



HAL
open science

Modulations des canaux ASIC3 par les lipides endogènes et la température

Kevin Delanoe

► **To cite this version:**

Kevin Delanoe. Modulations des canaux ASIC3 par les lipides endogènes et la température. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. ⟨NNT : 2022COAZ6011⟩. ⟨tel-05009369⟩

HAL Id: tel-05009369

<https://theses.hal.science/tel-05009369v1>

Submitted on 28 Mar 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.



HAL Authorization

THÈSE DE DOCTORAT

Modulations des canaux ASIC3 par les lipides endogènes et la température

Kévin DELANOE

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences de la Vie
et de la Santé d'Université Côte d'Azur**

Dirigée par : Emmanuel DEVAL

Soutenu le : 27 avril 2022

Devant le jury, composé de :

Dr. Paula POUSINHA, MCU, UCA – IPMC

Dr. Jérôme BUSSEROLES, MCU, UCA –
NeuroDol

Dr. Clarisse VANDEBROUK, MCU, Université de
Poitiers – STIM

Dr. Nicolas CENAC, DR INSERM – IRSD

Pr. Olivier SORIANI, PU, UCA – IBV

Dr. Emmanuel DEVAL, DR CNRS – IPMC



Modulations des canaux ASIC3 par les lipides endogènes et la température

Président de jury :

Pr. Olivier SORIANI, PU, Université Côte d'Azur – Institut de Biologie de Valrose (IBV), Nice

Rapporteurs :

Dr. Clarisse VANDEBROUK, MCU, Université de Poitiers – Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), Poitiers

Dr. Nicolas CENAC, DR INSERM – Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), Toulouse

Examineurs :

Dr. Paula POUSINHA, MCU, Université Côte d'Azur – Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), Valbonne

Dr. Jérôme BUSSEROLES, MCU, Université Clermont Auvergne – NeuroDol, Clermont Ferrand

Directeur de thèse :

Dr. Emmanuel DEVAL, DR CNRS – Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), Valbonne

Résumé en Français

Les canaux ioniques ASIC3 (Acid-Sensing Ion Channel 3) sont des canaux sodiques excitateurs majoritairement exprimés dans le système nerveux périphérique. Les variations extracellulaires du pH sont considérées comme le principal signal activateur des ASIC3, qui sont essentiellement vus comme des senseurs de protons. Ces dernières années, il a été démontré que la lysophosphatidylcholine (LPC) et l'acide arachidonique (AA), qui sont des lipides endogènes, activent les canaux ASIC3 à pH physiologique en l'absence d'acidification extracellulaire.

Durant ma thèse, j'ai participé à une étude mettant en évidence des taux importants de LPC16:0 dans les liquides synoviaux de patients souffrants de diverses pathologies articulaires douloureuses, incluant l'ostéoarthrose. Ces taux de LPC16:0 ont été corrélés avec les scores de douleur dans la cohorte de patients ostéoarthritiques, et des injections intra-articulaires de ce lipides chez l'animal induisent un comportement douloureux chronique associé à des comorbidités anxio-dépressives. Les animaux invalidés pour le canal ASIC3, ou co-injectés avec un inhibiteur d'ASIC3 sont protégés de ces effets.

J'ai pu montrer *in vitro* que l'application de LPC16:0 est capable d'activer spécifiquement le canal ASIC3 exprimé en système hétérologue, mais également les canaux ASIC3 natifs des neurones sensoriels et nociceptifs issus des ganglions rachidiens (DRG) de souris en culture primaire. De plus, les courants natifs induits par la LPC16:0 dans les neurones DRG sont associés à une dépolarisation membranaire dépendante d'ASIC3. Grâce à ces travaux, nous pouvons émettre l'hypothèse que la LPC16:0 intra-articulaire active les canaux ASIC3 des neurones DRG innervant l'articulation, générant une dépolarisation qui conduit au développement d'un état douloureux chronique, au moins chez la souris et potentiellement chez l'homme.

Mes travaux de thèse m'ont également permis d'identifier deux nouveaux lipides endogènes capables de moduler positivement les canaux ASIC3. Il s'agit du lysoPAF et du PAF, deux éther-lipides analogues structuraux de la LPC. Ils sont non seulement capables de potentialiser les courants ASIC3 induits par l'acidité, mais aussi d'activer les canaux en l'absence d'acidification extracellulaire et sont indépendants du récepteur au PAF. Ces effets sont comparables à ceux de la LPC et il semble que les trois lipides agissent sur le canal ASIC3 via un mécanisme d'action commun. Mes résultats suggèrent plutôt un effet direct sur le canal, ou dans son environnement proche, plutôt qu'un effet lié à des déformations membranaires par les lipides. J'ai pu démontrer que le lysoPAF est capable d'activer les canaux ASIC3 natifs dans les neurones DRG et d'induire une dépolarisation membranaire concomitante, suggérant que ce lipide pourrait, comme la LPC, avoir des effets proalgiques.

J'ai également pu montrer durant ma thèse que les canaux ASIC3 sont sensibles au froid. Les basses températures ayant pour effet augmenter l'amplitude des courants induit par l'acidification et

de ralentir les cinétiques d'inactivation. Cependant, la délétion d'ASIC3 ne semble pas altérer la sensibilité au froid des neurones DRG en culture primaire.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de faire mettre en évidence la LPC16:0 comme facteur déclencheur des douleurs articulaires, via l'activation d'ASIC3. De plus, j'ai pu identifier deux nouveaux modulateurs lipidiques endogènes du canal ASIC3, le PAF et le lysoPAF, ce qui ouvre de nouvelles perspectives quant au(x) rôle(s) de ces lipides dans la douleur. La modulation des canaux ASIC3 par différents stimuli tels que l'acidité, les lipides et le froid, renforcent l'idée que ce canal se comporte comme un détecteur de coïncidence.

Mots clés : lysophosphatidilcholine, douleur, ASIC, lysoPAF, PAF

Abstract

Acid-Sensing Ion Channel 3 (ASIC3) are excitatory sodium channels predominantly expressed in the peripheral nervous system. Extracellular pH changes are considered the main activating signal for ASIC3, which are essentially seen as proton sensors. In recent years, it has been shown that lysophosphatidylcholine (LPC) and arachidonic acid (AA), which are endogenous lipids, activate ASIC3 channels at physiological pH in the absence of extracellular acidification.

During my thesis, I participated in a study that demonstrated significant levels of LPC16:0 in synovial fluids of patients suffering from various painful joint pathologies, including osteoarthritis. These LPC16:0 levels were correlated with pain scores in the osteoarthritic cohort, and intra-articular injections of this lipid in animals induced chronic pain behaviour associated with anxiety-depressive comorbidities. Animals invalidated for the ASIC3 channel, or co-injected with an ASIC3 inhibitor are protected from these effects.

I was able to show in vitro that the application of LPC16:0 is able to specifically activate the heterologously expressed ASIC3 channel, but also the native ASIC3 channels of sensory and nociceptive neurons from dorsal root ganglia (DRG) of primary cultured mice. Furthermore, native LPC16:0-induced currents in DRG neurons are associated with ASIC3-dependent membrane depolarisation. Based on this work, we can hypothesise that intra-articular LPC16:0 activates ASIC3 channels in DRG neurons innervating the joint, generating a depolarisation that leads to the development of a chronic pain state, at least in mice and potentially in humans.

My thesis work also allowed me to identify two new endogenous lipids capable of positively modulating ASIC3 channels. These are lysoPAF and PAF, two ether lipids that are structural analogues of LPC. They are not only able to potentiate acid-induced ASIC3 currents, but also to activate the channels in the absence of extracellular acidification and are independent of the PAF receptor. These effects are comparable to those of LPC and it appears that all three lipids act on the ASIC3 channel via a common mechanism of action. My results suggest a direct effect on the channel, or in its immediate environment, rather than an effect related to membrane deformations by the lipids. I was able to demonstrate that lysoPAF is able to activate native ASIC3 channels in DRG neurons and to induce a concomitant membrane depolarisation, suggesting that this lipid could, like LPC, have pro-algesic effects.

I also showed during my thesis that ASIC3 channels are cold sensitive. Low temperatures increase the amplitude of acidification-induced currents and slow down the inactivation kinetics. However, deletion of ASIC3 does not appear to alter the cold sensitivity of DRG neurons in primary culture.

In conclusion, my thesis work allowed me to identify LPC16:0 as a trigger for joint pain, via ASIC3 activation. In addition, I was able to identify two new endogenous lipid modulators of the ASIC3 channel, PAF and lysoPAF, which opens new insights into the role(s) of these lipids in pain. The modulation of ASIC3 channels by different stimuli such as acidity, lipids and cold, reinforce the idea that this channel behaves as a coincidence detector.

Keywords: lysophosphatidylcholine, pain, ASIC, lysoPAF, PAF

*« La douleur est une grande institutrice,
elle nous révèle bien des secrets que la joie ne connaît pas. »*

Alfred Auguste Pilavoine ; Les pensées, mélanges et poésies (1845)

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci aux rapporteurs, Dr. Clarisse Vandebrouk et le Dr. Nicolas Cénac. Merci aux examinateurs, Dr. Paula Pousinha et au Dr. Jérôme Busseroles. Merci au Pr. Olivier Soriani de présider ce jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Emmanuel Deval. Sans lui je n'aurais pas découvert le monde de la recherche en électrophysiologie, domaine dans lequel je m'épanouie depuis mes premiers cours à l'université dispensés par le Pr. Olivier Soriani. Emmanuel tu as su me donner ma chance lors d'un stage volontaire en 2016, tu m'as accompagné au fil de ces années et poussé à donner le meilleur de moi-même. Tes conseils et ton expertise ont permis de m'agrandir dans le domaine de l'électrophysiologie, à prendre confiance en moi et à ne pas hésiter à bricoler, améliorer et engranger du savoir-faire. Tu m'as donné toutes les clés pour réussir, autant dans le savoir-faire que dans le savoir être. Tu m'as dit en début de thèse que l'on change au cours de cette dernière, et c'est vrai, ces quatre années passées dans ton équipe m'ont profondément changé, pour le mieux j'en suis convaincu.

Je tiens à remercier de Dr. Miguel Salinas, qui au fil de ma thèse a su me faire réfléchir autrement, sur d'autres choses et à refaire le monde (pas que physique et mathématique). Tu m'as appris pratiquement tout ce que je sais en biochimie et en structure fonction, j'ai beaucoup appris grâce à toi. Je tiens aussi à remercier Sylvie Diochot, notre expert en toxine et animaux venimeux, qui a toujours une curiosité à nous apprendre sur un animal et qui m'a montré l'extraction de venin de petits animaux. Merci également à Valérie Friend, qui m'a appris la culture cellulaire et l'abécédaire des trucs et astuces en laboratoire, je m'en sers quotidiennement. Merci au Dr. Anne Baron pour avoir été là pour mes interrogations (pas toujours professionnelles je l'avoue), même si je sais que tu n'as pas le choix tu es juste derrière moi dans le bureau. Merci au Pr. Jacques Noël pour son expertise électrophysiologique je n'oublierais pas ton sourire quand tu t'amuses à titiller les gens. Un grand merci au Dr Eric Lingueglia, qui a toujours été une oreille attentive et posée tout au long de ma thèse, il a su me diriger quand j'en avait besoin.

Merci aux différents thésards qui ont partagé mon quotidien et qui ont pour la plupart terminé leur voyage avant moi. Notamment le Dr. Sébastien Marra avec qui j'ai appris à patcher (et à jurer). Le Dr. Clément Verkest qui m'a montré sa passion de la biblio et la dévotion à la science. Le Dr. Bonnie Labrum, avec qui j'ai pu partager quelques anecdotes en animalerie ou en salle de patch. Le Dr. Ahmed Negm qui a su me faire découvrir d'autres techniques et d'autres implications de mon domaine. Et bien évidemment le futur Dr. Maurizio Toft, que je n'hésiterais pas à féliciter le moment venu. Ton caractère

a été rafraîchissant pour ma fin de thèse, j'ai beaucoup ri et appris d'avoir un voisin comme toi dans le bureau.

Merci aussi aux post doctorants le Dr. Magda Chaffaï et le Dr. Ludivine Pidoux qui ont pu me faire bénéficier de leurs expertises et de leurs expériences. Cela m'a beaucoup aidé dans mes choix passés et futur. Merci tout particulièrement au Dr. Ludivine Pidoux pour avoir partagé mon quotidien en salle de patch et affronté les journées pourries ensemble dans le labo.

Un grand merci à tous ceux qui m'entourent dans l'institut. Un grand merci notamment au Dr. Paula Pousinha de m'avoir fait bénéficier de son expertise et son enseignement lors de mon passage dans son équipe, tu m'auras accompagné jusqu'à ma soutenance. Merci aux autres thésards post-doc et chercheurs de l'équipe Frédéric Checler, j'ai toujours reçu un accueil amical. Tout particulièrement le futur Dr. Loan Vaillant Beuchot, qui va soutenir d'ici peu, pour m'avoir soutenu et accompagné depuis plus de 8ans, tu vas me manquer alors n'hésite pas à passer quand tu veux. Merci au futur Dr. Wendy Marcantonio qui a aussi partagé mon quotidien et mes galères en tant que voisine. Merci à l'équipe du Dr. Bruno Antony pour leur expertise sur les lipides et leur disponibilité, notamment Antoine Reynaud qui m'a beaucoup aidé, merci encore.

Merci de façon générale à tous les membres de l'IPMC pour leur bonne humeur et le quotidien que j'ai partagé avec vous pendant tant d'années.

Mention spéciale au Dr. Alexandre Boscari, qui malgré mon inexpérience m'a offert l'opportunité de débiter dans le monde de la recherche. Je n'en serais pas là aujourd'hui sans notre rencontre merci beaucoup. Merci aussi au futur Dr. Carole Beillard qui m'a sauvé mainte fois pendant ma scolarité et avec qui j'ai beaucoup ri, sans toi non plus je n'y serais pas arrivé.

Un grand merci et un gros bisou à ma famille, pourtant pas loin dans le Var mais que je vois que trop rarement. Merci à mes frères, Brice pour m'avoir accompagné dans la recherche, même si c'était en électronique pour lui c'était toujours bon d'avoir un cobaye naïf à qui faire des répétitions pour mes oraux. Yoann bien que trop loin m'a fait le bonheur de me dire que je suis officiellement tonton, je me sens grand (pas vieux) merci pour tes nouvelles. Un énorme bisou à ma maman qui s'est battue et à tout fait pour que j'aie jusqu'au bout des choses. J'ai ta détermination, ta force et aussi ton caractère. Oui bon personne n'est parfait ! Mais je pense fort à vous tous où que je sois.

Enfin un merci tout particulier à ma belle-famille qui m'a accueilli à bras ouverts auprès de leur fille. Je garde la meilleure pour la fin évidemment. Merci à toi Charlotte, ma compagne avec qui je partage mon quotidien (même si on n'est pas à côté) pour le meilleur et pour le pire depuis plus de 3ans maintenant. Je ne serais pas qui je suis sans toi, je ne serais pas non plus là où j'en suis. Tu as été mon phare dans la nuit durant ma thèse, je compte garder le cap dans l'avenir. Merci pour tout et ce qui va suivre...

