaillée dans la partie « matériels et méthodes ».

Une longue étape de mise au point des conditions d'expérimentation optimales a été nécessaire pour obtenir les premières données d'affinité entre les deux protéines. Nous avons tout d'abord déterminé le PBS-T comme étant le solvant préférentiel pour l'ensemble de nos expérimentations car il ne favorisait pas la formation d'agrégats en solution. Nous devons ensuite nous assurer du marquage TRIP8b-HIS par le RED-tris-NTA à l'aide d'un test d'affinité conduit par le Monolith, qui a confirmé une liaison avec une affinité de l'ordre de 150nM (donnée non montrée). De plus, en lien avec les données publiées par nos collaborateurs américains sur le criblage par polarisation de fluorescence de molécules perturbatrices de l'interaction (Ye Han et al. 2015), nous avons ajusté les concentrations des protéines afin d'avoir une concentration finale pour TRIP8b<sub>241-602</sub> de 300nM, et une concentration maximum de 37.5 $\mu$ M pour HCN<sub>C40</sub>. Enfin, nous avons observé qu'une incubation de 3 heures de ces deux protéines en solution était nécessaire pour permettre leur interaction.

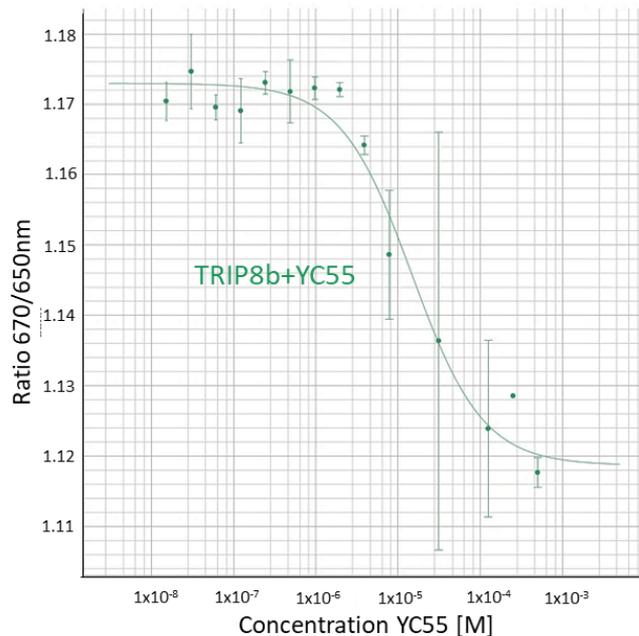
De manière théorique, lorsque la concentration du ligand (HCN<sub>C40</sub>) augmente, il se lie à TRIP8b<sub>241-602</sub> marqué, en modifiant sa thermodiffusion, ce qui entraîne une modification du signal fluorescent et renseigne sur l'affinité des deux protéines. Ainsi, la protéine marquée TRIP8b<sub>241-602</sub> (300nM) est mise en solution pendant 3 heures avec des concentrations

croissantes du ligand HCN<sub>C40</sub> (0.001µM-33.5µM). La valeur de l'affinité est calculée par le modèle d'ajustement standard (courbe verte), et révèle que HCN se lie à TRIP8b avec un Kd de 247nM (*figure 46.A*).

(A)



(B)



**Figure 46. Étude par thermophorèse a microéchelle et spectral shift de l'interaction HCN-TRIP8b *in vitro* et sa perturbation par YC55**

(A) Affinité entre les protéines recombinantes TRIP8b<sub>241-602</sub> (300nM) et HCN<sub>C40</sub> (concentration croissante) en absence (en vert) ou en présence de YC55 100µM (en rouge) sans normalisation, et après normalisation (B) affinité entre une concentration croissante de YC55 et TRIP8b<sub>241-602</sub> (300nM). 1 point correspond à 3 lectures du Monolith Nanotemper (n=3).

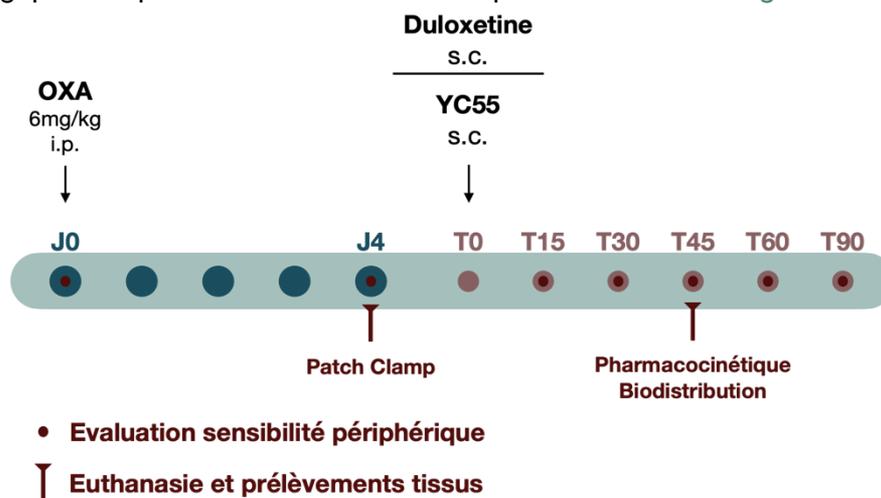
Pour mettre au point le test *in vitro* d'efficacité des peptoides, nous avons sélectionné en premier lieu YC55. Afin de définir la concentration optimale du composé permettant de rompre l'interaction HCN-TRIP8b, nous avons tout d'abord vérifié qu'il pouvait se lier à TRIP8b<sub>241-602</sub> et dans ce cas, quelle était sa constante de dissociation. Pour ce faire, une concentration croissante de YC55 (0.015-500µM) était mis en solution pendant 3 heures avec une concentration constante (300nM) de TRIP8b<sub>241-602</sub> marqué. Les expérimentations ont donné un Kd de 14.5µM (*figure 46.B*).

Nous avons donc choisi d'utiliser une concentration de YC55 à 100µM, correspondante approximativement au Kd multiplié par 10, pour évaluer son efficacité à rompre l'interaction HCN-TRIP8b en sa présence. Nous avons ajouté le peptoïde en concentration constante dans les 16 tubes (100µM), selon les mêmes conditions que précédemment, pendant 3h. Les valeurs du ratio 670nm/650nm obtenues pour cette expérimentation suivent la courbe d'affinité rouge présentée dans la *figure 46.A*. La constante résultante en présence de YC55 est de 1.83µM.

La superposition de la courbe associée à l'interaction HCN-TRIP8b et la courbe associée à l'interaction HCN-TRIP8b en présence de YC55 révèle une différence dans le profil d'affinité (*figure 46.A*). En effet, lorsque les valeurs ne sont pas normalisées, le plateau bas correspondant aux plus basses concentrations de HCN<sub>C40</sub> est associé à une plus faible émission de fluorescence par TRIP8b en présence de YC55. La normalisation de ces deux courbes en fonction de la fraction de TRIP8b liée démontre un décalage d'1 logarithme (*figure 46.B*). Ces données obtenues *in vitro* suggèrent donc que le peptoïde YC55 est capable de perturber l'interaction HCN-TRIP8b au niveau du site de liaison de TRIP8b contenant le domaine TPR. Les expérimentations évaluant l'effet *in vitro* de chaque composé test *in vivo*, sur l'interaction HCN-TRIP8 sont en cours au laboratoire.

### 3. Evaluation des propriétés pharmacodynamiques du peptïde YC55

D'après nos résultats de criblage de composés, le peptïde YC55 est celui qui montre l'effet antalgique le plus intéressant, lorsqu'injecté par voie intrathécale, sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Il perturbe *in vitro* l'interaction HCN-TRIP8b avec un Kd de 1.83 $\mu$ M. Pour la suite du projet, ce composé a donc été utilisé comme molécule outil pour étudier plus précisément l'implication des canaux HCN et de la protéine TRIP8b dans les NPIO aigues et apporter la preuve d'efficacité de notre stratégie pour réduire l'hypersensibilité au froid chez la souris traitée à l'oxaliplatine. Nous avons ainsi entrepris une étude pharmacologique complète avec YC55 suivant le protocole décrit en *figure 47*.

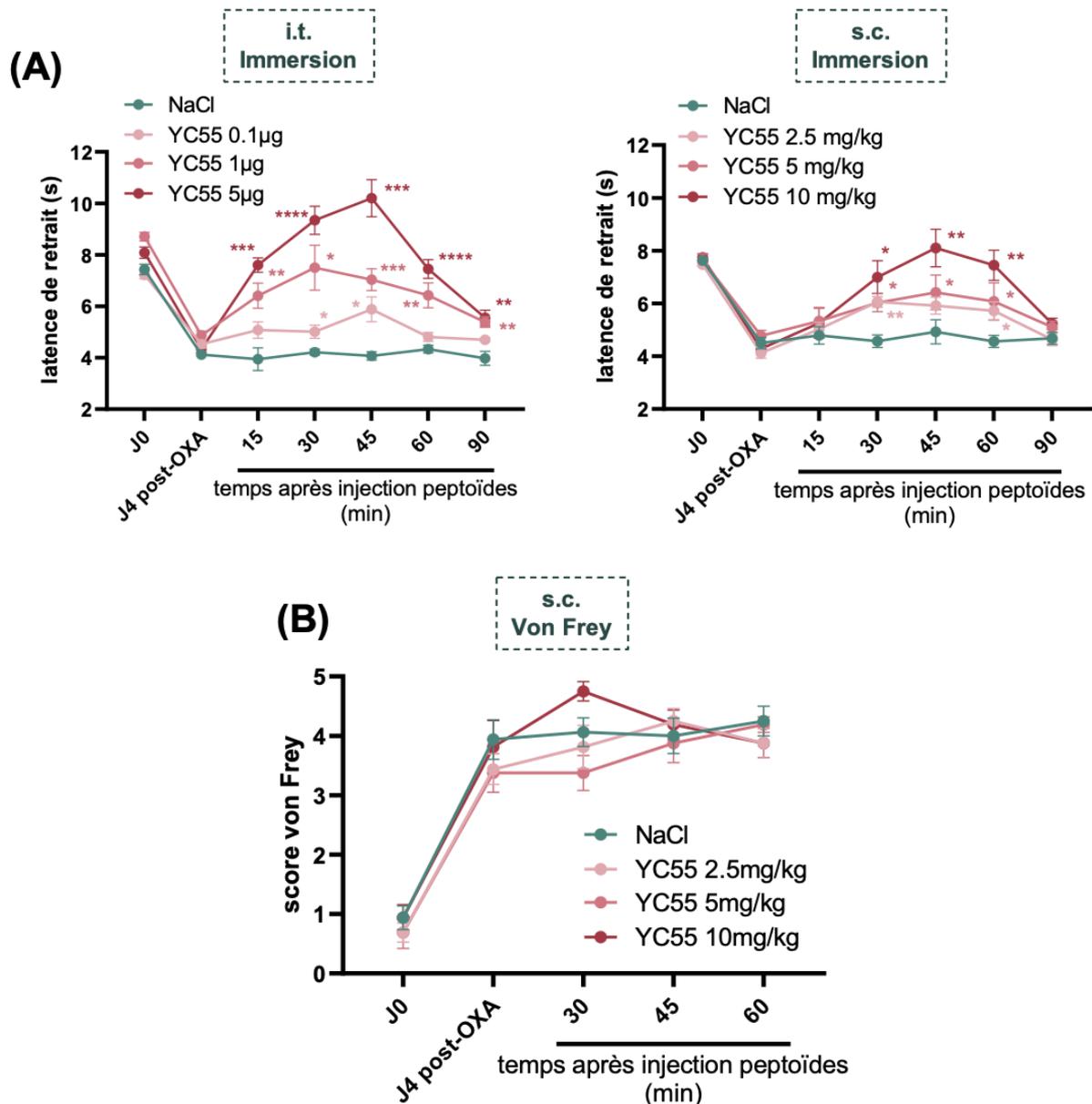


**Figure 47. Description des protocoles des tests d'efficacité pharmacologique du composé YC55**

#### 3.1. Étude de la sensibilité périphérique

Pour compléter nos données préliminaires, nous avons testé des doses croissantes de YC55 par voie intrathécale (0.1 $\mu$ g, 1 $\mu$ g et 5 $\mu$ g) et systémique en sous-cutanée (2.5mg/kg, 5mg/kg et 10mg/kg) sur le modèle NPIO aigue (*figure 48*). Le test d'immersion de la patte dans un bain à 10°C montre un effet dose-dépendant de YC55 injecté en i.t. et s.c. sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine à J4 (*figure 48.A*), l'effet antalgique maximal est constaté avec les doses de 5 $\mu$ g et 10mg/kg respectivement. Nous observons un effet significatif sur l'hypersensibilité au froid dès les doses les plus faibles. Le pic d'effet pharmacologique du peptïde à la dose maximale est observable à T45, temps auquel la moyenne des latences de retrait atteint 10 secondes après l'injection i.t. et 8 secondes après injection s.c. Enfin, la sensibilité retourne à un état basal à T90. L'effet après l'injection intrathécale est rapide, une différence significative des latences de retraits est observée entre les doses de 1 $\mu$ g et 5 $\mu$ g par rapport au groupe NaCl, dès 15 minutes post-injection, alors que l'effet en injection systématique est plus lent, une différence significative entre la plus haute dose de YC55 et le NaCl est mesurable à partir de T30 minutes.

L'hypersensibilité mécanique a également été évaluée par le test de von Frey (*figure 48.B*). Cette fois, nous n'observons pas d'action du composé sur ce type de douleur aux 3 doses administrées en systémique. L'ensemble de ces tests ont été effectués chez le mâle et la femelle. Les résultats ne révèlent pas de dimorphisme sexuel quant à l'effet pharmacologique du composé.



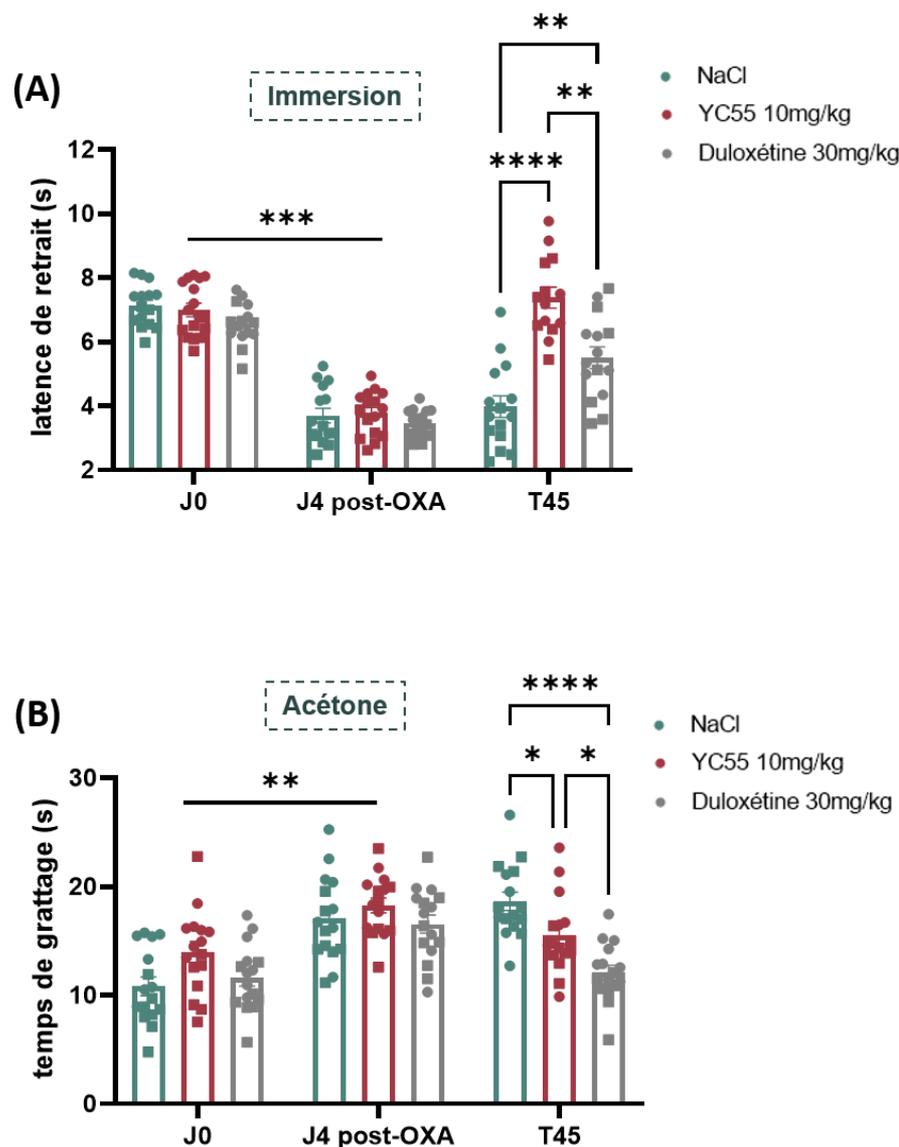
**Figure 48. Effet pharmacologique du peptoïde YC55 sur les symptômes caractéristiques de la NPIO aigue**

**(A)** Latences de retrait de la patte dans un bain à 10°C des souris OXA avec administration i.t. à J4 de YC55 à 0.1µg, 1µg et 5µg et avec administration s.c. à J4 de YC55 à 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg. **(B)** Effet du peptoïde aux 3 doses sur l'hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine mesurée par le test du Von frey. (\*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.001, \*\*\*\*<0.0001 ; n=8mâles ; 2way Anova sidak post-hoc)

Dans des tests comparatifs, au T<sub>max</sub> (T45), nous avons mesuré les effets de la dose maximale du peptoïde YC55 (10mg/kg) et de la duloxétine (30mg/kg), seule molécule recommandée pour le traitement des neuropathies périphériques chimio-induites. Compte-

tenu de la symptomatologie observée en clinique (i.e. paresthésies et dysesthésies induites par le froid au niveau des extrémités des membres et également au niveau oro-facial), nous avons évalué la sensibilité thermique extra-céphalique et céphalique par le test d'immersion de la patte à 10°C et le test d'acétone sur le territoire des vibrisses, respectivement (*figure 49*).

Les mesures de latences de retrait de la patte à T45min (*figure 49.A*) montrent une diminution significative de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine pour les deux composés, à savoir une diminution de 47% ( $p < 0.0001$ ) pour YC55 et de 30% ( $p = 0.0094$ ) pour la duloxétine, par rapport au NaCl. A noter, aux doses utilisées, que l'effet du peptoïde est statistiquement supérieur à celui de la duloxétine ( $p = 0.015$ ).



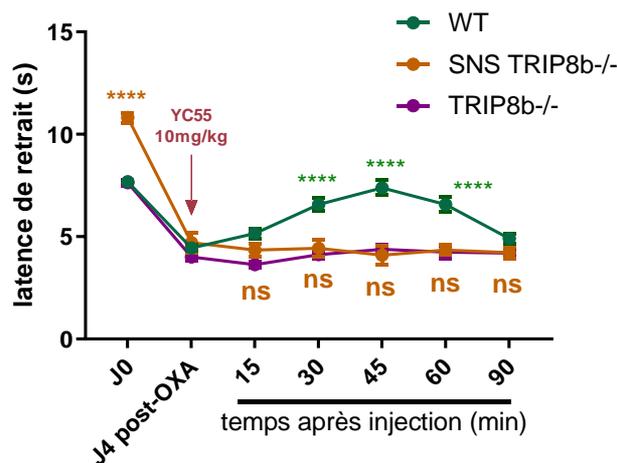
**Figure 49. Comparaison de l'effet pharmacologique du YC55 à la dose maximale par rapport au traitement recommandé en clinique, la duloxétine**

(A) Latences de retrait dans le bain froid à 10°C et (B) effet de l'acétone sur le temps de grattage en secondes de la face après administration du YC55 (s.c.) à 10mg/kg, la duloxétine (s.c.) à 30mg/kg ou le NaCl (s.c.) à J0, J4 post-OXA et T45 après traitement.

(\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.001$ , \*\*\*\* $< 0.0001$  ;  $n = 8♀$  (carrés) et  $8♂$  (ronds) ; two-way Anova, Sidak post-hoc)

La sensation de froid provoquée par l'évaporation de l'acétone induit un grattage de la face chez la souris saine. Ce phénomène est exacerbé à J4 post-OXA ( $p=0.012$ ). L'oxaliplatine induit donc une hypersensibilité thermique céphalique. Le groupe de souris traité YC55 présente à T45min. moins de sensibilité à l'acétone par rapport au groupe NaCl, comme en reflète la diminution significative du temps de grattage (*NaCl*  $18.7\pm 0.8s$  ; *YC55*  $15.5\pm 0.9s$  ;  $n=16$ ,  $p=0.0408$ , *2Way Anova*, *Sidak test post-hoc*) (*figure 49.B*). La duloxétine dosée à 30mg/kg est plus efficace sur ce comportement à T45min. par rapport à NaCl ( $p<0.0001$ ), avec un temps de grattage de  $12.1\pm 0.7s$ .

Afin de valider la cible des mimes peptidiques, YC55 a été testé *in vivo* chez des souris transgéniques mâles dont le gène *TRIP8b* a été délété dans l'ensemble des tissus (*TRIP8b<sup>-/-</sup>*) ou spécifiquement dans les nocicepteurs (*SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup>*) (*figure 50*). Les niveaux de base des latences de retrait de la patte mesurés sur les souris *TRIP8b<sup>-/-</sup>* par le test d'immersion est similaire aux souris *TRIP8b<sup>+/+</sup>* (WT). En revanche les seuils sont significativement plus hauts pour les souris *SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup>*, qui démontre ainsi une hyposensibilité basale ( $10.56\pm 0.01s$ ,  $p=0.0042$ , *2Way Anova*, *Tukey post-hoc*). Le modèle NPIO a été induit pour l'ensemble des génotypes. La délétion de *TRIP8b* n'a pas évité l'installation d'une hypersensibilité au froid 4 jours après l'injection d'oxaliplatine. Concernant les *SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup>* à J0, la moyenne des temps de latence était de  $10.8\pm 0.2s$  puis à J4 de  $4.7\pm 0.5s$  ( $p<0.0001$ , *2Way Anova*, *Tukey post-hoc*). Concernant les *TRIP8b<sup>-/-</sup>*, la moyenne à J0 était de  $7.6\pm 0.1s$  puis à J4 de  $4.0\pm 0.2s$ . Conformément aux tests réalisés précédemment, le composé YC55 dosé à 10mg/kg et administré par voie sous-cutanée induit une forte réversion de l'hypersensibilité au froid chez les animaux *littermate*, tandis qu'aucune efficacité pharmacologique n'est observée pour les deux autres génotypes pour lesquelles les niveaux de latence sont maintenus au niveau basal post-OXA.



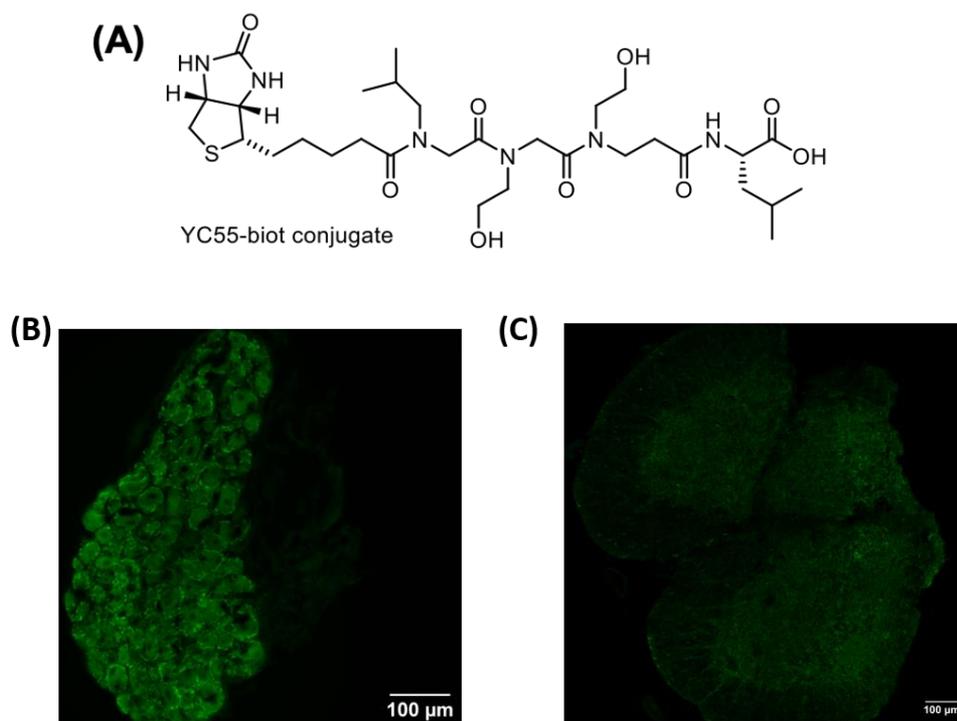
**Figure 50. Effet pharmacologique du peptide YC55 sur les souris *TRIP8b<sup>-/-</sup>* et *SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup>***

Latences de retrait de la patte mesurée chez des souris *littermate* (*TRIP8b<sup>+/+</sup>* et *TRIP8b<sup>fl/fl</sup>*) en vert, *SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup>* en orange et *TRIP8b<sup>-/-</sup>* en violet, avant et après injection d'oxaliplatine et après injection du peptide YC55 à 10mg/kg en s.c

( \*\*\*\*<math>0.0001</math> ;  $n=8$  mâles ; *two way Anova*, *Sidak post-hoc*)

### 3.2. Données de biodistribution et pharmacocinétique du peptotide YC55

Une fois l'efficacité pharmacodynamique de YC55 démontrée, nous avons cherché à la corréler avec la présence du composé dans les tissus d'intérêts (DRG et moelle épinière). Pour cela, deux options s'offraient à nous. La première a consisté à localiser le composé en utilisant un conjugué YC55-Biotine, synthétisé par ligation chimique d'une molécule de biotine à l'extrémité N-terminale de YC55 (*figure 51.A*). Après avoir confirmé l'efficacité *in vivo* du composé biotinylé par rapport au peptotide seul, les DRG et la ME fixés par PFA4% ont été prélevés à T45min (effet maximal). Après réaction de la biotine avec la streptavidine couplée à un fluorochrome 488nm, les coupes de ces tissus ont été examinées au microscope à épifluorescence (*figure 51.B-C*). Nous observons un marquage intense péri-membranaire dans les DRG (*figure 51.B*), tandis que le marquage est faible dans la ME (*figure 51.C*).

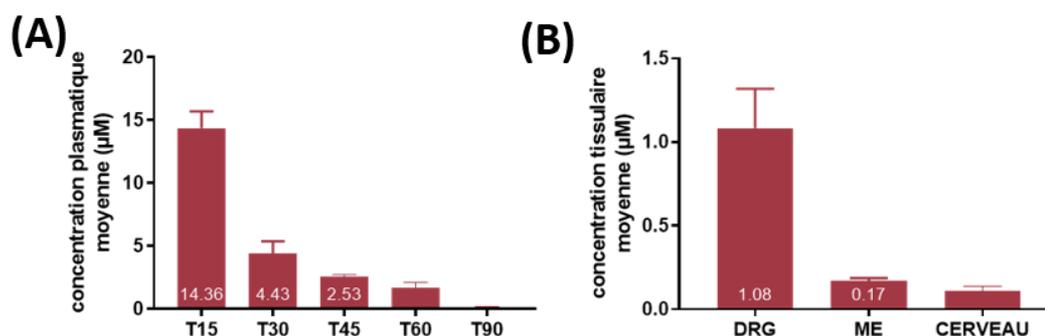


**Figure 51. Biodistribution de peptotide conjugué biotine**

(A) formule chimique du conjugué injecté et observé par couplage de la streptavidine dans (B) les DRG et (C) la moelle épinière (ME) prélevés à T45

La deuxième option a consisté à doser précisément, par HPLC-LC/MS, le peptotide dans des échantillons de plasma, de DRG, de moelle épinière et de cerveau obtenus à partir de souris VEH (n=3) et de souris OXA (n=3) (dosages réalisés par Synovo GmbH®, Germany). Les niveaux plasmatiques de YC55 ont été dosés à tous les temps de la cinétique réalisée *in vivo* (*figure 52.A*). Nous avons observé des concentrations de YC55 très comparables dans les souris VEH et OXA, et une décroissance très rapide entre T15 et T90 minutes. Précisément, à T15min., la concentration plasmatique relevée était en moyenne de  $14.4 \pm 3.2 \mu\text{M}$ , chutant rapidement à  $4.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$  à T30min., et à  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$  à T45min., lors de

l'effet antalgique maximal rapporté *in vivo*. Enfin, les niveaux plasmatiques mesurés étaient faibles 60 minutes après l'administration du composé ( $1.6 \pm 1 \mu\text{M}$ ) et proche de zéro à T90min. ( $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ). Ces résultats suggèrent donc une élimination rapide du composé par l'organisme et/ou un volume de distribution tissulaire important. Pour vérifier celui-ci, les cerveaux, DRG et moelle épinière ont été prélevés sur des souris VEH et OXA injectées YC55 à son pic d'effet (T45). Les dosages réalisés montrent des concentrations de l'ordre du micromolaire dans les DRG ( $1.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ) et de l'ordre du nanomolaire dans la ME ( $170 \pm 40 \text{nM}$ ) et le cerveau ( $110 \pm 65 \text{nM}$ ) (figure 52.B). A noter que la concentration du composé, bien que variable compte tenu du faible nombre d'animaux, était deux fois supérieure dans les DRG de souris traitées à l'oxaliplatine ( $1.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ) par rapport aux souris VEH ( $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ).



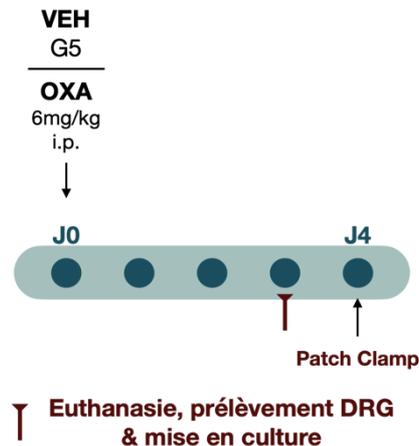
**Figure 52. Dosage pharmacocinétique de YC55 dans le sang et les tissus**

(A) concentration moyenne plasmatique en  $\mu\text{M}$  en fonction du temps de la cinétique (B) Concentration moyenne tissulaire en  $\mu\text{M}$  dans les DRG, la moelle épinière et le cerveau à T45min.

#### 4. Étude fonctionnelle du courant médié par les canaux HCN dans les neurones du DRG

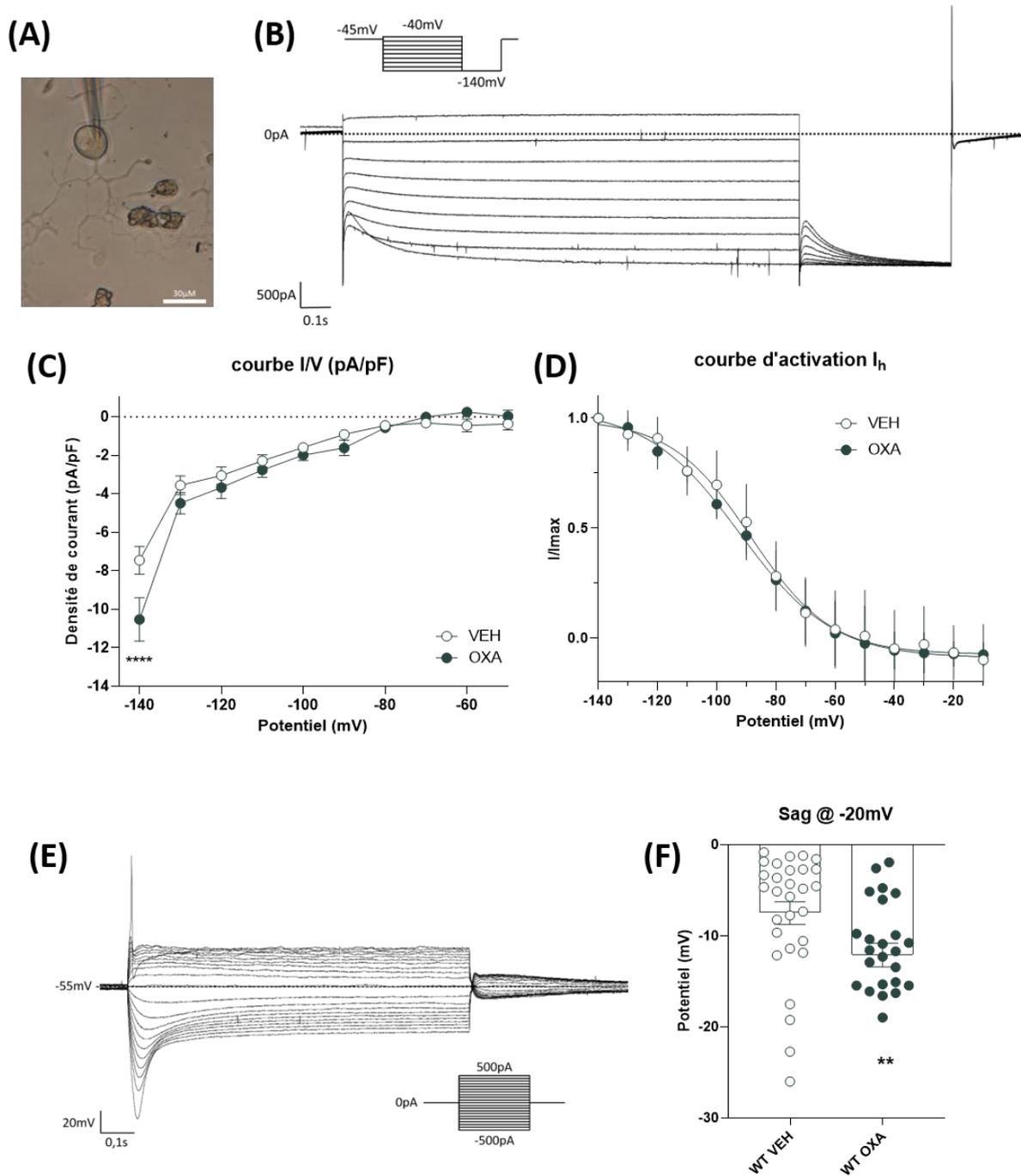
Les données obtenues en biologie moléculaire montrent dans les DRG de notre modèle NPIO aigue, une surexpression des transcrits des canaux HCN1 et HCN2 et une augmentation de la population neuronale TRPA1 exprimant le canal HCN1. Pour compléter ces résultats, nous avons entrepris des expériences d'électrophysiologie et avons étudié l'évolution du courant  $I_h$  dans ce modèle. A l'heure actuelle, les données de la littérature montrent des modifications du courant  $I_h$  (i.e. augmentation de la densité du courant) dans les neurones sensoriels suite à un traitement à l'oxaliplatine administré en chronique chez le rat (Dini et al. 2018 ; Resta et al. 2018). Une autre étude, plus récente, montre également une augmentation de la densité de courant dans des neurones isolés du DRG traités avec  $100 \mu\text{M}$  d'oxaliplatine (Yongning et al. 2021). Toutefois, aucun résultat n'a été publié montrant une évolution du courant chez la souris après une seule injection d'oxaliplatine.

Nous avons souhaité vérifier les paramètres fonctionnels du courant médié par les canaux HCN dans les nocicepteurs du modèle NPIO aigue par l'intermédiaire de la technique de patch clamp appliquée sur des cellules isolées de DRG, selon le protocole en [figure 53](#). Nous nous sommes focalisés sur les neurones de petites et moyennes tailles (potentiellement neurones A $\delta$  et C des fibres nociceptives) que nous avons sélectionné visuellement ([figure 54.A](#)), et en fonction de leur capacitance membranaire (entre 15 et 60pF).



**Figure 53. Protocole de l'étude fonctionnelle**

Fonctionnellement, pour évaluer une variation de canaux HCN membranaire, nous avons calculé la densité de courant  $I_h$  en normalisant l'amplitude du courant par rapport à la capacitance membranaire de chaque neurone enregistré. Aussi, le courant  $I_h$  isolé a été systématiquement obtenu en soustrayant le courant enregistré en présence d'un bloqueur ZD7288 (30 $\mu$ M) au courant entrant total obtenu par un protocole d'hyperpolarisation. En voltage clamp, pour induire l'ouverture des canaux HCN, le potentiel de membrane des neurones a tout d'abord été fixé à  $V_m = -45$ mV (potentiel de jonction de 10mV déduit), puis des sauts hyperpolarisants ont été réalisés, par pas de 10mV entre les potentiels -140mV et -40mV ([figure 54.B](#)). L'amplitude du courant mesurée dans les DRG (courbe IV, [figure 54.C](#)) montre une augmentation significative de la densité de courant  $I_h$  à -140mV ( $p=0.0001$ ) entre les groupes VEH et OXA. Enfin, l'analyse du courant de queue montre des courbes d'activation superposées et des valeurs de demi-activation comparables entre les neurones du groupe VEH (-88.52mV,  $n=7$  cellules) et du groupe OXA (-92.16mV,  $n=7$  cellules) ([figure 54.D](#)). Ainsi, ces données suggèrent une augmentation de la localisation membranaire du canal quatre jours après une injection d'oxaliplatine 6mg/kg, mais pas d'altération de ses propriétés biophysiques puisque la probabilité d'ouverture des canaux HCN ne semble pas modifiée. Concernant la dépolarisation membranaire induite par le flux entrant de cations consécutifs à l'ouverture du canal HCN (saut de -200pA pour  $V_m=-20$ mV), nous observons une augmentation du potentiel, donc de l'amplitude du sag pour le groupe OXA (VEH -  $7.5 \pm 1.2$   $n=29$  ; OXA -  $12.1 \pm 1.3$  ;  $p=0.003$  ;  $n=26$ ) par rapport au groupe VEH.

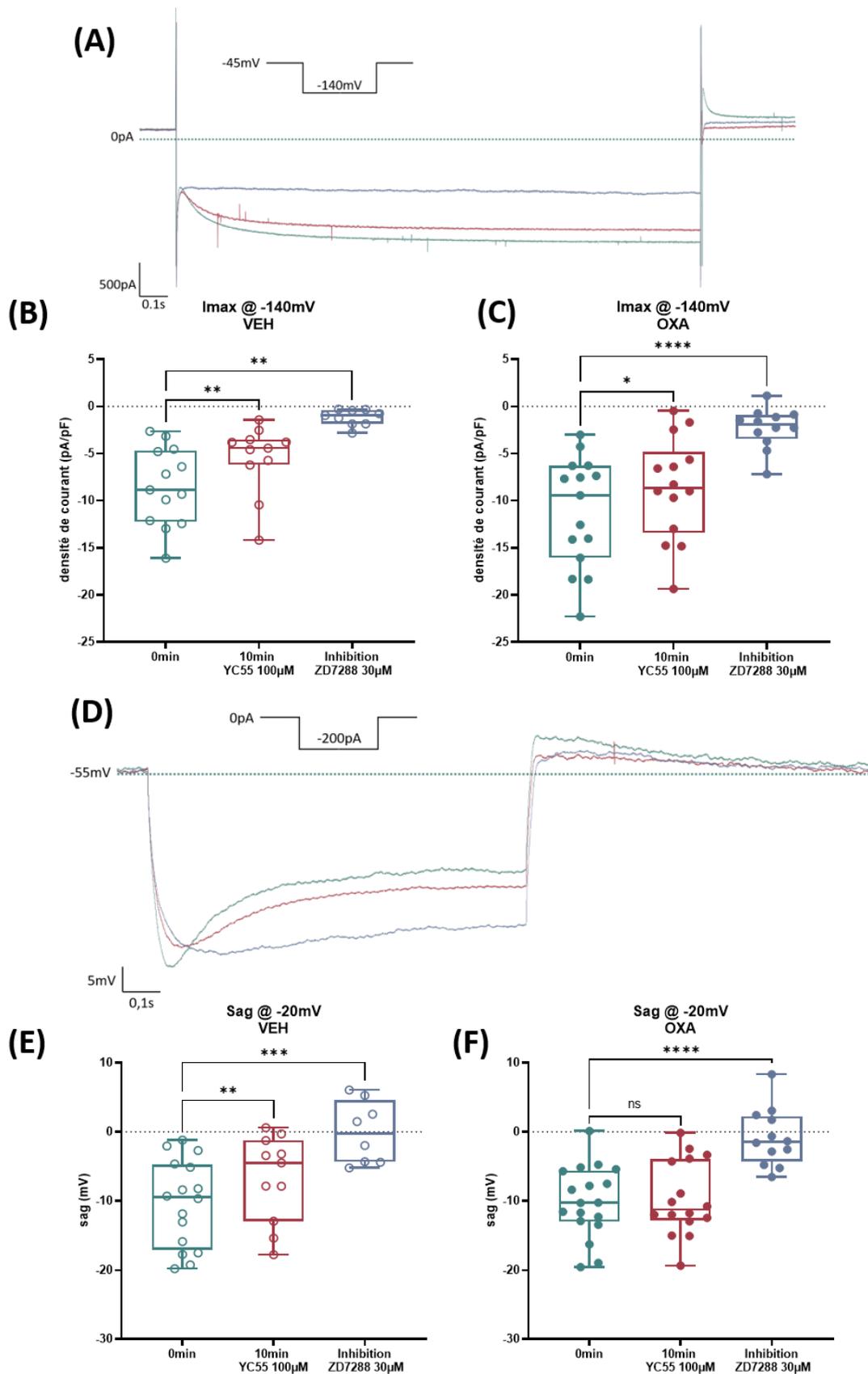


**Figure 54. Fonctions du courant  $I_h$  et du sag dans les neurones de DRG isolés de souris VEH et OXA**

**(A)** Photos d'une cellule isolée patchée **(B)** Représentation d'une trace de courant  $I_h$  enregistrée dans les petits et moyens neurones des cellules isolées de DRG de souris VEH **(C)** Comparaison de la densité de courant entre -50mV et -140mV **(D)** Comparaison de la courbe d'activation du canal entre des souris VEH et OXA **(E)** Représentation d'une trace de sag membranaire induit par l'hyperpolarisation dans les petits et moyens neurones des cellules isolées de DRG de souris OXA **(F)** Comparaison du sag à -20mV entre souris VEH et OXA

(\*\*\*\*>0.001, 2way Anova, Sidak post-hoc ; \*\*>0.01, mann whitney test)

Pour explorer fonctionnellement le mécanisme d'action de YC55 sur l'interaction HCN-TRIP8b, nous avons complété notre étude électrophysiologique avec des enregistrements du courant  $I_h$  et du sag en présence du composé à une concentration de  $100\mu\text{M}$  (10X environ le  $K_d$  mesuré). Ces tests ont également été réalisés sur des neurones de petite et moyenne taille de DRG prélevés chez la souris VEH et OXA. Après stabilisation du courant  $I_h$  pendant 3 à 5 minutes, YC55 ou NaCl a été ajouté à la solution extracellulaire et le courant a été enregistré toutes les minutes pendant 10 minutes. Sur la [figure 55.A](#), nous avons représenté un courant obtenu par saut hyperpolarisant à  $-140\text{mV}$  (vert) qui montre un blocage partiel de  $I_h$  en présence de YC55 (rouge), puis un blocage complet après administration de ZD7288 ( $30\mu\text{M}$ ) pendant 3 minutes (bleu). Nous avons mesuré l'amplitude du courant  $I_h$  dans les neurones VEH et OXA dans ces conditions ([figure 55.B-C](#)). Pour les neurones issus de DRG VEH et OXA, nous avons observé une absence d'effet du NaCl sur le courant  $I_h$  (*données supplémentaires en annexe 5, figure supp. 1*). En revanche, par rapport au temps 0 minutes chez les souris OXA, nous observons une diminution significative du courant  $I_{\text{max}}$  par le composé YC55 de 23% ( $n=14$  cellules) tandis que le ZD7288 bloque significativement 79% du courant ( $n=12$  cellules) (YC55  $p=0.03$  par rapport à  $T_0\text{min}$ ; ZD7288  $p<0.0001$  par rapport à  $T_0\text{min}$ ) ([figure 55.C](#)). Concernant le sag ([figure 55.D](#)), nous observons une réduction significative de son amplitude après une incubation de 10 minutes de YC55 pour les cellules provenant d'animaux VEH, par rapport à  $T_0$  ( $T_0 -10.4\pm 1.6$ ;  $T_{10}$  YC55  $-6.7\pm 1.8$ ;  $p=0.0059$ ;  $n=11$ ) ([figure 55.E](#)). Toutefois, cet effet est perdu chez les souris OXA ( $T_0 -10.10\pm 1.1$ ;  $T_{10}$  YC55  $-9.56\pm 1.3$ ;  $p=0.8$ ;  $n=16$ ) ([figure 55.F](#)).



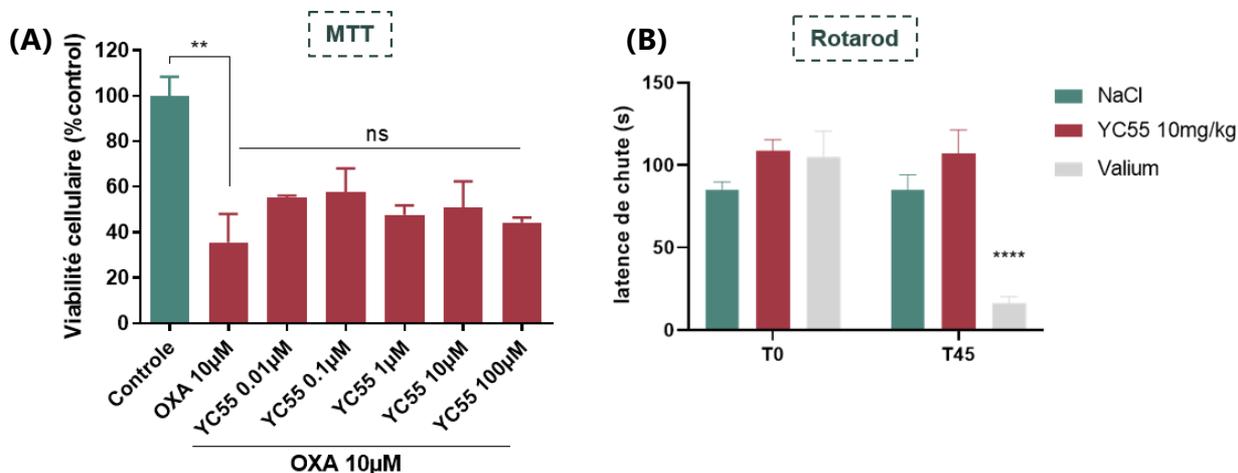
**Figure 55. Effet pharmacologique du peptide YC55 sur la fonction du canal  $I_h$  et sur les propriétés membranaires des nocicepteurs des DRG**

**(A)** Trace representative du courant  $I_h$  avec application pendant 10 minutes du peptide YC55 (rouge), ou du NaCl (vert), ou pendant 3 minutes de ZD7288 (bleu). Courant maximum d'action à -140mV chez les souris **(B)** VEH ou souris **(C)** OXA. **(D)** Trace representative du courant membranaire induit par l'hyperpolarisation. **(E)** Mesure de l'amplitude du sag chez la souris VEH et **(F)** OXA ( $* > 0.05$ ,  $** > 0.01$ ,  $*** < 0.001$ ,  $**** < 0.0001$ , 1Way Anova mesures répétées)

## 5. Innocuité du peptoïde

Dans la perspective d'une application clinique de notre stratégie pour le traitement symptomatique des NPIO aiguës, nous avons vérifié l'innocuité de YC55 (0.01µM-100µM) sur l'effet cytotoxique produit par l'oxaliplatine (10µM) sur une lignée immortalisée HT29 d'adénocarcinome colorectal par l'intermédiaire d'un test MTT (*figure 56.A*). Dans ces cellules, nous avons montré que les canaux HCN sont présents, les transcrits de TRIP8b ne sont quant à eux pas exprimés (*données supplémentaires de RT-qPCR en annexe 5, figure supp. 2*). Nous observons 48h heures après le traitement des cellules l'effet cytotoxique attendu de l'oxaliplatine la viabilité cellulaire étant diminuée de 64.4% par rapport au contrôle ( $p=0.0049$ ). En présence d'une dose croissante de YC55, la viabilité est inchangée ; en effet, à la dose la plus élevée (100µM) nous mesurons une viabilité de  $44.30\pm 2.1\%$ . Le peptoïde n'interfère donc pas sur l'effet antiprolifératif de l'oxaliplatine sur les cellules HT29.

Enfin, nous voulions vérifier si l'effet antalgique de YC55 n'était pas dû à un effet indésirable sédatif de la molécule (*figure 56.B*). Nous avons évalué les fonctions motrices des animaux traités aux YC55 à la dose la plus élevée (10mg/kg) par le test du rotarod, 45 minutes après l'injection, en comparaison avec le valium dosé à 2.5mg/kg, une molécule anxiolytique avec propriété sédatrice. Le valium diminue significativement la latence de chute ( $16.43\pm 3.8s$  ;  $p<0.0001$ ,  $n=8$ ), en comparaison du groupe NaCl ( $85\pm 9s$ ), et le peptoïde n'a pas eu d'effet sédatif sur les souris (*latence* :  $107\pm 14.4s$ ).



**Figure 56. Vérification de l'innocuité du peptoïde *in vitro* et *in vivo***

(A) La viabilité cellulaire des cellules HT29 immortalisées de cancer colorectal en présence d'une concentration croissante de YC55 (0-100µM) et d'oxaliplatine 10µM a été évaluée par MTT à 48h d'incubation ( $n=3$ ). (B) Les fonctions motrices des souris traitées YC55 et Valium ont été évaluées par le rotarod. (\*\* $>0.01$ , \*\* $>0.001$ , 1Way Anova)

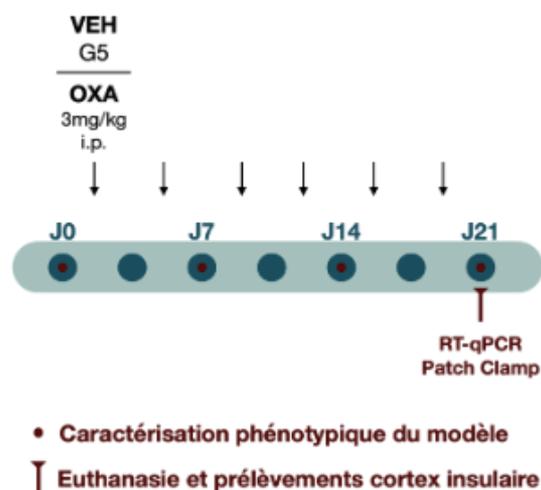
L'ensemble de ces données montrent l'intérêt de cibler l'interaction HCN-TRIP8b dans les symptômes associés à la NPIO aiguë. Notre stratégie consistant à rompre cette interaction par l'intermédiaire de peptides mimant le domaine TPR produit un effet antalgique spécifique et dose-dépendante, sans induire d'effet secondaire.



## - CHAPITRE 3 -

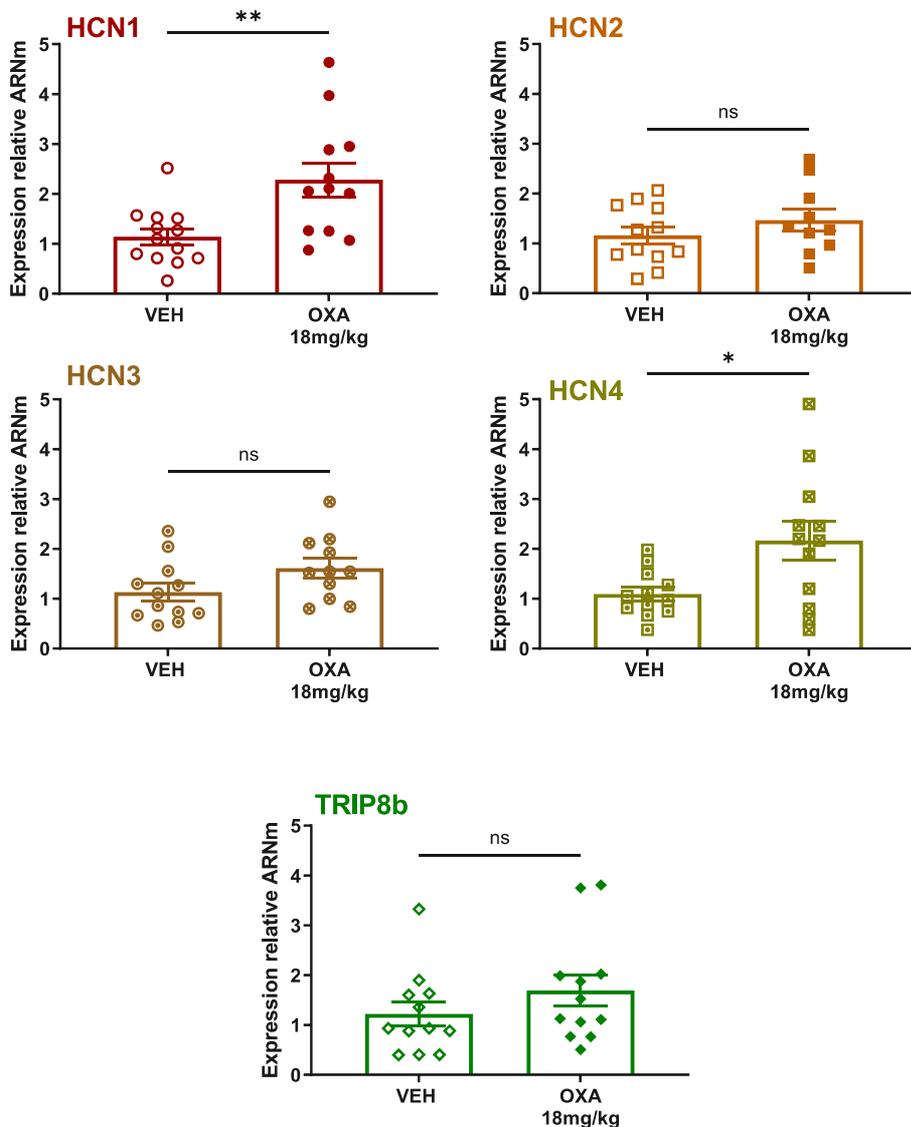
# Investigation de la contribution centrale du complexe HCN-TRIP8b dans la NPIO chronique

Des données publiées de RNAseq suggèrent une absence de changement d'expression dans les DRG de HCN et de TRIP8b dans un modèle de NPIO chronique (dose cumulée 18mg/kg, Lamoine et al. 2021). Des études relatant l'implication de mécanismes centraux dans la chronicisation de la douleur sont émergentes dans la littérature (Phillips et Clauw 2011; Finnerup, Kuner, et Jensen 2021). De plus, la surexpression des transcrits de HCN2 dans la CDME de rats NPIO chroniques (dose cumulée 32 mg/kg) mesurée par l'équipe de Liu en 2018 conforte l'hypothèse d'une contribution centrale de ces canaux dans le maintien de la douleur neuropathique induite par oxaliplatine (X. Liu et al. 2018). A ce jour, aucune étude transcriptomique n'informe sur les changements d'expression au niveau supra-spinal d'un modèle NPIO chronique. Toutefois, des données non publiées de notre laboratoire montrent une surexpression de l'ARNm codant HCN4 dans plusieurs structures du cerveau, dont le cortex insulaire. Notre premier objectif a donc été d'investiguer la participation centrale de HCN et TRIP8b dans le modèle NPIO chronique publié par l'équipe, dont la caractérisation phénotypique a été notre second objectif (*timeline suivi pour ce chapitre en figure 57*) (Lamoine et al. 2021). Ce modèle d'injections répétées d'oxaliplatine consiste en six administrations i.p. à 3mg/kg, à raison de 2 deux par semaine, pendant 3 semaines. La dose cumulée d'oxaliplatine administrée à J21 étant de 18mg/kg.



**Figure 57. Plan d'expérimentation du modèle NPIO chronique**

Pour ce premier objectif, nous nous sommes concentrés sur une structure spécifique du cerveau, le cortex insulaire, du fait de son rôle dans les modalités sensorielle et émotionnelle de la douleur et dans l'intégration corticale de la perception du froid (Craig et al. 2000; Bokinjec et al. 2022; Vestergaard et al. 2023). Nous avons étudié l'expression de l'ensemble des isoformes des canaux HCN ainsi que les transcrits de TRIP8b dans les cortex insulaire droit et gauche par RT-qPCR à J21 (*figure 58*). Nous constatons une augmentation significative des isoformes HCN1 et HCN4, leur expression relative ayant doublé (*HCN1 VEH : 1.1±0.2 ; OXA chronique : 2.3±0.3 / HCN4 VEH : 1.1±0.1 ; OXA chronique : 2.2±0.4 ; test Mann-Whitney*). Les niveaux de *HCN2*, *HCN3*, et *TRIP8b* n'ont quant à eux pas été modifiés par le traitement OXA 18mg/kg.



**Figure 58. Quantification transcriptionnelle des 4 isoformes HCN et TRIP8b**

Les niveaux de transcrits HCN1, HCN2, HCN3 et HCN4 ont été mesurés par RT-qPCR dans le cortex insulaire droit + gauche des souris VEH ou OXA prélevé à J21.

(\*>0.05, \*\*>0.01, test Mann-Whitney, n=10-12)

## 1. Expression des transcrits HCN-TRIP8b dans le cortex insulaire

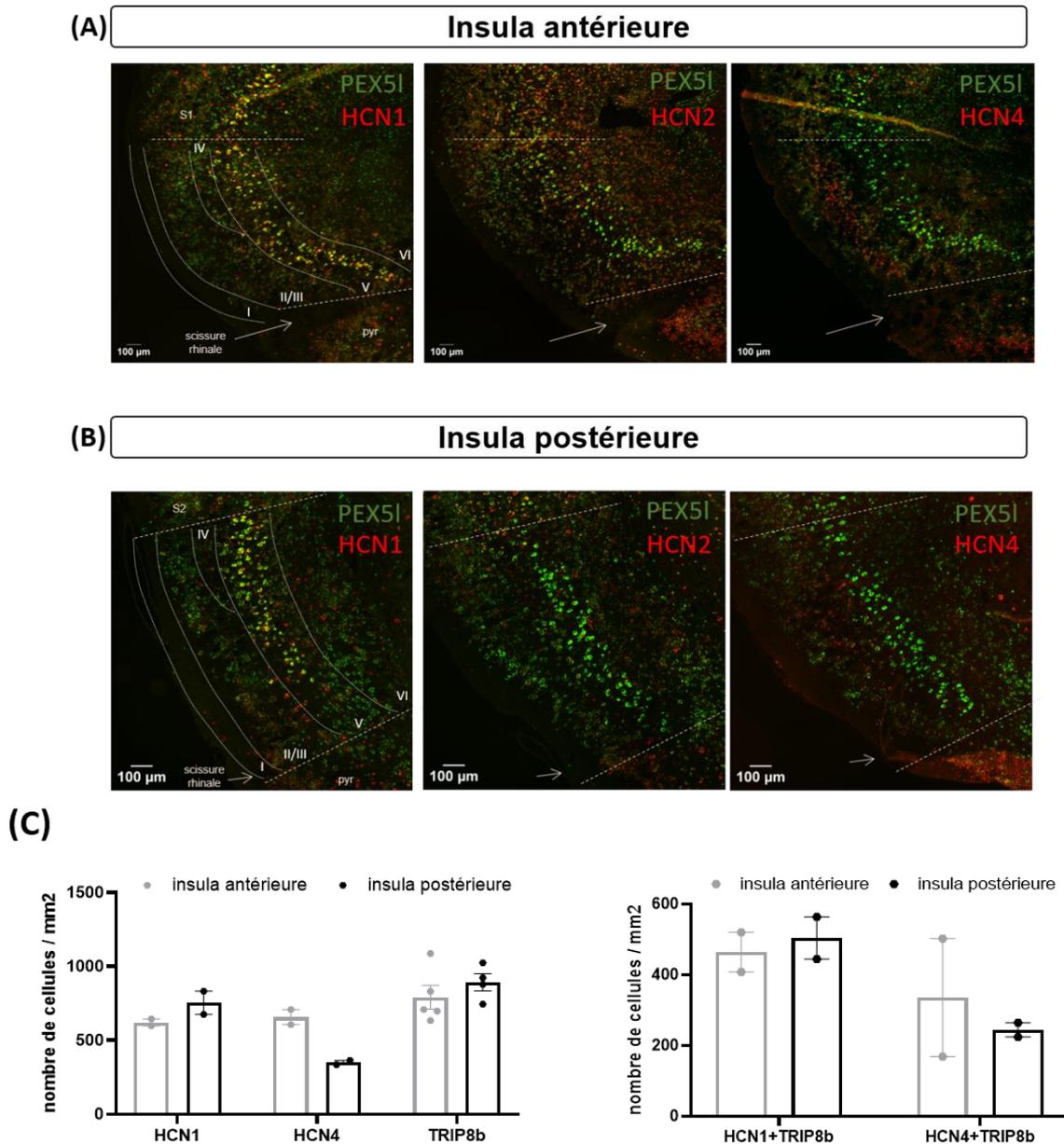
Au sein des tissus nerveux centraux, la coexpression de HCN1-TRIP8b, HCN2-TRIP8b et HCN4-TRIP8b a été mise en évidence dans le soma des neurones du cortex S2 et dans les noyaux du thalamus (Zobeiri et al. 2018). Compte tenu des résultats obtenus en RT-qPCR, nous avons vérifié la coexpression de HCN1, HCN2 et HCN4 avec l'ARNm de TRIP8b dans l'insula de souris naïve. Chez le rongeur, c'est une région corticale située entre le cortex pyriforme et le cortex somato-sensoriel selon l'axe proximo-distal. Cette structure se divise en insula antérieure et postérieure. Les informations nociceptives intégrées dans chacune de ces deux divisions diffèrent puisque la région antérieure traite majoritairement l'émotion associée à la douleur, alors que la postérieure a un rôle dans l'intégration sensorielle et notamment la perception de la température. De ce fait, il était intéressant de caractériser l'expression des transcrits *HCN-TRIP8b* séparément selon la région. Pour cela, nous avons eu la même stratégie que pour les neurones périphériques, celle d'utiliser l'hybridation *in situ* par RNAscope®. Elle a été réalisée sur coupes de cerveau entier de souris comprenant le cortex insulaire et sélectionnée à l'aide des coordonnées stéréotaxiques de l'atlas du cerveau de souris (The Mouse Brain in Stereotaxic coordinates, Franklin et Paxinos, 2<sup>nd</sup> Ed.) (*Exemple en annexe 6*). Les photos ont été prises spécifiquement au niveau de l'insula antérieure (*figure 59.A*) et l'insula postérieure (*figure 59.A*), et les comptages des neurones exprimant les canaux HCN et TRIP8b ont été réalisés sur toutes les couches du cortex insulaire.

Le marquage fluorescent des transcrits *TRIP8b* a été superposé aux marquages de *HCN1*, *HCN2* et *HCN4*. Nous observons une distribution des transcrits *HCNs* différentes en fonction des couches corticales de l'insula antérieure et postérieure, représentées sur la *figure 59*. Dans ces régions, *HCN1* semble davantage exprimé par les cellules de la couche V, tandis que l'expression de *HCN4* semble majoritaire dans les couches superficielles II/III. Quant à *HCN2*, son expression est largement présente dans l'ensemble des couches de la région insulaire antérieure et postérieure ; de même que pour l'ARNm de *TRIP8b* qui semble avoir une expression homogène. À noter qu'un marquage intense est observé dans la couche V, correspondant à davantage d'expression des transcrits par cellule.

Nous avons montré plus tôt la surexpression de HCN1 et HCN4 dans le cortex insulaire de NPIO chronique. Bien que nous visualisions une coexpression remarquable des ARNm de *HCN1* et *TRIP8b* dans les couches profondes de l'insula antérieure et postérieure (*figure 59.A-B*), nous avons souhaité quantifier ces expressions afin d'avoir une idée précise et chiffrée des co-expressions de HCN1-TRIP8b et HCN4-TRIP8b. Un comptage manuel a été réalisé (*figure 59.C*) sur ces coupes et nous avons fait le choix de quantifier selon une région d'intérêt exprimée en mm<sup>2</sup>. Pour HCN1 et HCN4 respectivement, nous avons mesuré 621.1±23/mm<sup>2</sup> et 656.8±51.6/mm<sup>2</sup> cellules positives dans l'insula antérieure et 753.2±78.1/mm<sup>2</sup> et

## DONNÉES EXPÉRIMENTALES

349.3±14.9/mm<sup>2</sup> dans l'insula postérieure. Les transcrits de TRIP8b ont été comptés dans 791.3±80.6 cellules par mm<sup>2</sup> de l'insula antérieure, et 892.3±58.1/mm<sup>2</sup> de l'insula postérieure. Ces résultats nous ont permis de déterminer un niveau de coexpression plus important pour HCN1-TRIP8b dans le cortex antérieur et qui est doublé dans le cortex postérieur par rapport à HCN4-TRIP8b (503.6±59.4 vs 544±20.1/mm<sup>2</sup>).



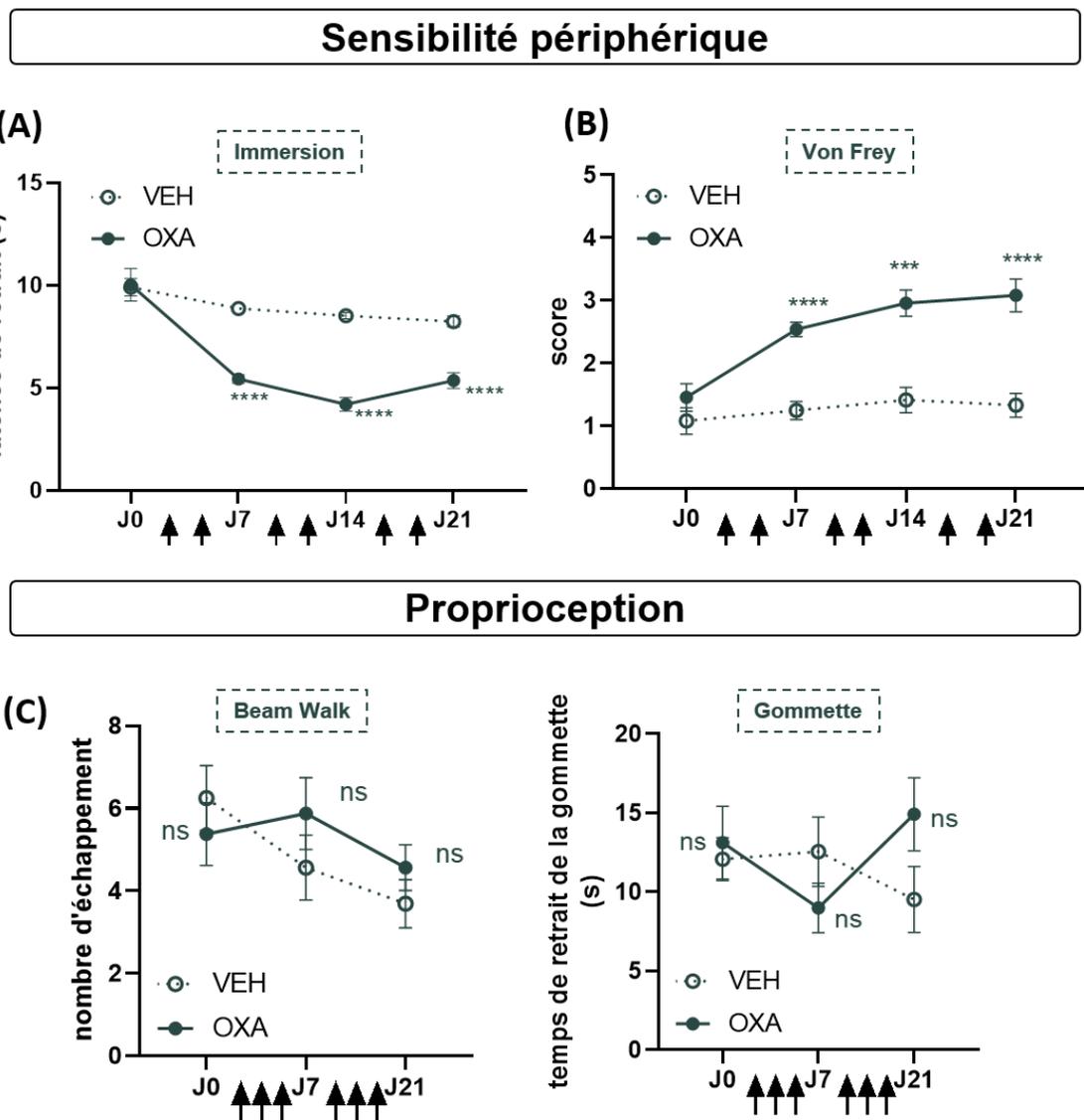
**Figure 59. Distribution de l'ARNm dans le cortex insulaire de souris naïve**

Photos (20x) représentatives de l'hybridation *in situ* par RNAscope pour la coexpression des gènes TRIP8b en vert, HCN1 ou HCN2 ou HCN4 en rouge (A) dans le cortex insulaire antérieur (Bregma 1.10mm) et (B) dans le cortex insulaire postérieur (Bregma -0.30mm). (C) quantification du nombre de cellules par mm<sup>2</sup> selon la région d'intérêt.

Les barres d'échelle correspondent à 100 μm.

## 2. Caractérisation phénotypique du modèle chronique

Les traitements répétés d'oxaliplatine induisent chez les patients une persistance des symptômes sensoriels, une dysfonction de la proprioception, une installation de troubles moteurs, ainsi que des troubles cognitifs et des comorbidités associées comme l'anxiété et la dépression. Nous avons donc souhaité évaluer la symptomatologie induite par les doses cumulées d'oxaliplatine chez la souris, selon le modèle NPIO détaillé plus haut (figure 60). Nous avons effectué une batterie de tests comportementaux. **La sensibilité mécanique et thermique** des souris est vérifiée à J0, J7, J14 et J21 par les tests de von Frey et d'immersion de la patte au froid, respectivement (figure 60.A).



**Figure 60. Tests évaluant la sensibilité périphérique et la proprioception au cours des 6 injections d'oxaliplatine à 3mg/kg**

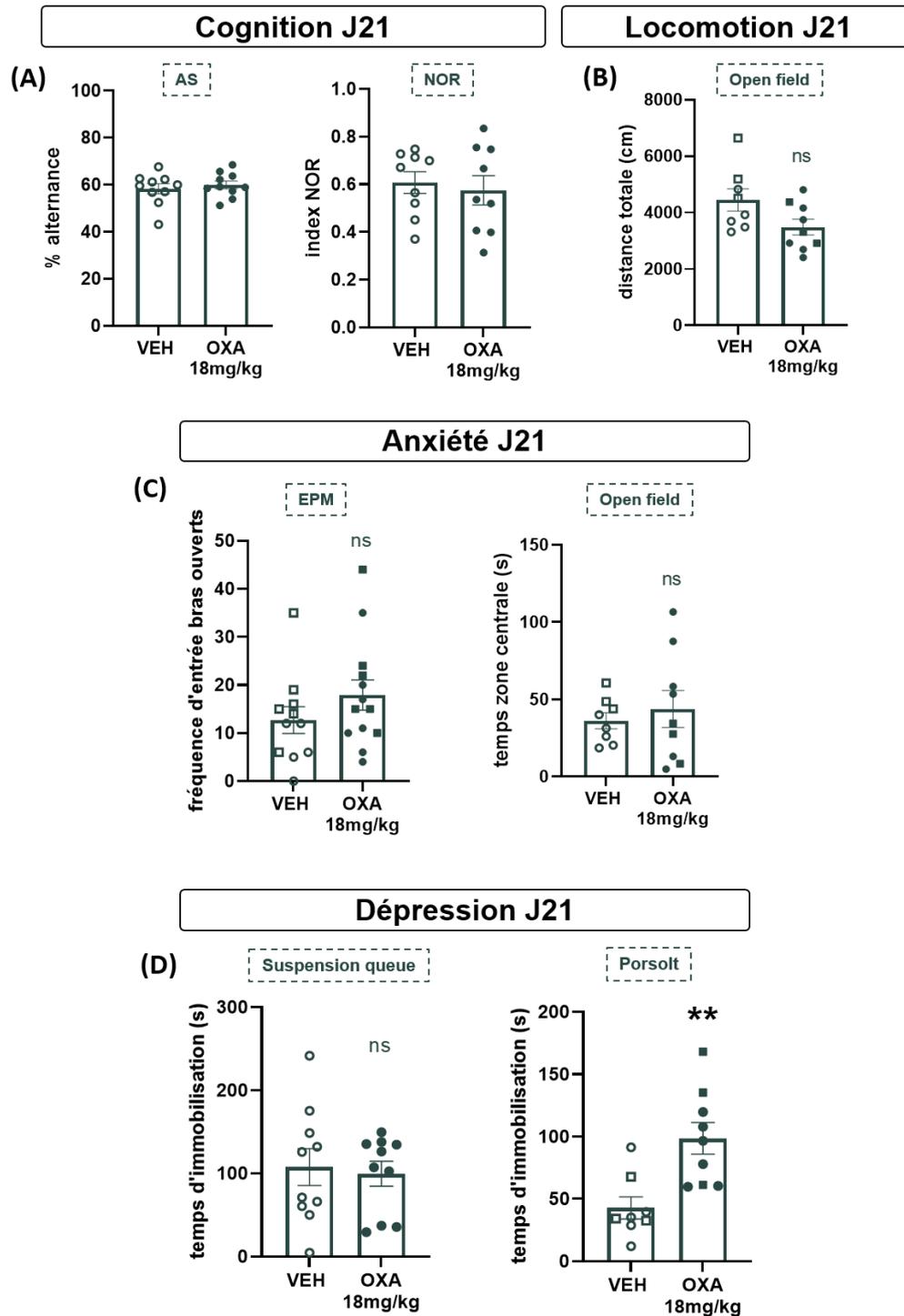
La sensibilité périphérique des souris VEH et OXA a été vérifiée à J0, J7, J14 et J21 par (A) le test d'immersion 10°C et (B) par le test de Von frey. (C) La proprioception a été analysée à J0, J7 et J21 par le nombre d'échappement au beam walk et par le temps de retrait d'une gommette déposée sur la patte (\*\*\*\*>0.0001, two way Anova, n=12)

Les souris développent une hypersensibilité au froid dès le 7<sup>ème</sup> jour après 2 injections qui persiste jusqu'à 21 jours (après 6 injections). A J14, les souris VEH ont une moyenne de latence à  $8.5 \pm 0.1s$ , contre  $4.2 \pm 0.3s$  pour les souris OXA ( $p=0.0001$ , *2Way Anova*, *Sidak post-hoc*). Des résultats similaires ont été démontrés pour la sensibilité mécanique, qui s'installe à J7 et persiste jusqu'à J21, où le score est le plus élevé (VEH :  $1.33 \pm 0.2$  ; OXA :  $3.10 \pm 0.3$ ,  $p < 0.0001$ , *2Way Anova*, *Sidak post-hoc*) (*figure 60.B*). Les tests évaluant la **proprioception** (*figure 60.C*) par le test de Beam Walk et le test de la gommette n'ont pas révélé de différence significative entre le groupe VEH et OXA au cours du temps. Un phénomène d'apprentissage a été observé pour le test du Beam Walk, où le nombre d'échappement diminue au fur et à mesure des passages (J0 :  $6.2 \pm 0.8$  J21 :  $3.7 \pm 0.6$ ), au même titre que l'augmentation du temps de passage sur la poutre.