Table des matières

Résumé en français	3
Abstract	5
Remerciements.....	8
Table des matières	11
Table des figures et des tableaux.....	14
Table des abréviations	16
Introduction générale	19
Introduction	20
I. La douleur ; un concept universel et subjectif.....	20
La douleur aiguë.....	21
La douleur chronique	21
<u>1. Anatomophysiologie des voies sensorielles et nociceptives périphériques.....</u>	<u>23</u>
<u>2. Transmission du signal nociceptif</u>	<u>26</u>
<u>3. Perception.....</u>	<u>27</u>
Les récepteurs couplés à des protéines G.....	28
Les canaux potassiques à deux domaines pore	29
Les canaux « transient receptor potential »	29
Les canaux ioniques sensibles à l'acide.....	30
II. Les canaux ASIC.....	31
<u>1. Découverte des canaux ASIC.....</u>	<u>31</u>
<u>2. Phylogénie des canaux ASIC.....</u>	<u>33</u>
<u>3. Structure des canaux ASIC</u>	<u>36</u>
3.1 Gènes et sous unités.....	36
3.2 Structure	37
3.3 Activation/inactivation des canaux ASIC.....	41
<u>4. Propriété physico chimique</u>	<u>43</u>
4.1 Perméabilité ionique.....	43
4.2 Sensibilité au pH	43
4.3 Cinétiques et courants associés.....	45

5. Rôle et distribution tissulaire	48
5.1 Système nerveux périphérique	49
5.2 Système nerveux central	53
5.3. Autres tissus.....	56
6. Pharmacologie et régulateurs des canaux ASIC	59
6.1 Protéines partenaires	59
6.2 Modulateurs exogènes	62
6.3 Toxines.....	64
6.4 Modulateurs endogènes.....	66
III. Les activateurs lipidiques des canaux ASIC	69
1. Structure et caractérisation	69
1.1 Découverte et caractérisation	69
1.2 Structure des lipides	71
2. métabolisme et répartition.....	74
2.1 Biosynthèse.....	74
2.2 Régulation de la biosynthèse	80
2.3 Répartition dans l'organisme	82
3. Fonctions cellulaires	85
3.1 PAF.....	85
3.2 LysoPAF.....	89
3.3 Acide arachidonique	89
3.4 Lysophosphatidylcholine.....	92
Contexte et objectifs de la thèse	97
Résultats.....	99
Modulation d'ASIC3 par des lipides	99
Le lyso platelet-activating factor (lysoPAF) et le platelet-activating factor (PAF) sont deux nouveaux modulateurs endogènes des canaux ASIC3 (article 2)	106
Implication d'ASIC3 dans la perception du froid.....	107
Discussion.....	112
Nouveaux activateurs lipidiques endogènes des canaux ASIC3	112

Modulation d'ASIC3 dans la réponse au froid.....	118
Conclusion générale	120
Annexes.....	122
Bibliographie	125

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Réponses douloureuses physiologiques et physiopathologiques selon l'intensité des stimuli.	22
Figure 2 : Organisation du système nerveux périphérique et de la terminaison nerveuse périphérique nociceptive.....	25
Tableau 1 : Classification des fibres sensorielles afférentes et leurs fonctions.....	27
Figure 3 : Enregistrement des premiers courants sodiques activés par l'acidification extracellulaire...	32
Figure 4 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC.....	35
Figure 5 : Structure du canal Δ ASIC1a homomérique de poulet.....	39
Figure 6 : Schéma du mécanisme d'activation et d'inactivation du canal ASIC1a.....	42
Tableau 2 : Propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux ASIC homomériques.....	44
Figure 7 : Caractéristiques biophysiques et électrophysiologiques des courants ASIC.....	47
Tableau 3 : Profile transcriptomique humain et murin des canaux ASIC1-4 dans les DRG contrasté avec d'autre tissus.....	48
Tableau 4 : Expression tissulaire et rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux ASIC chez les mammifères.	58
Tableau 5 : Modulation des canaux ASIC par des protéines partenaires.....	62
Tableau 6 : Principaux modulateurs des canaux ASIC.....	68
Figure 8 : Schéma des formes effectives des phospholipides.....	71
Figure 9 : Représentation 2D des structures des différents lipides activateurs des canaux ASIC.	73
Figure 10 : La biosynthèse des éther- et ester-lipides dans le péroxysome.....	74
Figure 11 : Voie de biosynthèse et de dégradation de la LPC et de l'acyl-PAF.....	75
Figure 12. Biosynthèse du lysoPAF par transacylation.....	77
Figure 13 : Biosynthèse du PAF par la voie de novo et la voie de remodelage.	78
Figure 14 : Ensemble des voies métaboliques simplifiées de l'acyl-PAF et de l'alkyl-PAF chez les mammifères.....	79
Figure 15 : Diversité de composition et répartition des différentes espèces de phosphatidylcholine. .	83
Figure 16 : Schéma simplifié illustrant les principales voies de signalisation pro-inflammatoires induite par la liaison du PAF à son récepteur (PAFR).	86
Figure 17 : L'injection de LPC16:0 et d'AA produit un comportement douloureux spontané chez les animaux, via un mécanisme ASIC3 dépendant.	92
Figure 18 : Les niveaux de LPC16:0 sont augmentés dans les fluides synoviaux des patients souffrant de douleurs articulaires.	101

Figure 19 : La LPC16:0 induit un courant ASIC3 non inactivant dans un système d'expression recombinant.	103
Figure 20 : La LPC16:0 induit un courant non inactivant, dépendant de l'ASIC3, associé à la dépolarisation de la membrane dans les neurones DRG de souris.....	105
Figure 21 : Effets des températures froides sur l'activité des canaux ASIC3 exprimés dans des cellules HEK 293.....	108
Figure 22 : Effets des températures froides sur l'activité des canaux ASIC natifs des neurones DRG de souris WT et ASIC3 KO.	110
Figure 23 : Densité allongée au sein de la structure des canaux cASIC1.....	117
Figure 24 : Schéma bilan de la modulation d'ASIC3 par les lipides et la température.	121

Table des abréviations

5HT : Sérotonine	Cd ²⁺ : Cadmium
AA : Acide Arachidonique	CDP : Cytidine-diphosphate
ACC : cortex angulaire supérieur	CTP : Cytidine-triphosphate
ACCN : Amiloride-sensitive cation channel neuronal	CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
AG : Acide gras	CIPP : Channel Interacting PDZ domain-containing Protein
AGPAT : 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyl transférase	Cl ⁻ : Chlore
AGPS : Glycérone phosphate synthase	CO ₂ : Dioxide de carbone
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens	CoA : Coenzyme A
AITC : Allyl isothiocyanate	cPLA2 : PLA2 cytoplasmique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	Cu ²⁺ : Cuivre
ANOVA : Analyse de la variance	DAG : Diacylglycérol
APETx2 : AnthoPleura Elegantissima ToXine 2	DEG : DEGénérines
ASIC : Acid sensing ion channel	DHA : Acide docosahexaénoïque
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	DHAP : Dihydroacétone phosphate
ATX : Autotaxine	DLS : Diffusion dynamique de la lumière
BASIC : Bile acid sensing ion channel	DRASIC : Dorsal Root ASIC
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau	DRG : Ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière
BNC : Brain Sodium Channel	DTM : Domaine transmembranaire (à rajouter dans la figure 6)
Ca ²⁺ : Calcium	EC50 : Half maximal Effective Concentration
CaMKII : protéine kinase calmoduline-dépendante II	ENaC : Epithelial Na ⁺ Channel
CA : Cornus amonis	FaNaC : FMRF-amide-activated Na ⁺ Channel
Ca _v : Canaux calciques voltage dépendant	FMRF : Phénylalanine-Méthionine-Arginine-Phénylalanine
CCA : Chondrocalcinose	

FURA-2 : Aminopolycarboxylic acid

G3P : Glycérol-3-phosphate

G3PDH : G3P O-acyl transférase

GABA : Gamma-AminoButyric Acid

GAS : Glycine-Alanine-Sérine

Gd²⁺ : Gadolinium

GMQ : 2-Guanidine-4-MethylQuinazoline

GNPAT : Glycéron phosphate O-acyl transférase

GPL : Glycérophospholipides

H⁺ : Proton

H₂O₂ : Eau oxygénée

HEK 293 : Human embryonic kidney 293

HG : Histidine-glycine

hIK1 : canal potassique calcium dépendant à conductance intermédiaire

HOCl : Acide hydrochlorique

HSF : Liquides synoviaux humains

HyNaC : Hydra sodium channel

IC50 : Half maximal Inhibitory Concentration

IPMC : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

IASP : International Association for the Study of Pain12

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporel

JNK : c-Jun N-terminal kinases

K⁺ : Potassium

K2P : Canaux potassiques à deux domaines pore

KO : Knock-Out

K_v : Canaux potassiques voltage dépendants

LCAT : Lécithine-cholestérol acyltransférase

LPA : Acide LysoPhosphatidique

LPC : LysoPhosphatidylCholine

LPE : LysoPhosphatidylEthanolamine

LPI : LysoPhosphatidylInositol

LPL : LysoPhosphoLipides

LPS : LysoPhosphatidylSérine

LTP : potentialisation à long terme

LysoPAF : Lyso platelet activating factor

MAG : Mono acyl glycérol

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDEG : Mammalian DEGenerin

MEC : Mechano-Electrical transduction Channel

MitTx : Micrurus tener Toxine

Na⁺ : Sodium

NAC : Noyau accubens

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Na_v : Canaux sodiques voltage dépendant

NGF : Nerve growth factor

NHERF : Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor

Ni²⁺ : Nickel

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO : Monoxyde d'azote

OA : Ostéoarthrite

P/AT : Phospholipase/acyltransférase

P2X : Récepteur ionotrope à l'ATP

PAF : Facteur d'Activation Plaquettaire

PAF-AH : PAF acétylhydrolase

PAFR : Récepteur au PAF

PAG : Substance grise périaqueducule

PLA : Phospholipase A

Pb²⁺ : Plomb

PC : Phosphatidylcholine

PcTx1 : PsalmoToxine-1

PexRAP : Alkyl/Acyl DHAP réductase

pH : Potentiel Hydrogène

pH₅₀ : pH de demi activation

PICK : Protein Interacting with C Kinase

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PSD-95 : PostSynaptic Density protein 95

PUFA : Acide gras poly insaturé

RCPGs : Récepteurs proton sensible couplés à des protéines G

ROS : Espèces réactive de l'oxygène

RIPK1 : Protéine kinase 1 interagissant avec les récepteurs

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SPA : Spondyloarthrite

SPASIC : SPinal cord ASIC

sPLA2 : Secreted PhosphoLipase A2

STOM : Stomatine

STOML : Stomatin-like protein

TASK : Twik-related acid-sensitive K⁺ channel

TFCP2 : Facteur de transcription CP2

TG : Ganglions trijumeaux

TM : Transmembranaire

TNaC : Testis Na⁺ Channel

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TNP : Trinitrophénol

TPM : Transcrit par million

TRAAK : TWIK-Related Arachidonic Acid K⁺ channel

TREK : TWIK-RElated K⁺ channel

TRESK : TWIK-RElated Spinal cord K⁺ channel

TRPA : Transient receptor potential ankyrine

TRPC : Transient receptor potential canonique

TRPM : Transient receptor potential mélastatine

TRPV : Transient receptor potential vaniloïde

VAS : Visual Analogue Scale

Zn²⁺ : Zinc

Introduction générale

La douleur est présente depuis tout temps, elle est un trait adaptatif résultant de la sélection naturelle servant de guide afin de garantir notre sécurité, en détectant des stimuli menaçant l'intégrité de l'organisme. Elle nous protège de notre environnement par le biais de sensations désagréables, améliorant ainsi notre capacité de survie. En effet, dans de rares cas d'insensibilité congénitale à la douleur, son rôle de garant de l'intégrité de notre organisme est mis en avant. En absence de cette perception douloureuse, l'organisme n'est pas alarmé des éventuels traumatismes (cutanés, musculaires et osseux). Ce type de maladie débute généralement par de l'automutilation chez l'enfant, et la répétition des nombreuses lésions favorise ainsi l'apparition de maladies et d'infections mettant le pronostic vital de l'individu en jeu.

La douleur représente un réel enjeu de santé publique. En France, l'Inserm estime qu'elle serait à l'origine de 2/3 des consultations médicales. Près de 30 % de la population adulte souffrent de douleurs chroniques (dont 1/3 de lombalgie), c'est-à-dire persistantes au-delà de 3 mois, et cela augmente avec l'âge avec une prédominance chez la femme. Cela représente 1,5 milliard de personnes dans le monde, et 20 millions de personnes rien qu'en France. Ces douleurs chroniques sont souvent rebelles aux traitements antalgiques conventionnels et affectent grandement la qualité de vie du patient, personnelle comme professionnelle.

Afin de mieux répondre aux besoins du corps médical pour prendre en charge et traiter les symptômes et pathologies douloureuses, il convient de mieux comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et neurobiologiques qui régissent les phénomènes douloureux. Cela nous permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces et spécifiques, et ainsi de proposer de nouveaux traitements plus pointus et performants.

Introduction

I. La douleur ; un concept universel et subjectif

La douleur est définie depuis 1979 (avec une révision en 2020) par l'association internationale pour l'étude de la douleur ou IASP (International Association for the Study of Pain) comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ».

La nociception correspond aux mécanismes moléculaires, cellulaires et systémiques responsables du traitement de l'information douloureuse, de la perception et la modulation de stimuli potentiellement nocifs. On parle alors de douleur lorsque ces stimuli sont interprétés et intégrés au niveau du cerveau, nécessitant un sujet conscient capable de ressentir cette douleur. La douleur n'est alors qu'un des nombreux effets possibles de la nociception. Certains phénomènes font appel à la nociception sans avoir la douleur en résultat, comme les réflexes de retrait, les réponses végétatives et hormonales, ainsi que la vocalisation. Ils peuvent être observés dans des conditions expérimentales ou pathologiques particulières, comme chez les sujets profondément anesthésiés ou dans certains modèles de lésions chez l'animal.

Ainsi nous pouvons séparer les perceptions en deux groupes selon l'intensité des stimuli sur les terminaisons nerveuses périphériques. Nous avons d'un côté la perception sensorielle (non-nocive) résultant de stimuli de faible intensité. De l'autre nous avons la perception nociceptive (nocive) résultant de stimuli allant au-delà de la perception sensorielle. Ce seuil de perception nociceptive est semblable à chaque individu, cependant ce seuil peut être altéré en situation pathologique ou en cas de lésion.

L'altération de ce seuil peut aboutir à deux mécanismes différents que l'on appelle allodynie et hyperalgie (ou hyperalgésie). Dans le cas de l'allodynie, il s'agit de la perception nociceptive de stimuli normalement non nocif, conduisant à la genèse de douleur. Dans le cas de l'hyperalgie, le seuil douloureux peut rester le même, cependant la réponse douloureuse se retrouve exacerbée. Ainsi dans le cas d'une allodynie un stimulus non nocif paraîtra douloureux, et dans le cas de l'hyperalgie un stimulus nocif de faible intensité pourra être perçu comme une douleur insoutenable (Figure 1).

La douleur est une expérience propre à chacun, subjective et complexe, modulée par plusieurs composantes. La composante sensorielle correspond au processus de détection, de localisation et de quantification du signal douloureux, modulée par le statut physique de l'individu (âge, sexe, hormones...). Intriquée à différents degrés, la composante émotionnelle désigne l'état psychologique et affectif dans lequel se situe l'individu, ainsi que son vécu douloureux.

On distinguera deux grands types de douleurs définis par l'IASP. Les douleurs aiguës ou physiologiques (*i.e.*, durée inférieure à 3 mois) et les douleurs chroniques ou pathologiques (*i.e.*, durée supérieure à 3 mois).

La douleur aiguë

Elle correspond au signal d'alarme qui protège notre organisme ; elle permet d'adopter des réactions dont le but est de diminuer la cause et d'en limiter les conséquences. Cette douleur est décrite en termes cliniques par « une sensation vive et cuisante qui s'inscrit dans un tableau clinique d'évolution rapide. » Elle résulte de l'activation des nocicepteurs, qui sont des neurones sensoriels périphériques spécialisés dans la détection et la conduction des stimuli potentiellement nocifs (Esposito et al., 2019).

Si la douleur aiguë représente la sentinelle garante de l'intégrité de l'organisme, les douleurs chroniques n'ont pas de rôle essentiel et résultent de dysfonctionnements anatomiques et/ou psychiques.

La douleur chronique

Elle a été décrite pour la première fois comme un syndrome et non un symptôme en 1936 par René Leriche comme une « douleur-maladie » sévère et durable. Dans ce contexte la douleur perd toute valeur protectrice et devient délétère pour l'organisme. Ces douleurs sont dues, au moins à l'origine, à des excès de nociception persistants souvent accompagnés d'inflammation ou de lésions nerveuses qui peuvent survenir par exemple lors de certaines pathologies comme l'arthrite et le cancer, voir des actes chirurgicaux. De nombreuses répercussions sont constatées notamment psychologiques, plus ou moins sévères, mais aussi sur la santé, la vie sociale et professionnelle de l'individu affecté.

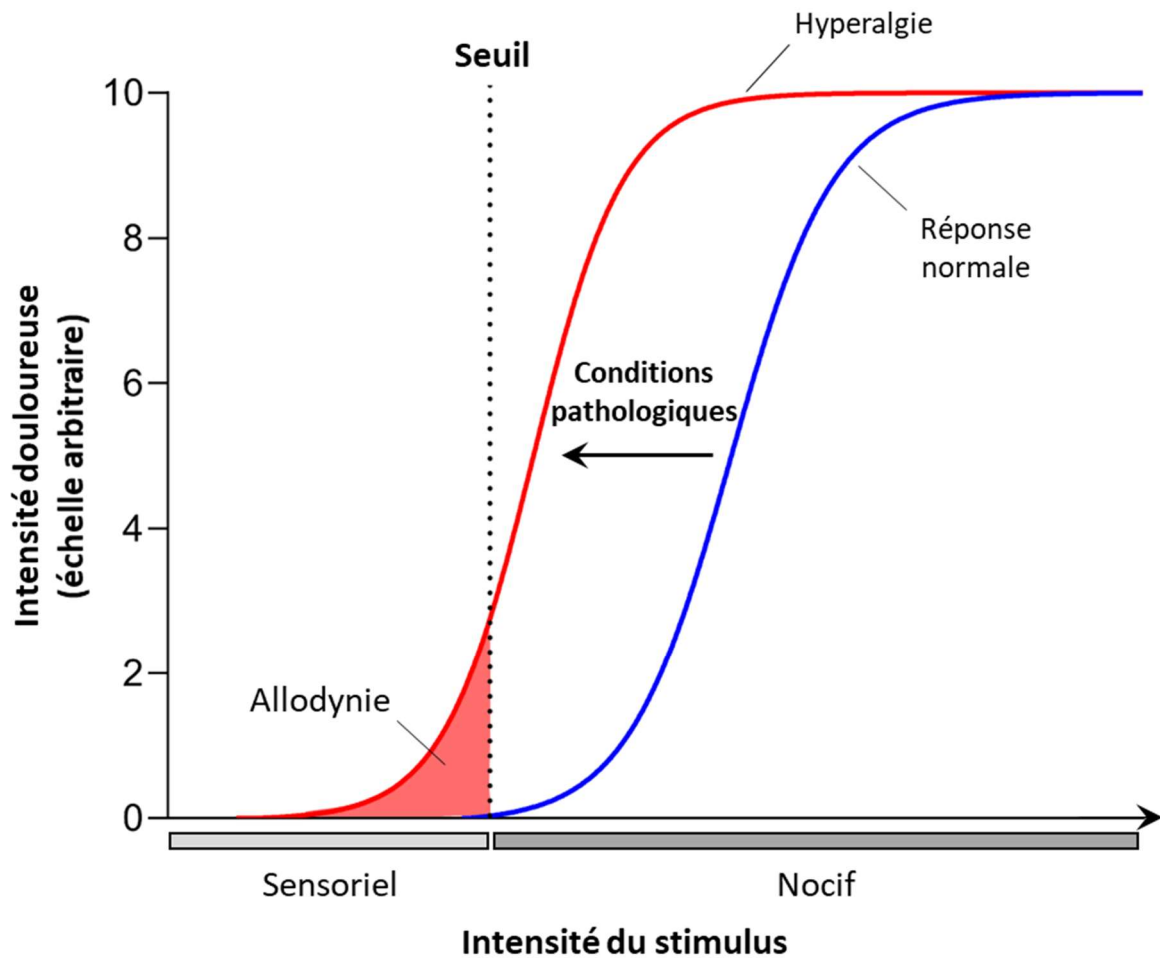


Figure 1 : Réponses douloureuses physiologiques et physiopathologiques selon l'intensité des stimuli.