Les **fonctions cognitives** trois semaines après la première injection (J21), correspondant à une dose cumulée d'oxaliplatine de 18mg/kg, ont été évaluées en utilisant le test du NOR ainsi que par la mesure de l'alternance spontanée (AS) dans le test du labyrinthe en Y (*figure 61.A*). Les administrations répétées d'oxaliplatine n'ont pas altéré la mémoire à court terme de reconnaissance d'objet (*index NOR VEH* :  $0.61 \pm 0.04$  ; *OXA* :  $0.57 \pm 0.06$ ) ni la mémoire de travail puisque les pourcentages d'alternance entre les souris VEH ( $58.4 \pm 2.1\%$ ) et les souris OXA ( $60 \pm 1.6\%$ ) sont similaires ( $p=0.8$ ).

Par ailleurs, les **fonctions motrices** semblent préservées, comme en témoigne les distances parcourues pendant 15 minutes dans l'open field entre les souris VEH ( $4451 \pm 391cm$ ) et OXA ( $3485 \pm 277cm$ ) ( $p=0.06$ ) (*figure 61.B*). Les comorbidités de type **anxiété** ont été évaluées et nous n'observons pas de différence dans les paramètres mesurés, autant dans la fréquence d'entrée dans les bras ouverts de l'EPM ( $p=0.23$ ) que dans le temps passé dans la zone centrale de l'open field ( $p=0.6$ ), ces deux zones étant considérées comme anxiogènes pour l'animal (*figure 61.C*).

Finalement, le **comportement de type dépressif** a été évalué par deux tests comportementaux, la nage forcée et la suspension de l'animal par la queue. Le temps d'immobilisation mesuré durant ces deux tests reflète l'abandon, la résignation des souris. Ce temps est significativement plus élevé chez les souris OXA à J21 pendant la nage forcée (VEH :  $42.7 \pm 8.8s$  ; OXA :  $98.5 \pm 12.7s$  ;  $p=0.0031$ , *unpaired t test*), alors qu'il est statistiquement inchangé lors de la suspension par la queue ( $p=0.8$ ) (*figure 61.D*). À savoir que les tests de locomotion, d'anxiété et de dépression ont été réalisés sur les deux sexes, et que nous n'avons pas observé de dimorphisme sexuel significatif chez ce modèle NPIO chronique.



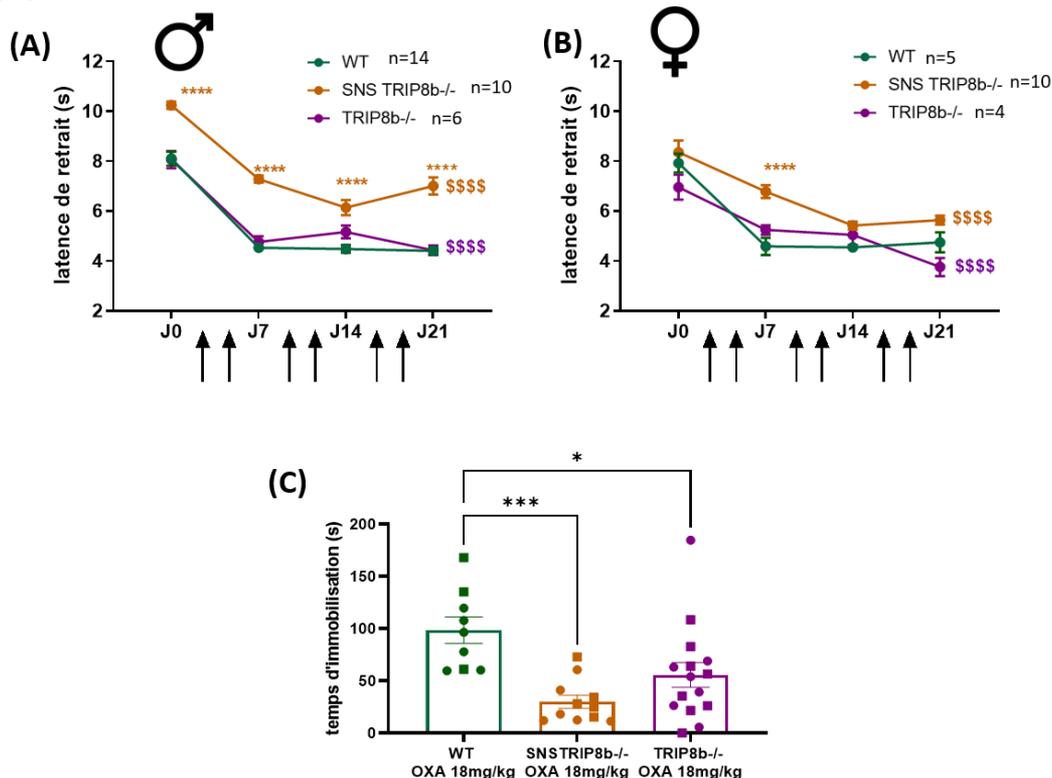
**Figure 61. Batterie de tests d'évaluation de la locomotion et du comportement cognitivo-émotionnel à J21 avec une dose cumulée de 18mg/kg d'oxaliplatine**

A J21 chez les souris VEH et OXA (dose cumulée de 18mg/kg) **(A)** la cognition par le test de l'Alternance Spontanée (AS) et le Novel Objectif Recognition (NOR) a été évaluée **(B)** la locomotion dans un open field a été vérifiée. Ont été caractérisées les comorbidités telles que **(C)** l'anxiété par l'Elevated Plus Maze (EPM) et l'open field et **(D)** la dépression par le test de la suspension de la queue et le test de Porsolt ou nage forcée (\*\*>0.01, unpaired t test, n=3-8 ♂(ronds) et ♀(carrés))

L'implication de TRIP8b dans l'hypersensibilité thermique au froid induite par l'oxaliplatine a été démontré dans le modèle NPIO aigue. Pour vérifier son implication dans les phénotypes caractéristiques de notre modèle NPIO chronique, nous avons induit le modèle chez des souris mâles (*figure 62.A*) et femelles (*figure 62.B*) TRIP8b<sup>-/-</sup> et des souris SNS<sup>TRIP8b</sup>

et nous avons mesuré l'hypersensibilité thermique au froid et le comportement de type dépressif évalués chez les souris WT. Chez les mâles, nous observons à nouveau une hyposensibilité basale (J0) des souris SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> qui n'est pas retrouvée chez les femelles. Après les deux premières injections d'oxaliplatine à 3mg/kg, la sensibilité au froid est significativement plus faible chez les femelles et mâles SNS par rapport au WT, alors qu'elle est comparable entre les WT et TRIP8b<sup>-/-</sup>. Chez les mâles SNS la sensibilité est significativement plus basse tout au long du protocole ( $p < 0.0001$ ), mais pas chez les femelles. De manière générale, nous observons un effet de l'oxaliplatine sur la sensibilité thermique entre J0 et J21 (\$\$\$\$ $< 0.0001$ ) pour les trois génotypes et les deux sexes.

Nous avons observé un comportement de type dépressif chez les souris NPIO chronique WT et nous avons pu apprécier le phénotype désinhibé des souris TRIP8b<sup>-/-</sup> qui avait déjà été montré par l'équipe de Chetkovitch (Lewis et al. 2009). Ce type de comportement a été évalué pour les trois génotypes dans notre étude. Nous observons une résignation significativement plus faible ( $55.9 \pm 11.9s$  ;  $p = 0.0210$ , 1Way Anova) pour les souris KO, par rapport aux souris WT ( $98.5 \pm 12.7s$ ) (figure 62.C). Cette différence est plus importante chez les souris SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> ( $p = 0.0006$ , 1Way Anova). Ce comportement ne montre pas de différence intersexe.

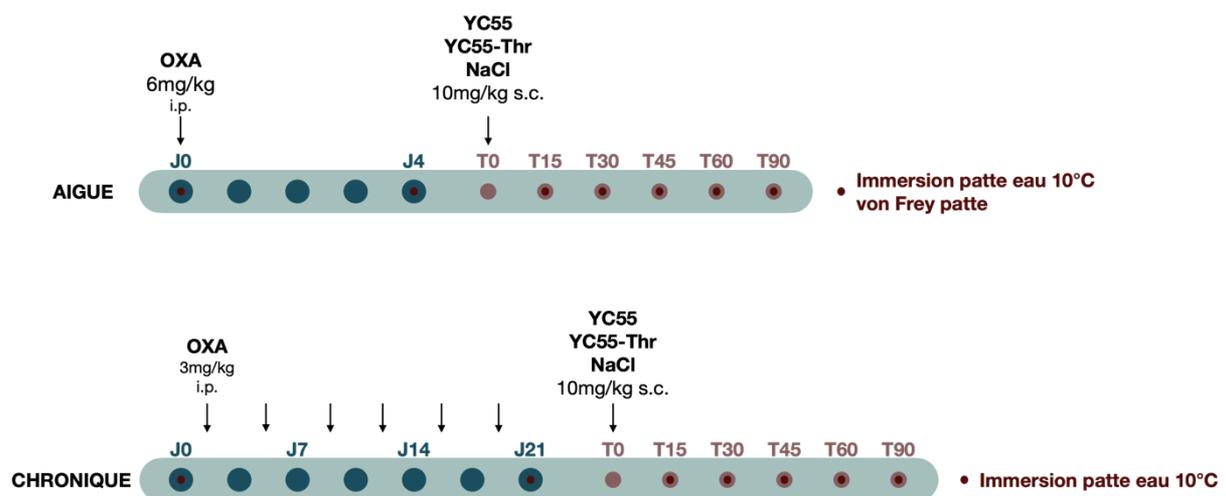


**Figure 62. Effet de dose répétées d'oxaliplatine sur la sensibilité thermique et la dépression du modèle NPIO chronique**

La sensibilité périphérique a été mesurée par l'immersion à 10°C chez (A) les mâles et (B) les femelles de souris SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> et TRIP8b<sup>-/-</sup> par rapport à des souris *littermate*  
 (C) L'état de type dépressif est évalué par la nage forcée à J21 pour les trois génotypes  
 (\* $> 0.05$ , \*\*\* $> 0.001$ , \*\*\*\* $> 0.0001$  vs WT ; \$\$\$ $> 0.0001$  J0 vs J21 ; 2way Anova ou 1way Anova  
 $n = 3-7$  ♂ (ronds) et ♀ (carrés)

### 3. Stratégie de vectorisation du peptoïde

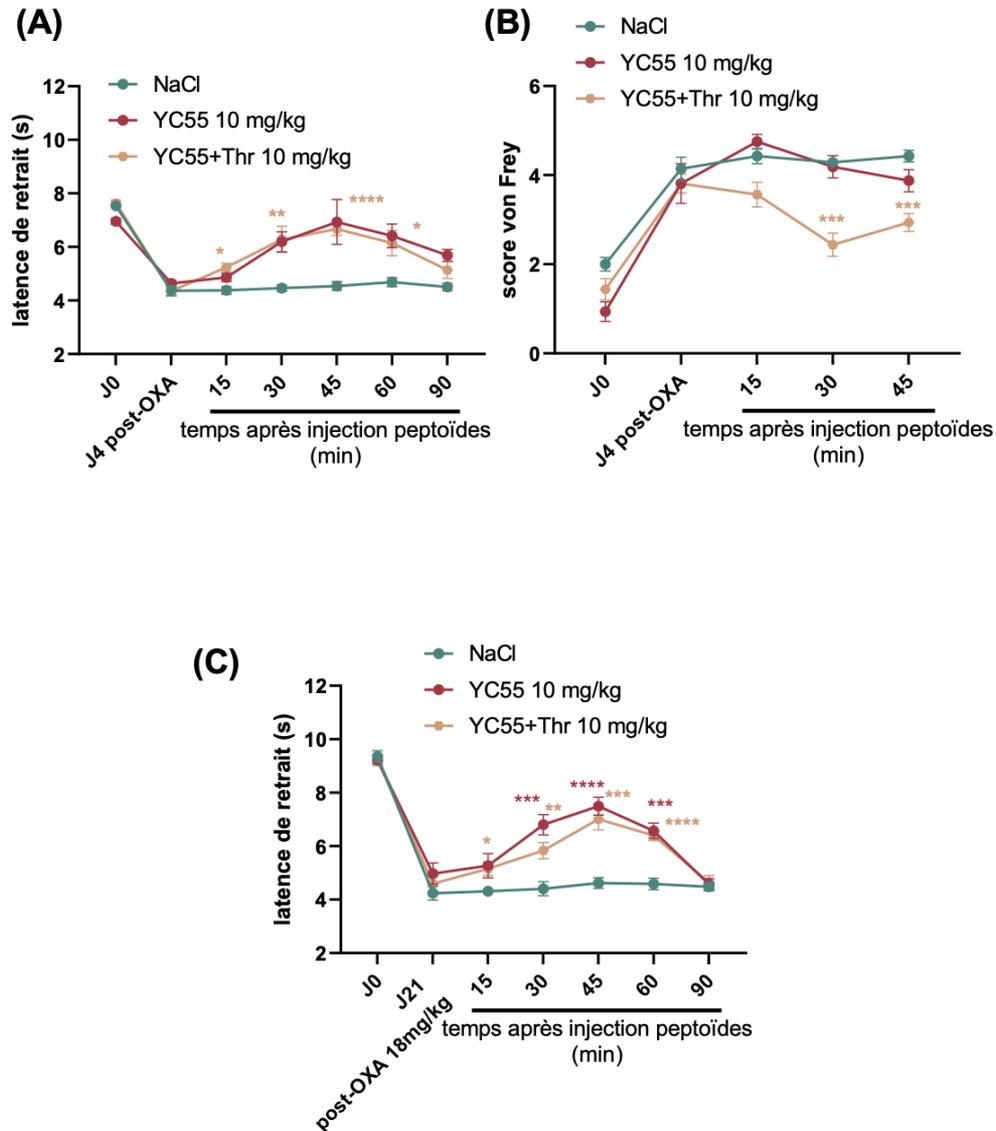
Les données de **biodistribution** du peptoïde YC55 décrites dans le 2<sup>ème</sup> chapitre des données expérimentales (*figures 51 et 52*) suggèrent un faible passage de la BHE puisque sa concentration dans le cerveau est très faible (110nM à T45min). Nous avons par ailleurs mesuré une surexpression dans le cortex insulaire, des canaux HCN1 et HCN4 en condition OXA. Pour tester l'efficacité de notre composé sur le modèle NPIO chronique, nous avons donc opté pour une stratégie de vectorisation du YC55. En effet, des vecteurs ont été développés et commercialisés pour délivrer sélectivement des médicaments dans le système nerveux central (*CPP ou Cell Penetrating Peptides*). Parmi eux, le peptide THR de 12 acides aminés (H-THRPPMWSPWP-NH<sub>2</sub>), qui cible le récepteur à la transferrine est présent dans les vaisseaux sanguins cérébraux a été indiqué dans la littérature comme outil de passage de la BHE (Díaz-Perlas et al. 2018). Les chimistes ont synthétisé un conjugué de YC55 avec le peptide commercial THR, en utilisant une méthodologie identique à celle utilisée pour produire YC55-Biotine. Ce peptide a été injecté dans le modèle NPIO aigue et chronique selon les protocoles *figure 63*. Son effet a été comparé à celui du YC55 seul (dose 10mg/kg) et le NaCl.



**Figure 63. Protocole suivi pour l'essai pharmacologique du peptoïde vectorisé**

Comme attendu, le peptoïde YC55 montre un effet antalgique sur l'hypersensibilité au froid du modèle NPIO aigue, absent pour l'hypersensibilité mécanique (*figure 64.A-B*). De manière intéressante, le peptoïde conjugué évoque le même effet sur la sensibilité thermique (*figure 64.A*), et induit également une diminution de la sensibilité mécanique évaluée par le test de von Frey, significativement dès T30min après injection, jusqu'à T45min (*T45, score NaCl : 4.43±0.13 ; YC55+THR : 2.93±0.2, p=0.0001, 2Way Anova, Tukey post-hoc*) (*figure 64.B*). Nous avons testé l'action de YC55 dans le modèle NPIO chronique avec une administration unique à J21 (*figure 64.C*). Nous observons également une augmentation du temps de retrait de la patte dès T30min, correspondant à un soulagement de l'hypersensibilité thermique, qui persiste pendant 30 minutes. Le pic d'effet se situe à T45, avec une moyenne

de latence pour le groupe YC55 à  $7.5 \pm 0.3s$ , contre  $4.6 \pm 0.2s$  pour le groupe NaCl ( $p < 0.0001$ , 2way Anova, Tukey post-hoc). Après l'injection du peptide vectorisé Thr, nous observons un effet similaire avec toutefois un effet analgésique significatif présent dès 15 minutes post-injection ( $p = 0.0474$ ) (figure 64.C).



**Figure 64. Essai pharmacologique du peptide YC55 couplé Thr sur la NPIO aigue et chronique**

(A) Latence de retrait de la patte dans un bain à 10°C des souris OXA aigue (6mg/kg) avec administration (s.c) à J4 du YC55 (10mg/kg) et du conjugué, comparé au NaCl, et (B) le score Von frey de ces souris. (C) Latence de retrait en secondes de la patte des souris OXA chronique (6x3mg/kg) avec le traitement du peptide YC55 (10mg/kg) et le conjugué Thr. (\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ , \*\*\*\* $<0.0001$ ;  $n=8$ ; 2way Anova, Sidak post-hoc)

# DISCUSSION & PERSPECTIVES



L'exploration des mécanismes impliqués dans la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine est au centre de mes travaux de thèse. Nous avons voulu mieux comprendre l'interaction entre le canal HCN et sa protéine partenaire TRIP8b dans les nerfs périphériques et dans le cortex insulaire. Nous avons exploré leur implication dans la NPIO modélisée chez l'animal, dans le but *in fine* de proposer un composé perturbateur de cette interaction protéine-protéine comme traitement innovant des douleurs neuropathiques.

Ces grands axes de recherche ont suscité des questionnements quant aux modèles animaux utilisés et les mécanismes associés dans la genèse de la douleur neuropathique et sa persistance chez l'animal, puis finalement sur les mécanismes d'action pharmacologique de notre composé antalgique.

# - CHAPITRE 1 - Genèse et persistance de la douleur neuropathique chez l'animal et l'implication de HCN et TRIP8b

Les canaux HCN sont largement distribués dans les voies de la douleur et jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique (Dunlop et al. 2009 ; Tsantoulas et al. 2016 ; Ramirez et al. 2018). Même si des bloqueurs spécifiques mais non sélectifs de ces canaux ont montré un effet antalgique chez plusieurs modèles animaux de douleur (e.g. Descoeur et al. 2011) et compte tenu de leur expression et de leur rôle dans la physiologie cardiaque, la modulation de leur activité *via* leur interaction avec leur protéine partenaire TRIP8b, qui n'est pas exprimée dans le tissu cardiaque, pourrait représenter une stratégie alternative mieux tolérée.

*L'interaction HCN-TRIP8b aurait-elle un rôle dans la genèse et/ou le maintien de la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine ?*

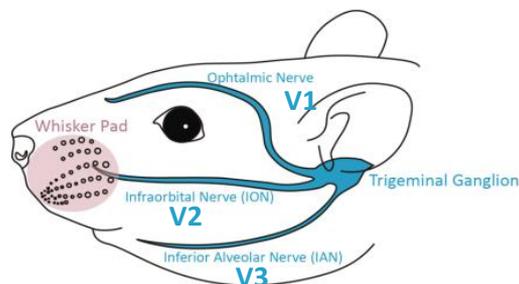
## 1. Le modèle NPIO aigu : hypersensibilité thermique et mécanique

Pour répondre à la première partie de cette problématique nous disposons d'un modèle murin de NPIO aigu qui consiste en une injection intra-péritonéale d'oxaliplatine à 6mg/kg. Le 4<sup>ème</sup> jour après l'injection d'oxaliplatine, un effet maximal d'hypersensibilité thermique au froid et mécanique est mesuré (Descoeur et al. 2011). Transposée à l'humain par la formule de Dubois (Dubois et Dubois 1916) cette dose équivalente à 220mg/m<sup>2</sup> est supérieure à ce qui est proposée par les protocoles de chimiothérapie classique par oxaliplatine, à savoir 85mg/m<sup>2</sup> (FOLFOX) ou 130mg/m<sup>2</sup> (CAPOX).

La dose choisie de 6mg/kg est la dose moyenne utilisée dans les études précliniques sur la NPIO aigue chez la souris. Le phénotype induit est proche du tableau clinique des neuropathies induites par oxaliplatine. En effet chez la souris, le pic des symptômes est entre le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour après l'injection (3 jours chez l'humain, *figure 12*) et est réversible le 6<sup>ème</sup> jour (le 5<sup>ème</sup> chez l'humain). Ces symptômes évalués chez les souris OXA, par rapport aux souris VEH (groupe contrôle), sont :

(1) **une hypersensibilité thermique** au froid observée au niveau **extra-céphalique** (pattes arrière). Ce symptôme est dorénavant établi dans la NPIO aigue chez l'animal puisque d'autres tests proposés dans la littérature l'ont également démontré, notamment le test de l'acétone déposé sur la patte qui augmente la réaction de grattage de l'animal (Reis et al. 2022), ou le test de la plaque froide à 10°C (Martin et al. 2020) jusqu'à -4°C (Sprowl et al. 2013).

(2) **une hypersensibilité thermique** au froid observée au niveau **céphalique**, particulièrement sur le territoire des vibrisses, comme en témoigne l'augmentation du temps de grattage de la face après le dépôt de l'acétone. L'acétone provoque un effet de fraîcheur sur la peau, dont les températures induites ont été estimées entre 15 et 21°C. Pour autant, celle-ci dépend de la température ambiante de la salle, contrôlée dans notre cas à 25°C, de la température corporelle (non contrôlée), et de la quantité d'acétone déposée (Deuis, Dvorakova, et Vetter 2017). La difficulté à déposer une goutte avec une tension égale entre chaque souris est à prendre en compte, mais dans nos expériences les conditions ont été les mêmes pour chaque souris, à savoir 20µL d'acétone déposée avec une pipette P100 une première fois sur le côté droit et une seconde fois sur le côté gauche du territoire des vibrisses, innervé par le nerf infra-orbital, ou le nerf V2 (*figure 64*), tout en évitant de toucher les yeux et le museau de l'animal.



**Figure 65. Innervation de la face d'un rongeur par le nerf trigéminal**

Chez l'humain, des sensations désagréables allant jusqu'à des sensations d'étoiffement, à la suite d'ingestion de boissons ou mets froids (4°C-10°C environ, correspondant à la température du réfrigérateur) ont été également rapportées, rendant difficile le quotidien des malades traités par oxaliplatine. Ainsi, il pourrait être intéressant

d'évaluer ce comportement spécifique chez la souris par un test d'aversion à la boisson froide par exemple, en conditionnant la souris à ne boire de l'eau que quelques heures par jour, afin de mesurer le volume consommé d'eau froide tempérée approximativement à 7°C. Cette modalité évalue la sensibilité de la zone orale qui est innervée par le nerf V3 chez le rongeur. J'ai expérimenté ce type de test comportemental durant ma thèse, toutefois les données obtenues n'étaient pas exploitables en raison d'un problème dans le protocole : la durée du conditionnement n'était pas assez importante. Une mise au point du protocole expérimentale sera mise en place prochainement au laboratoire. Nous nous attendons ainsi à une diminution du volume d'eau consommé chez les souris NPIO aigue.

Il existe un dispositif d'évaluation de la sensibilité oro-faciale qui se base sur le paradigme de conflit-récompense, où le conflit est une stimulation thermique de la zone faciale innervée par le nerf V2 et la récompense à ce stimulus est un biberon de lait. C'est le nombre de léchage du biberon qui est mesuré : un faible nombre est corrélé à une sensibilité thermique élevée (Caudle et Neubert 2022). Dans cette étude, la stimulation par une barre tempérée à 18°C n'a pas provoquée de changement dans le léchage du biberon chez les souris traitées par oxaliplatine (NPIO chronique 20mg/kg en dose cumulée). En adaptant le protocole et en diminuant la température de la barre de stimulation en dessous des 10°C, nous pourrions utiliser ce paradigme pour observer le comportement de notre modèle quatre jours après l'injection d'oxaliplatine.

(3) **une hypersensibilité mécanique** au niveau extra-céphalique. Nous pourrions également évaluer **l'hypersensibilité mécanique céphalique** au niveau des vibrisses, en s'inspirant des tests cliniques (Jensen et Finnerup 2014) ; par exemple, par une stimulation à l'aide d'un pinceau (« brush test ») ou d'un filament de von Frey qui évalue chez l'humain la sensibilité mécanique dite dynamique ou statique, respectivement (Vuralli et al. 2019).

## 2. Théorie de le canalopathie induite par l'oxaliplatine ?

Dans ce projet, les **paramètres électrophysiologiques *in vivo*** des nerfs sensoriels n'ont pas été évalués. Dans la littérature, il a été montré qu'une injection i.p. d'oxaliplatine ne modifie pas la conduction nerveuse caudale des axones sensoriels alors qu'une injection en intra-musculaire à la base de la queue provoque une augmentation du seuil et une réduction de l'amplitude du potentiel d'action (« SNAP » ou *sensory nerve action potential*) généré par un protocole d'hyperpolarisation *in vivo* à la base de la queue de la souris anesthésiée (Makker et al. 2020). Chez les patients sous oxaliplatine, l'hyperexcitabilité des nerfs (tibial, sural et radial) en aigue a été démontré de la même manière, par exploration de l'excitabilité axonale réalisée avant et après la cure d'oxaliplatine (S. B. Park, Lin, et al. 2009). Dans notre étude, nous pouvons aller plus loin et vérifier l'excitabilité du nerf sciatique ou saphène qui innerve la patte arrière suite à un stimulus de la peau, par l'intermédiaire d'une préparation « *skin-nerve* »

(Zimmermann et al. 2009). Au laboratoire NeuroDol, ce protocole est déjà utilisé pour réaliser des criblages de molécules et vérifier leur effet neuromodulateur sur un animal sain vs animal douloureux. Nous pourrions nous en inspirer pour mesurer les potentiels d'actions (fréquence, amplitude) du nerf provoqué par un stimulus au froid ou mécanique de la peau, dans le modèle NPIO aigue avant et après l'injection d'oxaliplatine.

L'altération de l'activité nerveuse induite par l'oxaliplatine est corrélée chez les patients à la sévérité de leurs symptômes sensoriels aigus. Ce phénomène pourrait être associé à un maintien de l'ouverture des canaux sodiques voltages dépendants qui génère une activité ectopique des neurones, à l'origine des paresthésies des extrémités (S. B. Park, Goldstein, et al. 2009; Heide et al. 2018). L'existence d'une **canalopathie** induite par une injection d'oxaliplatine est une théorie émergente dans la littérature. Celle-ci est définie par une dysrégulation de l'expression et/ou de la fonction des canaux membranaires (Raouf, Quick, et Wood 2010; Bennett et Woods 2014; Privitera et Anand 2019). Le dommage des DRG induit par l'accumulation d'oxaliplatine, et notamment son métabolite l'oxalate, est une hypothèse explicative du dérèglement de l'expression et de la fonction de certains canaux impliqués dans la genèse d'un potentiel d'action (les canaux Nav) et dans la transduction thermique (TRPM8, TRPA1) (S. B. Park et al. 2011; Lehky et al. 2004; Argyriou, Cavaletti, Antonacopoulou, et al. 2013a; Sereno et al. 2017). Cette théorie sera discutée dans les prochains paragraphes pour la mettre en lien avec nos observations expérimentales.

### 2.1. Surexpression des canaux HCN en condition OXA

Nous avons mesuré **les taux des transcrits HCN** dans les neurones sensoriels périphériques en condition basale et NPIO aigue à J4, et nous avons mis en évidence une surexpression de HCN1 et HCN2 dans le DRG et de HCN1 dans le TG. Grâce à la quantification des neurones positifs marqués par RNAscope®, nous avons en parallèle observé une augmentation de la population positive pour HCN2 dans les TG. Des changements dans les expressions de HCN avaient déjà été montré au pic des symptômes dans ce même modèle : une surexpression de HCN1 dans les DRG et les TG (Descoeur et al. 2011). Il n'existe pas d'autres études relatant les changements d'expressions des canaux HCN en condition NPIO aigue, mais une surexpression de HCN1 dans les DRG avait été également observée dans un modèle de neuropathie aigue induite par le paclitaxel (8mg/kg, Zhang et Dougherty 2014). L'implication de **TRIP8b** en tant que régulateur de l'activité et de l'expression des canaux HCN pourrait être cruciale dans le développement d'une neurotoxicité associée à la canalopathie. Dans notre étude nous n'avons pas observé de changement d'expression du gène en condition NPIO aigue. En revanche, la quantification par l'hybridation *in situ* a permis de révéler une augmentation de la population TRIP8b au sein des neurones des DRG.

Nous connaissons l'existence de **12 variants d'épissages** de TRIP8b (Lewis et al. 2009). Récemment, il a été émis que chacun possédait une fonction particulière *in vitro*, lors de son interaction avec HCN (*figure 66*) (Lewis et al. 2009; Ye Han et al. 2020). Des données de RNAseq préliminaires à ma thèse ont montré la présence dans le DRG de quatre différentes isoformes, sans qu'aucune d'elle ne soit différemment exprimée dans les DRG d'animaux VEH ou OXA. La première étant l'isoforme 2 (NM\_001163516.3), soit l'isoforme 1a ayant pour rôle *in vitro* de limiter l'adressage de HCN au niveau axonal. C'est l'isoforme la plus exprimée dans le cerveau (25 à 30% d'expression). La seconde est l'isoforme 3 (NM\_001163517.3) correspondant au C1 (*figure 26*), normalement uniquement exprimée dans les testicules (Ye Han et al. 2020). La troisième est l'isoforme 4 (NM\_001289505.2) ou 1bs-2 (*figure 26*) qui *in vitro* augmente l'expression de HCN à la surface membranaire. Et la 4<sup>ème</sup> isoforme (NM\_001310460.1) est l'isoforme 1b-2-4 (*figure 66*), qui produit une diminution du courant  $I_h$ . Les sondes TRIP8b utilisées pour l'expérimentation de RT-qPCR ont été conçues pour détecter l'ensemble des variants existants puisque des sondes s'hybrident avec une séquence comprise entre les exons 5 à 16, conservés pour les 11 isoformes. La similitude entre les séquences géniques de chacun complexifie leur design. En condition OXA, nous n'observons pas de différences globales d'expression de TRIP8b. L'utilisation de RNAseq nous permettrait de vérifier si une ou plusieurs isoformes sont ou non différemment exprimées, notamment celles qui un rôle préférentiel dans l'augmentation de l'adressage des canaux à la membrane, ou dans l'augmentation du courant  $I_h$ .

TRIP8b Isoform	Effect on HCN1 gating ( $\Delta V_{1/2}$ )	Effect on HCN1 expression	% TRIP8b mRNA
1a	-13.4 mV	~10-fold reduction	~25-30%
1a-2	-9.3 mV	no effect	<10%
1a-2-3-4	TBD	TBD	<1%
1a-2-4	-9.7 mV	~5-fold increase	<10%
1a-3-4	TBD	TBD	<5%
1a-4	-11.6 mV	~6-fold increase	~30-40%
1b-2	-10.7 mV	>100-fold reduction	~10-15%
1b-2-3-4	TBD	TBD	<1%
1b-2-4	-14.7 mV	>50-fold reduction	~10-15%

**Figure 66. Une partie des isoformes de TRIP8b et leur effet sur la fonction ( $V_{1/2}$ ) et l'expression *in vitro* de HCN1 et leur niveau d'expression dans le cerveau**

D'après Bina Santoro et al. 2009

## 2.2. Implication des récepteurs transducteurs du froid dans l'oxaliplatine ?

Les récepteurs transducteurs du froid connus à ce jour sont les récepteurs **TRPM8** pour la sensibilité aux températures non nociceptives comprises entre 15° et 20°C et **TRPA1** sensibles aux températures nociceptives en dessous de 15°C. Des données de la littérature démontrent une surexpression du transcrite TRPA1 dans les DRG du modèle 6mg/kg, mais les

changements d'expression de TRPM8 sont débattus dans ces conditions, puisqu'ils pourraient dépendre du temps post-injection (Gauchan et al. 2009; Descoeur et al. 2011; Rimola et al. 2021). Dans notre étude, nous avons quantifié les neurones positifs à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* en condition contrôle et condition NPIO aigue à J4 dans le DRG et le TG et nous n'avons pas observé de différence dans le nombre de neurones positifs pour *TRPA1* et *TRPM8*.

La sensibilité au froid des pattes induite par l'oxaliplatine est perdue chez des souris dont les gènes *TRPM8* et *TRPA1* ont été délétés (Descoeur et al. 2011; M. Zhao et al. 2012; Trevisan et al. 2013; Miyake et al. 2016). Aussi, des souris *TRPA1*<sup>-/-</sup> avec constriction du nerf V2 (infraorbital) présente une diminution du réflexe de léchage et grattage de la face suite au dépôt d'acétone sur le territoire d'implantation des vibrisses, par rapport à des souris *TRPA1*<sup>+/+</sup> (Trevisan et al. 2016). Ceci reflète l'implication de ces récepteurs dans la réponse au froid qui semblent être davantage exprimés et activés en condition NPIO. En plus d'agir sur la sensibilité thermique, un antagoniste des récepteurs TRPA1 abolit la sensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine (Descoeur et al. 2011). Des souris KO pour le gène TRPA1 ont également une réduction de l'allodynie mécanique induite par oxaliplatine (Nassini et al. 2011). D'ailleurs, cette hypersensibilité mécanique nous laisse penser également à une implication forte des mécanorécepteurs dans la pathologie. Nous pourrions évaluer par la même stratégie transcriptomique les changements dans une population neuronale sensible aux stimuli mécaniques, en comparant le nombre de neurones positifs pour les marqueurs Piezo2 par exemple, ou plus globalement par le NF200 qui est un marqueur des neurones de grand diamètre (A $\beta$ ) (Coste et al. 2010)

### **2.3. Changement dans la population neuronale de HCN dans les ganglions OXA**

La perturbation du profil moléculaire des ganglions périphériques pourrait expliquer l'origine de pathologies douloureuses et pourrait orienter les recherches thérapeutiques. Compte tenu du fait que l'hypersensibilité au froid représente le symptôme douloureux le plus caractéristique et invalidant de la NPIO, nous avons tout d'abord recherché les coexpressions de nos gènes d'intérêts HCN et TRIP8b avec ces marqueurs du froid *TRPA1* et *TRPM8* en condition basale pour *in fine* les comparer avec les coexpressions relatives à une condition neuropathique.

Dans un premier temps, nous avons montré une expression de HCN1 dans 67% des neurones. Quant à HCN2, nous comptons 81% de cellules. Aussi, nous comptons 39% de cellules positives pour TRPA1, et 13% pour TRPM8. Ces données sont relativement en accord avec la littérature, puisqu'une équipe américaine a montré 70.9% de cellules positives HCN1 et 71.5% de cellules positives HCN2 dans les DRG (Shiers, Klein et Price 2020). En revanche,

cette même étude a montré 53.2% de cellules positives pour TRPA1. Les neurones positifs pour les transcrits TRPM8 sont approximativement de 10% dans les DRG de souris (Dhaka et al. 2008). En raison d'une littérature limitée en quantification transcriptionnelle dans le TG, nous n'avons pas pu comparer nos résultats obtenus dans ce tissu. Des données protéiques montrent tout de même environ 12% de TRPM8 dans le TG (Abe et al. 2005). Dans notre étude, nous avons compté 18% de cellules positifs pour les transcrits TRPM8, ce qui est légèrement plus que dans le DRG. Il a déjà été montré que les transcrits TRPM8 sont davantage exprimés dans les TG que dans les DRG (Vandewauw, Owsianik, et Voets 2013).

Chez les souris NPIO, nous avons observé un changement dans la population neuronale exprimant TRPA1 et TRPM8 puisque dans le DRG, davantage de cellules TRPA1 positives expriment HCN1 et TRIP8b, et dans le TG davantage de cellules TRPM8 expriment HCN2 et TRIP8b. Ces données évoquent un changement de profil moléculaire des neurones périphériques en condition oxaliplatine. L'augmentation des transcrits HCN-TRIP8b dans les neurones TRPA1 ou TRPM8 positifs peut être corrélée à une augmentation de la traduction protéique en complexe HCN1/2-TRIP8b. Celle-ci pourrait promouvoir l'augmentation de la localisation de HCN à la membrane qui, associée à une modification des propriétés du canal, pourrait modifier l'excitabilité membranaire dans les neurones transducteurs du froid et ainsi participer au développement de l'hypersensibilité au froid céphalique et extra-céphalique.

#### **2.4. Augmentation de l'adressage membranaire de HCN en condition OXA**

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une **étude fonctionnelle** des canaux HCN dans les DRG en condition pathologique (NPIO aigue). Des enregistrements électrophysiologiques par la technique du patch clamp appliquée sur petits et moyens neurones de DRG a permis d'observer une augmentation de la densité de courant. Nous n'avons pas mesuré de changement dans la courbe d'activation du canal, en comparaison aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent une augmentation des canaux HCN localisés sur la membrane dans ces conditions. Une analyse complémentaire de la cinétique (valeur tau  $\tau$  en ms) des courants et leur comparaison avec des données obtenus dans un système d'expression HEK exprimant nos protéines d'intérêt pourraient nous permettre de préciser la composition des canaux à l'origine de  $I_h$  dans ce tissu (Ulens et Tytgat 2001; Moosmang et al. 2001). Dans la littérature, une étude fonctionnelle de 2009 réalisée dans les TG a mesuré des paramètres du courant  $I_h$  dans les neurones répondant au froid ( $V_{1/2}$  et  $\tau$ ) proche de ceux de l'hétérotétramère HCN1/HCN2 exprimés dans les HEK (Orio et al. 2009).