Ce graphique représente le score de douleur subjectif (en échelle arbitraire) en fonction de l'intensité des stimuli sensoriels et nocifs. La courbe bleue représente l'évolution de la réponse douloureuse d'un sujet sain (dite « normale »). La courbe rouge quant à elle représente la réponse douloureuse d'un sujet pathologique ayant une altération de la perception douloureuse. Cette courbe subit un décalage par rapport à la réponse « normale », induisant une réponse douloureuse pour des stimuli sensoriels, c'est l'allodynie. De plus elle peut être accompagnée d'hyperalgie, c'est-à-dire une réponse douloureuse exacerbée pour des stimuli normalement faiblement douloureux (D'après Gottschalk and Smith, 2001).

1. Anatomophysiologie des voies sensorielles et nociceptives périphériques

La douleur neuropathique ou neurogène est le résultat de lésions nerveuses périphériques ou centrales. Par opposition la douleur nociceptive ou par excès de nociception, est la résultante de l'activation des fibres nerveuses périphériques sensorielles, à la suite de stimuli de différentes natures. La nociception met en jeu des récepteurs (nocicepteurs) qui sont capables de détecter des stimuli potentiellement nocifs qui peuvent être mécaniques, thermiques ou chimiques (Emery and Ernfors, 2018; Woolf and Ma, 2007).

Les voies afférentes primaires ou fibres sensorielles, possèdent une extrémité innervant différents organes du corps, comme la peau, les muscles et les viscères. Les corps cellulaires des neurones sensoriels forment un cluster au niveau des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG), ou au niveau des ganglions trijumeaux (TG) pour les fibres innervant la face. Certains neurones sensoriels innervant le cœur, le tractus respiratoire et gastro-intestinal ou la vessie sont aussi localisés dans les ganglions plexiformes (nodose ganglia) associés au nerf vague.

Les neurones sensoriels périphériques sont caractérisés par une morphologie dite unipolaire ou pseudo-unipolaire, formant un « T ». Ils ne possèdent qu'une seule projection axonale qui est à peine éloignée du corps du DRG, va projeter d'un côté vers la corne dorsale de la moelle épinière, puis de l'autre vers la zone du corps innervée. Ces prolongements axonaux sont régulièrement appelés fibres sensorielles. La répartition des DRG se situe tout le long et de part et d'autre de la moelle épinière, au niveau des disques intervertébraux afin d'innervier de façon bilatérale le corps entier. Ainsi chaque ganglion peut être associé à la zone qu'il innerve en fonction de sa position au niveau vertébral, allant des vertèbres sacrées aux cervicales (Basbaum et al., 2009).

Les terminaisons périphériques composant l'extrémité des nocicepteurs, sont riches de canaux et récepteurs de différents types hautement spécialisés, répondant à une nature de stimulus dans une modalité propre à chacun (Woolf and Ma, 2007). Les fibres sensorielles, une fois activées par des stimuli périphériques, répondent de façon graduelle en fonction de l'intensité de stimulation. La dépolarisation induite va, si le potentiel seuil des canaux sodiques voltage dépendants (Na_v) est atteint, déclencher un influx nerveux transmis sous forme de signal électrique (potentiel d'action) à travers les fibres afférentes sensorielles primaires.

Les potentiels d'action vont circuler via les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG), représentant le dernier relais nerveux du système nerveux périphérique (SNP). Ces derniers projettent, via la racine dorsale sur des neurones secondaires présents dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les influx nerveux vont pouvoir être modulés avant d'être relayés vers les aires cérébrales supérieures afin d'être interprétés en message douloureux (Figure 2) (Basbaum et al., 2009).

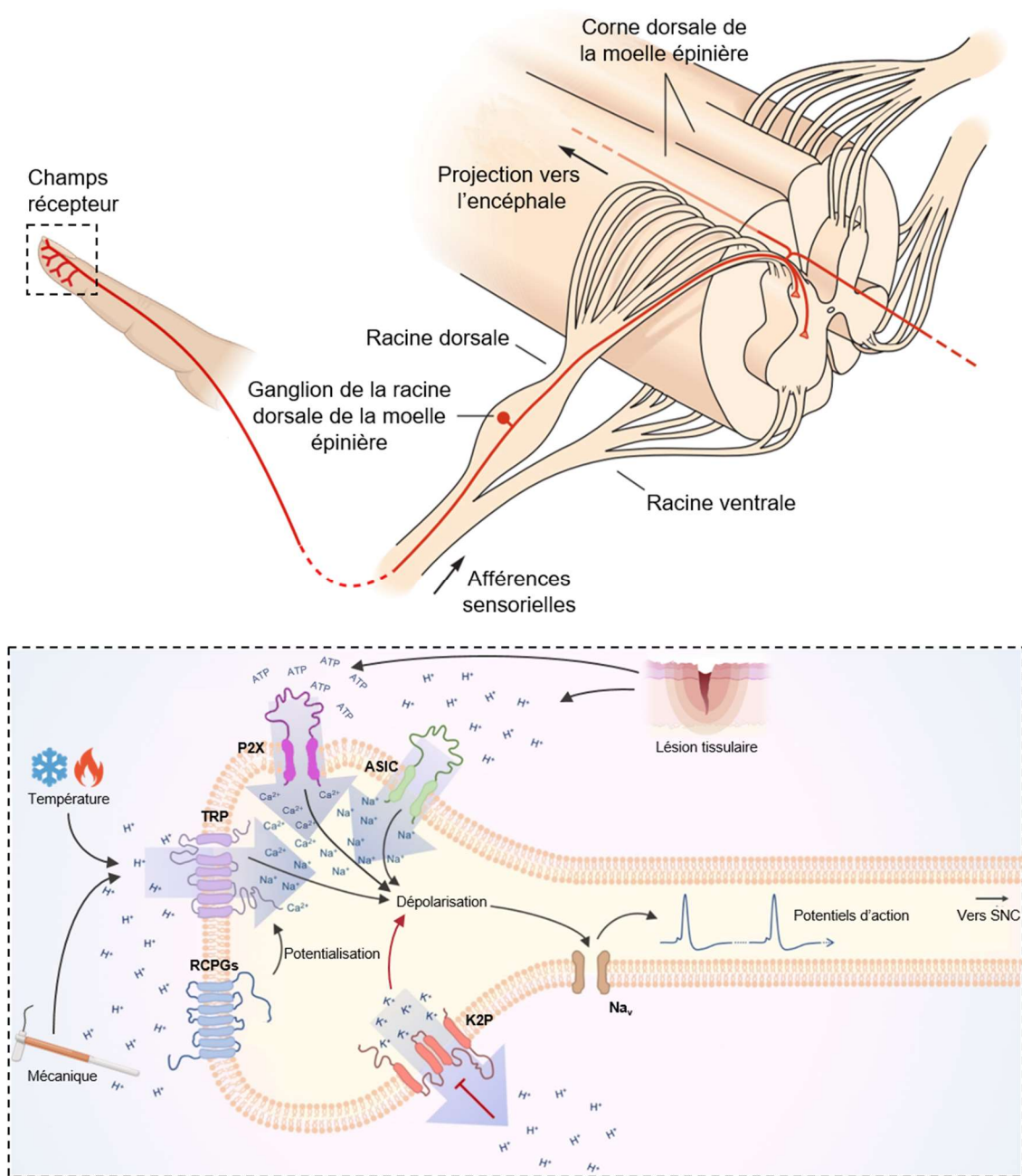


Figure 2 : Organisation du système nerveux périphérique et de la terminaison nerveuse périphérique nociceptive.

Schéma illustrant l'organisation du SNP en relation avec la moelle épinière (Panel supérieur). Schéma d'une terminaison nerveuse nociceptive présentant différentes modalités de stimulation. À la suite d'une lésion, de nombreux composés chimiques sont produits et libérés. C'est notamment le cas des protons et de l'ATP. Ainsi ces composés peuvent agir directement ou indirectement sur la terminaison nerveuse périphérique, modulant ainsi sa sensibilité (ASIC ; « Acid Sensing Ion Channel », Na_v ; Canaux sodiques voltage dépendant, TRP ; « Transient Receptor Potential », P2X ; Récepteur ionotrope de l'ATP, RCPGs ; récepteurs proton sensible couplés à des protéines G, K2P ; Canaux potassiques à deux domaines pore, ATP ; Adénosine Tri-Phosphate, H^+ ; Proton (D'après *Principles of neural science* 5ème édition, Pattison et al., 2019).

2. Transmission du signal nociceptif

Historiquement ces fibres sensorielles sont différenciées et classifiées par leurs vitesses de conduction électrique. Ce modèle de classification fût proposé en 1941 par Joseph Erlanger et Herbert Gasser (prix Nobel de physiologie ou de médecine, 1944), associant ainsi les vitesses de conduction électrique aux fonctions physiologiques des neurones, allant de A α à C (Gasser, 1941) (Tableau 1). Toutefois un autre modèle de classification existe, proposé par David Lloyd dans les années 1940, basé sur le diamètre des fibres nerveuse, allant de I à IV (Lloyd, 1942, 1943, 1944) (Tableau 1). Il est possible de faire un parallèle car la vélocité de la conduction électrique d'un neurone est intimement liée au diamètre de ce dernier. Ainsi on retrouvera pour les fibres sensorielles :

- Les fibres A α , ou de type I, sont celles qui possèdent le plus gros diamètre (12-20 μ m) et la plus grande vitesse de conduction nerveuse (72-120m.s⁻¹) et sont fortement myélinisées. Elles rassemblent les afférences sensorielles proprioceptives musculaires et tendineuses.
- Les fibres A β ou de type II, ont un diamètre moyen (6-12 μ m), avec une vitesse de conduction inférieure au A α (16-100m.s⁻¹) et possèdent une gaine de myéline importante. Ces fibres comprennent les afférences sensorielles proprioceptives musculaires et articulaires, mais participent avant tout à la mécanoperception cutanée non nocive.
- Les fibres A δ ou de type III, ont un faible diamètre (1-6 μ m), sont peu myélinisées et ont donc une vitesse de conduction lente (4-36m.s⁻¹). Elles participent à la mécanoperception, la perception musculaire et cutanée, la thermoperception non nocive et jouent un rôle important dans la nociception.
- Les fibres C ou de type IV, sont les plus fines (0,2-1,5 μ m) et les plus lentes (0,4-2m.s⁻¹) tout en étant non myélinisées. Ces fibres sont majoritairement impliquées dans la nociception mais aussi dans le toucher agréable (C-LTMR, Björnsdotter et al., 2010; Olausson et al., 2010).

En ce qui concerne les fibre C et A δ , elles sont toutes deux impliquées dans la nociception parmi d'autres modalités. On distinguera alors les fibres de bas seuils (ou low threshold), impliquées dans les perceptions sensorielles et les fibres de haut seuil (ou high threshold), ces dernières étant impliquées dans la nociception.





Fibres sensorielles	Myélinisation	Schéma de la fibre	Vitesse de conduction ($m.s^{-1}$)	Diamètre de l'axone (μm)	Fonctions
Aα (I)	Importante		72-120	12-20	Proprioception : musculaire et tendineuse
Aβ (II)	Oui		16-100	6-12	Proprioception : musculaire et articulaire Mécanoperception : cutanée
Aδ (III)	Légère		4-36	1-6	Mécanoperception : cutanée et musculaire Thermoperception non nocive Nociception : mécanique, thermique, chimique
C (IV)	Non		0,4-2	0,2-1,5	Mécanoperception : cutanée Thermoperception non nocive Nociception : mécanique, thermique, chimique

Tableau 1 : Classification des fibres sensorielles afférentes et leurs fonctions.

(D'après *Principles of neural science* 5ème édition, et *Neurosciences* 5ème édition).

3. Perception

Afin de percevoir son environnement, l'organisme a besoin de différents senseurs capables de détecter et intégrer les stimuli externes de différentes natures, afin de transmettre ces informations en une réponse nerveuse. Beaucoup de protéines présentes dans ces afférences sensorielles sont impliquées dans les phénomènes bioélectriques, comme des canaux ioniques, des échangeurs ou des pompes électrogéniques, ainsi que des récepteurs métabotropiques comme les récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) (Figure 2).

Dans ces phénomènes bioélectriques, de nombreuses familles de canaux ioniques sont impliquées. On peut déjà noter qu'une partie de ces canaux est impliquée dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos membranaire, et sont majoritairement des canaux potassiques, comme les canaux potassiques de fuite à deux domaines pores (K2P).

Une autre population de canaux de différentes familles participe directement au PA lui-même, dont majoritairement des Na_v , mais aussi des canaux calciques voltage dépendant (Ca_v) et les canaux potassiques voltage dépendants (K_v) (Bean, 2007). Enfin, une dernière population de canaux est impliquée dans la détection des stimuli externes. Ces canaux sont donc responsables de la dépolarisation initiale conduisant à la genèse de potentiels d'action.

Ces senseurs ont occupé la majeure partie de ma thèse, et particulièrement ceux impliqués dans la perception des stimuli acides. Du fait de mon intérêt particulier pour les canaux ioniques sensibles à l'acide (ASIC) sur lesquels porte mon sujet de thèse seuls ceux-ci seront détaillés (Chapitre II). Le lecteur pourra se référer aux diverses revues concernant les différentes familles de canaux précédemment évoquées dans la nociception qui ne seront pas traitées par la suite ; les canaux sodiques (Bennett et al., 2019; Goodwin and McMahon, 2021), potassiques (Busserolles et al., 2016; Feliciangeli et al., 2015; Tsantoulas and McMahon, 2014), et calciques (Bourinet et al., 2014; Zamponi et al., 2015).

En situation pathologique il n'est pas rare de constater une acidose, localisée ou générale dans certaines circonstances. C'est notamment le cas dans certaines pathologies comme l'ostéoarthrite, l'arthrite rhumatoïde, ou encore la goutte, pour ne citer qu'elles, où une acidification plus ou moins importante des tissus est mesurée. Dans d'autres pathologies les acidifications peuvent être plus prononcées, allant pour certains cancers jusqu'à une acidification locale à pH4,0 (Dulai et al., 2021; Lin et al., 2018). Dans d'autres situations physiopathologiques, comme lors d'une ischémie, suite à un acte chirurgical, ou simplement lors d'un exercice physique intense, une acidification tissulaire a été observé (Lin et al., 2018).

Il existe plusieurs familles de canaux ioniques sensibles à cette acidification, ce sont les canaux « transient receptor potential » (TRP), ASIC et les canaux potassiques à deux domaines pore (K2P) (Figure 2). De manière moins connue il existe aussi des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) sensibles à l'acidification extracellulaire.

Les récepteurs couplés à des protéines G

Les RCPG sensibles aux protons engagent des protéines G hétérotrimériques en réponse à de légères acidoses. À ce jour, un total de six RCPG (GPR4, 31, 65, 68, 132 & 151) sont décrit comme sensibles aux protons chez les mammifères (Ludwig et al., 2003; Mashiko et al., 2019; Murakami et al., 2004; Wang et al., 2004). De manière générale ils sensibilisent les afférences nociceptives périphériques et ont été montré pour certains comme coexprimés avec TRPV1 dans les neurones DRG suggérant fortement un rôle dans la nociception (Chen et al., 2009; Huang et al., 2007).

Bien que les rôles nociceptifs des RCPG soient moins connus que ceux des autres récepteurs sensibles aux protons, un faisceau d'arguments penche en leur faveur concernant leur rôle dans la nociception. Notamment leur association avec les conditions liées à la douleur acide, ainsi que les observations selon lesquelles la perte des RCPG entraîne une réduction des phénotypes douloureux dans divers modèles animaux (Hohmann et al., 2017; de Vallière et al., 2015).

Les canaux potassiques à deux domaines pore

Cette superfamille de canaux regroupe 15 sous-unités différentes regroupées en six sous-familles. Ces canaux K2P sont des canaux dit de fond, générant une fuite de potassium des cellules excitables ou non excitables, produisant ainsi des courants de fond. Ces courants sont d'une importance capitale, car ils jouent un rôle clé dans la fixation du potentiel de repos membranaire, et régulant ainsi l'excitabilité cellulaire (Enyedi and Czirják, 2010; Mathie and Veale, 2015).

Parmi les nombreux modulateurs de ces canaux dont l'étirement et la température, l'acidification joue le rôle de régulateur des canaux K2P. La plupart des canaux K2P sont sensibles aux protons et voient une réduction de l'efflux potassique constitutif lors d'une acidification. Ce blocage des K2P par les protons induit une dépolarisation de la membrane, participant ainsi à la nociception acide. Les canaux TASK1 et TASK3 sont particulièrement sensibles à la protonation et leur assemblage en hétéromère conduit à des propriétés de pH sensibilité intermédiaires (Duprat et al., 1997; Lopes et al., 2001; Morton et al., 2003).