Ces données électrophysiologiques sont en accord avec les données de la littérature (Resta et al. 2018; Yongning et al. 2021; Caudle et Neubert 2022). L'oxaliplatine en injection chronique (rat 10x2.4mg/kg) entraîne une augmentation de la densité de courant à -110mV jusque -130mV dans les petits et moyens neurones du DRG (<35 $\mu$ M), mais pas dans les larges

(>35 $\mu$ M) (Resta et al. 2018). Dans les neurones de DRG en culture traitées à l'oxaliplatine à 100 $\mu$ M et au sein de DRGs issus de souris injectées par oxaliplatine en aigue (1x6mg/kg i.p.), une augmentation de la densité de courant  $I_h$  avait également été observée à -120mV (Yongning et al. 2021). A ce jour, nous n'avons pas les données concernant les modifications fonctionnelles du courant  $I_h$  dans les TG en condition OXA, mais des travaux à l'origine d'un sujet de stage de master 2 sont actuellement en cours. Pour autant, Caudle et Neubert en 2022 ont observé une augmentation de l'amplitude de  $I_h$  dans les neurones de TG exprimant TRPM8 d'un modèle OXA (dose cumulée 20mg/kg) (Caudle et Neubert 2022), et ceci pourrait corroborer avec l'augmentation du nombre de cellules exprimant les canaux HCN2 et TRPM8 dans les TG mesurée par RNAscope®.

L'immunofluorescence et les dosages protéiques par Western Blot peuvent également donner des réponses quant à cette hypothèse d'adressage membranaire de HCN accrue en condition OXA. Dans un premier temps, nous avons expérimenté l'**immunohistochimie** sur tissus de DRG de souris naïve avec les anticorps HCN1 et HCN2 (Alomone) et TRIP8b (Neuromab). Nous observons un marquage membranaire pour HCN1, et un marquage membranaire et cytosolique pour HCN2 (*figure 67*). Toutefois, une mise au point quant à la fixation et la post-fixation par le PFA4% des DRG et TG serait nécessaire pour obtenir un marquage TRIP8b reproductible sur ce tissu. Pour pallier à ces problèmes techniques, nous avons choisi de réaliser des **immunocytochimies** sur des cellules en culture en condition basale ; un choix 'payant' qui nous a permis d'observer de façon reproductible un marquage de TRIP8b membranaire et cytosolique dans la majorité des neurones. Au même titre que les expérimentations de transcriptomiques, nous souhaitons vérifier la co-localisation du complexe HCN-TRIP8b avec les marqueurs de froid. Seule la protéine TRPA1 a été observée dans la population de DRG et semble colocalisée avec TRIP8b. Ces marquages n'ont pas été réalisés sur cellules en culture issues de souris traitées à l'oxaliplatine, mais nous pourrions envisager de quantifier le marquage fluorescent de HCN1 et HCN2 et déterminer précisément leur localisation (membrane/cytosol) afin de mettre à jour une potentielle redistribution subcellulaire du canal en condition OXA. Ce type de quantification en condition basale a été

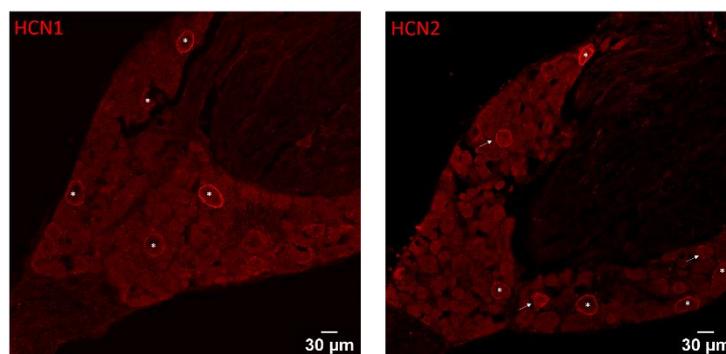
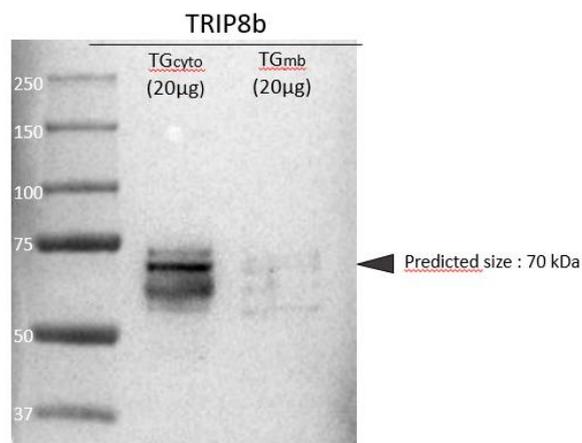


Figure 67. Essai immunohistochimique HCN1-HCN2 sur coupes de DRG

réalisée précédemment sur le DRG dans une publication de 2018, la fluorescence relative de HCN1 et HCN2 était plus intense dans la membrane des neurones que dans le cytosol (Dini et al. 2018). Une autre stratégie consistant à réaliser des Western Blot à partir d'extractions protéiques différentielles sur tissus DRG et TG réalisée soit par ultracentrifugations successives, soit par un kit commercial, pourraient permettre de quantifier l'expression protéique des HCN dans les extraits membranaires et dans les extraits cytosoliques (données préliminaires avec la protéine TRIP8b exprimée davantage dans le compartiment cytosolique, *figure 68*). Néanmoins, la très faible quantité de protéines extraites au niveau membranaire limite la détection par Western Blot des protéines HCN1 et 2. Il serait nécessaire d'augmenter l'effectif d'animaux pour regrouper les tissus et ainsi espérer obtenir davantage de concentration protéique. Des données préliminaires montrent que les DRG lombaires de 6 souris et les TG de 4 souris sont nécessaires pour obtenir une concentration optimale pour détecter nos protéines d'intérêts.



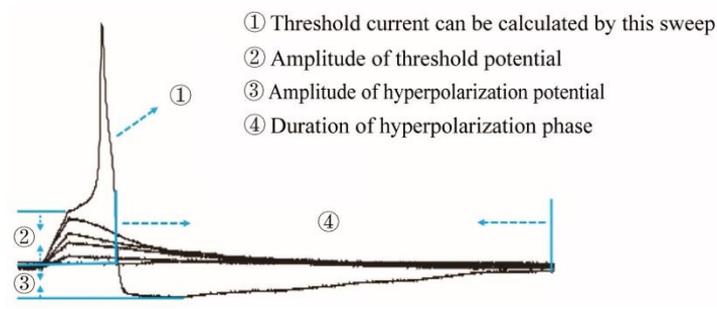
**Figure 68. Essai de Western Blot en extraction différentielle sur TG**

TG<sub>cyto</sub> : partie cytosolique, TG<sub>mb</sub> : partie membranaire – 20μg de protéines sont déposés –  
L'anticorps TRIP8b Neuromab (1/500) est incubé toute la nuit à 4°C et est révéillé par  
chimioluminescence par le secondaire couplé HRP

## 2.5. Augmentation de l'excitabilité neuronale par l'intermédiaire de HCN ?

L'ensemble des résultats obtenus sur le modèle NPIO aigue évoquent l'existence d'une canalopathie relative aux canaux HCN1-2 dans les TG et les DRG corrélée à l'hypersensibilité douloureuse céphalique et extracéphalique. La mesure des quantités de protéines par Western Blot n'a pas encore été exploitable pour les raisons évoquées dans le chapitre précédent, mais les données d'électrophysiologie sur les DRG nous laisse penser que la canalopathie impliqué une augmentation de l'expression des canaux HCN à la membrane. Les canaux HCN permettent le flux d'entrée d'ions positifs sodium et potassium dans le neurone, qui augmente alors le potentiel membranaire et génère le déclenchement des potentiels d'action. Une augmentation du nombre de canaux par l'oxaliplatine associé à une augmentation du sag pourrait contribuer à une hyperexcitabilité neuronale. Nous avons analysé ce sag à une valeur de dépolarisation qui est présente dans tous les neurones, à

savoir -20mV et nous avons observé une augmentation significative en condition OXA par rapport aux souris VEH. De plus, l'excitabilité neuronale est caractérisée par la capacité du neurone à générer des potentiels d'action (PA). Dans notre étude, nous avons sélectionné les petits et moyens neurones qui correspondent majoritairement à des nocicepteurs A $\delta$  ou de type C. Dans ces neurones, le seuil une fois atteint est associé à la génération de potentiels d'actions. Il nous reste à caractériser l'excitabilité neuronale dans ces neurones, et analyser la rhéobase, le seuil d'activation, la durée et la fréquence de PA, l'amplitude et la durée de l'hyperpolarisation induite, comme présenté en *figure 69*. A noter que des expériences complémentaires qui seraient davantage physiologique pour mesurer l'excitabilité membranaire dans le DRG pourraient être réalisées au laboratoire, tels que des enregistrements électrophysiologiques directement à partir de préparation de DRG, ou l'utilisation de préparations nerf-peau, comme détaillé plus haut.



**Figure 69. Paramètres du potentiel d'action**

D'après Yongning et al. 2021

Une seule étude a montré *in vitro* l'augmentation de l'excitabilité neuronale du DRG après perfusion d'oxaliplatine (100 $\mu$ M) dans l'environnement cellulaire (Yongning et al. 2021). Ils ont montré une augmentation de la génération de PA, une diminution du seuil d'activation du PA, une augmentation de la durée de l'hyperpolarisation induite. Une incubation longue d'oxaliplatine (6 min) potentialisait ces effets. L'ivabradine a partiellement inversée l'effet induit par l'oxaliplatine sur la durée de l'hyperpolarisation du potentiel d'action, mais l'amplitude et le seuil d'activation du PA étaient inchangés. Ils émettent la possibilité que l'oxaliplatine pourrait altérer l'excitabilité des neurones également par une voie indépendante du canal HCN (Yongning et al. 2021).

### 3. Le modèle NPIO chronique : hypersensibilité et dépression

La chronicisation des symptômes observée en clinique, est modélisée chez la souris par des injections répétées d'oxaliplatine, provoquant la persistance des symptômes sensoriels. Un premier modèle utilisé au laboratoire (Poupon et al. 2018) utilisait la dose de 6mg/kg injectée deux fois par semaine pendant 4 semaines. Les expérimentateurs se sont aperçus que les animaux étaient faibles et que les données hématologiques étaient trop basses à J28, suggérant une toxicité globale indésirable qui pourrait biaiser notre étude sur la

neurotoxicité. En s'accordant aux protocoles cliniques, nous avons choisi au laboratoire la dose d'injection de 3mg/kg pour la souris, puisqu'elle est équivalente à 110mg/m<sup>2</sup> chez l'humain considérée comme la concentration cliniquement pertinente en 2007 par Liston et Davis (Liston et Davis 2017). Le calendrier d'injection consiste à deux injections par semaine pendant 3 semaines. Nous avons suivi le comportement des animaux au fur et à mesure des injections. La sensibilité périphérique thermique et mécanique sur les extrémités est perçue dès J7 (i.e. après deux injections) et persiste jusqu'à J21 (i.e. après 6 injections). Ces résultats sont en accord avec les études sur modèles NPIO chroniques, où la sensibilité thermique et mécanique est présente parfois jusqu'à 28j (Michot et al. 2014; Marmioli et al. 2017; Poupon et al. 2018; Mine et al. 2022). La sensibilité céphalique n'a pas été évaluée dans ce modèle, mais il pourrait être intéressant de la comparer avec ce qui a été fait précédemment dans une étude menée au laboratoire, 8 injections d'oxaliplatine à 6mg/kg induisait une sensibilité orofaciale par l'acétone (Poupon et al. 2018). Il pourrait être intéressant de continuer le suivi post-traitement des souris après J21 pour contrôler l'installation de la neuropathie à long terme, comme nous pouvons l'observer en clinique par le phénomène de coasting (Kerckhove et al. 2017; 2018).

Des troubles de la proprioception notamment l'apparition de chute en position debout ou en marche sont largement rapportés chez les patients traités sous oxaliplatine (Bullinger et al. 2011; Vincent et al. 2016; A. B. Wang et al. 2020). Dans notre modèle NPIO chronique, nous n'avons pas observé de troubles proprioceptifs au décours du temps, mais un modèle avec une concentration d'oxaliplatine plus importante a conduit au développement des troubles locomoteurs et de la proprioception (Poupon et al. 2018). Notre résultat négatif peut ainsi être expliqué par la faible posologie que nous proposons, par rapport à ce que nous pouvons retrouver dans les publications (Cavaletti et al. 2001; Marmioli et al. 2017; Warncke et al. 2021). En effet, les six injections correspondant à une concentration cumulée de 18mg/kg transposé à l'humain représenterait approximativement une exposition de 660mg/m<sup>2</sup>. Il a été montré dans plusieurs études que c'est une dose cumulée de plus de 800mg/m<sup>2</sup> qui est associée à la chronicisation des symptômes notamment des perturbations des fonctions sensorimotrices, des anomalies neurophysiologiques, auxquelles s'ajoutent des comorbidités de type anxiété et dépression. Il serait donc pertinent de réaliser deux injections de plus pour modéliser au mieux les symptômes proprioceptifs (dose cumulée atteinte de 24mg/kg soit 880mg/m<sup>2</sup>). Nous avons voulu vérifier la manifestation des comorbidités dans notre modèle en réalisant une batterie de tests comportementaux d'évaluation cognitivo-émotionnelle. Seul un comportement de type dépressif a été observé, caractérisé par une augmentation du temps de résignation, c'est-à-dire d'immobilisation pendant la nage forcée. Il est important de préciser que la température de l'eau utilisée pour la nage forcée était systématiquement contrôlée, en regard de la sensibilité au froid des souris sous oxaliplatine, nous devons chauffer l'eau afin d'éviter ce biais (26±1°C). Une corrélation entre les niveaux de sensibilité des souris et la

dépression induite par l'oxaliplatine pourrait être vérifiée par une analyse du coefficient de détermination entre ces deux paramètres. Les études cliniques montrent d'ailleurs une forte association entre la gravité des symptômes sensorimoteurs et l'apparition de la dépression chez les patients sous traitement (Tofthagen et al. 2013; Kerckhove et al. 2021). Des comportements de type dépressifs sont également observés chez d'autres modèles animaux NPIO, en l'occurrence 14 jours après une unique injection d'oxaliplatine à 6mg/kg (Micov et al. 2020) et après des doses cumulées de 28mg/kg (Hache et al. 2015) et 48mg/kg (Poupon et al. 2018).

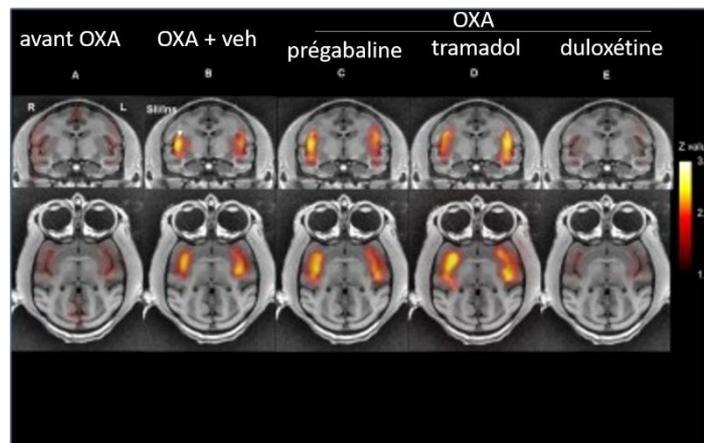
L'existence de perturbation cognitive post-chimiothérapie (ou chemobrain) est un sujet de plus en plus discuté dans la littérature (Andreis et al. 2013; Bompaire et al. 2017; Branca et al. 2018; Rao et al. 2022). Dès lors, nous avons évalué la mémoire à court terme de reconnaissance ou de travail chez la souris par des tests comportementaux mais nous n'avons pas observé d'altération cognitive. Une étude australienne a évalué ces comportements selon différentes posologies d'oxaliplatine et a montré que 3 injections de 6mg/kg induisait un déclin cognitif 4 mois après le traitement et jusqu'à 11 mois (Fardell et al. 2012). Tel que discuté plus haut, nous pourrions poursuivre l'évaluation comportementale, notamment cognitive, pour évaluer la mémoire de la souris après la dernière administration d'oxaliplatine.

#### 4. Hypothèses mécanistiques de la chronicisation de la douleur

La chronicisation de la douleur est à l'origine de la dégradation de la qualité de vie des patients sous oxaliplatine, et conduit à la diminution ou l'arrêt du traitement. Après les altérations majoritairement fonctionnelles provoquées par une injection d'oxaliplatine, les mécanismes recensés dans la littérature semble proposer une altération davantage morphologique des neurones périphérique suite à l'administration répétées d'oxaliplatine (Marmioli et al. 2017; Poupon et al. 2018; Warncke et al. 2021). Dans notre étude, nous n'avons pas vérifié la morphologie des neurones des DRG ni des nerfs associés. Il pourrait être intéressant de vérifier l'intégrité des neurones ganglionnaires et l'innervation cutanée de la patte ou du territoire des vibrisses. En effet, une étude a montré des dommages dans les terminaisons axonales exprimant TRPM8 au niveau de l'innervation des vibrisses qui pourraient expliquer la sensibilité au froid péri-orale induite par une posologie chronique de l'oxaliplatine (Caudle et Neubert 2022). Ces dégénération sont associées à un ensemble de mécanismes détaillés dans l'introduction bibliographique (Sałat 2020), notamment la toxicité de l'oxaliplatine induite dans l'ADN mitochondrial, le stress oxydant et la neuroinflammation. De plus, l'altération de la BHE provoquée par l'oxaliplatine promeut le passage dans le cerveau des composés associés à ces divers phénomènes, et compromet le bon fonctionnement cérébral. Ceci pourrait expliquer les altérations centrales rapportées par les études cliniques sur l'anxiété, la dépression et les altérations cognitives.

#### 4.1. Activation insulaire

L'implication de l'insula dans la douleur induite par l'oxaliplatine n'est que peu documentée (Ferrier et al. 2015; Nagasaka et al. 2017; Shidahara et al. 2019), pourtant sa fonction dans l'intégration sensorielle et émotionnelle de la douleur est avérée. Les études d'imageries sur le macaque ont montré une activation du cortex insulaire majoritairement antérieur (Nagasaka et al. 2017) et le SII après le traitement à l'OXA (5mg/kg i.v. infusion de 2h), en même temps qu'une hypersensibilité au froid de la queue (10°C). L'activation et l'hypersensibilité était reversée significativement par le traitement à la duloxétine (30mg/kg, *figure 70*) (Nagasaka et al. 2017; Shidahara et al. 2019).

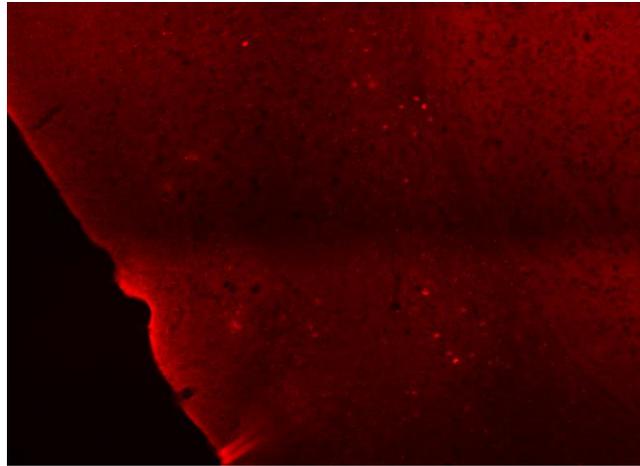


**Figure 70. Imagerie IRMf cérébrale pendant la stimulation au froid de la queue**

Shidahara et al. 2019

De plus, il a été montré une participation de l'insula dans l'intégration centrale des informations thermiques, spécifiquement du froid (Vestergaard et al. 2023). Ainsi, outre l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle du petit animal, nous pourrions vérifier simplement l'activation neuronale de l'insula de notre modèle NPIO chronique suite à une stimulation de la patte dans un bain froid. J'ai réalisé pendant ma thèse des expériences préliminaires visant à évaluer le nombre de neurones marqués par la protéine c-fos, marqueur de l'activation neuronale, dans l'insula en condition OXA avec immersion des deux pattes arrière, dans un bain d'eau à 10°C (*figure 71*). Le protocole est à mettre au point pour s'assurer d'une activation neuronale due à la stimulation sensorielle et non pas au stress induit par le test. Dans cette étude préliminaire, j'ai réalisé 10 immersions de 30 secondes chacune, espacées de 30 secondes. Il serait nécessaire d'avoir un groupe contrôle VEH avec stimulation, mais également un groupe VEH et OXA sans stimulation, afin de confirmer un niveau basal très pauvre en neurones activés. Le comptage des neurones marqués pourrait nous donner une idée quant à la participation de l'insula dans les mécanismes de la NPIO chronique. Nous nous

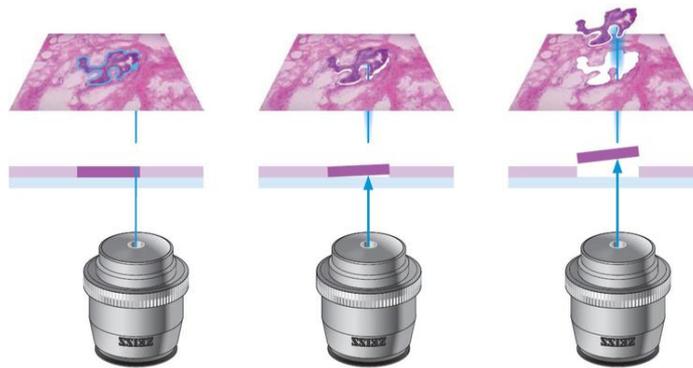
attendons à une activation neuronale accrue par la stimulation. Nous pourrions également comparer les marquages obtenus dans l'insula antérieure avec ceux obtenus dans l'insula postérieure et ceux obtenus dans l'insula droite avec le gauche, en cas de latéralisation (Wu et al. 2020)



**Figure 71. Essai de marquage c-fos sur insula NPIO chronique J21 avec stimulation au froid des pattes arrière**

### **4.2. Surexpression de HCN1 et 4 dans l'insula OXA**

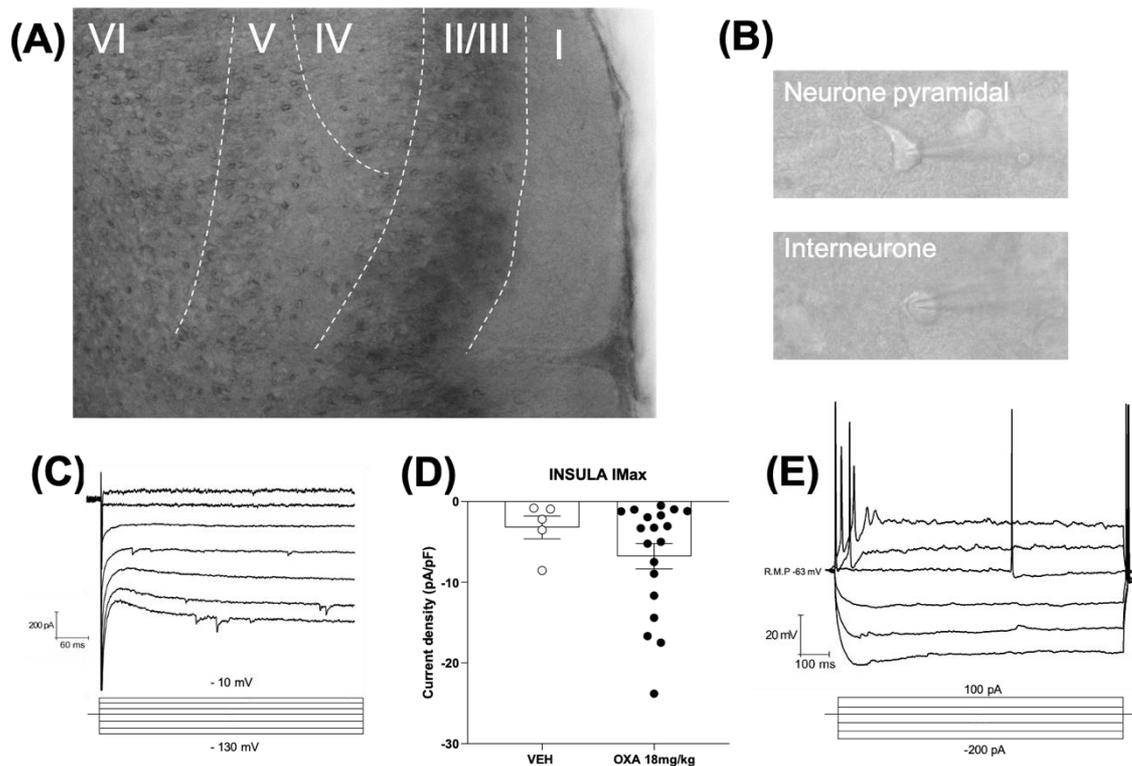
Compte-tenu de ces données bibliographiques, nous avons souhaité dans notre étude travailler sur l'insula pour mieux comprendre les mécanismes induits par la NPIO chronique chez la souris et potentiellement l'implication des canaux HCN et de TRIP8b, dans cette région. Nous avons mesuré par RT-qPCR une augmentation significative de l'isoforme HCN1 et HCN4 dans le cortex insulaire entier droit et gauche, mais pas de TRIP8b à J21. Les fonctions différentes de l'IA (composante émotionnelle de la douleur) et l'IP (composante sensorielle de la douleur) nous laissent penser qu'une régulation différente de nos cibles, selon la région est possible. Nous envisageons de faire des expériences de microdissection permettant de découper des parties précises d'un tissu sur coupes déposés sur lames (*figure 72*). Ainsi, nous pourrions sélectivement sélectionner la région insulaire d'intérêt sur fine coupe de cerveau de 8 $\mu$ M et isoler l'IA et l'IP pour mesurer les quantités des transcrits dans chacun de ces régions.



**Figure 72. Principe de la microdissection par laser d'un tissu**

Des données obtenues au sein du laboratoire (Ferrier et al. 2015) montre des variations métaboliques dans l'insula postérieure et le thalamus de souris OXA (dose cumulée 18mg/kg). Dans l'IP une diminution des taux d'asparagine, de créatine, de glutamine et une augmentation des taux de choline, par rapport aux souris VEH ont été retrouvées par RMN. Cette concentration en choline est corrélée à une hypersensibilité mécanique des animaux. Enfin, le récepteur M2 muscarinique de l'acétylcholine a été retrouvé lui aussi surexprimé et un antagoniste spécifique injecté directement dans l'IP a inhibé l'hypersensibilité mécanique (Ferrier et al. 2015). De façon intéressante, l'activité rythmique des interneurons cholinergiques est régulée par les canaux HCN. En effet, les courant  $I_h$  régule l'excitabilité membranaire de ces neurones en dépolarisant la membrane jusqu'au seuil de déclenchement des potentiels d'action (Varga et al. 2008; Z. Zhao et al. 2016). En outre, l'activation des récepteurs M2 induit une diminution du taux d'AMPC dans le neurone susceptible de modifier l'activité des canaux HCN. Ainsi, nous aimerions vérifier si les canaux HCN participent à une modification de la transmission cholinergique dans la souris OXA. Ces expérimentations sont programmées au laboratoire à l'aide de la technique de patch clamp sur souris ChAt-GFP qui permettra d'identifier les cellules de l'insula qui reçoivent des afférences cholinergiques.

Au début de ma thèse, nous avons projeté d'étudier l'activité des canaux HCN dans l'insula afin de vérifier si un traitement chronique à l'oxaliplatine pouvait induire des modifications du courant  $I_h$ . Pour cela, nous avons mis au point la technique du patch-clamp sur tranches de cerveau au laboratoire. Cette mise au point a été longue et affectée par les périodes de confinements liés au Covid-19 pendant lesquelles nous n'avons pas pu réaliser d'enregistrements. Nous nous sommes concentrés sur l'insula postérieure (*figure 73.A*) pour son implication dans la composante sensorielle de la douleur. En absence de données montrant précisément l'expression et la localisation des canaux HCN et TRIP8b dans cette région, nous avons réalisé des enregistrements en voltage-clamp et current-clamp « à l'aveugle » sur des neurones pyramidaux et des interneurons (*figure 73.A-E*).



**Figure 73. Données préliminaires de l'étude fonctionnelle du courant  $I_h$  dans l'insula postérieure**

Dans nos expériences, nous avons observé que peu de neurones exprimaient un courant  $I_h$  mesurable au niveau du soma chez la souris vehicule. En plus de la faible quantité de cellules montrant un courant  $I_h$ , celui-ci était généralement de faible amplitude (<150pA). Les premières données de RT-qPCR montrant une surexpression de HCN1 et HCN4 nous ont ensuite conduit à focaliser nos enregistrements sur le modèle NPIO chronique avec la dose cumulée de 18mg/kg. Malheureusement, en l'absence d'outils permettant de cibler spécifiquement les neurones positifs pour HCN et TRIP8b et/ou sensibles à une stimulation thermique et faute de temps cette partie du projet a été mis en suspend pour pouvoir se focaliser sur le modèle de NPIO aigu. Malgré le peu de rendement dans nos expériences, nous avons pu tout de même mesurer une densité de courant (*figure 73.C-D*) dans n=5 VEH et n=19 OXA 18mg/kg (J21) neurones (VEH:  $-3.2 \pm 1.4 \text{ pA/pF}$ ; OXA:  $-6.7 \pm 1.6 \text{ pA/pF}$ ). Néanmoins, le faible nombre de neurones ne permet pas de conclure.

Les résultats préliminaires obtenus quant à la faible proportion de neurones exprimant un courant  $I_h$ , de surcroit de petite taille laissent à penser qu'il serait pertinent d'enregistrer les courants au niveau des dendrites, comme cela a été réalisé dans différentes structures exprimant les canaux HCN (Davie et al. 2006; Harnett, Magee, et Williams 2015; Y Han et al. 2017). Des enregistrements macroscopiques de  $I_h$ , en condition « cell-attached » auraient l'avantage de permettre une analyse de fluctuation non stationnaire et ainsi calculer le nombre de canaux HCN exprimés à la membrane. Une mise au point de marquages immunohistochimiques pour HCN1, HCN4 et TRIP8b, jusque-là infructueux devraient

permettent de valider l'intérêt de ces enregistrements. Enfin, pour pallier à l'identification des types cellulaires de l'insula exprimant les canaux HCN, nous pourrions compléter nos données d'hybridation *in situ* et/ou de co-marquages protéiques avec des sondes VGLuT (transport du glutamate, neurones excitateurs pyramidaux) et VGAT (transport du GABA, neurones inhibiteurs) en plus des canaux HCN1 et HCN4. Une étude d'imagerie transcriptomique par RNAscope® réalisée en Australie a dévoilé une co-expression de HCN4 et des neurones VGAT ou VGLuT positifs dépendante de la région du cerveau, par exemple, dans le thalamus HCN4 est davantage exprimé par les neurones excitateurs et dans le striatum dans les interneurons cholinergiques (Oyler et al. 2019). L'utilisation de souris génétiquement modifiées (souris Fos-Trap, Guenther et al. 2013) pourrait également nous donner l'indication des neurones activés dans l'insula à cibler pour cette étude fonctionnelle.

## 5. Implication de TRIP8b dans la NPIO aigue et chronique par des outils génétiques ?

Nous n'avons pas montré de surexpression de la protéine auxiliaire TRIP8b dans nos modèles aigue et chronique de NPIO. Pourtant, son action majeure sur la régulation fonctionnelle et l'expression des canaux HCN suscite questionnement sur sa contribution dans la NPIO. L'effet pharmacologique du peptide YC55 suggère son implication, mais nous avons souhaité explorer cet axe de recherche également par l'utilisation d'outil génétique. Ainsi, nous avons utilisé des souris avec délétion totale du gène TRIP8b (souris TRIP8b<sup>-/-</sup>), ou une invalidation spécifiquement dans les neurones Nav1.8 positifs (souris SNS<sup>TRIP8b-/-</sup>). Chez l'animal sain, nous avons observé un phénotype d'hyposensibilité aux stimuli froids chez la souris SNS<sup>TRIP8b-/-</sup> mâle, mais pas chez la souris SNS femelle, émettant une implication hormonale. Nous pourrions vérifier les cycles oestriques systématiquement pour potentiellement expliquer cette différence inter-sexe. La souris TRIP8b<sup>-/-</sup> possède les mêmes seuils de sensibilité thermique que les WT. Après induction de la NPIO chez les SNS<sup>TRIP8b-/-</sup>, nous observons à J4 (1x6mg/kg) des seuils associés à une hypersensibilité au froid, et à J7

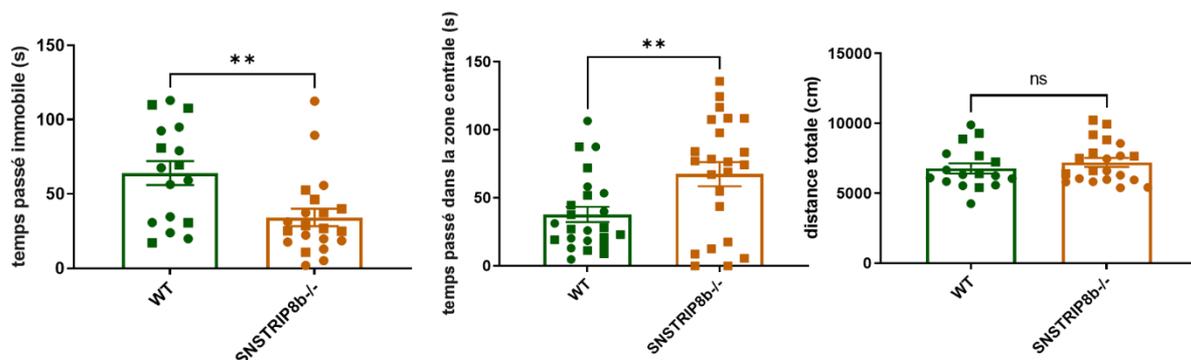


Figure 74. Phénotype des souris SNS TRIP8b<sup>-/-</sup>

Le temps passé immobile, mesuré pendant la nage forcée ; le temps passé dans la zone centrale dans une arène pendant 15 minutes ; et la distance totale parcourue dans cette arène. \*\*>0.01 t test

(2x3mg/kg) une diminution de cette sensibilité. Jusqu'à J21, le mâle SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> reste moins sensible que les WT. Quel que soit le sexe et le génotype, nous observons un effet de l'oxaliplatine significatif à J21 par rapport à J0, qui démontrent l'installation de la neuropathie chez ces souris. A noter que l'hypersensibilité oro-faciale aigüe pour ces génotypes n'a pas été évaluée mais cette expérimentation est prévue à court terme. Par ailleurs, la dose cumulée de 18mg/kg d'oxaliplatine n'a pas induit chez les souris TRIP8b<sup>-/-</sup> et SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> le comportement de type dépressif observé chez les souris WT. Ceci est en accord avec ce qui a déjà été observé par l'équipe américaine pour le génotype TRIP8b<sup>-/-</sup> (Lewis et al. 2011), mais nous aimerions vérifier ce comportement spécifique chez les souris Nav1.8Cre car la désinhibition des souris SNS<sup>TRIP8b<sup>-/-</sup></sup> est plus importante que les KO globaux, cela pourrait donc être un effet de la lignée. De ce fait, nous avons souhaité aller plus loin et vérifier au niveau basal l'anxiété et la propension à développer des symptômes dépressifs chez ces souris (*figure 74*). Ces souris sont statistiquement moins anxieuses et ont un comportement de type dépressif moins important que les souris *littermate* TRIP8b<sup>f/f1</sup>. Nous aurions pu penser que ce phénomène était dû à une hyperactivité des souris, mais les résultats de la distance totale parcourue dans une arène, évaluant la locomotion, ne montrent pas de différences significatives (*figure 74*). De plus, en raison d'études démontrant que Nav1.8 n'est pas exclusivement exprimé dans les nocicepteurs (Shields et al. 2012), l'utilisation de souris AdvilinCre (i.e. protéine spécifique des neurones sensoriels) à la place des souris Nav1.8Cre pour la reproduction avec les TRIP8b<sup>f/f1</sup> pourrait être davantage pertinent (Zurborg et al. 2011).

Pour aller plus loin, nous avons souhaité étudier le courant I<sub>h</sub> chez ces souris TRIP8b<sup>-/-</sup>. Des données préliminaires obtenues récemment et qui doivent être consolidées montrent des résultats intéressants. Notamment, les densités de courant I<sub>h</sub> dans les neurones de DRG VEH ou OXA de ces animaux TRIP8b<sup>-/-</sup> ne sont pas statistiquement différentes et sont comparables (à -140mV) voir inférieures (entre -130 et -110mV), à la densité de courant dans les neurones de DRG issus de souris WT VEH (*figure 75*). Enfin, la densité de courants mesurée chez les souris TRIP8b<sup>-/-</sup> est inférieure à la densité relevée chez la souris WT OXA. La densité de courant I<sub>h</sub> dans ces souris pourrait donc refléter et confirmer l'action de TRIP8b dans l'adressage membranaire des canaux HCN des DRG.

Le phénotype hypersensible par l'oxaliplatine et la diminution membranaire des canaux HCN induit par le génotype soulèvent des questions en suspens. L'existence de phénomène compensatoire comme la régulation des canaux HCN par d'autres protéines d'interaction pourrait expliquer l'hypersensibilité induite par l'oxaliplatine dans le modèle NPIO. Nous pouvons citer la protéine MRP1 par exemple, qui est surexprimée dans les DRG de souris NPIO chronique (Resta et al. 2018).