Les canaux mécanosensibles TREK-1 et TRAAK voient eux aussi leur activité modulée en présence d'une acidose, et sont inhibés par le proton extracellulaire (Sandoz et al., 2009). Dans l'ensemble, la sensibilité aux protons des canaux K2P est commune à la plupart des sous-familles, impliquant des résidus histidine protonables dans le domaine extracellulaire, un trait conservé chez les différentes espèces de mammifères.

Les canaux « transient receptor potential »

Cette superfamille de canaux regroupe 28 gènes différents, classés en 6 sous-familles chez les mammifères (Clapham et al., 2005). Beaucoup d'entre eux sont connus pour participer à la thermoperception chaude (TRP Vanilloïde 1-4) ou froide (TRP Mélastatine 8, TRP Canonique 5, TRP Ankyrine 1), et couvre la majorité du spectre de détection de la température. Il est intéressant de noter que beaucoup de canaux sont polymodaux et donc sensibles à des stimuli de différentes natures, et les canaux TRP n'y font pas exception. On notera alors que les TRPV1, TRPV4, TRPC4 et TRPC5 sont particulièrement sensibles à l'acidose.

TRPV1 est le canal TRP exprimé le plus abondamment dans les nocicepteurs. Comme nous allons l'aborder par la suite, la sensibilité au pH de TRPV1 est bien différente de celle des canaux ASIC. Son ouverture par les protons extracellulaires n'est possible que pour des pH inférieurs à 6,6, et génère un courant soutenu en forme de créneaux (Jordt et al., 2000; Tominaga et al., 1998).

Une acidose légère (pH7~6,6), peut toutefois, sans provoquer son ouverture induire une sensibilisation du canal pour d'autres stimuli tel que la chaleur ou la capsaïcine (Holzer, 2008; Tominaga et al., 1998). En condition d'acidose le canal peut ainsi être activé pour une température équivalente à la température corporelle (Tominaga et al., 1998). L'importance de ce canal est d'autant plus forte qu'il est particulièrement présent dans les afférences nociceptives, lui permettant de jouer un rôle central dans les mécanismes nociceptifs. TRPV4 possède une sensibilité au pH encore plus faible, ne s'activant que pour des pH inférieurs à 6 (Suzuki et al., 2003). Les canaux TRPC4 & 5 semblent avoir leurs courants potentialisés lors d'une acidose légère à pH7,0 (Semtner et al., 2007). Cependant contrairement à TRPV1 leur rôle dans la détection de l'acide reste peu étudié.

Les canaux ioniques sensibles à l'acide (ASIC)

Les canaux ASIC portent leur fonction en leur nom et sont donc sensibles à l'acidose. Ils sont présents dans un large éventail d'espèces et jouent un rôle prépondérant dans la nociception et la douleur. Ces canaux étant le sujet principal de ma thèse nous les verrons plus en détails dans le chapitre suivant.

II. Les canaux ASIC

1. Découverte des canaux ASIC

Au cours de ma thèse j'ai essentiellement étudié les canaux ASIC pour « Acid-Sensing Ion Channels ». Il s'agit de canaux ioniques activés par l'acidification extracellulaire.

Au début des années 1980, l'équipe du Prof. Oleg Krishtal effectue une expérience de patch-clamp de routine consistant à caractériser une dose réponse avec de la sérotonine sur des cellules de neuroblastomes. Oleg Krishtal et Vladimir Pidoplichko mirent en évidence des courants dépolarisants jusqu'alors inconnus. Il s'avéra que leur solution n'était pas tamponnée correctement et avait donc un pH acide. L'expérience fût reproduite sur des neurones sensoriels de ganglions spinaux de la racine dorsale de la moelle épinière (neurones DRG) et trijumeaux (TG) de rat, et ils aboutirent à la conclusion de la présence d'un récepteur aux protons (Figure 3) (Krishtal and Pidoplichko, 1980).

L'année suivante la même équipe met en évidence que ce canal est majoritairement perméable au sodium (Krishtal and Pidoplichko, 1981a), et neuf ans plus tard que ce canal possède aussi une certaine perméabilité au calcium (Kovalchuk et al., 1990). Rapidement l'implication du canal dans la nociception est mise en avant, de par sa localisation dans les neurones DRG et TG (Krishtal and Pidoplichko, 1981b, 1981a).

Cependant l'identité de ces fameux récepteurs aux protons resta nébuleuse jusque dans les années 1990. Cette époque riche de nouvelles techniques de clonage moléculaire, permit au groupe du Pr Michel Lazdunski d'identifier la nature moléculaire de bon nombre de canaux ioniques, dont différents canaux sodiques de la famille ENaC/DEG (« epithelial sodium channel/degenerin »). Sont notamment identifiés le canal ENaC, un canal sodique épithélial, le canal FaNaC (« FMRFamide-gated Sodium Channel ») (Lingueglia et al., 1995), un canal activé directement par le peptide FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), ainsi que le canal MDEG (« Mammalian Degenerin ») découvert en même temps par le groupes du Pr Michael Welsh sous le nom de BNC1 (« Brain Sodium Channel 1 ») (Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996).

Cependant la nature de l'activateur restait inconnue, et sa découverte fût, comme pour sa première description fonctionnelle par l'équipe du Prof. Krishtal, due au hasard lorsqu'un composé dissous dans une solution acide fût testé sur un canal homologue. Le courant enregistré possédait des caractéristiques similaires à celui qui fût observé par Krishtal & al. en 1980. Ces expérimentations débouchèrent à l'identification moléculaire d'une nouvelle famille de canaux ioniques, les canaux ASIC activés par les protons (Acid-Sensing Ion Channels) (Waldmann et al., 1997a).

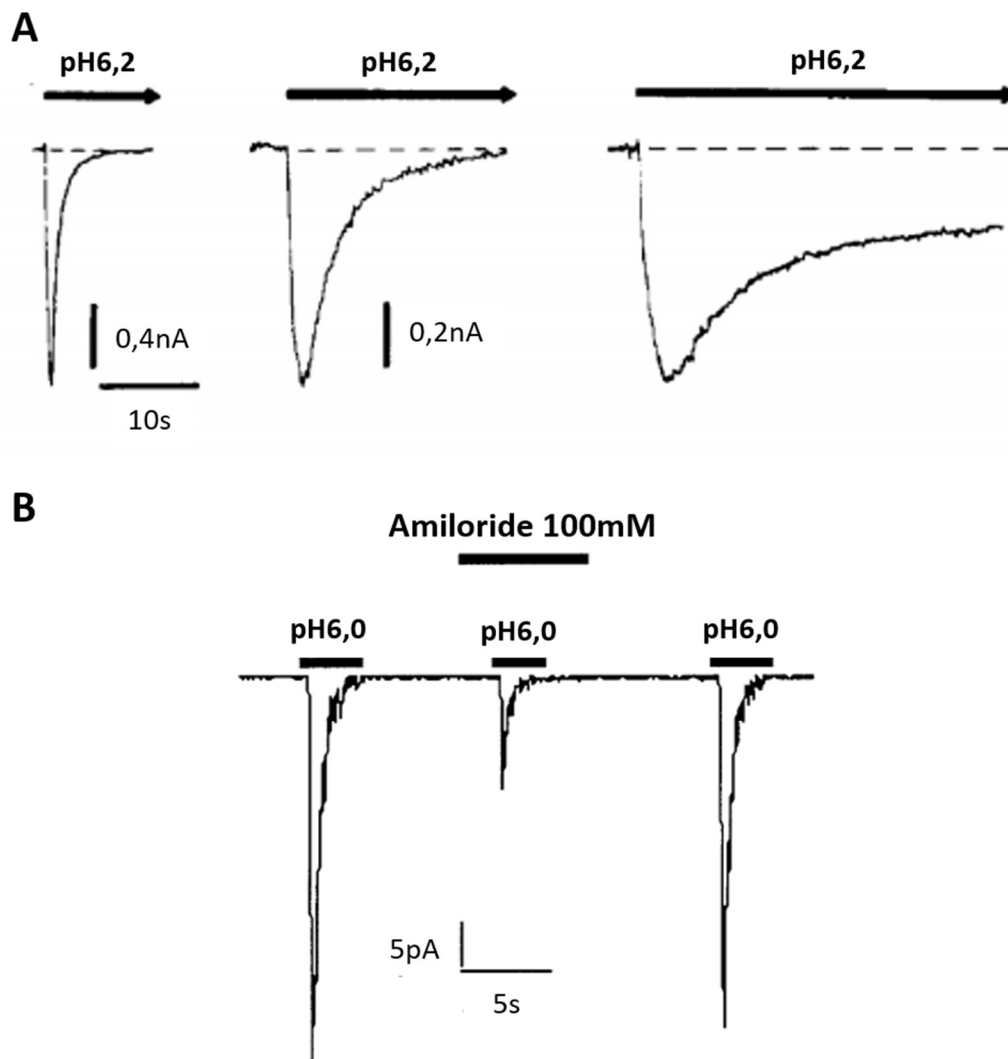


Figure 3 : Enregistrement des premiers courants sodiques activés par l'acidification extracellulaire.
A. Exemples illustrant les différents types de cinétiques de courants produits dans les neurones TG, à la suite d'un saut de pH de pH7,4 à pH6,2 (Potentiel imposé fixe à -100mV, 21°C). **B.** Inhibition des courants ASIC1 produit par acidification extracellulaire à pH6,0 par l'amiloride à 100mM (D'après Krishtal and Pidoplichko, 1981c; Waldmann et al., 1999).

Le premier canal identifié dans la littérature sous ce nom fût ASIC1a, par l'équipe du Pr Michel Lazdunski (Waldmann et al., 1997a), rapidement suivi de l'identification des autres membres de cette famille tel qu'ASIC2a, qui n'est autre que BNC1/MDEG qui est aussi activable par l'acidité, identifié un an au préalable et présentant 67% d'homologie avec le canal ASIC1a (Waldmann et al., 1999).

Le troisième membre de la famille ASIC, fût lui aussi observé fonctionnellement la première fois en 1991 (Bevan and Yeats, 1991). Enregistré dans des neurones DRG en culture en réponse à une acidification extracellulaire, ce canal fût par la suite cloné et caractérisé en 1997 par l'équipe du Pr Michel Lazdunski sous le nom de DRASIC (Dorsal Root ASIC) ensuite renommé ASIC3 (Waldmann and Lazdunski, 1998; Waldmann et al., 1997b). Ce canal partageant plus de 50% d'homologie avec le canal ASIC1a, produit un courant biphasique caractéristique que je détaillerai plus avant dans la partie « Mécanistiques et propriétés biophysiques des canaux ASIC ».

Plus récemment, en l'an 2000 un quatrième membre de la famille ASIC est identifié, présentant plus de 45% d'homologie avec les autres sous unités. Anciennement appelé SPASIC (Spinal Cord ASIC), ASIC4 est grandement exprimé dans le système nerveux central et particulièrement dans l'hypophyse. La particularité de ce dernier membre de la famille ASIC est qu'il n'est pas sensible à l'acidification extracellulaire. En conséquence de la nature inconnue de son activateur, le canal ASIC4 reste très peu étudié et ses propriétés encore très méconnues (Akopian et al., 2000; Chen et al., 2021b; Gründer et al., 2000)

2. Phylogénie des canaux ASIC

Comme évoqué précédemment, les canaux ASIC font partie de la superfamille ENaC/DEG/ASIC (epithelial sodium channel/degenerin/acid-sensing ion channel). Tous les membres de cette famille partagent des caractéristiques communes. Au sein de cette superfamille les canaux sont tous cationiques et majoritairement sodiques, ils sont tous inhibés en présence d'amiloride (Korkushko and Kryshtal', 1984; Waldmann et al., 1997a) et présentent tous une topologie similaire de leurs sous unités : des extrémités amino- et carboxy-terminales (N- terminal et C-terminal) intracellulaires, une large boucle extracellulaire reliant deux segments transmembranaires.

Cependant même si ces canaux partagent des caractéristiques communes, leurs activateurs et leurs rôles n'en sont pas moins variés. Les canaux MEC-4 (mechano-electrical transduction channel 4) et DEG-1 (degenerin 1) par exemple sont activés par stimulation mécanique et certaines mutations entraînent la dégénérescence des neurones qui les expriment chez le nématode, caractéristique d'où les canaux DEG tirent leur nom.

D'autres encore comme les canaux épithéliaux ENaC sont activés constitutivement, jouant un rôle prépondérant dans la réabsorption du sodium chez les mammifères, et grandement impliqués dans l'homéostasie sodique dans le colon, les reins et les poumons.

Enfin les derniers membres de cette superfamille, les canaux FaNaC, HyNaC et ASIC sont activés en présence d'un ligand. Les canaux FaNaC sont activés par le peptide FMRFamide dans les neurones de l'escargot (*Helix aspera*) (Lingueglia et al., 1995), les canaux HyNaC par le peptide RFamide de l'hydre (*Hydra magnipapillata*) (Assmann et al., 2014; Golubovic et al., 2007) et les canaux ASIC par les protons dans le neuraxe de la douleur.

L'homologie des séquences entre les mammifères varie entre 45% et 60% pour les sous unités ASIC, si l'on exclue le canal BASIC (Bile ASIC). Même si quelques travaux le dénomment ASIC5, il n'est pas à proprement parlé un canal ASIC car il présente moins de 30% d'homologie avec les séquences des autres membres de la famille. De plus il est sensible aux acides biliaires mais insensible aux protons.

L'homologie entre les orthologues de l'homme et du rat est proche de 100 % pour les sous unités ASIC1, -2 et -4, 83 % pour ASIC3 et 85 % pour les sous-unités ENaC (Figure 4). Une première équipe avait situé l'apparition de la sensibilité aux protons chez des analogues des canaux ASIC il y a 420 millions d'années (Coric et al., 2005). Récemment une équipe a pu mettre en évidence que la sensibilité aux protons chez des analogues des canaux ASIC était plus ancienne, et serait apparue il y a 600 millions d'années chez des Chordés (Tunicier) (Lynagh et al., 2018).

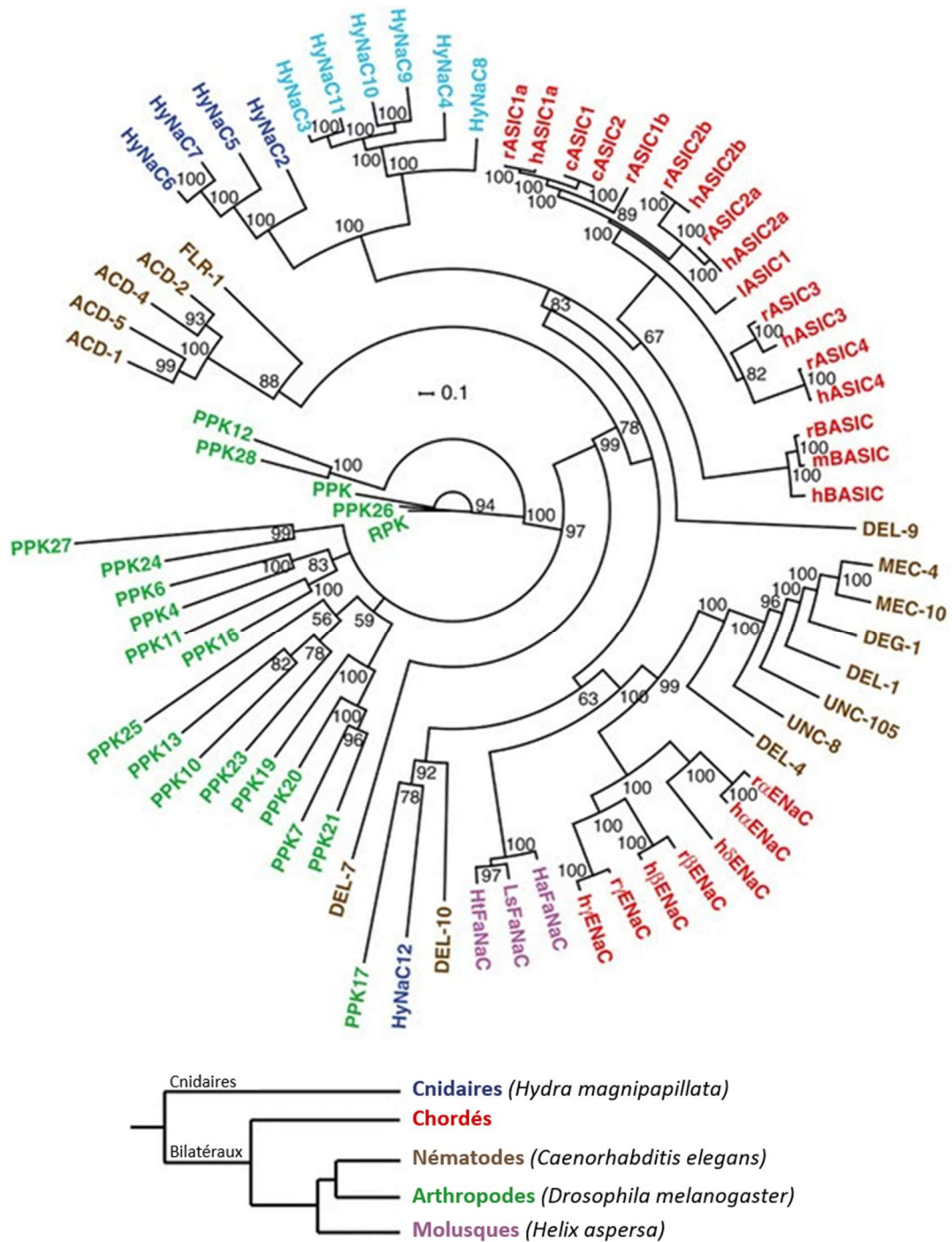


Figure 4 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC.