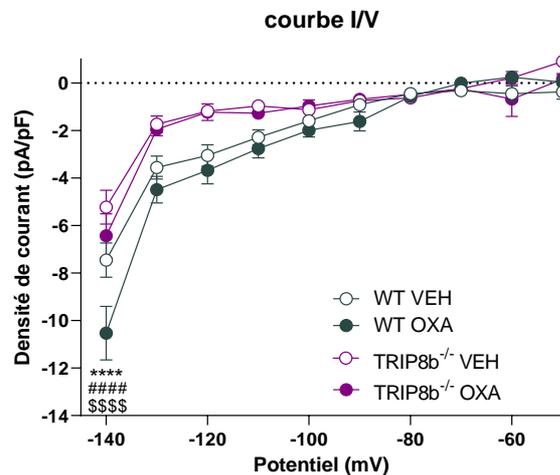


Figure 75. Données préliminaires de la courbe I/V sur courant  $I_h$  chez des souris TRIP8b<sup>-/-</sup> par rapport aux souris WT

## - CHAPITRE 2 -

# Modulation pharmacologique de l'interaction HCN-TRIP8b : perspective thérapeutique ?

### 1. Effet antalgique du peptoïde YC55 par sa capacité à perturber l'interaction HCN-TRIP8b

Au cours de cette thèse, nous avons entrepris une étude pharmacologique en collaboration avec le laboratoire de chimie de Clermont-Ferrand. Les chimistes ont produit des analogues peptoïdes du domaine SNL de HCN, dans le but d'interagir avec le domaine TPR de TRIP8b, pour diminuer l'interaction HCN-TRIP8b et ainsi perturber l'adressage membranaire et/ou la localisation membranaire de HCN dans un contexte pathologique de NPIO. Ils se sont basés sur la structure cristallographique du complexe SNL avec TRIP8b. Celle-ci a permis de mettre en évidence la présence de deux poches hydrophobes au sein même de la poche d'interaction TPR de TRIP8b. Les résultats de la modélisation moléculaire, suggèrent que la leucine (R1) et le benzyle (R4) du peptoïde YC55 semblent être des éléments clés pour occuper les première et seconde poche hydrophobe (figure 76). La présence du groupement benzyle est également un outil pour faciliter la purification par HPLC, car il peut

être couplé avec un groupement réactif aux UV. Ensuite, le travail des chimistes a été d'ajouter et modifier les acides aminés et les groupements (R2, R3, R4, R5) en fonction de cette dynamique moléculaire.

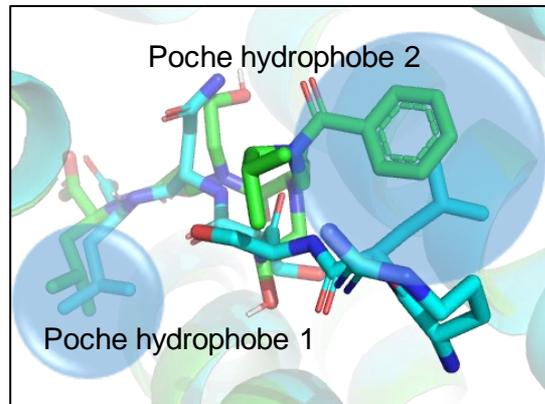


Figure 76. Dynamique moléculaire entre HCN (bleu) et YC55 (vert)

Les peptoides synthétisés ont été testés dans le modèle NPIO aigue. L'effet maximal sur l'hypersensibilité au froid est rapporté majoritairement entre 30 et 45 minutes après l'injection en intrathécale des peptoides. Finalement, c'est le premier peptotide synthétisé et testé *in vivo* YC55 qui fut à l'origine du meilleur effet antalgique sur le froid, observable notamment par l'AUC la plus élevée (figure 41). Il est important de noter qu'un effet antinociceptif est présent également chez les animaux sains (figure 77), ceci est en accord avec les données électrophysiologiques qui montrent un effet inhibiteur de  $I_h$  par YC55 autant chez les animaux VEH que OXA.

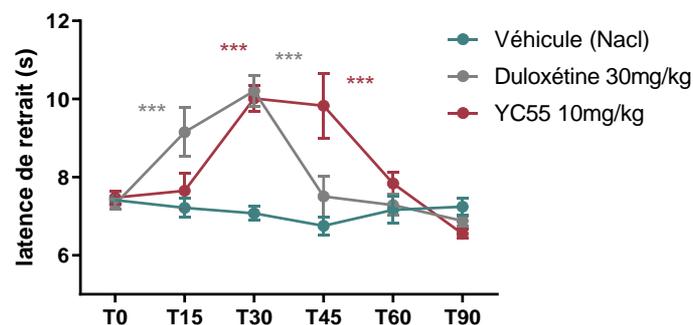
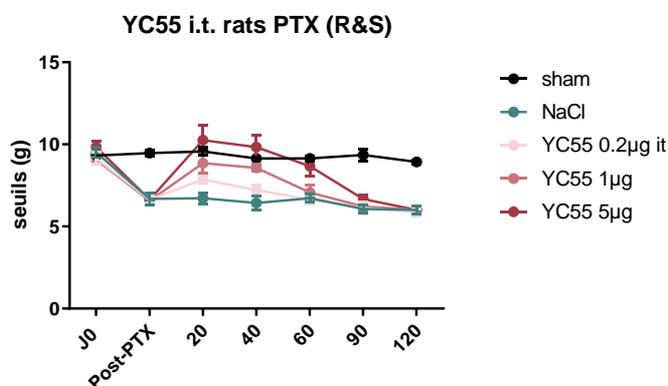


Figure 77. Tests YC55 en comparaison à la duloxétine sur animaux sains

\*\*\* < 0.001 ; 2way anova, tukey post hoc

Néanmoins, le peptide YC55 n'a pas montré d'effet sur la douleur mécanique induite par l'oxaliplatine. Ceci pourrait être expliqué par le type de fibres impliqués et la combinatoire de récepteurs mécanosensibles exprimée par ces fibres. Pour vérifier cette hypothèse, nous pouvons réaliser une hybridation *in situ* par RNAscope® ou une immunohisto/cytochimie, avec les sondes et anticorps HCN et TRIP8b, et des marqueurs phénotypiques des fibres méchanoceptives. Ainsi, nous nous attendons à une faible co-expression de HCN et TRIP8b avec ce type de fibre. Dans le même sens, l'ivabradine n'a un effet sur l'hypersensibilité mécanique qu'à des doses élevées et répétées. Il pourrait être intéressant d'évaluer l'effet pharmacologique d'une injection répétée du peptide YC55 sur le modèle NPIO aigue et chronique. Nous pourrions administrer au pic d'effet, à T45, une seconde dose de YC55 pour ainsi favoriser un effet antalgique à plus long terme. Aussi, cette molécule ne passe pas la barrière hématoencéphalique, donc par une stratégie de ligation chimique nous avons généré un peptide vectorisé, qui diminue l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine de façon similaire à YC55. Et de manière remarquable, il est efficace sur l'hypersensibilité mécanique. Si le peptide YC55 n'agit pas sur l'hypersensibilité mécanique du modèle NPIO, il est efficace injecté en i.t. sur la douleur thermique au chaud (46°C) et sur la douleur provoquée par une stimulation mécanique (Randall & Selitto) dans un autre modèle de neuropathie chimioinduite, induite par le paclitaxel (*figure 78*).

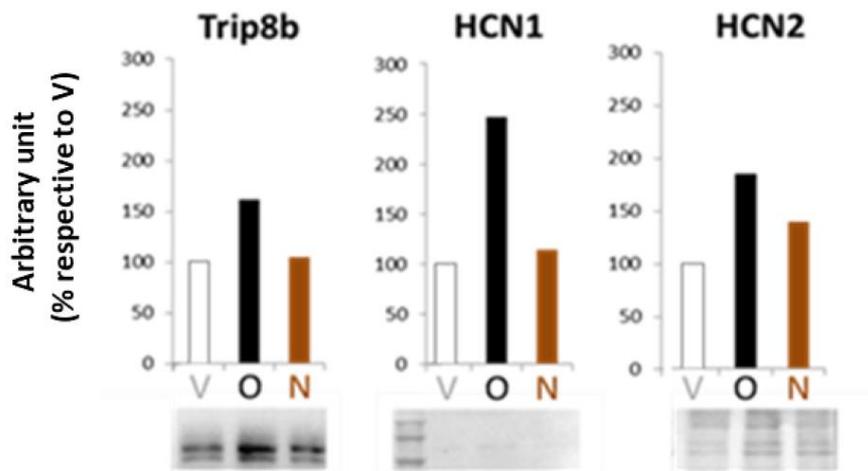


**Figure 78. Effet de YC55 sur la sensibilité mécanique du modèle PTX**

Le mécanisme pressenti de YC55 de par sa formule chimique mimant la partie SNL est de perturber l'interaction HCN-TRIP8b. Nous avons vérifié le potentiel perturbateur de YC55, et nous avons mesuré un IC<sub>50</sub> de 1.83µM. Ce test a été permis par la technologie du Monolith®, nécessitant la production recombinante des protéines d'intérêts. Il serait intéressant de vérifier cette donnée avec une seconde production de TRIP8b et HCN<sub>C40</sub>, dans le but de s'assurer d'une reproductibilité par l'utilisation d'un réplica considéré comme biologique. Nous voulons à plus long terme et dans le meilleur des cas, tester *in vitro* l'ensemble des peptides testés *in vivo*, afin de corrélérer, ou non, leur action sur l'antalgie à leur capacité de perturber l'interaction HCN-TRIP8b.

De plus, nous avons choisi d'explorer le mécanisme fonctionnel de YC55 par patch clamp sur culture de cellules isolées de DRG, en comparaison au ZD7288, bloqueur des canaux HCN. Pour cela nous avons appliqué le peptoïde en solution (concentration finale de 100µM) pendant 10 minutes sur des neurones issus de souris VEH et OXA, et le courant  $I_h$  isolé par la soustraction de la trace résultante du blocage par le ZD7288 a été mesuré. Nous avons observé un effet du peptoïde, à savoir environ 30% d'inhibition de l'amplitude du courant à -140mV autant chez les souris VEH que OXA, alors que le bloqueur ZD7288 bloque à hauteur de 80% le courant. En raison des propriétés dépolarisantes du canal, la modulation du courant par le peptoïde devrait éviter la dépolarisation de la membrane. C'est ce que l'on a retrouvé par la mesure du sag en présence de YC55 chez les souris VEH, en revanche cet effet est perdu chez les souris OXA, même si la cinétique de dépolarisation est plus lente. Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation significative du nombre de canaux et ainsi du sag chez les souris OXA, le blocage de 30% du courant par le peptoïde ne pourrait être pas suffisant pour bloquer la dépolarisation membranaire dans nos conditions d'expérimentation. Il est également possible que nous ciblions des neurones qui n'expriment pas la protéine TRIP8b. Ceci pourrait être vérifié par immunocytochimie (anticorps TRIP8b) en fixant par PFA4% les neurones patchés de l'étude fonctionnelle. A noter que nous incubons 3h le peptoïde en présence des protéines recombinantes pour la technique de thermophorèse à micro-échelle et le Tmax de l'effet *in vivo* est à 45 minutes. Il pourrait être alors pertinent d'incuber plus longtemps le peptoïde YC55 dans le milieu de culture, jusqu'à 3h par exemple. Il pourrait être envisagé également d'ajouter le peptoïde au milieu intracellulaire dans la pipette d'enregistrement pour faciliter une action directe intracellulaire sur l'interaction HCN-TRIP8b. Par ailleurs, les expérimentations de l'effet de YC55 sur les souris TRIP8b KO totaux sont en cours. Nous attendons chez ces souris une perte d'inhibition par YC55 sur le courant  $I_h$ .

Notre hypothèse est que la perturbation de l'interaction HCN-TRIP8b induite par YC55 pourrait permettre la délocalisation membranaire de HCN. Ceci pourrait être vérifié par Western Blot sur extractions différentielles (membrane/cytosol). Nous nous attendons ainsi à une diminution des taux protéiques de HCN dans la fraction membranaire, par rapport à des souris OXA traitées par le véhicule NaCl. Des données préliminaires concernant l'utilisation de la petite molécule NUCC-5953 obtenus par nos collaborateurs Américains qui est antalgique dans notre modèle NPIO aigue (*figure 29*) ont montré une tendance à la diminution des protéines TRIP8b, HCN1 et potentiellement HCN2 dans les DRG de souris NPIO traitées par le NUCC-5953 en i.t à 5nmol (*figure 79*). Cette molécule possède les mêmes caractéristiques que YC55 puisqu'elle cible TPR(TRIP8b)-SNL(HCN1) pour perturber cette interaction (Han et al, 2015).



**Figure 79. Données préliminaires de quantification d'extrait protéique total sur DRG (n=1) de souris V=VEH ; O=NPIO ; N=NPIO+NUCC-5953(5nmol)**

L'injection systémique (4mg/kg) de ce composé chez des souris NPIO aigue conduit à un effet pharmacologique similaire (AUC : 97.58+/-13.54) que YC55 injecté à 5mg/kg (données non montrées). En étude fonctionnelle, il pourrait être intéressant de comparer les effets du NUCC sur les courants  $I_h$  enregistrés dans les DRG. Nous pourrions également, dans le cadre de notre collaboration, tester *in vivo* la molécule découverte récemment, le NUCC-0200590 qui module également l'activité du canal et pas uniquement son expression.

Le mécanisme de délocalisation membranaire du canal a déjà été expliqué pour la canal potassique Kv1.5 dans les myocytes par le traitement à la quinidine, à l'origine de propriété antiarythmique. Des études d'immunocytochimies anti-GFP ont montré spécifiquement par l'utilisation de la protéine Kv1.5-GFP une internalisation du canal dans les cellules immortalisées HL-1 musculaires cardiaques au bout de 10 minutes de traitement à la quinidine (Schumacher et al. 2009).

## 2. Innocuité de YC55

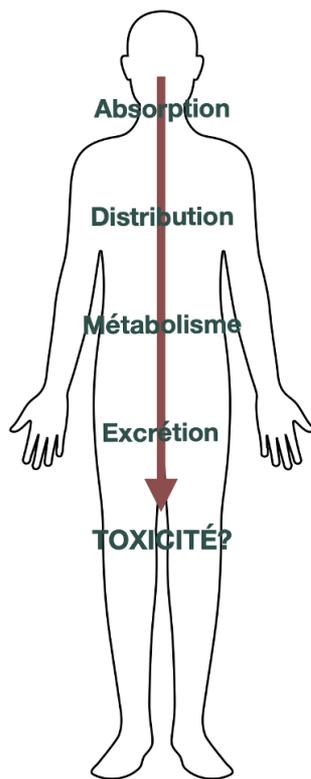


Figure 80. Modèle ADMET

Pour son utilisation à plus large échelle, il est indispensable de s'assurer de l'innocuité du peptoïde par la réalisation de tests complémentaires suivant le modèle ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité) (*figure 80*) (Ghosh et al. 2016). Avant tout, nous avons observé la solubilisation du peptoïde lyophilisé dans le sérum physiologique (NaCl 0.9%), qui est un avantage pour son utilisation clinique potentielle.

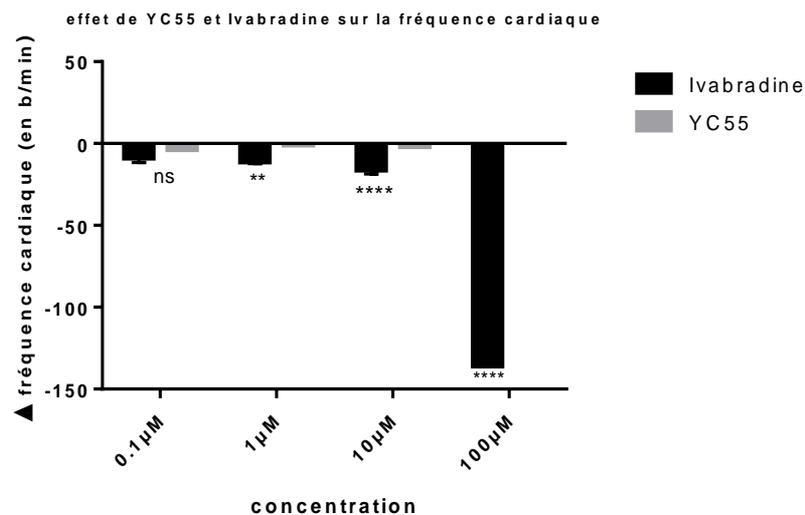
Durant ma thèse, nous avons vérifié la distribution du peptoïde chez la souris. Premièrement à l'aide d'une stratégie de conjugaison du peptoïde par la biotine, nous avons vérifié sa présence dans les DRG et la moelle épinière à T45, et nous avons observé uniquement de la fluorescence dans le DRG, qui semble être extracellulaire ou membranaire. Le poids de la biotine pourrait être un désavantage dans l'entrée intracellulaire du peptoïde, mais son action *in vivo* sur l'hypersensibilité au froid de l'oxaliplatine est maintenue, suggérant la conservation de son activité sur l'interaction HCN-TRIP8b. Sa distribution principalement périphérique a été confirmée par un dosage tissulaire du peptoïde. Le composé ne

semble que faiblement passer la BHE. Vérifier sa concentration dans les tissus (DRG, TG, moelle épinière, cerveau) à différents temps est une perspective de ce projet. De plus, sa concentration plasmatique décroît rapidement, la concentration maximum est à T15 et nulle à T90. Un des premiers avantages d'un peptoïde est sa stabilité biologique augmentée. Dans notre étude, il ne semble pas qu'il soit dégradé, ces résultats évoquent plutôt son élimination rapide dans le sang. Mais cette donnée sera à confirmer par l'étude ADMET.

Nous avons entrepris des analyses de toxicité sur les cellules de cancer colorectal. Pour une utilisation clinique chez des patients traités par oxaliplatine, il était indispensable de garantir que le mime peptidique n'interférait pas avec l'effet cytotoxique de l'oxaliplatine. De façon intéressante, une étude a montré un effet de l'ivabradine antiprolifératif des cellules de cancer du sein (Mok et al. 2021). Dans ces cellules issues de cancer du sein, il a été montré une surexpression des canaux HCN2 et HCN3, corrélée à une augmentation de la mortalité chez les patientes. Dans notre étude, avec des doses croissantes de YC55, la cytotoxicité et l'effet antiprolifératif induite par l'oxaliplatine sur la lignée cellulaire humaine HT29 n'exprimant pas TRIP8b est inchangée. Le peptoïde ne semble pas avoir d'effet prolifératif sur des cellules cancéreuses. Il est prévu de réaliser des tests de viabilité cellulaire sur plusieurs lignées cellulaires du cancer colorectal comme la lignée T84 issue de carcinome humain du colon,

dont l'expression du gène TRIP8b sera préalablement vérifié systématiquement. A plus long terme, nous pourrions envisager de tester la molécule YC55 *in vivo* sur des souris Apcmin qui développent spontanément des tumeurs de l'intestin, traitées par oxaliplatine (Moser et al. 1995).

Compte tenu de l'effet bradycardisant du blocage des canaux HCN, il peut nous être demandé de s'assurer que notre stratégie par peptidomimétique n'induit pas d'effet secondaire cardiaque, bien que notre cible soit spécifique des neurones du système nerveux et que les souris TRIP8b<sup>-/-</sup> ne montrent pas d'altération cardiaque (Scherschel et al. 2021). Des données préliminaires dans le laboratoire, obtenue chez l'animal anesthésié chez lequel la fréquence cardiaque était monitorée, montrent un effet bradycardisant dose-dépendant de l'ivabradine. Aux mêmes doses, le peptoïde YC55 n'induit pas de changement dans la fréquence cardiaque du rat (*figure 81*). Ces données sont issues d'une expérimentation avec un seul rat, et sont donc à prendre avec du recul. Il serait nécessaire de compléter ces résultats avec d'autres rats anesthésiés, ou de réaliser un monitoring sur animaux éveillés.



**Figure 81. Données préliminaires de la fréquence cardiaque d'un rat perfusé anesthésié par le peptoïde YC55 en comparaison avec l'ivabradine**

### 3. Perspective thérapeutique humaine ?

La perspective clinique de notre étude pharmacologique nous amènerait également à quantifier l'expression ARNm de HCN et TRIP8b chez les DRG et TG de l'Homme. Leur coexpression serait un atout pour la translation de notre stratégie pharmacologique. Cette piste d'exploration est d'ailleurs lancée dans le laboratoire du Dr. Bourinet à l'IGF de Montpellier, où des expérimentations de RNAscope® sont en cours sur des tissus de DRG humains. Des données de la littérature suggèrent une population de neurones exprimant HCN1 importante (94%) mais seulement 44% de neurones positifs pour HCN2 dans les DRG humains (Shiers, Klein, et Price 2020).

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Nous aimerions également évaluer l'effet *in vitro* du peptotide sur des cellules neuronales sensoriels humains dérivés d'IPSC (Ankam et al. 2019). Après s'être assuré de l'expression de TRIP8b et HCN dans ces neurones par RT-qPCR, nous souhaitons réaliser une étude fonctionnelle par patch clamp, selon le même protocole que nous avons suivi sur culture primaire de DRG. Un test de croissance de neurite pourrait être proposé, en raison de l'importance de ce phénomène dans le développement d'un réseau neuronal complet (Delp et al. 2018; S. Li et al. 2021) et pourrait donner des indications sur un potentiel effet neuroprotecteur du composé YC55.

Si nos cibles sont confirmées chez l'humain, que l'innocuité de notre stratégie de modulation de protéine-protéine est attestée, et que la synthèse à grande échelle des peptoides est possible, cette stratégie pourrait constituer une application clinique innovante et bien tolérée contre la neuropathie induite par oxaliplatine.

# CONCLUSION GÉNÉRALE



Mon travail de thèse a permis de mieux comprendre la physiopathologie des neuropathies périphériques aiguë et chronique induites par chimiothérapie à l'aide d'un modèle murin développant des symptômes de type douleur neuropathique exacerbées par le froid et des comorbidités associées après administration d'oxaliplatine. Particulièrement, nous avons mis en évidence dans le système nerveux périphérique et central l'implication des canaux ioniques HCN et leur protéine partenaire TRIP8b dans cette pathologie.

Notre étude pharmacologique par screening de mimes peptidiques sur ce modèle a révélé un composé perturbateur de l'interaction HCN-TRIP8b à l'origine d'un effet antalgique sur l'hypersensibilité au froid. L'utilisation de peptoïde dans une telle application biomédicale est innovante. En raison de sa cible d'intérêt TRIP8b qui n'est pas impliquée dans les grandes fonctions physiologiques, cette stratégie est bien tolérée. Les futures études se concentreront davantage sur l'exploration de son mécanisme d'action et sur les pré-requis essentiels à son développement pour, à terme, envisager un essai clinique chez l'Homme. Protégé par un brevet publié en 2022, un article original sur l'utilisation de ce composé est en cours de rédaction.

J'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction d'une revue de la littérature relatant la sécurité des traitements utilisés contre les douleurs neuropathiques, notamment les opioïdes et cannabinoïdes utilisés dans les études cliniques (*annexe 7*). Nous avons conclu l'existence d'effets indésirables majeurs de ces molécules et surtout un manque de transparence dans les données relatives à l'innocuité ou la toxicité des traitements proposés dans ces études.

Dans l'ensemble, cette thèse m'a permis d'observer qu'il était nécessaire de trouver une solution aux effets indésirables neurologiques induits par la chimiothérapie, impactant la qualité de vie de patients atteints de cancer. Notre stratégie constitue ainsi une piste prometteuse pour ce problème de santé publique.



# ANNEXES



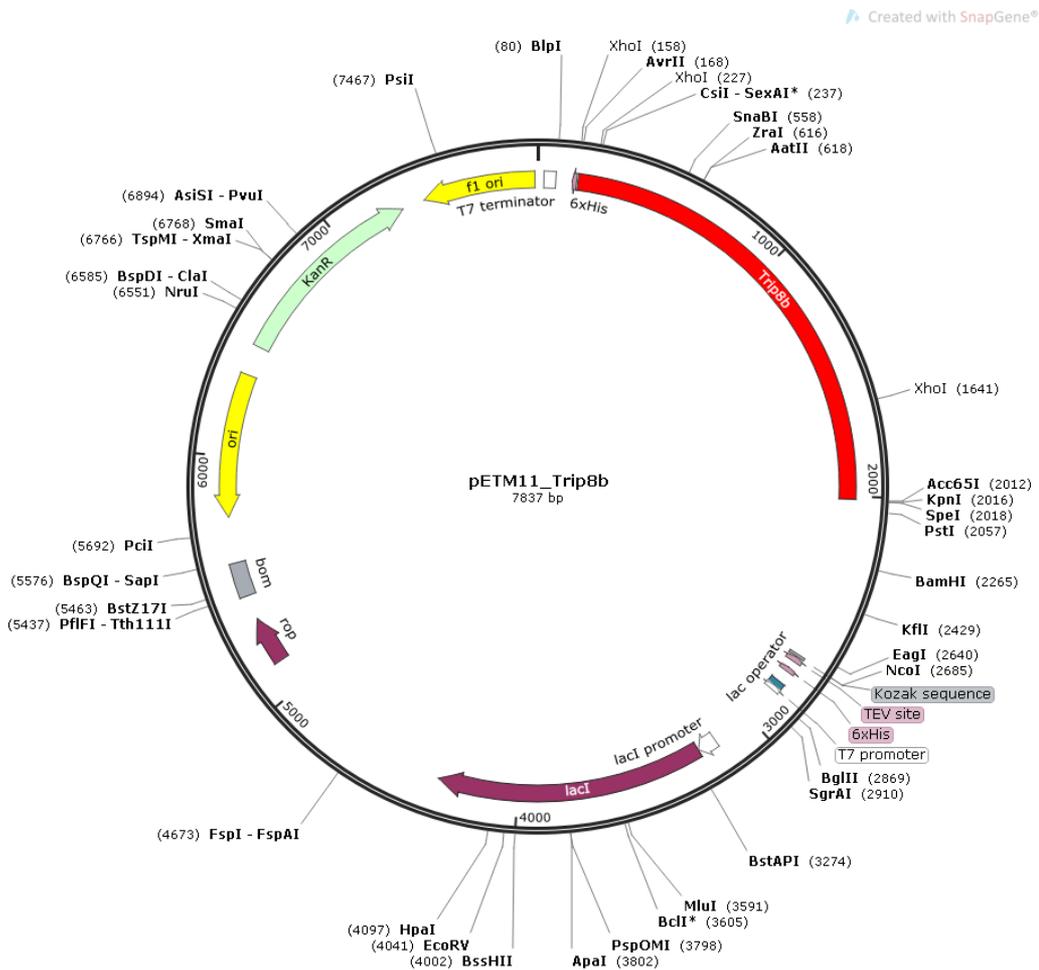
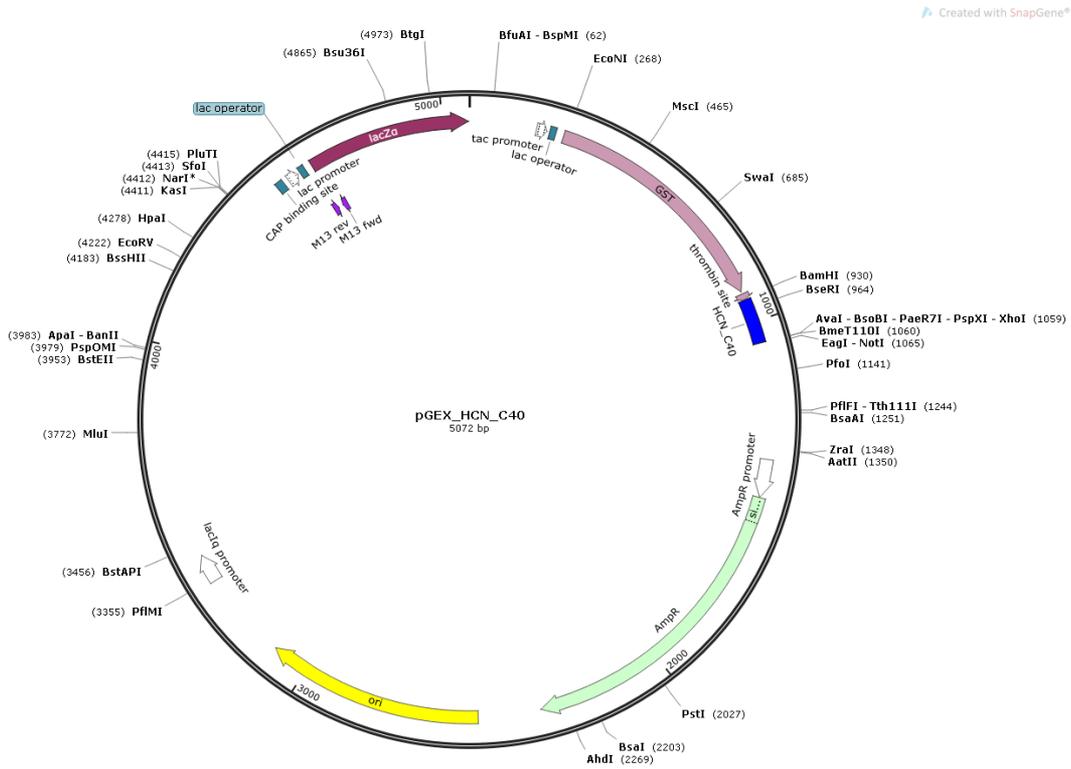
## ANNEXE 2 : SOLUTIONS ELECTROPHYSIOLOGIE SUR TRANCHES

<b>NMDG-HEPES</b>	
cutting + prerecovery 32°C	mM
NMDG	93
KCl	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	30
HEPES	20
Glucose	25
Sodium Ascorbate	5
Thiourea	2
Sodium Pyruvate	3
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10

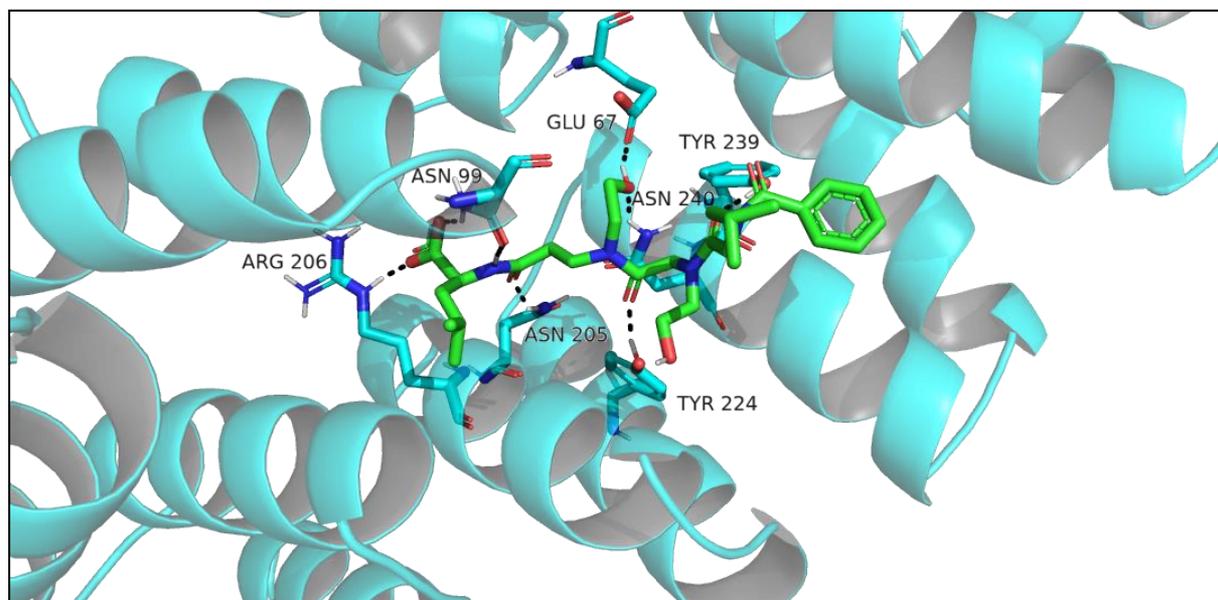
<b>STANDARD</b>	
perfusion/recording	mM
NaCl	126
KCl	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	18
Glucose	11
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2

<b>HEPES</b>	
recovery RT	mM
NaCl	92
KCl	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	30
HEPES	20
Glucose	25
Sodium Ascorbate	5
Thiourea	2
Sodium Pyruvate	3
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2

# ANNEXE 3 : VECTEURS D'EXPRESSION



## ANNEXE 4 : MODÉLISATION MOLÉCULAIRE INTERACTION YC55-TRIP8b



Modélisation moléculaire entre TRIP8b (bleu) et YC55 (vert)

# ANNEXE 5 : DONNEES SUPPLEMENTAIRES

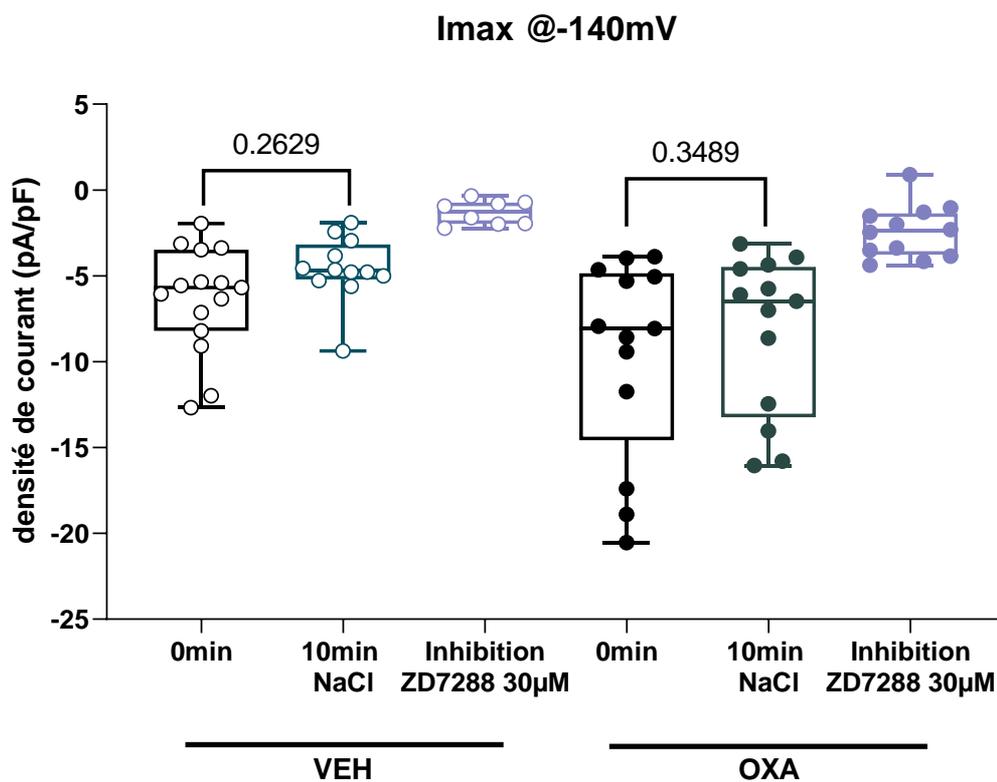


Figure supp. 1 : effet du NaCl sur la densité de courant  $I_h$  dans les DRG en culture

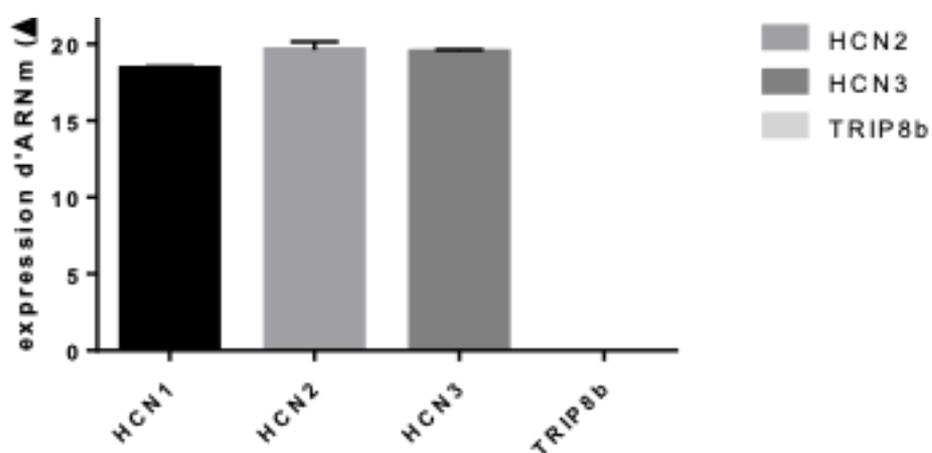
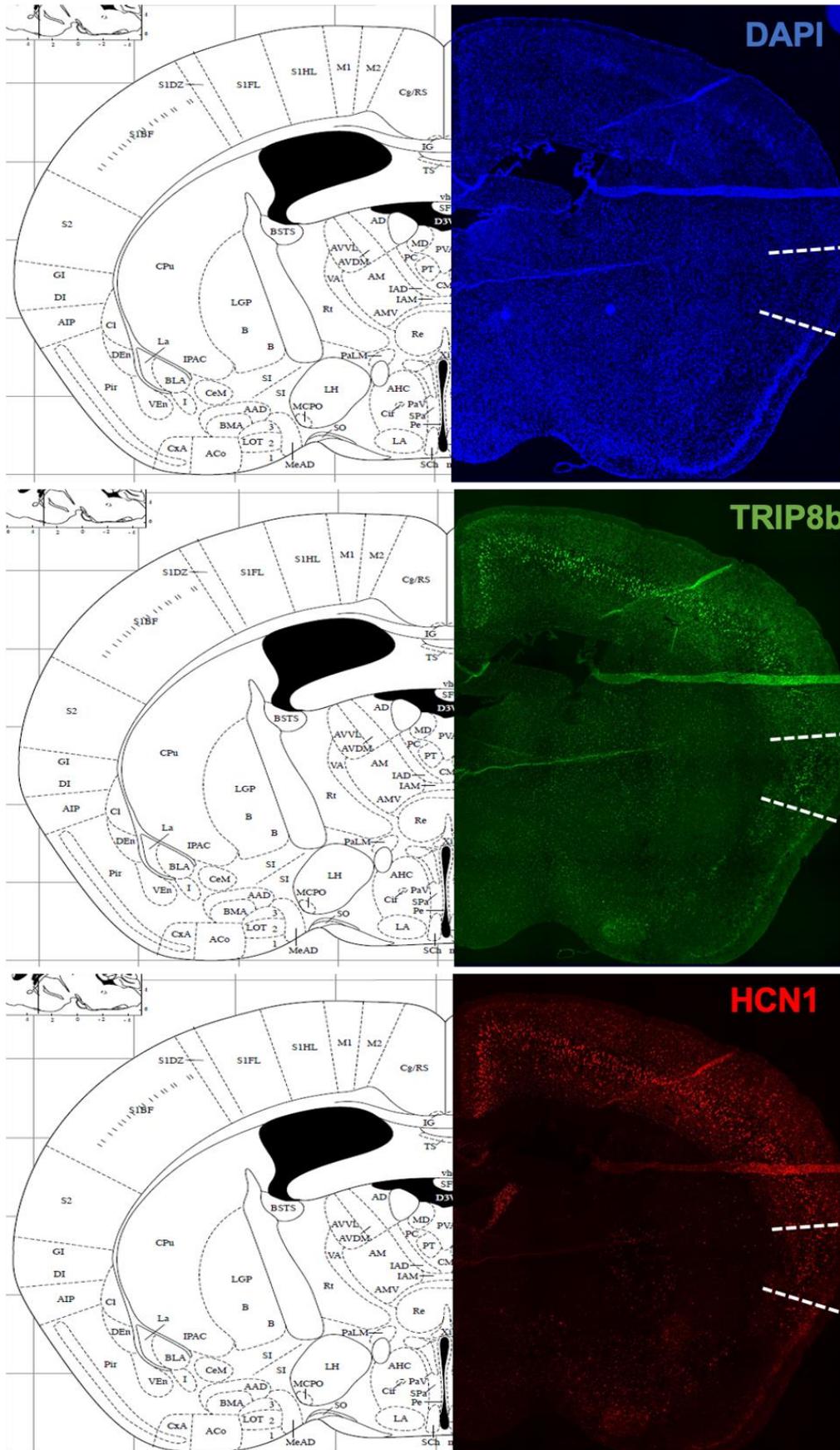


Figure supp. 2 : RT-qPCR sur cellules humaines HT29 ( $\Delta$ Ct par rapport au gène 18S)



# ANNEXE 6 : RNASCOPE® CORTEX INSULAIRE POSTÉRIEUR



# ANNEXE 7 : ARTICLE DE REVUE



Expert Opinion on Drug Safety



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ieds20>

## The Safety of Medications used to Treat Peripheral Neuropathic Pain, Part 2 (Opioids, Cannabinoids and Other Drugs): review of Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trials

Mélissa Cuména1 , Marie Selvy , Nicolas Kerckhove , Célian Bertin , Margaux Morez , Christine Courteix , Jérôme Busserolles & David Balayssac

To cite this article: Mélissa Cuména1 , Marie Selvy , Nicolas Kerckhove , Célian Bertin , Margaux Morez , Christine Courteix , Jérôme Busserolles & David Balayssac (2020): The Safety of Medications used to Treat Peripheral Neuropathic Pain, Part 2 (Opioids, Cannabinoids and Other Drugs): review of Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trials, Expert Opinion on Drug Safety, DOI: [10.1080/14740338.2021.1842871](https://doi.org/10.1080/14740338.2021.1842871)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14740338.2021.1842871>



Published online: 04 Nov 2020.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 15



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ieds20>

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-Elseyed, Alaa A, Ryo Ikeda, Zhanfeng Jia, Jennifer Ling, Xiaozhuo Zuo, Min Li, et Jianguo G Gu. 2015. « KCNQ Channels in Nociceptive Cold-Sensing Trigeminal Ganglion Neurons as Therapeutic Targets for Treating Orofacial Cold Hyperalgesia ». *Molecular Pain* 11 (janvier): s12990-015-0048-8. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0048-8>.
- Abe, Junji, Hiroshi Hosokawa, Makoto Okazawa, Mikako Kandachi, Yosuke Sawada, Keiji Yamanaka, Kiyoshi Matsumura, et Shigeo Kobayashi. 2005. « TRPM8 Protein Localization in Trigeminal Ganglion and Taste Papillae ». *Brain Research Molecular Brain Research* 136 (1-2): 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.013>.
- Acosta, Cristian, Simon McMullan, Laiche Djouhri, Linlin Gao, Roger Watkins, Carol Berry, Katherine Dempsey, et Sally N. Lawson. 2012. « HCN1 and HCN2 in Rat DRG Neurons: Levels in Nociceptors and Non-Nociceptors, NT3-Dependence and Influence of CFA-Induced Skin Inflammation on HCN2 and NT3 Expression ». Édité par Zhe Zhang. *PLoS ONE* 7 (12): e50442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050442>.
- Agnes, Jonathan Paulo, Vitória Wibbelt Dos Santos, Raquel Nascimento das Neves, Rosângela Mayer Gonçalves, Marina Delgobo, Carolina Saibro Girardi, Débora Denardin Lückemeyer, et al. 2021. « Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation ». *The Journal of Pain* 22 (8): 996-1013. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.03.142>.
- Ahles, Tim A. 2012. « Brain Vulnerability to Chemotherapy Toxicities ». *Psycho-Oncology* 21 (11): 1141-48. <https://doi.org/10.1002/pon.3196>.
- Ahles, Tim A., Andrew J. Saykin, Brenna C. McDonald, Yuelin Li, Charlotte T. Furstenberg, Brett S. Hanscom, Tamsin J. Mulrooney, Gary N. Schwartz, et Peter A. Kaufman. 2010. « Longitudinal Assessment of Cognitive Changes Associated with Adjuvant Treatment for Breast Cancer: Impact of Age and Cognitive Reserve ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (29): 4434-40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.0827>.
- Beijers, Mols F, et Vreugdenhil G. 2014. « A Systematic Review on Chronic Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy and the Relation with Oxaliplatin Administration ». *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 22 (7). <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2242-z>.
- André, Thierry, Corrado Boni, Lamia Mounedji-Boudiaf, Matilde Navarro, Josep Tabernero, Tamas Hickish, Clare Topham, et al. 2004. « Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 350 (23): 2343-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>.
- André, Thierry, Corrado Boni, Matilde Navarro, Josep Tabernero, Tamas Hickish, Clare Topham, Andrea Bonetti, et al. 2009. « Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (19): 3109-16. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771>.
- Andreis, Federica, Marco Ferri, Maria Mazzocchi, Fausto Meriggi, Anna Rizzi, Luigina Rota, Brunella Di Biasi, et al. 2013. « Lack of a Chemobrain Effect for Adjuvant FOLFOX Chemotherapy in Colon Cancer Patients. A Pilot Study ». *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 21 (2): 583-90. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1560-2>.
- Ankam, Soneela, Amandine Rovini, Saurabh Baheti, Ron Hrstka, Yanhong Wu, Kiley Schmidt, Hailong Wang, et al. 2019. « DNA Methylation Patterns in Human iPSC-Derived Sensory Neuronal Differentiation ». *Epigenetics* 14 (9): 927-37. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1625672>.
- Apkarian, A. Vania, M. Catherine Bushnell, Rolf-Detlef Treede, et Jon-Kar Zubieta. 2005. « Human Brain Mechanisms of Pain Perception and Regulation in Health and Disease ». *European Journal of Pain* 9 (4): 463-463. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>.
- Argyriou, Andreas A., Guido Cavaletti, Anna Antonacopoulou, Armando A. Genazzani, Chiara Briani, Jordi Bruna, Salvatore Terrazzino, et al. 2013a. « Voltage-Gated Sodium Channel

- Polymorphisms Play a Pivotal Role in the Development of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity: Results from a Prospective Multicenter Study ». *Cancer* 119 (19): 3570-77. <https://doi.org/10.1002/cncr.28234>.
- Argyriou, Andreas A., Guido Cavaletti, Chiara Briani, Roser Velasco, Jordi Bruna, Marta Campagnolo, Paola Alberti, et al. 2013. « Clinical Pattern and Associations of Oxaliplatin Acute Neurotoxicity ». *Cancer* 119 (2): 438-44. <https://doi.org/10.1002/cncr.27732>.
- Attal, Nadine, D. Bouhassira, M. Gautron, J. N. Vaillant, E. Mitry, C. Lepère, P. Rougier, et F. Guirimand. 2009. « Thermal Hyperalgesia as a Marker of Oxaliplatin Neurotoxicity: A Prospective Quantified Sensory Assessment Study ». *Pain* 144 (3): 245-52. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.024>.
- Attal, Nadine, Michel Lanteri-Minet, Bernard Laurent, Jacques Fermanian, et Didier Bouhassira. 2011. « The Specific Disease Burden of Neuropathic Pain: Results of a French Nationwide Survey ». *Pain* 152 (12): 2836-43. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>.
- Attwell, D., et M. Wilson. 1980. « Behaviour of the Rod Network in the Tiger Salamander Retina Mediated by Membrane Properties of Individual Rods ». *The Journal of Physiology* 309 (décembre): 287-315. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013509>.
- Balayssac, D., J. Ferrier, B. Pereira, B. Gillet, C. Petorin, J. Vein, F. Libert, A. Eschalier, et D. Pezet. 2015. « Prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by a polyamine-reduced diet--NEUROXAPOL: protocol of a prospective, randomised, controlled, single-blind and monocentric trial ». *BMJ Open* 5 (4): e007479.
- Balducci, Valentina, Caterina Credi, Leonardo Sacconi, Maria Novella Romanelli, Laura Sartiani, et Elisabetta Cerbai. 2021. « The HCN Channel as a Pharmacological Target: Why, Where, and How to Block It ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 166 (novembre): 173-81. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.07.010>.
- Bankston, John R., Stacey S. Camp, Frank DiMaio, Alan S. Lewis, Dane M. Chetkovich, et William N. Zagotta. 2012. « Structure and stoichiometry of an accessory subunit TRIP8b interaction with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (20): 7899-7904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201997109>.
- Barbuti, Andrea, et Dario DiFrancesco. 2014. « The 'funny' side of sepsis ». *The Journal of Physiology* 592 (Pt 6): 1171. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271171>.
- Bartos, Daniel C., Eleonora Grandi, et Crystal M. Ripplinger. 2015. « Ion Channels in the Heart ». *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1423-64. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140069>.
- Basbaum, Allan I., Diana M. Bautista, Grégory Scherrer, et David Julius. 2009. « Cellular and Molecular Mechanisms of Pain ». *Cell* 139 (2): 267-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- Bauer, Daniel, Jan Wissmann, Anna Moroni, Gerhard Thiel, et Kay Hamacher. 2022. « Weak Cation Selectivity in HCN Channels Results From K+-Mediated Release of Na+ From Selectivity Filter Binding Sites ». *Function* 3 (3): zqac019. <https://doi.org/10.1093/function/zqac019>.
- Beijers, Antoinetta J. M., Floortje Mols, Vivianne C. G. Tjan-Heijnen, Catharina G. Faber, Lonneke V. van de Poll-Franse, et Gerard Vreugdenhil. 2015. « Peripheral Neuropathy in Colorectal Cancer Survivors: The Influence of Oxaliplatin Administration. Results from the Population-Based PROFILES Registry ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 54 (4): 463-69. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.980912>.
- Bennett, David L. H., et C. Geoffrey Woods. 2014. « Painful and Painless Channelopathies ». *The Lancet Neurology* 13 (6): 587-99. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70024-9).
- Benzoni, Patrizia, Giorgia Bertoli, Federica Giannetti, Chiara Piantoni, Raffaella Milanese, Matteo Pecchiari, Andrea Barbuti, Mirko Baruscotti, et Annalisa Bucchi. 2021. « The Funny Current: Even Funnier than 40 Years Ago. Uncanonical Expression and Roles of HCN/f Channels All over the Body ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1979-2019: a "Funny" journey lasting 40 years, the multiple roles of f/HCN channels, 166 (novembre): 189-204. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.007>.

- Berret, Emmanuelle, Michael Kintscher, Shriya Palchadhuri, Wei Tang, Denys Osypenko, Olexiy Kochubey, et Ralf Schneggenburger. 2019. « Insular Cortex Processes Aversive Somatosensory Information and Is Crucial for Threat Learning ». *Science (New York, N.Y.)* 364 (6443): eaaw0474. <https://doi.org/10.1126/science.aaw0474>.
- Biel, Martin, Christian Wahl-Schott, Stylianos Michalakis, et Xiangang Zong. 2009. « Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function ». *Physiological Reviews* 89 (3): 847-85. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2008>.
- Biswas, Riya, Piyush Bugde, Ji He, Fabrice Merien, Jun Lu, Dong-Xu Liu, Khine Myint, Johnson Liu, Mark McKeage, et Yan Li. 2019. « Transport-Mediated Oxaliplatin Resistance Associated with Endogenous Overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 Cells ». *Cancers* 11 (9): 1330. <https://doi.org/10.3390/cancers11091330>.
- Bompaire, Flavie, Thomas Durand, Isabelle Léger-Hardy, Dimitri Psimaras, et Damien Ricard. 2017. « Chemotherapy-Related Cognitive Impairment or “Chemobrain”: Concept and State of Art ». *Geriatric Et Psychologie Neuropsychiatrie Du Vieillissement* 15 (1): 89-98. <https://doi.org/10.1684/pnv.2017.0659>.
- Bosman, Alexis, Laura Sartiani, Valentina Spinelli, Martina Del Lungo, Francesca Stillitano, Daniele Nosi, Alessandro Mugelli, Elisabetta Cerbai, et Marisa Jaconi. 2013. « Molecular and Functional Evidence of HCN4 and Caveolin-3 Interaction During Cardiomyocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 22 (11): 1717-27. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0247>.
- Bouhassira, Didier, Nadine Attal, Jacques Fermanian, Hael Alchaar, Michèle Gautron, Etienne Masquelier, Sylvie Rostaing, et al. 2004. « Development and Validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory ». *Pain* 108 (3): 248-57. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.024>.
- Bradley, Kim, Marianne Laforest, Sandra Kish, et Chantal Guillemette. 2014. « Efficacité d'un tableau d'ajustement de l'oxaliplatine selon le grade de neuropathie à l'Hôtel-Dieu de Québec ». *Pharmactuel* 47 (2). <https://pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/951>.
- Branca, Jacopo Junio Valerio, Mario Maresca, Gabriele Morucci, Matteo Becatti, Ferdinando Paternostro, Massimo Gulisano, Carla Ghelardini, Daniela Salvemini, Lorenzo Di Cesare Mannelli, et Alessandra Pacini. 2018. « Oxaliplatin-Induced Blood Brain Barrier Loosening: A New Point of View on Chemotherapy-Induced Neurotoxicity ». *Oncotarget* 9 (34): 23426-38. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25193>.
- Briani, Chiara, Andreas A. Argyriou, Cristina Izquierdo, Roser Velasco, Marta Campagnolo, Paola Alberti, Barbara Frigeni, et al. 2014. « Long-Term Course of Oxaliplatin-Induced Polyneuropathy: A Prospective 2-Year Follow-up Study ». *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS* 19 (4): 299-306. <https://doi.org/10.1111/jns.12097>.
- Brouwers, Elke EM, Alwin DR Huitema, Jos H. Beijnen, et Jan HM Schellens. 2008. « Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin ». *BMC Clinical Pharmacology* 8 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-8-7>.
- Brown, H. F., D. DiFrancesco, et S. J. Noble. 1979. « How Does Adrenaline Accelerate the Heart? » *Nature* 280 (5719): 235-36. <https://doi.org/10.1038/280235a0>.
- Bucchi, Annalisa, Mirko Baruscotti, Marco Nardini, Andrea Barbuti, Stefano Micheloni, Martino Bolognesi, et Dario DiFrancesco. 2013. « Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 Channels ». *PLOS ONE* 8 (1): e53132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053132>.
- Craig, A. D. 2009. « How Do You Feel — Now? The Anterior Insula and Human Awareness ». *Nature Reviews Neuroscience* 10 (1): 59-70. <https://doi.org/10.1038/nrn2555>.
- Buijs, Tamara Joëlle et Peter Anthony McNaughton. 2020. « The Role of Cold-Sensitive Ion Channels in Peripheral Thermosensation ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14: 262. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00262>.

- Bullinger, Katie L., Paul Nardelli, Qingbo Wang, Mark M. Rich, et Timothy C. Cope. 2011. « Oxaliplatin neurotoxicity of sensory transduction in rat proprioceptors ». *Journal of Neurophysiology* 106 (2): 704-9. <https://doi.org/10.1152/jn.00083.2011>.
- Cain, David M., Sergey G. Khasabov, et Donald A. Simone. 2001. « Response Properties of Mechanoreceptors and Nociceptors in Mouse Glabrous Skin: An In Vivo Study ». *Journal of Neurophysiology* 85 (4): 1561-74. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.4.1561>.
- Calejo, Ana I., Marisa Reverendo, Virgília S. Silva, Patrícia M. Pereira, Manuel A. S. Santos, Robert Zorec, et Paula P. Gonçalves. 2014. « Differences in the Expression Pattern of HCN Isoforms among Mammalian Tissues: Sources and Implications ». *Molecular Biology Reports* 41 (1): 297-307. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2862-2>.
- Cassidy, Jim, Josep Taberero, Chris Twelves, René Brunet, Charles Butts, Thierry Conroy, Filippo Debraud, et al. 2004. « XELOX (Capecitabine plus Oxaliplatin): Active First-Line Therapy for Patients with Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (11): 2084-91. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.069>.
- Caudle, Robert M., et John K. Neubert. 2022. « Effects of Oxaliplatin on Facial Sensitivity to Cool Temperatures and TRPM8 Expressing Trigeminal Ganglion Neurons in Mice ». *Frontiers in Pain Research* 3 (mai): 868547. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.868547>.
- Cavaletti, G, G Tredici, M. G Petruccioli, E Dondè, P Tredici, P Marmioli, C Minoia, A Ronchi, M Bayssas, et G Griffon Etienne. 2001. « Effects of Different Schedules of Oxaliplatin Treatment on the Peripheral Nervous System of the Rat ». *European Journal of Cancer* 37 (18): 2457-63. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00300-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00300-8).
- Cecchin, E., M. D'Andrea, S. Lonardi, C. Zanusso, N. Pella, D. Errante, E. De Mattia, J. Polesel, F. Innocenti, et G. Toffoli. 2013. « A Prospective Validation Pharmacogenomic Study in the Adjuvant Setting of Colorectal Cancer Patients Treated with the 5-Fluorouracil/Leucovorin/Oxaliplatin (FOLFOX4) Regimen ». *The Pharmacogenomics Journal* 13 (5): 403-9. <https://doi.org/10.1038/tj.2012.31>.
- Chaplan, Sandra R., Hong-Qing Guo, Doo Hyun Lee, Lin Luo, Changlu Liu, Chester Kuei, Alexander A. Velumian, Matthew P. Butler, Sean M. Brown, et Adrienne E. Dubin. 2003. « Neuronal Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels Drive Neuropathic Pain ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (4): 1169-78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01169.2003>.
- Chen, Shan, Jing Wang, Lei Zhou, Meena S. George, et Steven A. Siegelbaum. 2007. « Voltage Sensor Movement and CAMP Binding Allosterically Regulate an Inherently Voltage-Independent Closed-Open Transition in HCN Channels ». *The Journal of General Physiology* 129 (2): 175-88. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609585>.
- Chenaf, Chouki, Jessica Delorme, Noémie Delage, Denis Ardid, Alain Eschalier, et Nicolas Authier. 2018. « Prevalence of Chronic Pain with or without Neuropathic Characteristics in France Using the Capture–Recapture Method: A Population-Based Study ». *Pain* 159 (11): 2394-2402. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001347>.
- Cho, Hyun-Jung, John B. Furness, et Ernest A. Jennings. 2011. « Postnatal Maturation of the Hyperpolarization-Activated Cation Current, I(h), in Trigeminal Sensory Neurons ». *Journal of Neurophysiology* 106 (4): 2045-56. <https://doi.org/10.1152/jn.00798.2010>.
- Cho, Hyun-jung, Vasiliki Staikopoulos, Jason J. Ivanusic, et Ernest A. Jennings. 2009. « Hyperpolarization-Activated Cyclic-Nucleotide Gated 4 (HCN4) Protein Is Expressed in a Subset of Rat Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons ». *Cell and Tissue Research* 338 (2): 171-77. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0869-8>.
- Clapham, David E. 1998. « Not So Funny Anymore ». *Neuron* 21 (1): 5-7. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80508-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80508-5).
- Claveras Cabezudo, Ainara, Asma Feriel Khoualdi, et Nazzareno D'Avanzo. 2022. « Computational Prediction of Phosphoinositide Binding to Hyperpolarization-Activated Cyclic-Nucleotide Gated Channels ». *Frontiers in Physiology* 13: 859087. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.859087>.

- Cliff, J., A. L. Jorgensen, R. Lord, F. Azam, L. Cossar, D. F. Carr, et M. Pirmohamed. 2017. « The Molecular Genetics of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 120 (décembre): 127-40. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.09.009>.
- Cohen, Steven P, Lene Vase, et William M Hooten. 2021. « Chronic Pain: An Update on Burden, Best Practices, and New Advances ». *The Lancet* 397 (10289): 2082-97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00393-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00393-7).
- Combe, Crescent L., et Sonia Gasparini. 2021. « Ih from Synapses to Networks: HCN Channel Functions and Modulation in Neurons ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 166 (novembre): 119-32. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.06.002>.
- Cordeiro Matos, Steven, Zizhen Zhang, et Philippe Séguéla. 2015. « Peripheral Neuropathy Induces HCN Channel Dysfunction in Pyramidal Neurons of the Medial Prefrontal Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (38): 13244-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0799-15.2015>.
- Coste, Bertrand, Jayanti Mathur, Manuela Schmidt, Taryn J. Earley, Sanjeev Ranade, Matt J. Petrus, Adrienne E. Dubin, et Ardem Patapoutian. 2010. « Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels ». *Science (New York, N. Y.)* 330 (6000): 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>.
- Costigan, Michael, Joachim Scholz, et Clifford J. Woolf. 2009. « Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage ». *Annual Review of Neuroscience* 32: 1-32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.
- Craig, A. D., K. Chen, D. Bandy, et E. M. Reiman. 2000. « Thermosensory Activation of Insular Cortex ». *Nature Neuroscience* 3 (2): 184-90. <https://doi.org/10.1038/72131>.
- Cruzado, Juan Antonio, Sonia López-Santiago, Virginia Martínez-Marín, Gema José-Moreno, Ana Belén Custodio, et Jaime Feliu. 2014. « Longitudinal Study of Cognitive Dysfunctions Induced by Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer Patients ». *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 22 (7): 1815-23. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2147-x>.
- Dallel, Radhouane, Luis Villanueva, Alain Woda, et Daniel Voisin. 2003. « [Neurobiology of trigeminal pain] ». *Medecine Sciences: M/S* 19 (5): 567-74. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003195567>.
- Daou, Ihab, Hélène Beaudry, Ariel R. Ase, Jeffrey S. Wieskopf, Alfredo Ribeiro-da-Silva, Jeffrey S. Mogil, et Philippe Séguéla. 2016. « Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain ». *eNeuro* 3 (1): ENEURO.0140-15.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0140-15.2016>.
- DaSilva, A.F., et M.F. DosSantos. 2012. « The Role of Sensory Fiber Demography in Trigeminal and Postherpetic Neuralgias ». *Journal of Dental Research* 91 (1): 17-24. <https://doi.org/10.1177/0022034511411300>.
- Davie, Jenny T., Maarten H. P. Kole, Johannes J. Letzkus, Ede A. Rancz, Nelson Spruston, Greg J. Stuart, et Michael Häusser. 2006. « Dendritic Patch-Clamp Recording ». *Nature Protocols* 1 (3): 1235-47. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.164>.
- DeBerg, Hannah A., John R. Bankston, Joel C. Rosenbaum, Peter S. Brzovic, William N. Zagotta, et Stefan Stoll. 2015. « Structural Mechanism for the Regulation of HCN Ion Channels by the Accessory Protein TRIP8b ». *Structure* 23 (4): 734-44. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.02.007>.
- Delp, Johannes, Simon Gutbier, Stefanie Klima, Lisa Hoelting, Kevin Pinto-Gil, Jui-Hua Hsieh, Michael Aichem, et al. 2018. « A High-Throughput Approach to Identify Specific Neurotoxicants/ Developmental Toxicants in Human Neuronal Cell Function Assays ». *ALTEX* 35 (2): 235-53. <https://doi.org/10.14573/altex.1712182>.
- Denyer, J C, et H F Brown. 1990. « Pacemaking in Rabbit Isolated Sino-Atrial Node Cells during Cs+ Block of the Hyperpolarization-Activated Current If. » *The Journal of Physiology* 429 (1): 401-9. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018264>.

- Descoeur, Juliette, Vanessa Pereira, Anne Pizzoccaro, Amaury Francois, Bing Ling, Violette Maffre, Brigitte Couette, et al. 2011. « Oxaliplatin-induced Cold Hypersensitivity Is Due to Remodelling of Ion Channel Expression in Nociceptors ». *EMBO Molecular Medicine* 3 (5): 266-78. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100134>.
- Deuis, Jennifer R., Lucie S. Dvorakova, et Irina Vetter. 2017. « Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00284>.
- Deuis, Jennifer R., Yu Ling Lim, Silmara Rodrigues de Sousa, Richard J. Lewis, Paul F. Alewood, Peter J. Cabot, et Irina Vetter. 2014. « Analgesic effects of clinically used compounds in novel mouse models of polyneuropathy induced by oxaliplatin and cisplatin ». *Neuro-Oncology* 16 (10): 1324-32. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou048>.
- Deuis, Jennifer R., Katharina Zimmermann, Andrej A. Romanovsky, Lourival D. Possani, Peter J. Cabot, Richard J. Lewis, et Irina Vetter. 2013. « An Animal Model of Oxaliplatin-Induced Cold Allodynia Reveals a Crucial Role for Nav1.6 in Peripheral Pain Pathways ». *Pain* 154 (9): 1749-57. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.05.032>.
- Devor, Marshall. 2018. « Rethinking the causes of pain in herpes zoster and postherpetic neuralgia: the ectopic pacemaker hypothesis ». *Pain Reports* 3 (6): e702. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000702>.
- Dewar, Michael Bradley. 2019. « HCN3 Has Minimal Involvement in the Sensation of Acute, Inflammatory and Neuropathic Pain ». *The Journal of Physiology* 597 (22): 5333-34. <https://doi.org/10.1113/JP278770>.
- Dhaka, Ajay, Taryn J. Earley, James Watson, et Ardem Patapoutian. 2008. « Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections ». *Journal of Neuroscience* 28 (3): 566-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008>.
- Di Cesare Mannelli, Lorenzo, Alessandra Pacini, Laura Micheli, Alessia Tani, Matteo Zanardelli, et Carla Ghelardini. 2014. « Glial Role in Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain ». *Experimental Neurology* 261 (novembre): 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.016>.
- Di Cesare Mannelli, Lorenzo, Matteo Zanardelli, Paola Failli, et Carla Ghelardini. 2012. « Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Oxidative Stress as Pathological Mechanism. Protective Effect of Silibinin ». *The Journal of Pain* 13 (3): 276-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.11.009>.
- Di Francesco, A. M., A. Ruggiero, et R. Riccardi. 2002. « Cellular and Molecular Aspects of Drugs of the Future: Oxaliplatin ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (11): 1914-27. <https://doi.org/10.1007/PL00012514>.
- Díaz-Perlas, Cristina, Benjamí Oller-Salvia, Macarena Sánchez-Navarro, Meritxell Teixidó, et Ernest Giralt. 2018. « Branched BBB-Shuttle Peptides: Chemoselective Modification of Proteins to Enhance Blood–Brain Barrier Transport ». *Chemical Science* 9 (44): 8409-15. <https://doi.org/10.1039/C8SC02415D>.
- DiFrancesco, D. 1981. « A Study of the Ionic Nature of the Pace-Maker Current in Calf Purkinje Fibres. » *The Journal of Physiology* 314 (1): 377-93. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013714>.
- DiFrancesco, D. 1993. « Pacemaker Mechanisms in Cardiac Tissue ». *Annual Review of Physiology* 55 (1): 455-72. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.002323>.
- DiFrancesco, D, A Ferroni, M Mazzanti, et C Tromba. 1986. « Properties of the Hyperpolarizing-Activated Current (I<sub>h</sub>) in Cells Isolated from the Rabbit Sino-Atrial Node. » *The Journal of Physiology* 377 (1): 61-88. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016177>.
- DiFrancesco, D, et C Tromba. 1988. « Inhibition of the Hyperpolarization-Activated Current (I<sub>h</sub>) Induced by Acetylcholine in Rabbit Sino-Atrial Node Myocytes. » *The Journal of Physiology* 405 (1): 477-91. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017343>.
- Ding, Weihua, Zerong You, Shiqian Shen, Lucy Chen, Shengmei Zhu, et Jianren Mao. 2016. « Inhibition of HCN Channel Activity in the Thalamus Attenuates Chronic Pain in Rats ».

- Ding, Weihua, Zerong You, Shiqian Shen, Jinsheng Yang, Grewo Lim, Jason T. Doheny, Shengmei Zhu, Yi Zhang, Lucy Chen, et Jianren Mao. 2018. « Increased HCN Channel Activity in the Gasserian Ganglion Contributes to Trigeminal Neuropathic Pain ». *The Journal of Pain* 19 (6): 626-34. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.01.003>.
- Dini, Leonardo, Martina Del Lungo, Francesco Resta, Michele Melchiorre, Valentina Spinelli, Lorenzo Di Cesare Mannelli, Carla Ghelardini, et al. 2018. « Selective Blockade of HCN1/HCN2 Channels as a Potential Pharmacological Strategy Against Pain ». *Frontiers in Pharmacology* 9 (novembre): 1252. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01252>.
- Djoughri, Laiche, et Sally N. Lawson. 2004. « Abeta-Fiber Nociceptive Primary Afferent Neurons: A Review of Incidence and Properties in Relation to Other Afferent A-Fiber Neurons in Mammals ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 46 (2): 131-45. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.015>.
- Doan, T. N. 2004. « Differential Distribution and Function of Hyperpolarization-Activated Channels in Sensory Neurons and Mechanosensitive Fibers ». *Journal of Neuroscience* 24 (13): 3335-43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5156-03.2004>.
- Dubois, Delafied, et Eugene F. Dubois. 1916. « CLINICAL CALORIMETRY: TENTH PAPER A FORMULA TO ESTIMATE THE APPROXIMATE SURFACE AREA IF HEIGHT AND WEIGHT BE KNOWN ». *Archives of Internal Medicine* XVII (6\_2): 863-71. <https://doi.org/10.1001/archinte.1916.00080130010002>.
- Du, Lu, Shao-Jun Wang, Jian Cui, Wen-Juan He, et Huai-Zhen Ruan. 2013. « Inhibition of HCN Channels within the Periaqueductal Gray Attenuates Neuropathic Pain in Rats ». *Behavioral Neuroscience* 127 (2): 325-29. <https://doi.org/10.1037/a0031893>.
- Egashira, Nobuaki, Shingo Hirakawa, Takehiro Kawashiri, Takahisa Yano, Hiroaki Ikesue, et Ryozi Oishi. 2010. « Mexiletine Reverses Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Rats ». *Journal of Pharmacological Sciences* 112 (4): 473-76. <https://doi.org/10.1254/jphs.10012SC>.
- Emery, Edward C., Gareth T. Young, Esther M. Berrocoso, Lubin Chen, et Peter A. McNaughton. 2011. « HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain ». *Science* 333 (6048): 1462-66. <https://doi.org/10.1126/science.1206243>.
- Emery, Edward C., Gareth T. Young, et Peter A. McNaughton. 2012. « HCN2 Ion Channels: An Emerging Role as the Pacemakers of Pain ». *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (8): 456-63. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.004>.
- van Haren F, van den Heuvel S, Radema S, van Erp N, van den Bersselaar L, Vissers K, et Steegers M. 2020. « Intravenous Lidocaine Affects Oxaliplatin Pharmacokinetics in Simultaneous Infusion ». *Journal of Oncology Pharmacy Practice : Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* 26 (8). <https://doi.org/10.1177/1078155220905011>.
- Faivre, Sandrine, Denise Chan, Richard Salinas, Barbara Woynarowska, et Jan M. Woynarowski. 2003. « DNA Strand Breaks and Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Cancer Cells ». *Biochemical Pharmacology* 66 (2): 225-37. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00260-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00260-0).
- Fardell, Joanna E., Janette Vardy, Jeanette D. Shah, et Ian N. Johnston. 2012. « Cognitive Impairments Caused by Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Chemotherapy Are Ameliorated by Physical Activity ». *Psychopharmacology* 220 (1): 183-93. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2466-2>.
- Ferrier, Jérémy, Mathilde Bayet-Robert, Romain Dalmann, Abderrahim El Guerrab, Youssef Aissouni, Danielle Graveron-Demilly, Maryse Chalus, et al. 2015. « Cholinergic Neurotransmission in the Posterior Insular Cortex Is Altered in Preclinical Models of Neuropathic Pain: Key Role of Muscarinic M2 Receptors in Donepezil-Induced Antinociception ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (50): 16418-30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1537-15.2015>.

- Finnerup, Nanna Brix, Rohini Kuner, et Troels Staehelin Jensen. 2021. « Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment ». *Physiological Reviews* 101 (1): 259-301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>.
- Fisher, Daniel W., Phillip Luu, Neha Agarwal, Jonathan E. Kurz, et Dane M. Chetkovich. 2018. « Loss of HCN2 Leads to Delayed Gastrointestinal Motility and Reduced Energy Intake in Mice ». *PLoS One* 13 (2): e0193012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193012>.
- Flegel, Caroline, Nicole Schöbel, Janine Altmüller, Christian Becker, Andrea Tannapfel, Hanns Hatt, et Günter Gisselmann. 2015. « RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors ». *PLoS One* 10 (6): e0128951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128951>.
- Fogle, Keri J., Alex K. Lyashchenko, Harma K. Turbendian, et Gareth R. Tibbs. 2007. « HCN Pacemaker Channel Activation Is Controlled by Acidic Lipids Downstream of Diacylglycerol Kinase and Phospholipase A2 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (11): 2802-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4376-06.2007>.
- Foote, Kendall M., Kyle A. Lyman, Ye Han, Ioannis E. Michailidis, Robert J. Heuermann, Danielle Mandikian, James S. Trimmer, Geoffrey T. Swanson, et Dane M. Chetkovich. 2019. « Phosphorylation of the HCN Channel Auxiliary Subunit TRIP8b Is Altered in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy and Modulates Channel Function ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (43): 15743-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010027>.
- Fujita, Shunsuke, Takeshi Hirota, Ryo Sakiyama, Misaki Baba, et Ichiro Ieiri. 2019. « Identification of Drug Transporters Contributing to Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy ». *Journal of Neurochemistry* 148 (3): 373-85. <https://doi.org/10.1111/jnc.14607>.
- Garcia-Larrea, Luis. 2012. « The Posterior Insular-Opercular Region and the Search of a Primary Cortex for Pain ». *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 42 (5): 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2012.06.001>.
- Garcia-Larrea, Luis, Caroline Perchet, Christelle Creac'h, Philippe Convers, Roland Peyron, Bernard Laurent, François Mauguière, et Michel Magnin. 2010. « Operculo-Insular Pain (Parasyllian Pain): A Distinct Central Pain Syndrome ». *Brain: A Journal of Neurology* 133 (9): 2528-39. <https://doi.org/10.1093/brain/awq220>.
- Gasser, H. S., et Joseph Erlanger. 1927. « The rôle played by the sizes of the constituent fibers of a nerve trunk in determining the form of its action potential wave ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 80 (3): 522-47. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1927.80.3.522>.
- Gauchan, Punam, Tsugunobu Andoh, Atsushi Kato, et Yasushi Kuraishi. 2009. « Involvement of Increased Expression of Transient Receptor Potential Melastatin 8 in Oxaliplatin-Induced Cold Allodynia in Mice ». *Neuroscience Letters* 458 (2): 93-95. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.029>.
- Gebremedhn, Endale Gebreegziabher, Peter John Shortland, et David Anthony Mahns. 2018. « The Incidence of Acute Oxaliplatin-Induced Neuropathy and Its Impact on Treatment in the First Cycle: A Systematic Review ». *BMC Cancer* 18 (1): 410. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4185-0>.
- Gehrlach, Daniel A, Caroline Weiland, Thomas N Gaitanos, Eunjae Cho, Alexandra S Klein, Alexandru A Hennrich, Karl-Klaus Conzelmann, et Nadine Gogolla. 2020. « A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex ». Édité par Kate M Wassum et Yoav Livneh. *eLife* 9 (septembre): e55585. <https://doi.org/10.7554/eLife.55585>.
- Gélébart, Juliette, Luis Garcia-Larrea, et Maud Frot. 2022. « Amygdala and anterior insula control the passage from nociception to pain ». *Cerebral Cortex*, août, bhac290. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhac290>.
- Ghosh, Jayeeta, Michael S. Lawless, Marvin Waldman, Vijay Gombur, et Robert Fraczekiewicz. 2016. « Modeling ADMET ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1425: 63-83. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0_4).