Les différents membres de cette superfamille peuvent être associés en sous-groupes. D'une part en bleu pour les Cnidaires, en rouge pour les Chordés, en vert pour les arthropodes, en brun pour les nématodes et en rose pour les mollusques. Les abréviations des noms d'espèces sont les suivantes : c, poulet (*Gallus gallus*) ; h, humain (*Homo sapiens*) ; Ha, *Helix aspersa* ; Ht, *Helisoma trivolvis* ; l, lamproie (*Lampetra fluviatilis*), Ls, *Lymnaea stagnalis* ; m, souris (*Mus musculus*) ; r, rat (*Rattus norvegicus*). Les autres protéines proviennent de *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* ou *Hydra magnipapillata* (D'après Assmann et al. 2014).

3. Structure des canaux ASIC

3.1 Gènes et sous unités

Les canaux ASIC1-4 sont codés par les gènes ACCN1-4 (Amiloride-sensitive cation channel neuronal 1-4). La sous unité ASIC1 est codée par le gène ACCN2 et le canal ASIC2 par le gène ACCN1, différence expliquée par la chronologie de leur découverte. Les gènes codant pour ces sous unités ASIC enrichissent le nombre de sous unités disponibles au sein du vivant en subissant des épissages alternatifs ou en utilisant des promoteurs différents dans le cas d'ASIC1a/1b et ASIC2a/2b (García-Añoveros et al., 1997; Hoagland et al., 2010). Cela produit ainsi de nouvelles sous unités aux propriétés bien différentes.

De plus, les canaux ASIC sont issus de l'assemblage trimérique de sous unités (Carnally et al., 2008), sous forme d'homomère ou hétéromère, offrant d'avantage de diversité de combinaisons des sous unités ASIC, et donc d'autant plus de diversité fonctionnelle.

- ACCN2 codant pour deux sous unités chez le rongeur comme chez l'homme ASIC1 : ASIC1a anciennement dénommée ASIC α ou BNaC2 α , et ASIC1b auparavant nommée ASIC β ou BNaC2 β . L'homologie de séquence protéique entre ces deux sous unités est d'environ 80%, la différence se situe au niveau du premier tiers de la sous unité, correspondant à l'extrémité N-terminale intracellulaire, le premier segment transmembranaire et une partie de la boucle extracellulaire.
- ACCN1 codant pour deux sous unités ASIC2 : ASIC2a anciennement dénommée MDEG1, BNC1 ou BNaC1 α , et ASIC2b auparavant nommée MDEG2 ou BNaC1 β . Ces sous-unités différentes au niveau de l'extrémité N-terminale intracellulaire, du premier segment transmembranaire et d'une partie de la boucle extracellulaire. Cependant la sous unité ASIC2b n'est pas capable de former de canal homomérique fonctionnel si elle est exprimée seule. Cependant il peut s'associer à d'autres sous unités ASIC pour former des canaux hétéromériques fonctionnels en apportant de nouvelles propriétés et/ou régulations (Hesselager et al., 2004).
- ACCN3 codant pour la sous unité ASIC3 : ASIC3 anciennement dénommée DRASIC ou TNaC1. Chez l'homme il existe trois variants d'épissage alternatif nommés ASIC3a, ASIC3b et ASIC3c, possédant chacun plus de 80% d'homologie avec les variants présents chez le rat ou la souris. Seule l'extrémité carboxy-terminale est différente chez ces variants. Ces extrémités C-terminales produisent des motifs d'adressage cellulaire différents selon le variant (Babinski et al., 1999; Ishibashi and Marumo, 1998; de Weille et al., 1998).
- ACCN4 codant pour la sous unité ASIC4 : ASIC4 anciennement dénommée SPASIC ou BNaC4. Chez l'homme il existe deux variants d'épissage alternatif appelés hASIC4a et hASIC4b, qui possèdent

97% d'homologie avec le canal ASIC4 de rat (Gründer et al., 2000). Ce qui caractérise le canal ASIC4 comme un membre à part entière de la famille des canaux ASIC, outre son homologie avec les autres canaux de cette famille, c'est que même si ce dernier n'est pas activé par les protons chez les mammifères il est sensible à l'acidité chez d'autres animaux. En effet, chez d'autres vertébrés comme le zebra fish, le cœlacanthe, la grenouille ou encore le poulet, le canal ASIC4 est sensible aux protons (Chen et al., 2007; Lynagh et al., 2018). Une étude menée sur cette sous-unité a permis de rendre le variant de rat à nouveau sensible aux protons en créant un canal chimérique ASIC4/1a (Lynagh et al., 2018). Dans ce cas, les auteurs ont remplacé les domaines de la sous-unité ASIC4, sur lesquelles seraient situés les sites clés de la sensibilité aux protons, par ceux du canal ASIC1a.

3.2 Structure

C'est en 2007 grâce au travail du groupe d'Eric Gouaux que la cristallographie a pu mettre à jour la structure des canaux ASIC (Figure 5, panel du haut) (Jasti et al., 2007). Pour former le cristal nécessaire à la cristallographie au rayon X, ils ont eu l'astuce d'utiliser le canal ASIC1a de poulet tronqué d'une partie de leurs domaines amino (N) et carboxy (C) terminaux intracellulaires.

Par le passé, il avait été suggéré, sur la base de données fonctionnelles et biochimiques sur les canaux ENaC et FaNaC proposant la formation de tétramères, que les canaux ASIC étaient formés de 4 sous-unités (Waldmann et al., 1999). Cette hypothèse prit fin grâce à la structure par cristallographie révélant l'assemblage des sous-unités ASIC sous forme de trimère pour former un canal fonctionnel. Résultat qui fût reconfirmé par microscopie à force atomique en 2008 (Carnally et al., 2008).

Chaque sous-unité ASIC possède une large boucle extracellulaire constituée de 7 hélices α ainsi que de 2 feuillets β , représentant environ 70% de la protéine. Cette boucle est reliée aux deux régions hydrophobes transmembranaires (TM1 et TM2), formées chacune d'une hélice α . Ces deux régions transmembranaires sont chacune reliée à une extrémité intracellulaire N- ou C-terminale (Jasti et al., 2007).

Chaque sous unité peut être subdivisée en sous domaines nommés par analogie à une main se refermant sur une balle (Figure 5, panels du bas). Ainsi en schématisant on aura l'articulation en bleu, la paume en jaune, le pouce en vert, le doigt en violet, la β balle en orange et le domaine transmembranaire en rouge. La structure finale du canal en forme de calice, fait apparaître des vestibules dans la structure, qui sont très important pour la sélectivité ionique. On en dénombre quatre au total :

- Le vestibule intracellulaire au niveau de l'hémi-feuillet interne des segments transmembranaires
- Le vestibule extracellulaire responsable de l'entrée de sodium au niveau de la jonction entre les domaines transmembranaires et les domaines extracellulaires
- Le vestibule central au niveau du domaine de la paume et du pouce
- Le vestibule supérieur présent sur le haut de la structure au niveau du domaine du doigt et de l'articulation

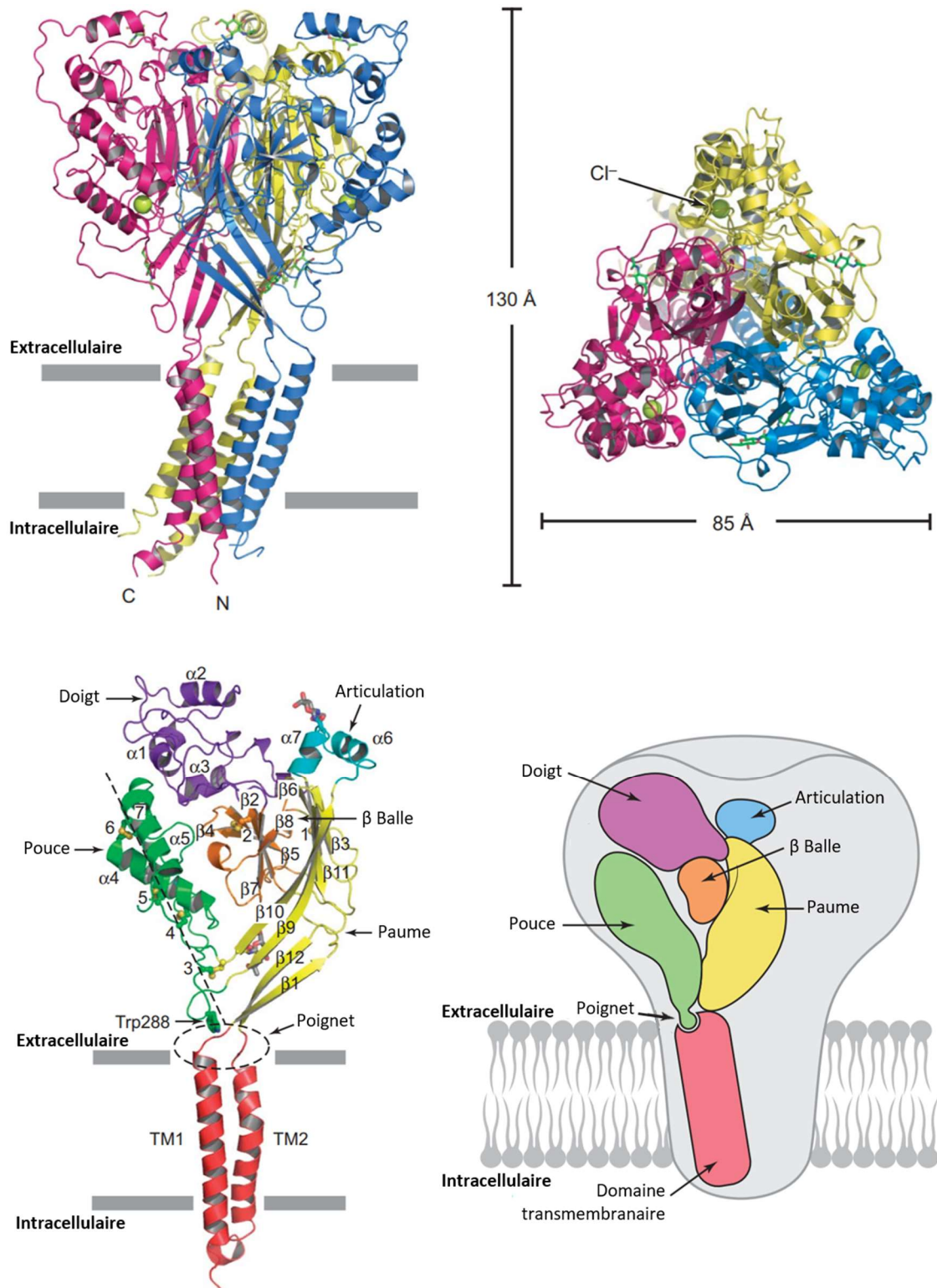


Figure 5 : Structure du canal Δ ASIC1a homomérique de poulet.

Vue de la structure du canal Δ ASIC1a de côté enchâssé dans la membrane (panel en haut à gauche), et par le dessus (panel en haut à droite). Chaque sous-unité indépendante est représentée par une couleur différente. Un seul ion chlorure par sous-unité est représenté par une sphère verte et l'hydrate de carbone lié à l'azote est représenté par un bâtonnet. Sous unité ASIC colorée et schématisée selon ses sous domaines (panel du bas) (D'après Jasti et al., 2007).

Les ions et les petites molécules accèdent au pore du canal par trois fenestrations menant directement au vestibule extracellulaire. Ces fenestrations sont au niveau de l'interface entre les domaines transmembranaires et la partie extracellulaire du canal, et sont responsables du passage des ions sodium lors de l'ouverture du canal. Sous ce vestibule extracellulaire se trouve le domaine porte possédant un motif de trois acides aminés, en position 443-445, hautement conservé même chez les canaux ENaC appelé motif GAS (Glycine-Alanine-Sérine). Ce motif se trouve sur le coude du segment TM2 et il est responsable de la sélectivité ionique du canal (Gonzales et al., 2009; Jasti et al., 2007).

De plus, il a récemment été montré qu'un autre motif de deux acides aminés, eux aussi conservés dans la famille ENaC/DEG, participe à la sélectivité ionique. Le motif HG (Histidine-Glycine) en position 29-30, soit plus de 400 acides aminés plus loin que le motif GAS, est situé sur la partie N-terminale du canal. Cette extrémité forme alors une boucle réentrant, avec le motif HG au niveau du coude, venant interagir avec le motif GAS présent alors sur le TM2 (Yoder and Gouaux, 2020; Yoder et al., 2018).

Comme abordé précédemment, les sous unités ASIC sont capables de s'assembler en trimère pour former un canal fonctionnel. Toutes les sous unités peuvent donc former des assemblages homo ou hétéromériques pour former un canal ASIC fonctionnel. A l'exception de la sous unité ASIC2b qui forme exclusivement des canaux hétéromériques fonctionnels et ASIC4 qui ne semble pas former de canaux homo ou hétéromériques fonctionnels. Cette grande variété d'assemblage est à l'origine de la grande diversité de courants ASIC existant, avec pour chacun des assemblages des propriétés qui lui sont propres, comme notamment la sélectivité ionique, la sensibilité au pH, les cinétiques de courant ou encore la sensibilité aux agents pharmacologiques (partie développée plus loin).

Le rôle des segments intracellulaires serait quelque peu réducteur si l'on n'y regardait pas plus en détail. Comme évoqué précédemment, la plupart des canaux ASIC ont une extrémité N- et C-terminales de taille variable. Ces extrémités sont particulièrement importantes pour la régulation des canaux par des signaux intracellulaires, des interactions protéine-protéine ou encore des modifications post-traductionnelles (partie développée plus loin).

3.3 Activation/inactivation des canaux ASIC

Les mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux ASIC a longtemps intrigué les scientifiques. C'est très largement grâce aux expériences de cristallographie, de mutagenèse et d'électrophysiologie qu'il a pu être possible de comprendre tous les mécanismes sous-jacents.

Les canaux ASIC possèdent différentes régions impliquées dans la détection des protons, notamment une région extracellulaire présente au niveau du pouce et du doigt appelée poche acide. Il s'agit d'une région particulièrement riche en résidus acides formant des paires carboxyl-carboxylate. A pH physiologique cette poche acide est étendue, c'est lors de l'exposition des résidus à un faible pH que cette poche acide va s'effondrer sur elle-même, induite par le rapprochement des résidus acides entre eux.

Pour permettre ce mouvement, c'est l'hélice $\alpha 5$ du pouce qui pivote au cœur du canal et va permettre au domaine pouce et doigt de rentrer en contact. Cet effondrement de la poche acide initie dans le même temps une rotation des sous unités individuelles autour du domaine palme, déplaçant ainsi les brins $\beta 1$ - $\beta 12$ vers la membrane (Figure 6-Activation). Ce mouvement provoque l'expansion de la fenestration extracellulaire, laissant ainsi entrer le sodium. Le canal se retrouve alors dans un état ouvert.

Cet état n'est pas permanent même si l'exposition à une solution acide perdure, le canal bascule vite dans un état désensibilisé qui devient insensible aux protons. Au niveau mécanistique, cela se traduit par le retournement des résidus faisant la liaison entre les structures $\beta 11$ - $\beta 12$, permettant au domaine paume de retourner à son état fermé. Cela permet aux hélices transmembranaires de se détendre à nouveau dans une conformation de repos, fermant ainsi la fenestration extracellulaire bloquant toute entrée de sodium (Figure 6-Désensibilisation).

Le retour à un état activable nécessite l'élimination des protons présents dans la poche acide. Lors d'un retour du pH à des valeurs plus physiologiques la déprotonation des résidus acides induit une répulsion électrostatique chassant les protons. Cette action va permettre à la poche acide de s'étendre à nouveau et aux résidus faisant la liaison entre les structures $\beta 11$ - $\beta 12$ de permuter dans état de repos. Ces derniers mécanismes permettent de retrouver un canal au repos et à nouveau sensible aux protons (Figure 6-Récupération) (Jasti et al., 2007; Yoder and Gouaux, 2020; Yoder et al., 2018).