- Giorgetti, A., P. Carloni, P. Mistrik, et V. Torre. 2005. « A Homology Model of the Pore Region of HCN Channels ». *Biophysical Journal* 89 (2): 932-44. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045286>.
- Gogolla, Nadine. 2017. « The Insular Cortex ». *Current Biology* 27 (12): R580-86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>.
- Graham, Joanne, Mohamed Muhsin, et Peter Kirkpatrick. 2004. « Oxaliplatin ». *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (1): 11-12. <https://doi.org/10.1038/nrd1287>.
- Gross, Christine, Andrea Saponaro, Bina Santoro, Anna Moroni, Gerhard Thiel, et Kay Hamacher. 2018. « Mechanical transduction of cytoplasmic-to-transmembrane-domain movements in a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (33): 12908-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002139>.
- Grothey, Axel. 2003. « Oxaliplatin-Safety Profile: Neurotoxicity ». *Seminars in Oncology* 30 (4 Suppl 15): 5-13. [https://doi.org/10.1016/s0093-7754\(03\)00399-3](https://doi.org/10.1016/s0093-7754(03)00399-3).
- Grothey, Axel. 2005. « Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity ». *Clinical colorectal cancer* 5 Suppl 1 (avril): S38-46. <https://doi.org/10.3816/cc.2005.s.006>.
- Guenther, Casey J., Kazunari Miyamichi, Helen H. Yang, H. Craig Heller, et Liqun Luo. 2013. « Permanent Genetic Access to Transiently Active Neurons via TRAP: Targeted Recombination in Active Populations ». *Neuron* 78 (5): 773-84. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.025>.
- Haanpää, Maija, Nadine Attal, Miroslav Backonja, Ralf Baron, Michael Bennett, Didier Bouhassira, Giorgio Cruccu, et al. 2011. « NeuPSIG Guidelines on Neuropathic Pain Assessment ». *Pain* 152 (1): 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.031>.
- Hache, G., B. P. Guiard, T. H. Nguyen, G. Quesseveur, A. M. Gardier, D. Peters, G. Munro, et F. Coudoré. 2015. « Antinociceptive Activity of the New Triple Reuptake Inhibitor NS18283 in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain ». *European Journal of Pain (London, England)* 19 (3): 322-33. <https://doi.org/10.1002/ejp.550>.
- Halliwel, James V., et Paul R. Adams. 1982. « Voltage-Clamp Analysis of Muscarinic Excitation in Hippocampal Neurons ». *Brain Research* 250 (1): 71-92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90954-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90954-4).
- Hamm, R. J., B. R. Pike, D. M. O'Dell, B. G. Lyeth, et L. W. Jenkins. 1994. « The Rotarod Test: An Evaluation of Its Effectiveness in Assessing Motor Deficits Following Traumatic Brain Injury ». *Journal of Neurotrauma* 11 (2): 187-96. <https://doi.org/10.1089/neu.1994.11.187>.
- Hammelmann, Verena, Marc Sebastian Stieglitz, Henrik Hülle, Karim Le Meur, Jennifer Kass, Manuela Brümmer, Christian Gruner, et al. 2019. « Abolishing CAMP Sensitivity in HCN2 Pacemaker Channels Induces Generalized Seizures ». *JCI Insight* 4 (9): e126418, 126418. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126418>.
- Han, Y, R J Heuermann, K A Lyman, D Fisher, Q-A Ismail, et D M Chetkovich. 2017. « HCN-Channel Dendritic Targeting Requires Bipartite Interaction with TRIP8b and Regulates Antidepressant-like Behavioral Effects ». *Molecular Psychiatry* 22 (3): 458-65. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.99>.
- Han, Ye, Iredia D. Iyamu, Matthew R. Clutter, Rama K. Mishra, Kyle A. Lyman, Chengwen Zhou, Ioannis Michailidis, et al. 2022. « Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of the TRIP8b-HCN Interaction with Efficacy in Neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 298 (7): 102069. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102069>.
- Han, Ye, Kyle A. Lyman, Kendall M. Foote, et Dane M. Chetkovich. 2020. « The Structure and Function of TRIP8b, an Auxiliary Subunit of Hyperpolarization-Activated Cyclic-Nucleotide Gated Channels ». *Channels* 14 (1): 110-22. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1740501>.
- Han, Ye, Kyle Lyman, Matt Clutter, Gary E. Schiltz, Quratul-Ain Ismail, Diego Bleifuss Prados, Chi-Hao Luan, et Dane M. Chetkovich. 2015. « Identification of small molecule inhibitors of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels ». *Journal of biomolecular screening* 20 (9): 1124-31. <https://doi.org/10.1177/1087057115589590>.

- Harding, Erika K., et Michael W. Salter. 2017. « VIP Cortical Conductors Set the Tone for Chronic Pain ». *Nature Neuroscience* 20 (8): 1037-38. <https://doi.org/10.1038/nn.4609>.
- Harnett, Mark T., Jeffrey C. Magee, et Stephen R. Williams. 2015. « Distribution and Function of HCN Channels in the Apical Dendritic Tuft of Neocortical Pyramidal Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (3): 1024-37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2813-14.2015>.
- Harrach, Saliha, et Giuliano Ciarimboli. 2015. « Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs ». *Frontiers in Pharmacology* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2015.00085>.
- Harrap, K. R. 1985. « Preclinical Studies Identifying Carboplatin as a Viable Cisplatin Alternative ». *Cancer Treatment Reviews* 12 Suppl A (septembre): 21-33. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(85\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90015-5).
- Healey, Shannon A Bernard, Ingrid Scholtes, Mark Abrahams, Peter A McNaughton, David K Menon, et Michael C Lee. 2021. « Role of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels in Neuropathic Pain: A Proof-of-Concept Study of Ivabradine in Patients with Chronic Peripheral Neuropathic Pain ». *PAIN Reports*, 8.
- Heide, Rikke, Hugh Bostock, Lise Ventzel, Peter Grafe, Joseph Bergmans, Anders Fuglsang-Frederiksen, Nanna B. Finnerup, et Hatice Tankisi. 2018. « Axonal Excitability Changes and Acute Symptoms of Oxaliplatin Treatment: In Vivo Evidence for Slowed Sodium Channel Inactivation ». *Clinical Neurophysiology* 129 (3): 694-706. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.11.015>.
- Heuermann, Robert J., Thomas C. Jaramillo, Shui-Wang Ying, Benjamin A. Suter, Kyle A. Lyman, Ye Han, Alan S. Lewis, et al. 2016. « Reduction of Thalamic and Cortical Ih by Deletion of TRIP8b Produces a Mouse Model of Human Absence Epilepsy ». *Neurobiology of Disease* 85 (janvier): 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.005>.
- Huang, Zhen-Zhen, Dai Li, Han-Dong Ou-Yang, Cui-Cui Liu, Xian-Guo Liu, Chao Ma, Jia-You Wei, Yong Liu, et Wen-Jun Xin. 2016. « Cerebrospinal Fluid Oxaliplatin Contributes to the Acute Pain Induced by Systemic Administration of Oxaliplatin ». *Anesthesiology* 124 (5): 1109-21. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001084>.
- Hughes, D I, S Sikander, C M Kinnon, K A Boyle, M Watanabe, R J Callister, et B A Graham. 2012. « Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn ». *The Journal of Physiology* 590 (Pt 16): 3927-51. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235655>.
- Jamieson, S. M. F., J. Liu, B. Connor, et M. J. McKeage. 2005. « Oxaliplatin Causes Selective Atrophy of a Subpopulation of Dorsal Root Ganglion Neurons without Inducing Cell Loss ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (4): 391-99. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0953-4>.
- Jasmin, Luc, Alberto Granato, et Peter T. Ohara. 2004. « Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: A tract-tracing study in the rat ». *Journal of Comparative Neurology* 468 (3): 425-40. <https://doi.org/10.1002/cne.10978>.
- Jensen, Troels S, et Nanna B Finnerup. 2014. « Allodynia and Hyperalgesia in Neuropathic Pain: Clinical Manifestations and Mechanisms ». *The Lancet Neurology* 13 (9): 924-35. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4).
- Jiang, Yu-Qiu, Guo-Gang Xing, Sheng-Lan Wang, Hui-Yin Tu, Ye-Nan Chi, Jie Li, Feng-Yu Liu, Ji-Sheng Han, et You Wan. 2008. « Axonal Accumulation of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channels Contributes to Mechanical Allodynia after Peripheral Nerve Injury in Rat ». *PAIN* 137 (3): 495-506. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.10.011>.
- Kashyap, Mahendra, Naoki Yoshimura, Phillip Smith, Michael Chancellor, et Pradeep Tyagi. 2015. « Characterization of the role of HCN channels in  $\beta$ 3-adrenoceptor mediated rat bladder relaxation ». *Bladder 2* (juillet): 15. <https://doi.org/10.14440/bladder.2015.44>.

- Kerckhove, Selvy M, Lambert C, Gonneau C, Feydel G, Pétorin C, Vimal-Baguet A, et al. 2021. « Colorectal Cancer Survivors Suffering From Sensory Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy Are Not a Homogenous Group: Secondary Analysis of Patients' Profiles With Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (avril). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.744085>.
- Kerckhove, Nicolas, Aurore Collin, Sakahlé Condé, Carine Chaletex, Denis Pezet, et David Balayssac. 2017. « Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review ». *Frontiers in Pharmacology* 8 (février): 86. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00086>.
- Kerckhove, Nicolas, Aurore Collin, Sakahlé Condé, Carine Chaletex, Denis Pezet, David Balayssac, et Virginie Guastella. 2018. « Neuropathies périphériques chimio-induites : symptomatologie et épidémiologie ». *Bulletin du Cancer* 105 (11): 1020-32. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.07.009>.
- Kerckhove, Nicolas, Marie Selvy, Céline Lambert, Coralie Gonneau, Gabrielle Feydel, Caroline Pétorin, Agnès Vimal-Baguet, et al. 2021. « Colorectal Cancer Survivors Suffering From Sensory Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy Are Not a Homogenous Group: Secondary Analysis of Patients' Profiles With Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (novembre): 744085. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.744085>.
- Kiguchi, Norikazu, Takehiko Maeda, Yuka Kobayashi, Toshikazu Kondo, Masanobu Ozaki, et Shiroh Kishioka. 2008. « The Critical Role of Invading Peripheral Macrophage-Derived Interleukin-6 in Vincristine-Induced Mechanical Allodynia in Mice ». *European Journal of Pharmacology* 592 (1): 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.008>.
- Kim, K.-S., J. Kim, S. K. Back, J.-Y. Im, H. S. Na, et P.-L. Han. 2007. « Markedly Attenuated Acute and Chronic Pain Responses in Mice Lacking Adenylyl Cyclase-5 ». *Genes, Brain and Behavior* 6 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00238.x>.
- Kim, Woojin, Yeongu Chung, Seunghwan Choi, Byung-Il Min, et Sun Kwang Kim. 2017. « Duloxetine Protects against Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain and Spinal Neuron Hyperexcitability in Rodents ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12): 2626. <https://doi.org/10.3390/ijms18122626>.
- Kobayashi, Kimiko, Tetsuo Fukuoka, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Atsushi Tokunaga, et Koichi Noguchi. 2005. « Distinct Expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 MRNAs in Rat Primary Afferent Neurons with Adelta/c-Fibers and Colocalization with Trk Receptors ». *The Journal of Comparative Neurology* 493 (4): 596-606. <https://doi.org/10.1002/cne.20794>.
- Kogelman, Lisette Johanna Antonia, Rikke Elgaard Christensen, Sara Hougaard Pedersen, Marcelo Bertalan, Thomas Folkmann Hansen, Inger Jansen-Olesen, et Jes Olesen. 2017. « Whole Transcriptome Expression of Trigeminal Ganglia Compared to Dorsal Root Ganglia in Rattus Norvegicus ». *Neuroscience* 350 (mai): 169-79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.027>.
- Koivisto, Ari-Pekka, Maria G. Belvisi, Rachele Gaudet, et Arpad Szallasi. 2022. « Advances in TRP Channel Drug Discovery: From Target Validation to Clinical Studies ». *Nature Reviews Drug Discovery* 21 (1): 41-59. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>.
- Kouranova, E. V., B. W. Strassle, R. H. Ring, M. R. Bowlby, et D. V. Vasilyev. 2008. « Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel mRNA and Protein Expression in Large versus Small Diameter Dorsal Root Ganglion Neurons: Correlation with Hyperpolarization-Activated Current Gating ». *Neuroscience* 153 (4): 1008-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.032>.
- Kraeuter, Ann-Katrin, Paul C. Guest, et Zoltán Sarnyai. 2019. « The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1916: 105-11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10).
- Laedermann, Cédric J., Matthieu Cachemaille, Guylène Kirschmann, Marie Pertin, Romain-Daniel Gosselin, Isabelle Chang, Maxime Albesa, et al. 2013. « Dysregulation of Voltage-Gated

- Sodium Channels by Ubiquitin Ligase NEDD4-2 in Neuropathic Pain ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (7): 3002-13. <https://doi.org/10.1172/JCI68996>.
- Lai, Josephine, Michael S. Gold, Chang-Sook Kim, Di Bian, Michael H. Ossipov, John C. Hunter, et Frank Porreca. 2002. « Inhibition of Neuropathic Pain by Decreased Expression of the Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel, NaV1.8 ». *Pain* 95 (1): 143-52. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00391-8).
- Lainez, Sergio, Christoforos Tsantoulas, Martin Biel, et Peter A McNaughton. 2019. « HCN3 Ion Channels: Roles in Sensory Neuronal Excitability and Pain ». *The Journal of Physiology* 597 (17): 4661-75. <https://doi.org/10.1113/JP278211>.
- Lamoine, Sylvain, Mélissa Cumenal, David A. Barriere, Vanessa Pereira, Mathilde Fereyrolles, Laëtitia Prival, Julie Barbier, et al. 2021. « The Class I HDAC Inhibitor, MS-275, Prevents Oxaliplatin-Induced Chronic Neuropathy and Potentiates Its Antiproliferative Activity in Mice ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1): 98. <https://doi.org/10.3390/ijms23010098>.
- Larsson, Max, et Saad S Nagi. 2022. « Role of C-Tactile Fibers in Pain Modulation: Animal and Human Perspectives ». *Current Opinion in Behavioral Sciences* 43 (février): 138-44. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2021.09.005>.
- Latrémolière, Alban. 2016. « Spinal Plasticity of the Nociceptive System: The Role of Central Sensitisation in Chronic Pain States ». In *An Introduction to Pain and Its Relation to Nervous System Disorders*, édité par Anna A. Battaglia, 35-87. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118455968.ch2>.
- Lechner, Stefan G. 2017. « An Update on the Spinal and Peripheral Pathways of Pain Signalling ». *E-Neuroforum* 23 (3): 131-36. <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A020>.
- Lecomte, Thierry, Bruno Landi, Philippe Beaune, Pierre Laurent-Puig, et Marie-Anne Loriot. 2006. « Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism (Ile105Val) Predicts Cumulative Neuropathy in Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy ». *Clinical Cancer Research* 12 (10): 3050-56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2076>.
- Lee, Chia-Hsueh, et Roderick MacKinnon. 2017. « Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel ». *Cell* 168 (1-2): 111-120.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.023>.
- Lee, Michael C., Simon Bond, Daniel Wheeler, Ingrid Scholtes, Graham Armstrong, Peter McNaughton, et David Menon. 2019. « A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Trial of the Influence of the HCN Channel Blocker Ivabradine in a Healthy Volunteer Pain Model: An Enriched Population Trial ». *Pain* 160 (11): 2554-65. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001638>.
- Lehky, T. J., G. D. Leonard, R. H. Wilson, J. L. Grem, et M. K. Floeter. 2004. « Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity: Acute Hyperexcitability and Chronic Neuropathy ». *Muscle & Nerve* 29 (3): 387-92. <https://doi.org/10.1002/mus.10559>.
- León-Aparicio, Daniel, Carolina Salvador, Omar Emiliano Aparicio-Trejo, Alfredo Briones-Herrera, José Pedraza-Chaverri, Luis Vaca, Alicia Sampieri, et al. 2019. « Novel Potassium Channels in Kidney Mitochondria: The Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Gated HCN Channels ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (20): 4995. <https://doi.org/10.3390/ijms20204995>.
- Lévi, F., G. Metzger, C. Massari, et G. Milano. 2000. « Oxaliplatin: Pharmacokinetics and Chronopharmacological Aspects ». *Clinical Pharmacokinetics* 38 (1): 1-21. <https://doi.org/10.2165/00003088-200038010-00001>.
- Levi, F., B. Perpoint, C. Garufi, C. Focan, P. Chollet, P. Depres-Brummer, R. Zidani, S. Brienza, M. Itzhaki, et S. Iacobelli. 1993. « Oxaliplatin Activity against Metastatic Colorectal Cancer. A Phase II Study of 5-Day Continuous Venous Infusion at Circadian Rhythm Modulated Rate ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 29A (9): 1280-84. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90073-o](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90073-o).

- Lewis, Alan S., Chad Estep, et Dane M. Chetkovich. 2010. « The Fast and Slow Ups and Downs of HCN Channel Regulation ». *Channels* 4 (3): 215-31. <https://doi.org/10.4161/chan.4.3.11630>.
- Lewis, Alan S., Emily Schwartz, C. Savio Chan, Yoav Noam, Minyoung Shin, Wytse J. Wadman, D. James Surmeier, Tallie Z. Baram, Robert L. Macdonald, et Dane M. Chetkovich. 2009. « Alternatively Spliced Isoforms of TRIP8b Differentially Control h Channel Trafficking and Function ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (19): 6250-65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0856-09.2009>.
- Lewis, Alan S., Sachin P. Vaidya, Cory A. Blaiss, Zhiqiang Liu, Travis R. Stoub, Darrin H. Brager, Xiangdong Chen, et al. 2011. « Deletion of the Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Auxiliary Subunit TRIP8b Impairs Hippocampal Ih Localization and Function and Promotes Antidepressant Behavior in Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (20): 7424-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0936-11.2011>.
- Li, Ning, Thomas A. Csepe, Brian J. Hansen, Halina Dobrzynski, Robert S.D. Higgins, Ahmet Kilic, Peter J. Mohler, et al. 2015. « Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 8 (5): 1219-27. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003070>.
- Li, Shuaizhang, Li Zhang, Ruili Huang, Tuan Xu, Fred Parham, Mamta Behl, et Menghang Xia. 2021. « Evaluation of Chemical Compounds That Inhibit Neurite Outgrowth Using GFP-Labeled iPSC-Derived Human Neurons ». *NeuroToxicology* 83 (mars): 137-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.01.003>.
- Liberati, Giulia, Dounia Mulders, Maxime Algoet, Emanuel N. van den Broeke, Susana Ferrao Santos, José Geraldo Ribeiro Vaz, Christian Raftopoulos, et André Mouraux. 2020. « Insular Responses to Transient Painful and Non-Painful Thermal and Mechanical Spinothalamic Stimuli Recorded Using Intracerebral EEG ». *Scientific Reports* 10 (1): 22319. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79371-2>.
- Ling, Bing, Nicolas Authier, David Balaýssac, Alain Eschalier, et François Coudore. 2007. « Behavioral and Pharmacological Description of Oxaliplatin-Induced Painful Neuropathy in Rat ». *Pain* 128 (3): 225-34. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.09.016>.
- Ling, Bing, Marie-Ange Coudoré-Civiale, David Balaýssac, Alain Eschalier, François Coudoré, et Nicolas Authier. 2007. « Behavioral and Immunohistological Assessment of Painful Neuropathy Induced by a Single Oxaliplatin Injection in the Rat ». *Toxicology* 234 (3): 176-84. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.02.013>.
- Ling, Jennifer, Ferhat Erol, Viacheslav Viatchenko-Karpinski, Hirosato Kanda, et Jianguo G Gu. 2017. « Orofacial Neuropathic Pain Induced by Oxaliplatin: Downregulation of KCNQ2 Channels in V2 Trigeminal Ganglion Neurons and Treatment by the KCNQ2 Channel Potentiator Retigabine ». *Molecular Pain* 13 (janvier): 1744806917724715. <https://doi.org/10.1177/1744806917724715>.
- Liston, Dane R., et Myrtle Davis. 2017. « Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: A guide for nonclinical studies ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (14): 3489-98. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>.
- Liu, Hui, Jun Zhou, Lianbing Gu, et Yunxia Zuo. 2017. « The Change of HCN1/HCN2 mRNA Expression in Peripheral Nerve after Chronic Constriction Injury Induced Neuropathy Followed by Pulsed Electromagnetic Field Therapy ». *Oncotarget* 8 (1): 1110-16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13584>.
- Liu, Xiaoyu, Lidong Zhang, Li Jin, Yuanhui Tan, Weiyan Li, et Jun Tang. 2018. « HCN2 Contributes to Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain through Activation of the CaMKII/CREB Cascade in Spinal Neurons ». *Molecular Pain* 14 (janvier): 1744806918778490. <https://doi.org/10.1177/1744806918778490>.
- Lolignier, Stéphane, Caroline Bonnet, Christelle Gaudioso, Jacques Noël, Jérôme Ruel, Muriel Amsalem, Jérémy Ferrier, et al. 2015. « The Nav1.9 Channel Is a Key Determinant of Cold

- Pain Sensation and Cold Allodynia ». *Cell Reports* 11 (7): 1067-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.027>.
- Loprinzi, Charles L., Christina Lacchetti, Jonathan Bleeker, Guido Cavaletti, Cynthia Chauhan, Daniel L. Hertz, Mark R. Kelley, et al. 2020. « Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update ». *Journal of Clinical Oncology* 38 (28): 3325-48. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>.
- Los, G., P. H. Mutsaers, M. Ruevekamp, et J. G. McVie. 1990. « The Use of Oxaliplatin versus Cisplatin in Intraperitoneal Chemotherapy in Cancers Restricted to the Peritoneal Cavity in the Rat ». *Cancer Letters* 51 (2): 109-17. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(90\)90045-y](https://doi.org/10.1016/0304-3835(90)90045-y).
- Lu, Changbo, Tao Yang, Huan Zhao, Ming Zhang, Fancheng Meng, Hao Fu, Yingli Xie, et Hui Xu. 2016. « Insular Cortex is Critical for the Perception, Modulation, and Chronification of Pain ». *Neuroscience Bulletin* 32 (2): 191-201. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0016-y>.
- Ludwig, A., X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann, et M. Biel. 1998. « A Family of Hyperpolarization-Activated Mammalian Cation Channels ». *Nature* 393 (6685): 587-91. <https://doi.org/10.1038/31255>.
- Luo, L., L. Chang, S. M. Brown, H. Ao, D. H. Lee, E. S. Higuera, A. E. Dubin, et S. R. Chaplan. 2007. « Role of Peripheral Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Modulated Channel Pacemaker Channels in Acute and Chronic Pain Models in the Rat ». *Neuroscience* 144 (4): 1477-85. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.048>.
- Lyman, Kyle A., Ye Han, Chengwen Zhou, Isabelle Renteria, Gai-Linn Besing, Jonathan E. Kurz, et Dane M. Chetkovich. 2021. « Hippocampal cAMP regulates HCN channel function on two time scales with differential effects on animal behavior ». *Science translational medicine* 13 (621): eabl4580. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl4580>.
- Ma, Yanqiao, Ji Chen, Deqian Yu, Bangcong Wei, Huan Jin, Junwei Zeng, et Xiaohong Liu. 2021. « cAMP-PKA Signaling Is Involved in Regulation of Spinal HCN Channels Function in Diabetic Neuropathic Pain ». *Neuroscience Letters* 750 (avril): 135763. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135763>.
- Makker, Preet G. S., Daniel White, Justin G. Lees, Jasneet Parmar, David Goldstein, Susanna B. Park, James Howells, et Gila Moalem-Taylor. 2020. « Acute changes in nerve excitability following oxaliplatin treatment in mice ». *Journal of Neurophysiology* 124 (1): 232-44. <https://doi.org/10.1152/jn.00260.2020>.
- Mangoni, M. E., L. Marger, et J. Nargeot. 2006. « If Current Inhibition: Cellular Basis and Physiology ». *Advances in Cardiology* 43: 17-30. <https://doi.org/10.1159/000095403>.
- Marini, Carla, Alessandro Porro, Agnès Rastetter, Carine Dalle, Ilaria Rivolta, Daniel Bauer, Renske Oegema, et al. 2018. « HCN1 Mutation Spectrum: From Neonatal Epileptic Encephalopathy to Benign Generalized Epilepsy and Beyond ». *Brain: A Journal of Neurology* 141 (11): 3160-78. <https://doi.org/10.1093/brain/awy263>.
- Marmioli, Paola, Beatrice Riva, Eleonora Pozzi, Elisa Ballarini, Dmitry Lim, Alessia Chiorazzi, Cristina Merigalli, et al. 2017. « Susceptibility of different mouse strains to oxaliplatin peripheral neurotoxicity: Phenotypic and genotypic insights ». *PLoS ONE* 12 (10): e0186250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186250>.
- Martin, Pierre-Yves, Stéphane Doly, Al Mahdy Hamieh, Eric Chapuy, Vittorio Canale, Marcin Drop, Séverine Chaumont-Dubel, et al. 2020. « MTOR Activation by Constitutively Active Serotonin6 Receptors as New Paradigm in Neuropathic Pain and Its Treatment ». *Progress in Neurobiology* 193 (octobre): 101846. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101846>.
- Mayer, M L, et G L Westbrook. 1983. « A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. » *The Journal of Physiology* 340 (juillet): 19-45.
- Mazzola, Laure, Jean Isnard, Roland Peyron, et François Mauguière. 2012. « Stimulation of the Human Cortex and the Experience of Pain: Wilder Penfield's Observations Revisited ». *Brain* 135 (2): 631-40. <https://doi.org/10.1093/brain/awr265>.

- McNaughton, Peter A. 2006. « Pain Transduction: Gating and Modulation of Ion Channels ». In *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200400112>.
- Megat, Salim, Pradipta R. Ray, Diana Tavares-Ferreira, Jamie K. Moy, Ishwarya Sankaranarayanan, Andi Wangzhou, Tzu Fang Lou, et al. 2019. « Differences between Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Nociceptors in Mice Revealed by Translational Profiling ». *Journal of Neuroscience* 39 (35): 6829-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2663-18.2019>.
- Meltzer, Shan, Celine Santiago, Nikhil Sharma, et David D. Ginty. 2021. « The Cellular and Molecular Basis of Somatosensory Neuron Development ». *Neuron* 109 (23): 3736-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.004>.
- Michaelis, M., H. J. Häbler, et W. Jäenig. 1996. « Silent Afferents: A Separate Class of Primary Afferents? ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 23 (2): 99-105. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb02579.x>.
- Michels, Guido, Fikret Er, Ismail F. Khan, Jeannette Endres-Becker, Mathias C. Brandt, Natig Gassanov, David C. Johns, et Uta C. Hoppe. 2008. « K<sup>+</sup> Channel Regulator KCR1 Suppresses Heart Rhythm by Modulating the Pacemaker Current I<sub>f</sub> ». *PLoS ONE* 3 (1): e1511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001511>.
- Michot, Benoit, Valérie Kayser, Gérard Bastian, Sylvie Bourgoin, et Michel Hamon. 2014. « Differential Pharmacological Alleviation of Oxaliplatin-Induced Hyperalgesia/Allodynia at Cephalic versus Extra-Cephalic Level in Rodents ». *Neuropharmacology* 79 (avril): 432-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.12.011>.
- Micov, Ana M., Maja A. Tomić, Marija B. Todorović, Milja J. Vuković, Uroš B. Pecikoza, Nebojsa I. Jasic, Jelena D. Djordjevic, et Radica M. Stepanović-Petrović. 2020. « Vortioxetine Reduces Pain Hypersensitivity and Associated Depression-like Behavior in Mice with Oxaliplatin-Induced Neuropathy ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 103 (décembre): 109975. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109975>.
- Milanesi, Raffaella, Mirko Baruscotti, Tomaso Gneccchi-Ruscione, et Dario DiFrancesco. 2006. « Familial Sinus Bradycardia Associated with a Mutation in the Cardiac Pacemaker Channel ». *The New England Journal of Medicine* 354 (2): 151-57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052475>.
- Milligan, Carol J., Ian J. Edwards, et Jim Deuchars. 2006. « HCN1 Ion Channel Immunoreactivity in Spinal Cord and Medulla Oblongata ». *Brain Research* 1081 (1): 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.019>.
- Mills, Emily P., Kevin A. Keay, et Luke A. Henderson. 2021. « Brainstem Pain-Modulation Circuitry and Its Plasticity in Neuropathic Pain: Insights From Human Brain Imaging Investigations ». *Frontiers in Pain Research* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpain.2021.705345>.
- Mine, Keisuke, Takehiro Kawashiri, Mizuki Inoue, Daisuke Kobayashi, Kohei Mori, Shiori Hiromoto, Hibiki Kudamatsu, et al. 2022. « Omeprazole Suppresses Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in a Rodent Model and Clinical Database ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (16): 8859. <https://doi.org/10.3390/ijms23168859>.
- Miyake, Takahito, Saki Nakamura, Meng Zhao, Kanako So, Keisuke Inoue, Tomohiro Numata, Nobuaki Takahashi, et al. 2016. « Cold Sensitivity of TRPA1 Is Unveiled by the Prolyl Hydroxylation Blockade-Induced Sensitization to ROS ». *Nature Communications* 7 (1): 12840. <https://doi.org/10.1038/ncomms12840>.
- Mok, Ka-Chun, Ho Tsoi, Ellen PS Man, Man-Hong Leung, Ka Man Chau, Lai-San Wong, Wing-Lok Chan, et al. 2021. « Repurposing Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels as a Novel Therapy for Breast Cancer ». *Clinical and Translational Medicine* 11 (11). <https://doi.org/10.1002/ctm2.578>.
- Momin, Aliakmal, Hervé Cadiou, Adrian Mason, et Peter A. McNaughton. 2008. « Role of the Hyperpolarization-Activated Current I<sub>h</sub> in Somatosensory Neurons ». *The Journal of Physiology* 586 (24): 5911-29. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163154>.

- Moosmang, S., M. Biel, F. Hofmann, et A. Ludwig. 1999. « Differential Distribution of Four Hyperpolarization-Activated Cation Channels in Mouse Brain ». *Biological Chemistry* 380 (7-8): 975-80. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.121>.
- Moosmang, S., J. Stieber, X. Zong, M. Biel, F. Hofmann, et A. Ludwig. 2001. « Cellular Expression and Functional Characterization of Four Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels in Cardiac and Neuronal Tissues ». *European Journal of Biochemistry* 268 (6): 1646-52. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02036.x>.
- Moser, A. R., C. Luongo, K. A. Gould, M. K. McNeley, A. R. Shoemaker, et W. F. Dove. 1995. « ApcMin: A Mouse Model for Intestinal and Mammary Tumorigenesis ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 31A (7-8): 1061-64. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00181-h](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00181-h).
- Müller, Frank, Alexander Scholten, Elena Ivanova, Silke Haverkamp, Elisabeth Kremmer, et U. Benjamin Kaupp. 2003. « HCN Channels Are Expressed Differentially in Retinal Bipolar Cells and Concentrated at Synaptic Terminals ». *European Journal of Neuroscience* 17 (10): 2084-96. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02634.x>.
- Nagasaka, Kazuaki, Kazunori Yamanaka, Shinya Ogawa, Hiroyuki Takamatsu, et Noriyuki Higo. 2017. « Brain Activity Changes in a Macaque Model of Oxaliplatin-Induced Neuropathic Cold Hypersensitivity ». *Scientific Reports* 7 (1): 4305. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04677-7>.
- Nair, Anroop B., et Shery Jacob. 2016. « A Simple Practice Guide for Dose Conversion between Animals and Human ». *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 7 (2): 27-31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
- Nassini, Romina, Maarten Gees, Selena Harrison, Gaetano De Siena, Serena Materazzi, Nadia Moretto, Paola Failli, et al. 2011. « Oxaliplatin Elicits Mechanical and Cold Allodynia in Rodents via TRPA1 Receptor Stimulation ». *Pain* 152 (7): 1621-31. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.051>.
- Negrini, Daniela, Cristiana Marcozzi, Eleonora Solari, Elena Bossi, Raffaella Cinquetti, Marcella Reguzzoni, et Andrea Moriondo. 2016. « Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in Peripheral Diaphragmatic Lymphatics ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 311 (4): H892-903. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00193.2016>.
- Nguyen, Minh Q., Youmei Wu, Lauren S. Bonilla, Lars J. von Buchholtz, et Nicholas J. P. Ryba. 2017. « Diversity amongst Trigeminal Neurons Revealed by High Throughput Single Cell Sequencing ». Édité par Alexander G Obukhov. *PLOS ONE* 12 (9): e0185543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185543>.
- Noam, Yoav, Markus U. Ehrenguber, Annie Koh, Paul Feyen, Erik M. M. Manders, Geoffrey W. Abbott, Wytse J. Wadman, et Tallie Z. Baram. 2014. « Filamin A Promotes Dynamin-Dependent Internalization of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Type 1 (HCN1) Channels and Restricts Ih in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (9): 5889-5903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522060>.
- Noble, D., et R. W. Tsien. 1968. « The Kinetics and Rectifier Properties of the Slow Potassium Current in Cardiac Purkinje Fibres ». *The Journal of Physiology* 195 (1): 185-214. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008454>.
- Noh, S., N. Kumar, N. Bukhanova, Y. Chen, P. L. Stemkowski, et P. A. Smith. 2014. « The Heart-Rate-Reducing Agent, Ivabradine, Reduces Mechanical Allodynia in a Rodent Model of Neuropathic Pain ». *European Journal of Pain (London, England)* 18 (8): 1139-47. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2014.00460.x>.
- Noma, A., et H. Irisawa. 1976. « Membrane Currents in the Rabbit Sinoatrial Node Cell as Studied by the Double Microelectrode Method ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 364 (1): 45-52. <https://doi.org/10.1007/BF01062910>.
- Notomi, Takuya, et Ryuichi Shigemoto. 2004. « Immunohistochemical Localization of Ih Channel Subunits, HCN1-4, in the Rat Brain ». *The Journal of Comparative Neurology* 471 (3): 241-76. <https://doi.org/10.1002/cne.11039>.

- Novella Romanelli, Maria, Laura Sartiani, Alessio Masi, Guido Mannaioni, Dina Manetti, Alessandro Mugelli, et Elisabetta Cerbai. 2016. « HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16 (16): 1764-91. <https://doi.org/10.2174/1568026616999160315130832>.
- Orio, Patricio, Rodolfo Madrid, Elvira de la Peña, Andrés Parra, Víctor Meseguer, Douglas A Bayliss, Carlos Belmonte, et Félix Viana. 2009. « Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors ». *The Journal of Physiology* 587 (Pt 9): 1961-76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165738>.
- Oyrer, Julia, Lauren E. Bleakley, Kay L. Richards, Snezana Maljevic, A. Marie Phillips, Steven Petrou, Cameron J. Nowell, et Christopher A. Reid. 2019. « Using a Multiplex Nucleic Acid in situ Hybridization Technique to Determine HCN4 mRNA Expression in the Adult Rodent Brain ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00211>.
- Pachman, Deirdre R., Rui Qin, Drew K. Seisler, Ellen M. L. Smith, Andreas S. Beutler, Lauren E. Ta, Jacqueline M. Lafky, et al. 2015. « Clinical Course of Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Results From the Randomized Phase III Trial N08CB (Alliance) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (30): 3416-22. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.8533>.
- Pape, H-C. 1996. « Queer Current and Pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons ». *Annual Review of Physiology* 58 (1): 299-327. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.001503>.
- Park, Jin-Hee, Jisook Chae, Kangsan Roh, Eui-Joon Kil, Minji Lee, Chung-Kyun Auh, Myung-Ah Lee, Chang-Hwan Yeom, et Sukchan Lee. 2015. « Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy via TRPA1 Stimulation in Mice Dorsal Root Ganglion Is Correlated with Aluminum Accumulation ». *PLOS ONE* 10 (4): e0124875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124875>.
- Park, Susanna B., David Goldstein, Arun V. Krishnan, Cindy S-Y Lin, Michael L. Friedlander, James Cassidy, Martin Koltzenburg, et Matthew C. Kiernan. 2013. « Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Critical Analysis ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63 (6): 419-37. <https://doi.org/10.3322/caac.21204>.
- Park, Susanna B., David Goldstein, Cindy S.-Y. Lin, Arun V. Krishnan, Michael L. Friedlander, et Matthew C. Kiernan. 2009. « Acute Abnormalities of Sensory Nerve Function Associated With Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (8): 1243-49. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.3425>.
- Park, Susanna B., Cindy S.-Y. Lin, Arun V. Krishnan, David Goldstein, Michael L. Friedlander, et Matthew C. Kiernan. 2009. « Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity: Changes in Axonal Excitability Precede Development of Neuropathy ». *Brain: A Journal of Neurology* 132 (Pt 10): 2712-23. <https://doi.org/10.1093/brain/awp219>.
- Park, Susanna B., Cindy S-Y. Lin, Arun V. Krishnan, David Goldstein, Michael L. Friedlander, et Matthew C. Kiernan. 2011. « Dose Effects of Oxaliplatin on Persistent and Transient Na<sup>+</sup> Conductances and the Development of Neurotoxicity ». Édité par Steven Barnes. *PLoS ONE* 6 (4): e18469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018469>.
- Peier, Andrea M., Aziz Moqrich, Anne C. Hergarden, Alison J. Reeve, David A. Andersson, Gina M. Story, Taryn J. Earley, et al. 2002. « A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol ». *Cell* 108 (5): 705-15. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9).
- Peirs, Cedric, Radhouane Dallel, et Andrew J. Todd. 2020. « Recent Advances in Our Understanding of the Organization of Dorsal Horn Neuron Populations and Their Contribution to Cutaneous Mechanical Allodynia ». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 127 (4): 505-25. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02159-1>.
- Peirs, Cedric, et Rebecca P. Seal. 2016. « Neural Circuits for Pain: Recent Advances and Current Views ». *Science* 354 (6312): 578-84. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8933>.
- Pereira, Vanessa, Sylvain Lamoine, Mélissa Cuménal, Stéphane Lolignier, Youssef Aissouni, Anne Pizzoccaro, Laetitia Prival, et al. 2021. « Epigenetics Involvement in Oxaliplatin-Induced

- Potassium Channel Transcriptional Downregulation and Hypersensitivity ». *Molecular Neurobiology* 58 (7): 3575-87. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02361-6>.
- Peters, Colin H., Rohit K. Singh, John R. Bankston, et Catherine Proenza. 2022. « Regulation of HCN Channels by Protein Interactions ». *Frontiers in Physiology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.928507>.
- Pfau, Doreen B., Christian Geber, Frank Birklein, et Rolf-Detlef Treede. 2012. « Quantitative Sensory Testing of Neuropathic Pain Patients: Potential Mechanistic and Therapeutic Implications ». *Current Pain and Headache Reports* 16 (3): 199-206. <https://doi.org/10.1007/s11916-012-0261-3>.
- Phillips, Kristine, et Daniel J. Clauw. 2011. « Central Pain Mechanisms in Chronic Pain States – Maybe It Is All in Their Head ». *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology* 25 (2): 141. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.02.005>.
- Pietrangeli, Alberto, Massimo Leandri, Edmondo Terzoli, Bruno Jandolo, et Carlo Garufi. 2006. « Persistence of High-Dose Oxaliplatin-Induced Neuropathy at Long-Term Follow-Up ». *European Neurology* 56 (1): 13-16. <https://doi.org/10.1159/000094376>.
- Poolos, Nicholas P. 2010. « Genetic Loss of HCN1 Channels Is Exciting, But Is It Epileptic? ». *Epilepsy Currents* 10 (2): 49-51. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2009.01352.x>.
- Porro, Alessandro, Andrea Saponaro, Federica Gasparri, Daniel Bauer, Christine Gross, Matteo Pisoni, Gerardo Abbandonato, et al. 2019. « The HCN domain couples voltage gating and cAMP response in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels ». Édité par Olga Boudker, László Csanády, László Csanády, John Bankston, et Marcel P Goldschen-Ohm. *eLife* 8 (novembre): e49672. <https://doi.org/10.7554/eLife.49672>.
- Porro, Alessandro, Gerhard Thiel, Anna Moroni, et Andrea Saponaro. 2020. « cyclic AMP Regulation and Its Command in the Pacemaker Channel HCN4 ». *Frontiers in Physiology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00771>.
- Poupon, Laura, Sylvain Lamoine, Vanessa Pereira, David A. Barriere, Stéphane Lolignier, Fabrice Giraudet, Youssef Aissouni, et al. 2018. « Targeting the TREK-1 Potassium Channel via Riluzole to Eliminate the Neuropathic and Depressive-like Effects of Oxaliplatin ». *Neuropharmacology* 140 (septembre): 43-61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.026>.
- Prato, Vincenzo, Francisco J. Taberner, James R. F. Hockley, Gerard Callejo, Alice Arcourt, Bassim Tazir, Leonie Hammer, et al. 2017. « Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors ». *Cell Reports* 21 (11): 3102-15. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.066>.
- Privitera, Rosario, et Praveen Anand. 2019. « Genetic Small Fiber Sensory Neuropathy and Channelopathy ». In *Small Fiber Neuropathy and Related Syndromes: Pain and Neurodegeneration*, édité par Sung-Tsang Hsieh, Praveen Anand, Christopher H. Gibbons, et Claudia Sommer, 73-82. Singapore: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3546-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3546-4_7).
- Prutianu, Iulian, Teodora Alexa-Stratulat, Elena Octaviana Cristea, Andrei Nicolau, Diana Cornelia Moisuc, Alina Alexandra Covrig, Karina Ivanov, et al. 2022. « Oxaliplatin-Induced Neuropathy and Colo-Rectal Cancer Patient's Quality of Life: Practical Lessons from a Prospective Cross-Sectional, Real-World Study ». *World Journal of Clinical Cases* 10 (10): 3101-12. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i10.3101>.
- « Psychiatry.Org - Updates to DSM-5-TR Criteria and Text ». s. d. Consulté le 10 novembre 2022. <https://www.psychiatry.org/443/psychiatrists/practice/dsm/updates-to-dsm/updates-to-dsm-5-tr-criteria-text>.
- Pypec, Maxime, Laurent Jouffret, Claude Taillefumier, et Olivier Roy. 2022. « First Series of N - Alkylamino Peptoid Homooligomers: Solution Phase Synthesis and Conformational Investigation ». *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 18: 845. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.85>.

- Radat, F., A. Margot-Duclot, et N. Attal. 2013. « Psychiatric Co-Morbidities in Patients with Chronic Peripheral Neuropathic Pain: A Multicentre Cohort Study ». *European Journal of Pain* 17 (10): 1547-57. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00334.x>.
- Ramanathan, Ramesh K., Jeffery W. Clark, Nancy E. Kemeny, Heinz-Josef Lenz, Kim O. Gococo, Daniel G. Haller, Edith P. Mitchell, et Carl G. Kardinal. 2003. « Safety and Toxicity Analysis of Oxaliplatin Combined With Fluorouracil or as a Single Agent in Patients With Previously Treated Advanced Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 21 (15): 2904-11. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.045>.
- Rao, Vanishree, Rashmi Bhushan, Priyanka Kumari, Sri Pragnya Cheruku, V. Ravichandiran, et Nitesh Kumar. 2022. « Chemobrain: A Review on Mechanistic Insight, Targets and Treatments ». *Advances in Cancer Research* 155: 29-76. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.04.001>.
- Raouf, Ramin, Kathryn Quick, et John N. Wood. 2010. « Pain as a Channelopathy ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3745-52. <https://doi.org/10.1172/JCI43158>.
- Reimann, Frank, James J. Cox, Inna Belfer, Luda Diatchenko, Dmitri V. Zaykin, Duncan P. McHale, Joost P. H. Drenth, et al. 2010. « Pain Perception Is Altered by a Nucleotide Polymorphism in SCN9A ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 5148-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913181107>.
- Reis, Angélica S., Carolina C. Martins, Ketlyn P. da Motta, Jaini J. Paltian, Gabriel P. Costa, Diego Alves, Cristiane Luchese, et Ethel Antunes Wilhelm. 2022. « Interface of Aging and Acute Peripheral Neuropathy Induced by Oxaliplatin in Mice: Target-Directed Approaches for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>—ATPase, Oxidative Stress, and 7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline Therapy ». *Molecular Neurobiology* 59 (3): 1766-80. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02659-5>.
- Renn, Cynthia L, Valentina A Carozzi, Peter Rhee, Danisha Gallop, Susan G Dorsey, et Guido Cavaletti. 2011. « Multimodal Assessment of Painful Peripheral Neuropathy Induced by Chronic Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Mice ». *Molecular Pain* 7 (janvier): 1744-8069-7-29. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-29>.
- Resta, F., L. Micheli, A. Laurino, V. Spinelli, T. Mello, L. Sartiani, L. Di Cesare Mannelli, et al. 2018. « Selective HCN1 Block as a Strategy to Control Oxaliplatin-Induced Neuropathy ». *Neuropharmacology* 131 (mars): 403-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.014>.
- Rimola, Vittoria, Tabea Osthues, Vanessa Königs, Gerd Geißlinger, et Marco Sisignano. 2021. « Oxaliplatin Causes Transient Changes in TRPM8 Channel Activity ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9): 4962. <https://doi.org/10.3390/ijms22094962>.
- Riva, Beatrice, Marianna Dionisi, Alberto Potenzieri, Alessia Chiorazzi, Celia Cordero-Sanchez, Roberta Rigolio, Valentina Alda Carozzi, et al. 2018. « Oxaliplatin Induces PH Acidification in Dorsal Root Ganglia Neurons ». *Scientific Reports* 8 (1): 15084. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33508-6>.
- Rivolta, Ilaria, Anna Binda, Alessio Masi, et Jacopo C. DiFrancesco. 2020. « Cardiac and Neuronal HCN Channelopathies ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 472 (7): 931-51. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02384-3>.
- Rosenberg, Barnett, Loretta Vancamp, James E. Trosko, et Virginia H. Mansour. 1969. « Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents ». *Nature* 222 (5191): 385-86. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- Rouvette, Tom, Luca Avenali, Julia Sondermann, Pratibha Narayanan, David Gomez-Varela, et Manuela Schmidt. 2015. « Modulation of Nociceptive Ion Channels and Receptors via Protein-Protein Interactions: Implications for Pain Relief ». *Channels (Austin, Tex.)* 9 (4): 175-85. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1051270>.
- Salat, Kinga. 2020. « Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy—Part 2: Focus on the Prevention of Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity ». *Pharmacological Reports* 72 (3): 508-27. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00106-1>.
- Salat, Kinga, et Barbara Filipek. 2015. « Antinociceptive Activity of Transient Receptor Potential Channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 Antagonists in Neurogenic and Neuropathic Pain

- Models in Mice ». *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 16 (3): 167-78. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400189>.
- Śałat, Kinga, Anna Furgala, et Natalia Malikowska-Racia. 2019. « Searching for Analgesic Drug Candidates Alleviating Oxaliplatin-induced Cold Hypersensitivity in Mice ». *Chemical Biology & Drug Design*, mars, cbdd.13507. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13507>.
- Santoro, B., S. Chen, A. Luthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs, et S. A. Siegelbaum. 2000. « Molecular and Functional Heterogeneity of Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels in the Mouse CNS ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (14): 5264-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05264.2000>.
- Santoro, Bina, Rebecca A. Piskorowski, Phillip Pian, Lei Hu, Haiying Liu, et Steven A. Siegelbaum. 2009. « TRIP8b Splice Variants Form a Family of Auxiliary Subunits That Regulate Gating and Trafficking of HCN Channels in the Brain ». *Neuron* 62 (6): 802-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.009>.
- Santoro, Bina, et Mala M. Shah. 2020. « Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels as Drug Targets for Neurological Disorders ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 60 (janvier): 109-31. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023356>.
- Santoro, Bina, Brian J. Wainger, et Steven A. Siegelbaum. 2004. « Regulation of HCN Channel Surface Expression by a Novel C-Terminal Protein-Protein Interaction ». *The Journal of Neuroscience* 24 (47): 10750-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3300-04.2004>.
- Saponaro, Andrea, Francesca Vallese, Alessandro Porro, et Oliver B. Clarke. 2022. « Validation of the Binding Stoichiometry between HCN Channels and Their Neuronal Regulator TRIP8b by Single Molecule Measurements ». *Frontiers in Physiology* 13: 998176. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.998176>.
- Scherschel, Katharina, Hanna Bräuninger, Andrea Mölders, Nadine Erlenhardt, Ehsan Amin, Christiane Jungen, Ulrike Pape, et al. 2021. « Characterization of the HCN Interaction Partner TRIP8b/PEX5R in the Intracardiac Nervous System of TRIP8b-Deficient and Wild-Type Mice ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9): 4772. <https://doi.org/10.3390/ijms22094772>.
- Schnorr, Sabine, Mirjam Eberhardt, Katrin Kistner, Hamsa Rajab, Johannes Käer, Andreas Hess, Peter Reeh, Andreas Ludwig, et Stefan Herrmann. 2014. « HCN2 Channels Account for Mechanical (but Not Heat) Hyperalgesia during Long-Standing Inflammation ». *Pain* 155 (6): 1079-90. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.02.006>.
- Scholz, Joachim, Nanna B. Finnerup, Nadine Attal, Qasim Aziz, Ralf Baron, Michael I. Bennett, Rafael Benoliel, et al. 2019. « The IASP Classification of Chronic Pain for ICD-11: Chronic Neuropathic Pain ». *PAIN* 160 (1): 53-59. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>.
- Schumacher SM, McEwen DP, Zhang L, Arendt KL, Van Genderen KM, Martens JR. 2009. « Antiarrhythmic drug-induced internalization of the atrial-specific k+ channel kv1.5 ». *Circ Res*. Jun 19;104(12):1390-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192773.
- Seibenhener, Michael L., et Michael C. Wooten. 2015. « Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 96 (février): 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>.
- Seifert, Reinhard, Alexander Scholten, Renate Gauss, Antoaneta Mincheva, Peter Lichter, et U. Benjamin Kaupp. 1999. « Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (16): 9391-96.
- Selvy, Marie, Bruno Pereira, Nicolas Kerckhove, Jérôme Busserolles, Fadila Farsi, Virginie Guastella, Patrick Merle, Denis Pezet, et David Balaýssac. 2021. « Prevention, Diagnosis and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Cross-Sectional

- Study of French Oncologists' Professional Practices ». *Supportive Care in Cancer* 29 (7): 4033-43. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05928-6>.
- Sereno, María, Gerardo Gutiérrez-Gutiérrez, Juan Moreno Rubio, María Apellániz-Ruiz, Lara Sánchez-Barroso, Enrique Casado, Sandra Falagan, et al. 2017. « Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy ». *BMC Cancer* 17 (janvier): 63. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-3031-5>.
- Seretny, Marta, Gillian L. Currie, Emily S. Sena, Sabrina Ramnarine, Robin Grant, Malcolm R. MacLeod, Leslie A. Colvin, et Marie Fallon. 2014. « Incidence, Prevalence, and Predictors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Pain* 155 (12): 2461-70. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>.
- Sharif, Behrang, Ariel R. Ase, Alfredo Ribeiro-da-Silva, et Philippe Séguéla. 2020. « Differential Coding of Itch and Pain by a Subpopulation of Primary Afferent Neurons ». *Neuron* 106 (6): 940-951.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.021>.
- Shidahara, Yuka, Takahiro Natsume, Yūji Awaga, Shin'ya Ogawa, Kurumi Yamoto, Shinichi Okamoto, Aldric Hama, Ikuo Hayashi, Hiroyuki Takamatsu, et Yasuhiro Magata. 2019. « Distinguishing Analgesic Drugs from Non-Analgesic Drugs Based on Brain Activation in Macaques with Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain ». *Neuropharmacology* 149 (mai): 204-11. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.031>.
- Shields, Shannon D., Hye-Sook Ahn, Yang Yang, Chongyang Han, Rebecca P. Seal, John N. Wood, Stephen G. Waxman, et Sulayman D. Dib-Hajj. 2012. « Nav1.8 Expression Is Not Restricted to Nociceptors in Mouse Peripheral Nervous System ». *Pain* 153 (10): 2017-30. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.022>.
- Shiers, Stephanie, Rebecca M. Klein, et Theodore J. Price. 2020. « Quantitative Differences in Neuronal Subpopulations between Mouse and Human Dorsal Root Ganglia Demonstrated with RNAscope in Situ Hybridization ». [bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.03.06.981597](https://doi.org/10.1101/2020.03.06.981597).
- Shigematsu, Nao, Takehiro Kawashiri, Daisuke Kobayashi, Shiori Shimizu, Keisuke Mine, Shiori Hiromoto, Mayako Uchida, Nobuaki Egashira, et Takao Shimazoe. 2020. « Neuroprotective Effect of Alogliptin on Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Vivo and in Vitro ». *Scientific Reports* 10 (1): 6734. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62738-w>.
- Sittl, Ruth, Angelika Lampert, Tobias Huth, E. Theresa Schuy, Andrea S. Link, Johannes Fleckenstein, Christian Alzheimer, Peter Grafe, et Richard W. Carr. 2012. « Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype NaV1.6-resurgent and persistent current ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (17): 6704-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118058109>.
- Smith, T., M. Al Otaibi, J. Sathish, et L. Djouhri. 2015. « Increased Expression of HCN2 Channel Protein in L4 Dorsal Root Ganglion Neurons Following Axotomy of L5- and Inflammation of L4-Spinal Nerves in Rats ». *Neuroscience* 295 (juin): 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.041>.
- Sprowl, Jason A., Giuliano Ciarimboli, Cynthia S. Lancaster, Hugh Giovinozzo, Alice A. Gibson, Guoqing Du, Laura J. Janke, Guido Cavaletti, Anthony F. Shields, et Alex Sparreboom. 2013. « Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity Is Dependent on the Organic Cation Transporter OCT2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11199-204. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305321110>.
- Starobova, Hana, Alexander Mueller, Jennifer R. Deuis, David A. Carter, et Irina Vetter. 2020. « Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice ». *The Journal of Pain* 21 (1): 182-94. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.06.008>.
- Stieber, Juliane, Stefan Herrmann, Susanne Feil, Jana Löster, Robert Feil, Martin Biel, Franz Hofmann, et Andreas Ludwig. 2003. « The Hyperpolarization-Activated Channel HCN4 Is Required for the Generation of Pacemaker Action Potentials in the Embryonic Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15235-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.2434235100>.

- Stieber, Juliane, Karen Wieland, Georg Stöckl, Andreas Ludwig, et Franz Hofmann. 2006. « Bradycardic and Proarrhythmic Properties of Sinus Node Inhibitors ». *Molecular Pharmacology* 69 (4): 1328-37. <https://doi.org/10.1124/mol.105.020701>.
- Stieglitz, Marc S., Stefanie Fenske, Verena Hammelmann, Elvir Becirovic, Verena Schöttle, James E. Delorme, Martha Schöll-Weidinger, et al. 2017. « Disturbed Processing of Contextual Information in HCN3 Channel Deficient Mice ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 436. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00436>.
- Stirling, L. Caroline, Greta Forlani, Mark D. Baker, John N. Wood, Elizabeth A. Matthews, Anthony H. Dickenson, et Mohammed A. Nassar. 2005. « Nociceptor-Specific Gene Deletion Using Heterozygous NaV1.8-Cre Recombinase Mice ». *Pain* 113 (1-2): 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.08.015>.
- Storey, D. J., M. Sakala, C. M. McLean, H. A. Phillips, L. K. Dawson, L. R. Wall, M. T. Fallon, et S. Clive. 2010. « Capecitabine Combined with Oxaliplatin (CapOx) in Clinical Practice: How Significant Is Peripheral Neuropathy? » *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 21 (8): 1657-61. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp594>.
- Story, Gina M., Andrea M. Peier, Alison J. Reeve, Samer R. Eid, Johannes Mosbacher, Todd R. Hricik, Taryn J. Earley, et al. 2003. « ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures ». *Cell* 112 (6): 819-29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00158-2).
- Stradleigh, Tyler W., Genki Ogata, Gloria J. Partida, Hanako Oi, Kenneth P. Greenberg, Kalen S. Krempely, et Andrew T. Ishida. 2011. « Colocalization of HCN Channel Subunits in Rat Retinal Ganglion Cells ». *The Journal of Comparative Neurology* 519 (13): 2546-73. <https://doi.org/10.1002/cne.22638>.
- Ta, Lauren E., Laura Espeset, Jewel Podratz, et Anthony J. Windebank. 2006. « Neurotoxicity of Oxaliplatin and Cisplatin for Dorsal Root Ganglion Neurons Correlates with Platinum-DNA Binding ». *Neurotoxicology* 27 (6): 992-1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.04.010>.
- Ta, Lauren E., Philip A Low, et Anthony J Windebank. 2009. « Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli ». *Molecular Pain* 5 (février): 9. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-9>.
- Taieb, Sarah, Véronique Trillet-Lenoir, Loïc Rambaud, Louis Descos, et Gilles Freyer. 2002. « Lhermitte Sign and Urinary Retention: Atypical Presentation of Oxaliplatin Neurotoxicity in Four Patients ». *Cancer* 94 (9): 2434-40. <https://doi.org/10.1002/cncr.10500>.
- Takasu, Keiko, Hideki Ono, et Mitsuo Tanabe. 2010. « Spinal Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channels at Primary Afferent Terminals Contribute to Chronic Pain ». *Pain* 151 (1): 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.06.020>.
- Tashiro, T., Y. Kawada, Y. Sakurai, et Y. Kidani. 1989. « Antitumor Activity of a New Platinum Complex, Oxalato (Trans-l-1,2-Diaminocyclohexane)Platinum (II): New Experimental Data ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 43 (4): 251-60. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(89\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0753-3322(89)90004-8).
- Tavares-Ferreira, Diana, Stephanie Shiers, Pradipta R. Ray, Andi Wangzhou, Vivekanand Jeevakumar, Ishwarya Sankaranarayanan, Anna M. Cervantes, et al. 2022. « Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors ». *Science Translational Medicine* 14 (632): eabj8186. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj8186>.
- Ting, Jonathan T., Brian R. Lee, Peter Chong, Gilberto Soler-Llavina, Charles Cobbs, Christof Koch, Hongkui Zeng, et Ed Lein. 2018. « Preparation of Acute Brain Slices Using an Optimized N-Methyl-D-Glucamine Protective Recovery Method ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 132 (février): 53825. <https://doi.org/10.3791/53825>.
- Toftthagen, Cindy, Kristine A. Donovan, Mary Ann Morgan, David Shibata, et Yating Yeh. 2013. « Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy's Effects on Health-Related Quality of Life of Colorectal Cancer Survivors ». *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the*

- Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 21 (12): 3307-13. <https://doi.org/10.1007/s00520-013-1905-5>.
- Treede, R. D., R. A. Meyer, et J. N. Campbell. 1998. « Myelinated Mechanically Insensitive Afferents from Monkey Hairy Skin: Heat-Response Properties ». *Journal of Neurophysiology* 80 (3): 1082-93. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.3.1082>.
- Treede, Rolf-Detlef, Winfried Rief, Antonia Barke, Qasim Aziz, Michael I. Bennett, Rafael Benoliel, Milton Cohen, et al. 2019. « Chronic Pain as a Symptom or a Disease: The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11) ». *PAIN* 160 (1): 19-27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>.
- Trevisan, Gabriela, Silvia Benemei, Serena Materazzi, Francesco De Logu, Gaetano De Siena, Camilla Fusi, Mateus Fortes Rossato, et al. 2016. « TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress ». *Brain* 139 (5): 1361-77. <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>.
- Trevisan, Gabriela, Serena Materazzi, Camilla Fusi, Alessandra Altomare, Giancarlo Aldini, Maura Lodovici, Riccardo Patacchini, Pierangelo Geppetti, et Romina Nassini. 2013. « Novel Therapeutic Strategy to Prevent Chemotherapy-Induced Persistent Sensory Neuropathy By TRPA1 Blockade ». *Cancer Research* 73 (10): 3120-31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4370>.
- Tsubota, Maho, Ryotaro Fukuda, Yusuke Hayashi, Takaya Miyazaki, Shin Ueda, Rika Yamashita, Nene Koike, et al. 2019. « Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants ». *Journal of Neuroinflammation* 16 (1): 199. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1581-6>.
- Uchida, Hitoshi, Lin Ma, et Hiroshi Ueda. 2010. « Epigenetic Gene Silencing Underlies C-Fiber Dysfunctions in Neuropathic Pain ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (13): 4806-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5541-09.2010>.
- Ulens, Chris, et Jan Tytgat. 2001. « Functional Heteromerization of HCN1 and HCN2 Pacemaker Channels ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (9): 6069-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000738200>.
- Ulmann, Lauriane, Jon P. Hatcher, Jane P. Hughes, Séverine Chaumont, Paula J. Green, François Conquet, Gary N. Buell, Alison J. Reeve, Iain P. Chessell, et Francois Rassendren. 2008. « Up-Regulation of P2X4 Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (44): 11263-68. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008>.
- Usoskin, Dmitry, Alessandro Furlan, Saiful Islam, Hind Abdo, Peter Lönnerberg, Daohua Lou, Jens Hjerling-Leffler, et al. 2015. « Unbiased Classification of Sensory Neuron Types by Large-Scale Single-Cell RNA Sequencing ». *Nature Neuroscience* 18 (1): 145-53. <https://doi.org/10.1038/nn.3881>.
- Maletic, V, et Raison Cl. 2009. « Neurobiology of Depression, Fibromyalgia and Neuropathic Pain ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14 (14). <https://doi.org/10.2741/3598>.
- Vandewauw, Ine, Grzegorz Owsianik, et Thomas Voets. 2013. « Systematic and Quantitative mRNA Expression Analysis of TRP Channel Genes at the Single Trigeminal and Dorsal Root Ganglion Level in Mouse ». *BMC Neuroscience* 14 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-21>.
- Varga, Viktor, Balázs Hangya, Kinga Kránitz, Anikó Ludányi, Rita Zemankovics, István Katona, Ryuichi Shigemoto, Tamás F Freund, et Zsolt Borhegyi. 2008. « The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum ». *The Journal of Physiology* 586 (Pt 16): 3893-3915. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155242>.

- Vasic, Verica, et Mirko H. H. Schmidt. 2017. « Resilience and Vulnerability to Pain and Inflammation in the Hippocampus ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 739. <https://doi.org/10.3390/ijms18040739>.
- Velasco, Roser, Montserrat Alemany, Macarena Villagrán, et Andreas A. Argyriou. 2021. « Predictive Biomarkers of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity ». *Journal of Personalized Medicine* 11 (7): 669. <https://doi.org/10.3390/jpm11070669>.
- Vestergaard, M., M. Carta, G. Güney, et J. F. A. Poulet. 2023. « The Cellular Coding of Temperature in the Mammalian Cortex ». *Nature* 614 (7949): 725-31. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05705-5>.
- Vienot, Angélique, Hortense Chevalier, Clément Bolognini, Elisabeta Gherga, Elodie Klajer, Aurélie Meurisse, Marine Jary, et al. 2020. « FOLFOXIRI vs FOLFIRINOX as first-line chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer: A population-based cohort study ». *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 12 (3): 332-46. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i3.332>.
- Vincent, Jacob A., Krystyna B. Wieczerszak, Hanna M. Gabriel, Paul Nardelli, Mark M. Rich, et Timothy C. Cope. 2016. « A Novel Path to Chronic Proprioceptive Disability with Oxaliplatin: Distortion of Sensory Encoding ». *Neurobiology of Disease* 95 (novembre): 54. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.004>.
- Vuralli, Doga, Anne-Sophie Wattiez, Andrew F. Russo, et Hayrunnisa Bolay. 2019. « Behavioral and cognitive animal models in headache research ». *The Journal of Headache and Pain* 20 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-0963-6>.
- Wahl-Schott, C., et M. Biel. 2009. « HCN Channels: Structure, Cellular Regulation and Physiological Function ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (3): 470-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>.
- Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum, et G. R. Tibbs. 2001. « Molecular Mechanism of CAMP Modulation of HCN Pacemaker Channels ». *Nature* 411 (6839): 805-10. <https://doi.org/10.1038/35081088>.
- Walf, Alicia A, et Cheryl A Frye. 2007. « The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents ». *Nature protocols* 2 (2): 322-28. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
- Wall, P.D. 1978. « THE GATE CONTROL THEORY OF PAIN MECHANISMS: A RE-EXAMINATION AND RE-STATEMENT ». *Brain* 101 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1093/brain/101.1.1>.
- Wang, Allison B., Stephen Nick Housley, Timothy C. Cope, Ann Marie Flores, et Eric J. Perreault. 2020. « Quantitative assessment of proprioceptive dysfunction in cancer survivors post oxaliplatin-containing chemotherapy. » *Journal of Clinical Oncology* 38 (15\_suppl): e24071-e24071. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.e24071](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e24071).
- Wang, Ze-Jun, Ismary Blanco, Sebastien Hayoz, et Tinatin I. Brelidze. 2020. « The HCN Domain Is Required for HCN Channel Cell-Surface Expression and Couples Voltage- and CAMP-Dependent Gating Mechanisms ». *Journal of Biological Chemistry* 295 (24): 8164-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013281>.
- Warncke, Urszula O., Wisam Toma, Julie A. Meade, Abigail J. Park, Danielle C. Thompson, Martial Caillaud, John W. Bigbee, Camron D. Bryant, et M. Imad Damaj. 2021. « Impact of Dose, Sex, and Strain on Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Mice ». *Frontiers in Pain Research* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpain.2021.683168>.
- Watson, James C., et P. James B. Dyck. 2015. « Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management ». *Mayo Clinic Proceedings* 90 (7): 940-51. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.05.004>.
- Weißgraeber, Stephanie, Andrea Saponaro, Gerhard Thiel, et Kay Hamacher. 2017. « A Reduced Mechanical Model for CAMP-Modulated Gating in HCN Channels ». *Scientific Reports* 7 (janvier): 40168. <https://doi.org/10.1038/srep40168>.

- Wilkars, Wiebke, Jessica Wollberg, Evita Mohr, Mieri Han, Dane M. Chetkovich, Robert Bähring, et Roland A. Bender. 2014. « Nedd4-2 Regulates Surface Expression and May Affect N-Glycosylation of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN)-1 Channels ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (5): 2177-90. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242032>.
- Wojnarowski, Jan M., William G. Chapman, Cheryl Napier, Maryanne C. S. Herzig, et Paul Juniewicz. 1998. « Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA ». *Molecular Pharmacology* 54 (5): 770-77. <https://doi.org/10.1124/mol.54.5.770>.
- Wu, Xing, Liping Liao, Xiangming Liu, Fang Luo, Tianming Yang, et Chenhong Li. 2012. « Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? » *Channels* 6 (6): 438-42. <https://doi.org/10.4161/chan.22209>.
- Yang, Lujia, Xiaoyan Liu, Kai Yao, Yan Sun, Fan Jiang, Haitao Yan, Peng Mao, et al. 2019. « HCN Channel Antagonist ZD7288 Ameliorates Neuropathic Pain and Associated Depression ». *Brain Research* 1717 (août): 204-13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.036>.
- Ychou, M., F. Viret, A. Kramar, F. Desseigne, E. Mitry, R. Guimbaud, J. R. Delpero, et al. 2008. « Tritherapy with Fluorouracil/Leucovorin, Irinotecan and Oxaliplatin (FOLFIRINOX): A Phase II Study in Colorectal Cancer Patients with Non-Resectable Liver Metastases ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62 (2): 195-201. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0588-3>.
- Yongning, Zhang, Lin Xianguang, Chen Hengling, Chen Su, Luo Fang, et Li Chenhong. 2021. « The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Currents Contribute to Oxaliplatin-Induced Hyperexcitability of DRG Neurons ». *Somatosensory & Motor Research* 38 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1080/08990220.2020.1834376>.
- Yoon, Seo-Yeon, Caleb R. Robinson, Haijun Zhang, et Patrick M. Dougherty. 2013. « Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity ». *The journal of pain: official journal of the American Pain Society* 14 (2): 205-14. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.11.002>.
- Young, Gareth T., Edward C. Emery, Elizabeth R. Mooney, Christoforos Tsantoulas, et Peter A. McNaughton. 2014. « Inflammatory and Neuropathic Pain Are Rapidly Suppressed by Peripheral Block of Hyperpolarisation-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels ». *Pain* 155 (9): 1708-19. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.05.021>.
- Yu, Xiao, Kai-Lai Duan, Chun-Feng Shang, Han-Gang Yu, et Zhuan Zhou. 2004. « Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (Ih channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (4): 1051-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305167101>.
- Zagotta, William N., Nelson B. Olivier, Kevin D. Black, Edgar C. Young, Rich Olson, et Eric Gouaux. 2003. « Structural Basis for Modulation and Agonist Specificity of HCN Pacemaker Channels ». *Nature* 425 (6954): 200-205. <https://doi.org/10.1038/nature01922>.
- Zhang, Haijun, et Patrick M. Dougherty. 2014. « Enhanced Excitability of Primary Sensory Neurons and Altered Gene Expression of Neuronal Ion Channels in Dorsal Root Ganglion in Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy ». *Anesthesiology* 120 (6): 1463-75. <https://doi.org/10.1097/ALN.000000000000176>.
- Zhang, Shuzhong, Katherine S. Lovejoy, James E. Shima, Leah L. Lagpacan, Yan Shu, Anna Lapuk, Ying Chen, et al. 2006. « Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity ». *Cancer research* 66 (17): 8847-57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0769>.
- Zhao, Meng, Kouichi Isami, Saki Nakamura, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, et Shuji Kaneko. 2012. « Acute Cold Hypersensitivity Characteristically Induced by Oxaliplatin Is Caused by the Enhanced Responsiveness of TRPA1 in Mice ». *Molecular Pain* 8 (janvier): 1744-8069-8-55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-55>.
- Zhao, Zhe, Kang Zhang, Xiaoyan Liu, Haitao Yan, Xiaoyun Ma, Shuzhuo Zhang, Jianquan Zheng, Liyun Wang, et Xiaoli Wei. 2016. « Involvement of HCN Channel in Muscarinic Inhibitory

- Action on Tonic Firing of Dorsolateral Striatal Cholinergic Interneurons ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10 (mars): 71. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00071>.
- Zigmond, A. S., et R. P. Snaith. 1983. « The Hospital Anxiety and Depression Scale ». *Acta Psychiatrica Scandinavica* 67 (6): 361-70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x>.
- Zimmermann, Lennerz Jk, Hein A, Link As, Kaczmarek Js, Delling M, Uysal S, Pfeifer Jd, Riccio A, et Clapham De. 2011. « Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 5 (TRPC5) Is a Cold-Transducer in the Peripheral Nervous System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (44). <https://doi.org/10.1073/pnas.1115387108>.
- Zimmermann, Katharina, Alexander Hein, Ulrich Hager, Jan Stefan Kaczmarek, Brian P. Turnquist, David E. Clapham, et Peter W. Reeh. 2009. « Phenotyping Sensory Nerve Endings in Vitro in the Mouse ». *Nature Protocols* 4 (2): 174-96. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.223>.
- Zimmermann, Katharina, Andreas Leffler, Alexandru Babes, Cruz Miguel Cendan, Richard W. Carr, Jin-ichi Kobayashi, Carla Nau, John N. Wood, et Peter W. Reeh. 2007. « Sensory Neuron Sodium Channel Nav1.8 Is Essential for Pain at Low Temperatures ». *Nature* 447 (7146): 855-58. <https://doi.org/10.1038/nature05880>.
- Zobeiri, Mehrnoush, Gilles van Luijtelaar, Thomas Budde, et Ilya V. Sysoev. 2019. « The Brain Network in a Model of Thalamocortical Dysrhythmia ». *Brain Connectivity* 9 (3): 273-84. <https://doi.org/10.1089/brain.2018.0621>.
- Zolles, Gerd, Nikolaj Klöcker, Daniela Wenzel, Jutta Weisser-Thomas, Bernd K. Fleischmann, Jochen Roeper, et Bernd Fakler. 2006. « Pacemaking by HCN Channels Requires Interaction with Phosphoinositides ». *Neuron* 52 (6): 1027-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.12.005>.
- Zong, X., J. Stieber, A. Ludwig, F. Hofmann, et M. Biel. 2001. « A Single Histidine Residue Determines the PH Sensitivity of the Pacemaker Channel HCN2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (9): 6313-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010326200>.
- Zurborg, Sandra, Agnieszka Piszczek, Conception Martínez, Philip Hublitz, Mumna Al Banachaabouchi, Pedro Moreira, Emerald Perlas, et Paul A Heppenstall. 2011. « Generation and characterization of an Advillin-Cre driver mouse line ». *Molecular Pain* 7 (septembre): 66. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-66>.



## Résumé

Les neuropathies périphériques, se manifestant par des troubles sensoriels des extrémités des membres et de la sphère oro-faciale, sont un effet indésirable quasi-systématique du traitement de tumeurs solides par l'oxaliplatine. Ces douleurs neuropathiques sont accompagnées de troubles moteurs et proprioceptifs qui s'installent au fur et à mesure des administrations et perdurent parfois après la fin des cures. Les comorbidités associées de type anxiété et dépression participent à l'altération de la qualité de vie du patient et mènent à une diminution ou l'arrêt du traitement, compromettant ainsi les chances de guérison face au cancer. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour les neuropathies périphériques chimio-induites. Seule la duloxétine est recommandée, avec un niveau de preuve d'efficacité modéré. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et le maintien de la douleur induite par l'oxaliplatine est nécessaire pour développer de nouvelles stratégies innovantes, efficaces et bien tolérées.

Les canaux HCN (*isoformes HCN1-4*), largement distribués dans les voies de la douleur et surexprimés dans des modèles précliniques de neuropathie périphérique induite par oxaliplatine (NPIO), sont une cible émergente. Le blocage pharmacologique de ces canaux par des molécules non sélectives diminue l'hypersensibilité thermique et mécanique des animaux NPIO. Cependant, la fenêtre thérapeutique est étroite en raison de l'expression et de la fonction de ces canaux dans les cellules du tissu nodal cardiaque.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à un partenaire protéique du canal HCN dont l'expression est exclusivement neuronale : la protéine TRIP8b, qui contrôle son adressage membranaire et sa fonction. Notre stratégie consiste à moduler les canaux HCN en perturbant pharmacologiquement l'interaction du canal avec TRIP8b et ainsi avoir un effet antalgique sans effet secondaire cardiaque. Dans des études *in vitro*, l'utilisation de la transcriptomique et de l'immunocytochimie, nous a permis de montrer une coexpression et colocalisation de ces deux cibles dans les neurones périphériques ganglionnaires lombaires (DRG) et trigéminaux (TG). Dans la NPIO aiguë chez la souris, nous avons observé une surexpression des canaux HCN1 et HCN2 et une augmentation du nombre de cellules positives pour *TRIP8b* dans ces tissus. Une surexpression des transcrits HCN1 et HCN4 est également observée dans le cortex insulaire (région impliquée dans les modalités sensorielle et émotionnelle de la douleur de ces animaux) après administrations répétées d'oxaliplatine, suggérant une implication potentielle de ces canaux dans la chronicisation de la neuropathie. Dans des études *in vivo*, nous avons utilisé une stratégie peptidomimétique pour rompre l'interaction HCN-TRIP8b. Un criblage de molécules synthétisés par l'équipe Chimie Organique Médicinale a mis en évidence un peptotide, le composé YC55, possédant une efficacité antalgique reproductible, dose-dépendante, supérieure à l'efficacité du composé de référence clinique (Duloxétine) et non observé chez l'animal délété pour TRIP8b. Enfin, nos études fonctionnelles ont permis de montrer une augmentation de la densité de courant  $I_h$  dans les DRG du modèle NPIO et un effet de YC55 suggérant une modulation de l'interaction HCN-Trip8b et renforçant notre preuve de concept.

En conclusion, nos résultats expérimentaux participent à la compréhension de l'implication des canaux HCN et de leur protéine partenaire TRIP8b dans la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine. Notre stratégie pharmacologique innovante basée sur la modulation des canaux HCN neuronaux offre une perspective thérapeutique intéressante pour traiter les neuropathies chimio-induites, sans induire d'effet indésirable.

Mots clés : canaux HCN ; neuropathie périphérique ; peptoides ; oxaliplatine