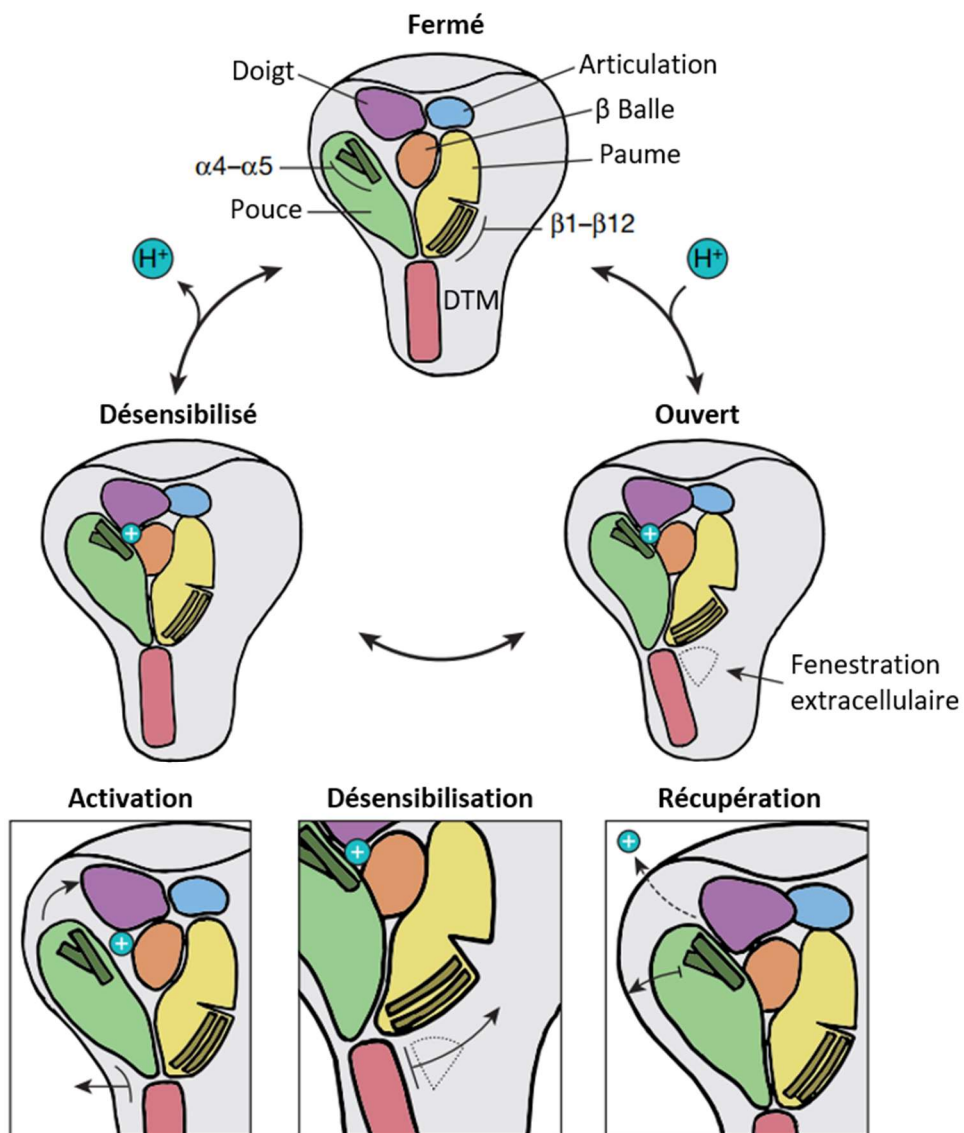


Figure 6 : Schéma du mécanisme d'activation et d'inactivation du canal ASIC1a.

Représentation cartoon du gating du canal ASIC1a. DTM ; Domaine transmembranaire (D'après Yoder et al., 2018).

4. Propriétés physico-chimiques

4.1 Perméabilité ionique

Comme nous l'avons vu précédemment la sélectivité des canaux ASIC est due à certaines parties de sa structure (voir partie structure). Les canaux ASIC sont majoritairement perméables au sodium, il s'agit là d'une caractéristique commune des membres de la superfamille des canaux ENaC/DEG/ASIC. Cette perméabilité au sodium des canaux ASIC, les place comme canaux ioniques dépolarisants/excitateurs. Toutefois, cette sélectivité n'est pas exclusive au sodium, et certains membres de la famille des ASIC possèdent une perméabilité relative à d'autres cations.

Cette perméabilité pour un ion s'exprime généralement en ratio par rapport à la perméabilité pour le sodium (Na^+). Dans le cas des canaux homomériques, par exemple, le ratio de perméabilité vis à vis du potassium (PNa^+/PK^+) est proche de 10, avec ASIC1a : 13, ASIC1b : 14, ASIC2a : 10, ASIC3 : 11,5 (Tableau 2) (Bassilana et al., 1997; Bässler et al., 2001; Waldmann et al., 1997a). Parmi les canaux ASIC seul le canal ASIC1a homomérique et le canal ASIC1a/2b semblent présenter une conductance pour le calcium (Ca^{2+}) avec un ratio $\text{PNa}^+/\text{PCa}^{2+}$ de 2,5 et 4,1 respectivement, contre 25 pour le ASIC1a/2a (Sherwood et al., 2011).

Cette entrée de calcium ASIC1a dépendante est aussi responsable d'une réponse calcique secondaire qui est particulièrement importante comme nous le verrons par la suite en conditions physiologiques et physiopathologiques (*cf.* Chapitre 2.5) (Chu et al., 2002; Waldmann et al., 1997a; Yermolaieva et al., 2004).

4.2 Sensibilité au pH

Comme évoqué précédemment la grande variété d'assemblage des sous-unités va offrir une richesse de propriétés spécifiques à chaque assemblage, notamment en ce qui concerne la sensibilité au proton et les cinétiques de courants (Figure 7.C). Les canaux ASIC1a et ASIC3 homomériques possèdent tous deux des pH seuils d'activation très proche du pH physiologique. Ces deux canaux nécessitent donc qu'une acidification modérée pour les activer, à partir de pH 7,0 et 7,2 respectivement (Deval et al., 2008; Sutherland et al., 2001; Waldmann et al., 1997a; Yagi et al., 2006). L'activation des canaux ASIC1b et ASIC2a nécessitent une acidification plus prononcée, avec un pH seuil d'activation de 6,5 (Bässler et al., 2001; Hesselager et al., 2004) et 6,0 respectivement (Lingueglia, 2007) (Tableau 2).

La grande variété de combinaisons des sous unités des canaux ASIC va permettre d’obtenir des canaux avec des propriétés intermédiaires aux canaux homomériques, permettant ainsi de couvrir un très large panel de détection d’acidification avec une gamme de pH allant de pH7,2 à 4,0. Une autre mesure permettant de caractériser les canaux ASIC entre eux est le pH de demi-activation ou pH_{50} (Figure 7.A). Cette dernière mesure permet d’obtenir des valeurs allant de 6,7 à 4,0 pour le canal ASIC3 et ASIC2a respectivement (Tableau 2).

De plus il existe quelques subtilités selon l’espèce exprimant les canaux ASIC. Nous avons abordé précédemment le cas d’ASIC4 qui est insensible au proton uniquement chez les mammifères (Chen et al., 2007; Lynagh et al., 2018). Le cas d’ASIC3 est un exemple encore plus frappant. Ce dernier possède deux arginines propres au canal humain (R68 & R83), préférant à ce dernier une sensibilité à l’alcalinisation. Ces dernières rendent le canal très instable, ce qui a pour conséquence de le rendre particulièrement sensible à la moindre variation de pH (Delaunay et al., 2012).

Alors qu’à contrario, ce même canal ASIC3 exprimé cette fois-ci chez le rat taupe nu (*Heterocephalus glaber*) possède trois mutations ($\Delta 1$, A62E, R102H) rendant la sous unité ASIC3 non fonctionnelle sous forme d’homomère (Schuhmacher et al., 2018). Ces mutations sont tout à fait pertinentes pour cet animal qui vit en milieu hypercapnique/hypoxique, protégeant ainsi ses neurones d’une mort par acidose (Husson and Smith, 2018).

Isoforme (rat)	pH seuil d’activation	pH demi-activation	τ inactivation à pH_{50} (ms)	Réactivation (s)	PNa^+/PK^+
ASIC1a	7,0 - 6,8	6,6 - 6,2	≈ 640	11 - 13	13
ASIC1b	6,5 - 6,2	6,2 - 5,8	≈ 890	3 - 6,1	14
ASIC2a	6,0 - 5,8	5,0 - 4,0	≈ 1400	0,9	10
ASIC3	7,2 - 7,0	6,7 - 6,2	≈ 290	0,4 - 0,6	11,5

Tableau 2 : Propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux ASIC homomériques.
Principales caractéristiques pour les canaux homomériques de rat exprimés en système hétérologues. (Benson et al., 2002; Gründer and Pusch, 2015; Hesselager et al., 2004; Kellenberger and Schild, 2015; Lingueglia, 2007; Sutherland et al., 2001; Waldmann et al., 1999)

4.3 Cinétiques et courants associés

Une mesure de cinétiques est une mesure permettant de caractériser au mieux les courants produits par les canaux ASIC lors d'une acidification. Si la cinétique d'activation est quant à elle quasiment instantanée, l'inactivation est plus ou moins rapide selon les isoformes, générant un courant transitoire (Figure 7.B).

Une fois activés par un saut de pH, les canaux basculent dans un état désensibilisé dans lequel ils deviennent insensibles au proton. Pour comparer les cinétiques d'inactivation des canaux ASIC entre elles (τ inactivation), j'ai choisi de me référer aux cinétiques d'inactivation mesurées pour le courant induit au pH de demi-activation (pH_{50}) (Tableau 2 & Figure 7.A). Si on regarde de plus près ces cinétiques d'inactivation on constate que les canaux ASIC2a sont les plus lents de la famille ASIC avec un τ inactivation à pH_{50} de 1400ms. Les canaux ASIC1a, ASIC1b et ASIC3 s'inactivent plus rapidement avec un τ inactivation à pH_{50} de 640, 890 et 290ms respectivement (Tableau 2).

Bien que le canal ASIC3 possède le τ inactivation le plus faible des canaux ASIC homomériques, celui-ci présente une particularité qui lui est propre. Contrairement aux autres canaux ASIC il ne s'inactive pas complètement (Figure 7.B). Ce dernier présente un courant biphasique typique, avec un courant transitoire et une phase de courant soutenu qui perdure tant que l'acidification est présente. Cette particularité s'explique par deux mécanismes distincts.

Le premier résulte en la superposition des courbes d'activation et d'inactivation, pour des valeurs d'acidification modérée (entre $\text{pH}7,3$ et $6,5$), c'est ce que l'on appelle le courant de fenêtre. Dans cette gamme de pH un courant persistant est observé tant que l'acidose est maintenue (Figure 7.A & B) (Deval et al., 2008; Yagi et al., 2006). Cette gamme de pH induisant un courant soutenu représentent de petites acidifications par rapport au pH physiologique (*i.e.* $\text{pH}7,4$), et elles sont retrouvées dans des situations physiopathologiques, comme l'asthme, l'ostéoarthrite, l'arthrite rhumatoïde, la goutte et bien d'autres encore (Dulai et al., 2021).

Le second est la conséquence d'une acidification importante (inférieure à $\text{pH}6,0$). Les expériences sur les canaux chimériques entre ASIC1a et ASIC3 ont mis en évidence qu'il fallait au moins la présence du premier segment transmembranaire (TM_1), et de la partie N-terminale du canal ASIC3 pour observer cette propriété.

Ces valeurs de pH sont éloignées des valeurs de pH physiologiques classiques mais on peut les retrouver en situations pathologiques comme dans certains cancers particulièrement virulent comme les cancers osseux (Tian et al., 2017; Zhou et al., 2017), dans certains cas de lésions pulmonaires sévères (Dulai et al., 2021), dans les gastrites, les ulcères de l'estomac ou les cystites.

Bien que la composante transitoire des courants ASIC natifs semble capable de générer des potentiels d'action, ce n'est généralement pas le cas du courant soutenu d'ASIC3. Cependant son impact sur l'excitabilité des neurones n'est pas négligeable, et suffit bien souvent à sensibiliser les neurones de rat et de souris en les dépolarisant (Deval et al., 2003, 2008; Yagi et al., 2006).

Cet impact du courant soutenu est encore plus flagrant pour le canal ASIC3 humain. Comme décrit précédemment ce dernier s'active en réponse à l'alcalinisation et à l'acidose de faible amplitude en plus de pouvoir générer un courant transitoire en cas d'acidose importante. Ce canal, constitutivement activé en situation physiologique, jouerait un rôle essentiel comme canal de fond en sensibilisant les neurones. Il participerait donc à la fine régulation du potentiel de repos des neurones, et son rôle dans la nociception est d'autant plus important qu'il est fortement exprimé dans les neurones DRG (Tableau 3) (Delaunay et al., 2012).

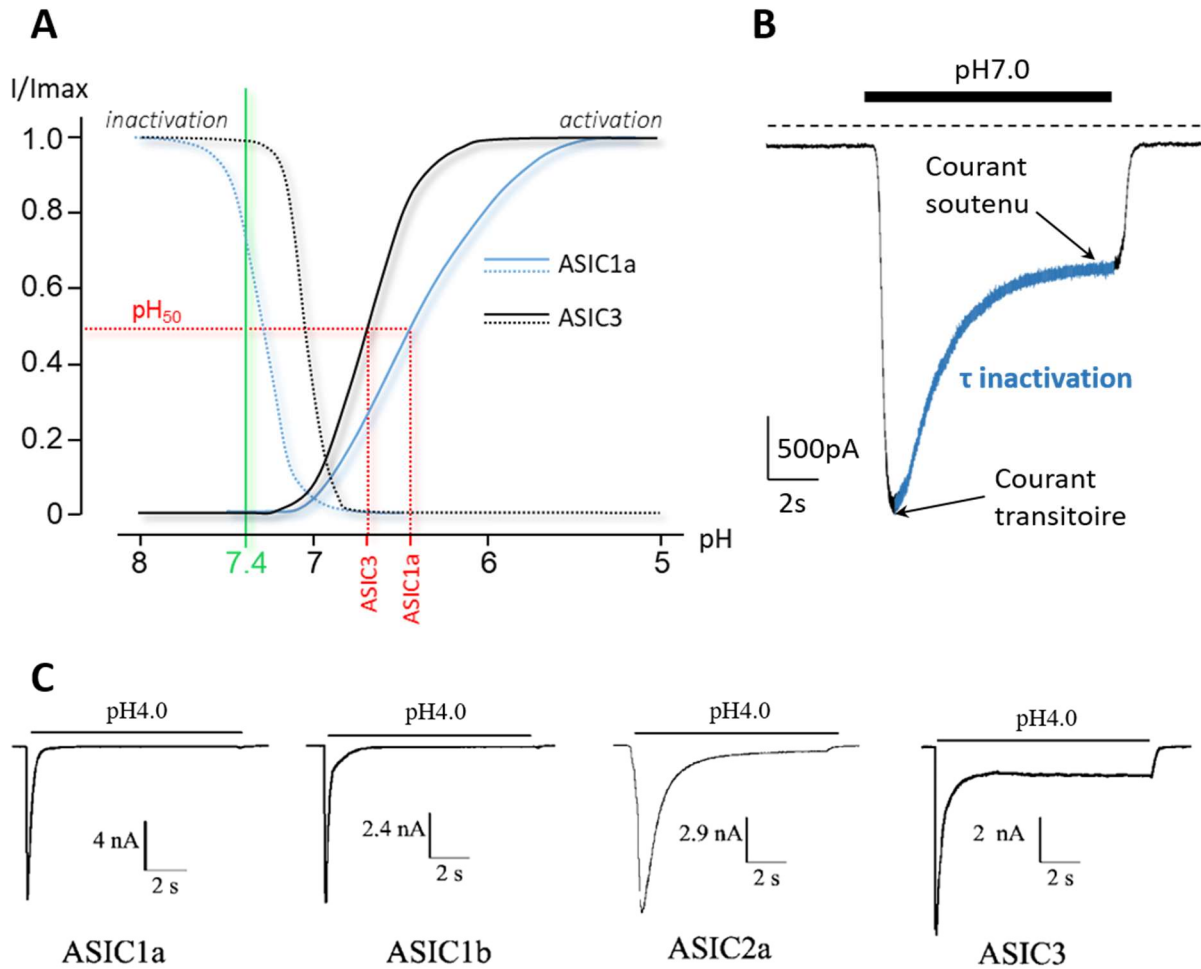


Figure 7 : Caractéristiques biophysiques et électrophysiologiques des courants ASIC.

A. Courbe de pH dépendance de l'activation (en trait plein) et de l'inactivation (en pointillés) des canaux ASIC3 (en noir) et ASIC1a (en bleu). La courbe d'activation est obtenue en comparant le pic de courant induit par un saut de pH acide en partant d'un pH de repos à pH8,0 (où tous les canaux sont à l'état fermé) normalisé par le courant maximal obtenu à pH5,0. La courbe d'inactivation est obtenue quant à elle en mesurant l'amplitude du pic de courant en fonction du pH de conditionnement, normalisé par le courant maximal de référence (pH5,0 avec un conditionnement à pH8,0) (Deval et al., 2010). **B.** Cinétique d'inactivation (en bleu) d'un courant ASIC3 homomérique induit par une acidification rapide et modérée de pH7,4 à pH7,0. **C.** Cinétiques des courants ASIC homomériques typiques suite à de fortes acidifications extracellulaires de pH7,4 à pH4,0 (D'après Hesselager et al., 2004).

5. Rôles et distribution tissulaire (SNC, SNP et autres tissus)

Les canaux ASIC sont majoritairement exprimés dans le système nerveux, et très présents dans le neuraxe de la douleur. Cependant ils sont aussi exprimés dans de nombreux autres tissus non neuronaux et ils sont impliqués dans nombre de processus physiologiques et physiopathologiques autres que la nociception.

	Humain				Souris			
	ASIC1	ASIC2	ASIC3	ASIC4	Asic1	Asic2	Asic3	Asic4
DRG	20,18	1,15	78,80	0,39	65,7	63,5	292,8	1,7
Nerf tibial	1,66	1,49	11,19	0,19	60,2	16,4	2,3	61,5
Cortex frontal	24,06	28,58	40,35	14,27	22,7	150,3	0,0	8,0
Moelle épinière	9,19	6,18	42,45	4,87	48,8	82,6	1,1	4,3
Hippocampe	24,87	28,26	45,72	9,63	7,2	139,0	0,0	3,7
Noyaux accumbens	49,23	24,93	62,85	10,32	75,9	64,5	3,0	34,5
Noyaux caudés	48,52	11,99	37,39	10,17	23,9	96,7	0,5	21,2
Muscles squelettiques	0,25	0,00	3,79	0,00	0,5	0,4	1,4	0,0
Cœur	0,56	0,00	2,15	0,00	2,2	0,1	0,6	0,1
Foie	0,12	0,00	1,32	0,00	0,7	0,0	0,6	0,0
Poumons	1,10	0,76	10,75	0,42	1,1	0,2	0,5	0,1
Petit intestin	3,79	11,61	0,78	1,22	0,9	0,9	0,8	0,0
Sang total	0,76	0,39	8,53	0,19	0,9	0,0	0,1	0,0

Tableau 3 : Profile transcriptomique humain et murin des canaux ASIC1-4 dans les DRG contrasté avec d'autre tissus.

Valeurs exprimées en transcrit par million (TPM) (Mesures extraites du Pain center de Dallas <https://paincenter.utdallas.edu/sensoryomics/>).

5.1 Système nerveux périphérique

La première description de courants ioniques sensibles à l'acidification ont été décrit en 1980, dans des cultures primaires de neurones DRG et trijumeaux de rat (Krishtal and Pidoplichko, 1980). Très rapidement la localisation de ces canaux dans ces neurones périphériques a laissé supposer un rôle dans la nociception (Krishtal and Pidoplichko, 1981c, 1981b).

La totalité des canaux ASIC sont exprimés de manière hétéroclite dans le SNP (Tableau 3), y compris dans les neurones de gros diamètre, impliqués dans la proprioception, et dans les neurones de petits diamètres, spécifiques de la nociception (Price et al., 2000, 2001; Voilley et al., 2001). Il est intéressant de noter que les canaux ASIC3 et 1b sont très majoritairement exprimés dans le SNP chez le rongeur et de façon plus minoritaire dans certaines régions cérébrales (Tableau 3 & 4) (Chen et al., 1998; Schuhmacher and Smith, 2016; Waldmann et al., 1997a). Ces afférences périphériques permettent d'alerter via des messages douloureux d'un dommage quelconque qui peut être associé à une acidification tissulaire par exemple pendant l'ischémie, l'inflammation, la douleur cancéreuse ou dans les muscles pendant l'exercice (voir Tableau 4 pour synthèse).

Un grand nombre de travaux mettent en avant l'importance des canaux ASIC présent dans les afférences sensorielles, dans la nociception induite par l'acidification (Deval and Lingueglia, 2015). La suppression d'ASIC3 chez l'animal (souris knockout) a été décrit comme réduisant la douleur inflammatoire et la douleur induite par l'acidification chronique dans le muscle (Sluka et al., 2003, 2007; Walder et al., 2010).

L'injection intrathécale de siARN contre ASIC3 chez le rat (knockdown) diminue le comportement douloureux induit par l'inflammation cutanée ou dans un modèle de douleur postopératoire par incision de la patte arrière (Deval et al., 2008, 2011). L'injection locale de GMQ, un agoniste du canal ASIC3 a confirmé le rôle de ce dernier dans le comportement douloureux (Yu et al., 2010). A contrario l'injection d'APETx2 (Diochot et al., 2004), un peptide inhibiteur d'ASIC3, produit un effet analgésique dans différents modèles de douleur (Deval et al., 2008, 2011; Jacquot et al., 2022; Jurczak et al., 2022; Karczewski et al., 2010).

De la même manière, l'utilisation de toxines a pu aussi mettre au jour le rôle des canaux ASIC1 présent dans le SNP dans le comportement douloureux. L'injection de la MitTx, un peptide agoniste des canaux ASIC et plus particulièrement du canal ASIC1a, est capable de créer une douleur spécifique d'ASIC1a (Bohlen et al., 2011). A contrario, l'injection périphérique de mambalgine, un peptide inhibiteur de plusieurs sous-types de canaux ASIC, provoque un effet analgésique via son action inhibitrice sur ces canaux dont ASIC1b en périphérie (Diochot et al., 2012).

Une solution radicale consisterait à invalider les canaux ASIC pour bannir le comportement douloureux qu'ils médient via leur activation. C'est dans cet esprit qu'un modèle de souris triple KO ASIC1a/ASIC2/ASIC3 a été créé, cependant contrairement au résultat attendu, leur invalidation collective et constitutive produit une mécanosensibilité accrue. Les hypothèses proposées par les auteurs seraient que les canaux ASIC interagiraient avec des canaux mécanosensibles ou qu'ils participeraient à la modulation des signaux nociceptifs au niveau central. Ceci apporte une preuve supplémentaire que tous les aspects et implications des canaux ASIC ne sont pas encore compris (Kang et al., 2012).

En 2015, des travaux ont aussi mis en évidence l'implication d'ASIC3 dans le comportement de démangeaison (Peng et al., 2015). En effet, une particularité du canal ASIC3 est d'être très sensible à des ligands non protoniques, et donc de voir son activité altérée par d'autres composés lors de situations physiopathologiques, faisant de lui un détecteur de coïncidence (Deval et al., 2008) intégrant différents signaux dont l'acidification.

L'émission concomitante de peptides pruritogéniques, qui augmente le τ inactivation du canal ASIC3, et de protons produisent ensemble une démangeaison qui est réduite chez les animaux invalidés pour le canal ASIC3 (Peng et al., 2015). Il a été proposé qu'ASIC1, ASIC2 et particulièrement ASIC3 puissent être up-régulés par la situation inflammatoire présente dans les cas de capsulite (ou syndrome d'épaule gelée) au niveau de la capsule de l'épaule et dans les liquides synoviaux de patients (Cho et al., 2015).

De plus, le canal ASIC3 a été incriminé comme modulateur de la douleur et de l'hyperalgie associée dans un modèle murin d'ostéoarthrite (Izumi et al., 2012). En 2016, Marra et al. publiaient une étude sur l'activation d'ASIC3 sans acidification via des lipides endogènes, la lysophosphatidilcholine (LPC) et l'acide arachidonique (AA). Ces lipides ont été mesurés en forte concentration dans les liquides synoviaux de genoux chez des patients atteints de pathologies articulaires associées à des douleurs chroniques. L'injection sous cutanée de LPC et d'AA provoquent une douleur aiguë chez l'animal, et cette douleur est atténuée lors de co-injection avec de l'APETx2 ou de l'amiloride, un bloqueur non-sélectif des canaux ASIC (Marra et al., 2016) (Partie plus détaillée dans le chapitre III).

Les canaux ASIC sont liés à la nociception, mais sont aussi exprimés dans certains neurones impliqués dans des rôles différents (Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2020). En effet, les neurones de grand diamètre sont impliqués dans la perception de stimuli non nociceptifs, ce qui correspond à des neurones de bas seuil, répondant aux stimulations mécaniques (Price et al., 2000, 2001). Il a par ailleurs été montré qu'ASIC3 participe à la sensation de touché chez la souris en plus de répondre aux stimuli acide (Price et al., 2001).

De plus, la perte d'ASIC3 dans les neurones DRG parvalbumine positifs innervant le muscle (propriocepteurs), supprime la capacité de ces neurones à émettre des potentiels d'action en réponse à la déformation. Cela a pour conséquence chez ces souris de générer des pertes d'équilibre (Lin et al., 2016). De plus des travaux ont montré qu'ASIC3 est responsable de la douleur lors de fatigue musculaire (Gregory et al., 2015, 2016), et jouerait un rôle avec la testostérone pour protéger contre ce type de fatigue (Burnes et al., 2008).

Les canaux ASIC présent dans le muscle sont requis pour la douleur immédiate après exercice et sont régulés négativement par l'entraînement (Khataei et al., 2020). Il a aussi été décrit chez les souris femelles un rôle central d'ASIC1a présynaptique au niveau de la jonction neuromusculaire, permettant de réguler la transmission, la contraction musculaire et la fatigue (Urbano et al., 2014). Au niveau de la douleur musculaire, ASIC3 semble jouer un rôle central dans l'hyperalgie musculaire inflammatoire, et son inhibition permet d'enrayer le développement de l'hyperalgie mécanique secondaire mais ne serait pas impliqué dans l'hyperalgie thermique (Sluka et al., 2007; Walder et al., 2010).

Le canal ASIC3 semble impliqué, avec les canaux TRPV1 et Na_v1.8, dans la transition de la douleur aiguë à l'état chronique dans un modèle murin de fibromyalgie (Chen et al., 2014). De plus ASIC1b semble impliqué dans l'établissement de la chronicité de la douleur musculaire induite par l'acide, et son absence permettrait de réduire la durée de l'hyperalgie (Chang et al., 2019).

La situation sur la mécanosensibilité des canaux ASIC reste floue, et rien n'indique actuellement que ces canaux soient intrinsèquement mécanosensibles. Différents travaux montrent que les canaux ASIC2 & 3 ne sont pas nécessaires pour générer des courants en réponse à des stimuli mécaniques dans les neurones DRG en culture (Drew et al., 2004). Des canaux mécanosensibles tel que Piezo1 répondent à la déformation de la membrane correspondant au modèle de « force from lipids » (Syeda et al., 2016), tandis que l'application de Trinitrophénol (TNP) sur des cellules transfectées avec ASIC3 ne génère aucun courant (Marra et al., 2016).

Un mécanisme proposé pour la mécanosensibilité de la famille de canaux DEG/ENaC, dont ASIC3 fait partie, s'appuierait sur le modèle de « force from filaments » nécessitant la liaison du canal au cytosquelette intracellulaire ou à la matrice extracellulaire. Les canaux s'activent spécifiquement en réponse à la déformation dynamique du substrat et non à une stimulation mécanique directe du corps cellulaire (Chen and Wong, 2013; Lin et al., 2016).

De plus, la stomatine (STOM) et stomatine-like 3 (STOML3) sont des protéines partenaires des canaux ASIC (Brand et al., 2012; Lapatsina et al.; Price et al., 2004), et sont les homologues chez les mammifères de la protéine MEC-2 exprimée chez *C.elegans*, elle-même nécessaire dans la fonction des canaux mécanosensibles. Elle a elle-même été décrite comme participant à la mécanosensibilité chez le nématode, et la délétion de STOML3 chez les souris induit une perte de mécanosensibilité dans de nombreuses afférences cutanées, associée à une perte de signaux nerveux dans les neurones DRG en réponses au stimuli mécaniques (Wetzel et al., 2007).

ASIC1a, 2 & 3 sont exprimés dans les neurones DRG et des ganglions plexiformes innervant les intestins (Page et al., 2004, 2005). L'absence d'une des différentes sous unités des canaux ASIC dans les neurones innervant les intestins, entraîne des répercussions sur la sensibilité mécanique de ces tissus. La perte d'ASIC1a augmente cette mécanosensibilité de la partie supérieure du tractus digestif (œsophage et estomac) et ralentit la vidange gastrique.

Tandis que l'absence d'ASIC2 réduit la mécanosensibilité de la partie supérieure du tractus digestif et augmente la mécanosensibilité des afférences du côlon. Finalement, la délétion d'ASIC3 réduit la mécanosensibilité de l'ensemble des afférences du tractus gastrique (Brierley et al., 2010; Page et al., 2004, 2005). En restant dans le cadre du tractus digestif, il a été montré qu'ASIC3, contrairement à ASIC2, contribue au développement de l'hyperréactivité à l'acide gastrique, chez un modèle murin de gastrite (Wultsch et al., 2008).

Dans les neurones innervant la vessie et 25% expriment des courants ASIC-like (Montalbetti et al., 2018). La perte d'ASIC3 ne fait que ralentir le τ inactivation des courants évoqués, mais néanmoins empêche ces neurones de générer des potentiels d'action suite à une stimulation à pH acide. De plus, une autre publication a mis en avant une up-régulation des sous unités ASIC2a et 3 lors d'une cystite (Corrow et al., 2010). D'autres résultats viennent compléter cette étude, avec un test de miction où les souris KO pour ASIC3 ont un seuil de miction plus faible et un volume de miction plus élevé (Montalbetti et al., 2018).

5.2 Système nerveux central

Les canaux ASIC1a, 2a, 2b et 4 sont exprimés dans le SNC non seulement au niveau du cerveau (bulbe olfactif, hippocampe, cervelet, cortex, tronc cérébral) (Hoshikawa et al., 2017; Price et al., 1996; Waldmann et al., 1997a; Wemmie et al., 2002) mais aussi dans la moelle épinière (Baron et al., 2008; Duan et al., 2007; Wu et al., 2004). Ils sont impliqués dans de nombreux rôles physiologiques comme physiopathologiques que nous allons détailler ci-après.

Même au niveau central, les canaux ASIC restent associés à la nociception et à la douleur. Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, l'injection de mambalgine, un bloqueur des ASIC dont tous ceux exprimés dans le SNC (sauf ASIC4), en périphérie produit des effets analgésiques. Les effets centraux de son injection dans le SNC produit des effets analgésiques forts de la même amplitude que la morphine avec des effets secondaires moindre. Cet effet au niveau central serait porté par les canaux ASIC1a et ASIC2a (Diochot et al., 2012). De même dans une moindre mesure la psalmotoxine 1 (PcTx1), un autre peptide inhibiteur du canal ASIC1a (Escoubas et al., 2000), produit des effets analgésiques puissants lors de son injection dans le SNC (Mazzuca et al., 2007).

Dans un même temps, les canaux ASIC exprimés dans le cerveau ont très vite attiré l'attention, et ont rapidement été associé aux fonctions de plasticité, d'apprentissage et de mémorisation (Wemmie et al., 2002). Les canaux ASIC1a et ASIC2a ont été mis en évidence dans la structure hippocampique, comme participant aux processus de plasticité (Askwith et al., 2004). ASIC1a a été décrit dans les terminaisons post synaptique, et jouant un rôle dans l'homéostasie du calcium. Cette fonction lui permet de réguler la protéine kinase calmoduline-dépendante II (CaMKII) et de gérer la densité d'épines dendritiques (Zha et al., 2006). Une étude supplémentaire a pu mettre en évidence la présence d'ASIC1 dans les régions denses en épines dendritiques, suggérant un rôle des canaux ASIC dans les mécanismes de plasticité.

En effet dans l'amygdale, celui-ci contribuerait au conditionnement à la peur sans que cela ne touche le comportement de peur innée (Taughner et al., 2017; Wemmie et al., 2002, 2003). Cependant chez les souris ASIC1a KO, la restauration d'ASIC1a dans l'amygdale, et plus précisément les synapses cortico-basolatérales et les synapses intra-amygdaliennes (Chiang et al., 2015), permettrait de récupérer l'apprentissage de la peur (Coryell et al., 2008). ASIC4, dont le fonctionnement reste flou mais qui reste néanmoins connu pour down-réguler les autres sous unités ASIC, semble participer à réguler ce comportement de peur inné en exacerbant le comportement anxieux chez les souris ASIC4 KO (Lin et al., 2015).

Très récemment, des travaux ont démontré que ASIC4, régulé par la follistatine dans l'hippocampe, est impliqué dans l'apprentissage et la potentialisation à long terme (LTP) chez les souris, suggérant un rôle central du canal ASIC4 dans la cognition et son déclin lié à l'âge (Chen et al., 2021b). De manière plus générale ASIC1 & 2 sont impliqués dans les mécanismes de défense face aux stimuli aversifs. La perte de ces canaux chez la souris entraîne une baisse du freezing lors de conditionnement contextuel et auditif de la peur, mais aussi en réponse à une odeur de prédateur ou inhalation de CO₂ (Coryell et al., 2007; Price et al., 2014; Ziemann et al., 2009).

De plus des travaux récents ont démontré que l'exposition au CO₂ améliore la consolidation mémorielle chez la souris via ASIC1 présent dans l'amygdale (Lin et al., 2021). De façon intéressante, la création de souris transgéniques exprimant ASIC3 dans les mêmes structures cérébrales qu'ASIC1a, modifie les assemblages des sous unités ASIC et forme des hétéromères ASIC1a/3. Cette formation d'hétéromères va altérer les propriétés biophysiques des canaux ASIC natifs (dont la perméabilité calcique), inhibant ainsi le conditionnement à la peur (Vralsted et al., 2011).

Le comportement de panique et la dépression trouve eux aussi leur source dans l'amygdale et mettent en jeu ASIC1a de façon prépondérante et ASIC2. Dans ces études la perte d'ASIC1a augmenterait l'activité dans le test de nage forcée (Coryell et al., 2009; Price et al., 2014) et permettrait d'empêcher la baisse des niveaux de facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) dans l'hippocampe, signe biochimique de la dépression (Coryell et al., 2009).

De plus, la perte d'ASIC1a aurait des effets antidépresseurs indépendants et additifs à des antidépresseurs pharmacologiques utilisés couramment (Coryell et al., 2009). Une autre étude suggère qu'ASIC1a participe à la transmission synaptique dans le noyau accumbens (NAc) et joue un rôle dans le comportement addictif associé à la cocaïne. ASIC1a dans le NAc aurait pour rôle de réduire la plasticité induite par la cocaïne et les comportements associés (Kreple et al., 2014).

L'expression des canaux ASIC et spécifiquement ASIC1 et/ou ASIC2, sont présent dans des structures cérébrales associées au traitement de l'information douloureuse, comme la substance grise périaqueducule (PAG), le cortex angulaire supérieur (ACC) (Gobetto et al., 2021) et l'amygdale.

Comme nous venons de le voir l'amygdale est particulièrement importante au niveau de la plasticité, mais elle est aussi très liée à la composante émotionnelle de la douleur (Corder et al., 2019). Le blocage des canaux ASIC dans l'amygdale va, comme nous l'avons évoqué, avoir des répercussions bénéfiques pour certaines comorbidités associées à la douleur (Aissouni et al., 2017).

Au sein de la moelle épinière, les canaux ASIC sont présents, notamment dans les structures associées à la transmission et la plasticité synaptique. Pour être précis c'est surtout les sous unités ASIC1a, 2a & 2b qui sont exprimés dans les neurones sensoriels de second ordre, recevant des inputs des afférences périphériques, et qui sont impliqués dans les mécanismes de modulation et de transmission des signaux douloureux (Baron et al., 2008; Duan et al., 2007; Wu et al., 2004).

De plus, ASIC1a a été décrit comme occupant un rôle important dans un mécanisme de sensibilisation/facilitation spinale appelé « Wind-up » (induit par stimulation périphérique répétée des fibres C et provoquant une augmentation progressive de la fréquence de décharge des potentiels d'action des neurones DRG), et dans l'hypersensibilité des neurones DRG en situation inflammatoire (Duan et al., 2007).

Les canaux ASIC semblent aussi impliqués dans les dégâts secondaires dus à une ischémie cérébrale, où l'activation d'ASIC1a induit une entrée de calcium et une nécroptose acide, en recrutant via son domaine C-terminal la protéine RIPK1 (Protéine kinase 1 interagissant avec les récepteurs). L'inhibition d'ASIC1a via PcTx1 réduirait la mort neuronale et les dommages tissulaires (Wang et al., 2020, 2015; Xiong et al., 2004). Les canaux ASIC1 semblent aussi impliqués dans le fonctionnement normal de l'olfaction chez la souris, où l'on observe un déficit de l'odorat chez les souris ASIC1 KO (Vann and Xiong, 2018).

Les canaux ASIC semblent impliqués dans de grandes pathologies cérébrales, telles que l'épilepsie où l'acidose qui résulte après les crises semble être un signe de fin des crises. Chez les animaux où les crises sont provoquées par chimio-convulsivants, l'absence d'ASIC1a provoque des crises plus sévères tandis que la surexpression induit l'effet inverse. ASIC1a, ne réduisant ni le seuil de déclenchement, ni le début des crises, semble pourtant limiter leur durée (Ziemann et al., 2008).

L'activation des canaux ASIC1a par inhalation de CO₂ semble un moyen détourné de raccourcir les crises en abaissant le pH au niveau cérébral. Cette baisse de pH réversible permet de maintenir une activation d'ASIC1a dans les neurones inhibiteurs durant la crise. D'un autre côté, la baisse du métabolisme du glucose dans l'hippocampe des patients épileptiques induit une up-régulation de la sous unité ASIC2a en supprimant l'expression du facteur de transcription CP2 (TFCP2), ce qui renforce l'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux du CA1 (Cornus amonis). Ceci a pour conséquence d'augmenter la sensibilité aux crises des patients qui présentent une épilepsie du lobe temporal (Zhang et al., 2017).

5.3 Autres tissus

Toutes les sous unités des canaux ASIC sont exprimés hors des tissus neuronaux, et sont retrouvés dans beaucoup de tissus dans des situations pathologiques ou physiopathologiques. Ils vont être retrouvés dans au niveau gustatif où les canaux ASIC2 participent à la détection du goût acide chez le rat (Ugawa et al., 2003), mais ne semblent pas nécessaire chez la souris (Richter et al., 2004).

Chez l'homme il existe un type de « délétions naturelles » des canaux ASIC dans les cellules gustatives, aboutissant à une agueusie acide (absence de perception du goût acide). Il est intéressant de noter que ce défaut de perception n'affecte pas les autres modalités du goût, comme le sucré, salé et l'amertume (Huque et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la modalité de la perception du goût acide est indépendante des autres modalités.

On retrouve aussi ASIC2 & 3 au niveau de la rétine, où ils sont impliqués dans la protection contre la dégénérescence (Ettaiche et al., 2004, 2009). Le canal ASIC3 est aussi présent dans les cellules ciliées de la cochlée (Hildebrand et al., 2004), où la délétion chez les souris provoque un déficit d'audition. Ce déficit d'audition se retrouve à la fois chez la mère qui n'entends plus les cris des souriceaux dans les ultrasons et basse fréquences (4-32KHz), et chez les souriceaux qui subissent une altération de leur développement social (Wu et al., 2009).

Les canaux ASIC sont présents dans les cellules du système immunitaires où ils vont réguler différentes fonctions selon le type cellulaire ; ASIC1-3 vont être impliqué dans l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques (Tong et al., 2011), ASIC1 & 3 dans la phagocytose des macrophages (Kong et al., 2013), ASIC1a dans la communication des astrocytes dans la barrière hémato encéphalique (Yang et al., 2016), ASIC1 & 2a dans la modulation de la myéline et la clairance des débris par la microglie (Yu et al., 2015), ou encore ASIC1 dans la myélinisation et la communication microgliale (Foster et al., 2021; Yu et al., 2015).

Les canaux ASIC sont notamment exprimés, sans distinction dans certaines cellules cancéreuses particulièrement virulentes et sont impliqués dans la prolifération et la migration de ces cellules (Tian et al., 2017; Wang et al., 2021; Zhou et al., 2017). De façon générale ils semblent aussi impliqués dans les dégâts secondaires dus à une ischémie, où l'activation d'ASIC1a induit un influx calcique, et provoque l'apoptose cellulaire dans le rein (Song et al., 2019) ou le cœur (Redd et al., 2021). L'inhibition d'ASIC1a par la toxine PcTx1 permet de réduire les dégâts tissulaires induits par ces situations ischémiques.

De plus, les canaux ASIC1-3 sont présents dans les cellules musculaires lisses des artères cérébrales, pulmonaires et carotidiennes. Tandis qu'ASIC2 semble jouer un rôle dans le tonus myogénique en association avec les β - et γ -ENaC, en agissant comme mécanosenseur (Gannon et al., 2008), ASIC1a grâce à sa perméabilité calcique (*cf.* Chapitre 4.1), a été décrit comme acteur de la vasoconstriction, du remodelage vasculaire et de l'hypertrophie ventriculaire associés à l'hypertension pulmonaire induit par hypoxie chronique (Jernigan, 2015).

Isoforme	Distribution tissulaire	Physiologie et physiopathologie
ASIC1a	<p>SNC: moelle épinière, cerveau (frontal, mésencéphale, tronc cérébral, cervelet, hippocampe, cortex), cellules de la lignée oligodendrocytaire</p> <p>SNP : Neurones DRG, nerf sciatique, ganglion de la spirale cochléaire</p> <p>Autres : Lignée cellulaire de glioblastome, muscle lisse vasculaire, rétine, os, poumon, langue, vessie, intestin, cœur, rein</p>	<p>Fonction rétinienne, plasticité synaptique</p> <p>Durée des crises d'épilepsie, conditionnement à la peur, anxiété, sclérose en plaques, dépression, comportement de dépendance, hypertension pulmonaire, prolifération et migration des cellules cancéreuses pulmonaires, up-régulation pendant la capsulite, migration des cellules cancéreuses du pancréas (avec ASIC3), up-régulation par l'inflammation/la douleur inflammatoire dans la moelle épinière, dommages secondaires après un accident vasculaire cérébral et une lésion de la moelle épinière, lésion ischémique après reperfusion dans le cœur et les reins, cancer</p>
ASIC1b	<p>SNC : Moelle épinière et cerveau chez le rat (pré frontal, mésencéphale, tronc cérébral, cervelet, hippocampe)</p> <p>SNP : Neurones DRG</p> <p>Autres : Oreille interne, cellules ciliées cochléaires</p>	<p>Nociception, cancer</p>
ASIC2a	<p>SNC : Moelle épinière, cerveau (amygdale, hippocampe, cervelet, bulbe olfactif, cortex, tronc cérébral), cellules de la lignée oligodendrocytaire</p> <p>SNP : Neurones DRG, nerf sciatique, ganglion de la spirale cochléaire, peau</p> <p>Autres : Rétine, cœur, cellules gustatives, os, cellules gliales, vessie</p>	<p>Mécanosensation, transduction visuelle, goût, homéostasie cardiovasculaire</p> <p>Invasion et métastases dans le cancer colorectal, susceptibilité au bruit, up-régulation pendant la capsulite, up-régulation par l'inflammation dans la moelle épinière, up-régulation après une cystite, cancer</p>
ASIC2b	<p>SNC : moelle épinière, cerveau (amygdale, hippocampe, cervelet, bulbe olfactif, cortex, tronc cérébral)</p> <p>SNP : Neurones DRG, nerf sciatique, ganglion spiralé cochléaire</p> <p>Autres : Rétine, cellules gustatives</p>	<p>Transduction visuelle, homéostasie cardiovasculaire, goût</p> <p>Cancer</p>
ASIC3	<p>SNC : moelle épinière, cerveau (faible expression ; augmentée dans l'épilepsie)</p> <p>SNP : neurones DRG, nerf sciatique, fibres neuronales afférentes du côlon, ganglion spiralé cochléaire</p> <p>Autres : Lignée cellulaire de glioblastome, artérioles musculaires, muscle, articulation, intestin, cœur, oreille interne, rétine, cochlée, os, testicule, tissus adipeux, vessie, peau</p>	<p>Métabo-récepteur, toucher cutané et nociception, homéostasie cardiovasculaire, audition</p> <p>Mécanosensibilité et inflammation viscérale, douleur inflammatoire, démangeaison, migration des cellules cancéreuses du pancréas (avec ASIC1a), inhibition de l'épilepsie, angine de poitrine, hyperalgésie musculaire, up-régulation pendant la capsulite, up-régulation après une cystite, cancer</p>
ASIC4	<p>SNC : moelle épinière, tronc cérébral, cerveau (bulbe olfactif, glande pituitaire, striatum, hippocampe, amygdale, thalamus, hypothalamus, cortex, cervelet), cellules de la lignée oligodendrocytaire</p> <p>SNP (faible expression) : Neurones DRG (nouveau-né) et ganglion sympathique (nouveau-né), nerf sciatique</p> <p>Autres : Oreille interne, hypophyse</p>	<p>Rôle dans la suppression de la peur</p>

Tableau 4 : Expression tissulaire et rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux ASIC chez les mammifères.

(Adapté et complété d'après Foster et al., 2021; Sheng et al., 2021; Tian et al., 2017; Wu et al., 2017; Zhou et al., 2017)

6. Pharmacologie et régulateurs des canaux ASIC

6.1 Protéines partenaires

Les canaux ASIC présentent des extrémités N- et C-terminales intracellulaires, dont les séquences possèdent des sites d'interactions avec d'autres protéines. Ces interactions ont pour certaines déjà été décrites, avec de multiples effets allant de la maturation de la protéine, sa dégradation, son expression et sa localisation jusqu'à son gating (Cullinan et al., 2021; Zha, 2013).

Ces interactions protéine-protéine peuvent se faire de manière directe avec les extrémités du canal, ou bien indirecte via d'autres partenaires protéiques pour former des complexes multi protéiques, intégrant parfois d'autres canaux ioniques. En bref, les canaux ASIC, comme beaucoup de canaux ioniques, ne sont jamais seuls et leurs interactions avec d'autres protéines produisent de nombreux effets qui sont résumés dans le Tableau 5.

Les protéines intracellulaires agissant de pair avec les canaux ASIC, sont majoritairement des protéines accessoires. La majorité interagissent directement avec les canaux ASIC via le motif PDZ présent dans l'extrémité C-terminale, comme PSD-95, CIPP, NHERF1 & 2, Lin7-B ou encore PICK1 (Anzai et al., 2002; Baron et al., 2002; Cullinan et al., 2021; Deval et al., 2004, 2006).

Les domaines PDZ présents sur les canaux ASIC sont identiques pour ASIC1 et ASIC2, mais différents de celui d'ASIC3 ce qui expliquerait les différences de modulation entre les différentes sous unités ASIC par la même protéine. Les canaux ASIC natifs sont rarement des homomères, ajoutant plus de possibilités de modulation par les protéines partenaires.

En effet, ASIC3 n'est pas capable d'interagir seul avec PICK1, mais l'hétéromérisation avec ASIC2b que l'on retrouve dans les neurones sensoriels, confère la possibilité à la sous unité ASIC3 d'être modulée par PICK1 associée à ASIC2b, procurant une sensibilité à la PKC au canal hétéromérique (Deval et al., 2004). Ce mécanisme est retrouvé pour d'autres protéines évoquées dans le Tableau 5.

Comme abordé précédemment certaines protéines comme la stomatine, et les STOML1 & 3, semblent contribuer au rôle possible des canaux ASIC dans la mécano sensibilité (Brand et al., 2012; Lapatsina et al.; Price et al., 2004). Les protéines du cytosquelette semblent être elles aussi de bons candidats dans la participation à la mécanosensibilité des canaux ASIC (Cheng et al., 2018).

A l'heure actuelle les modalités nécessaires à l'activation directe ou indirecte des canaux ASIC par des stimuli mécaniques restent floues, et des travaux restent encore à venir sur le sujet. Néanmoins, il paraît indéniable que l'implication des canaux ASIC dans la mécanosensitivité est présente.

Certains travaux portant sur les interactions des canaux ASIC avec des partenaires protéiques, se sont orientés sur l'association avec d'autres canaux ioniques. Ces travaux ont suggéré des interactions avec différents canaux possibles comme les canaux GABA-A (Zhao et al., 2014), 5HT₃-R (Su et al., 2018), P2X (P2X_{3&5}) (Birdsong et al., 2010; Stephan et al., 2018), ENaC α (Trac et al., 2017), BK_{Ca} (Petroff et al., 2008), Kv1.3 (Petroff et al., 2012) et CFTR (Su et al., 2006). Bien que ces travaux méritent d'être approfondis, ils offrent des perspectives pour de nouveaux rôles et régulations des canaux ASIC en association avec d'autres canaux ioniques.

Protéines partenaires	Rôles protéines	Sous unité(s) ASIC	Site d'interaction	Effets sur ASIC
Stomatine	Protéine membranaire homologue de MEC-2	ASIC1a	?	Pas d'effet
		ASIC2a	?	∇ τ inactivation
		ASIC3	C ter, TM1	∇ I _{max}
STOML1	Protéine membranaire	ASIC1a	?	∇ I _{max}
		ASIC1b, 2a	?	Pas d'effet
		ASIC3	?	∇ τ inactivation
STOML3	Protéine membranaire homologue de MEC-2, liaison vésicule/microtubule	ASIC1a, 1b, 2b, 4	?	Pas d'effet
		ASIC2a, 3	?	∇ I _{max}
α-actinine 1	Lie ASIC au cytosquelette d'actine	ASIC1a	C ter	Pas d'effet
α-actinine 4	Lie ASIC au cytosquelette d'actine	ASIC1a	C ter	∇ I _{max} , ↗ sensibilité aux protons, ∇ τ réactivation
CIPP	Protéine membranaire accessoire, trafficking	ASIC3	C ter (PDZ)	↗ I _{max} , ↗ sensibilité aux protons
PSD-95	Protéine accessoire membranaire	ASIC2a, 3	C ter (PDZ)	∇ I _{max} , ∇ expression membranaire
NHERF1	Protéine accessoire membrane-cytosquelette	ASIC3	C ter (PDZ)	↗ I _{max} , ↗ I _{soutenu} , ↗ expression membranaire, ∇ τ réactivation
NHERF2	Protéine accessoire membrane-cytosquelette	ASIC3	C ter (PDZ)	↗ I _{max} , ↗ I _{soutenu}
Lin-7B	Protéine accessoire, distribution et recyclage membranaire	ASIC1a	?	↗ I _{max}
		ASIC3	C ter (PDZ)	↗ I _{max} , ↗ expression membranaire
AP2	Protéine adaptatrice endocytose	ASIC1a	C ter	∇ I _{max} , ∇ expression membranaire
PICK1	Protéine accessoire cytosolique	ASIC1a	C ter (PDZ)	↗ I _{max}
		ASIC2a, 2b	C ter (PDZ)	Permet l'action de la PKC sur ASIC2
Parkine	E3 ubiquitine lygase (via PICK1)	ASIC2a	C ter	Empêche ↗ I _{max} induite par PICK1/PKC
AKAP150	Protéine accessoire cytosolique	ASIC1a	Cter	↗ I _{max} via PKA
		ASIC2a	N ter & C ter	↗ I _{max}
Ht-31	Peptide synthétique, inhibiteur d'AKAP	ASIC1a	?	Empêche ↗ I _{max} induite par AKAP150/PKA
Annexine II p11.1	Trafficking des récepteurs synaptiques	ASIC1a	Nter	↗ I _{max} , ↗ expression membranaire
PIST	Protéine accessoire membranaire du golgi, trafficking et dégradation	ASIC3	C ter	↗ I _{max}
RIPK1	Protéine accessoire avec les récepteurs protéines kinases	ASIC1a	C ter	Déclanche necroptose via ASIC1a
Hsp90, & Grp4	Protéines chaperones	ASIC1a	?	?
Hsc70	Protéine chaperone	ASIC2a	?	↗ expression membranaire
Grp78 & calnexine	Protéines chaperones	ASIC1a, 2a	?	?
GABA _A	Canal chlore inhibiteur	ASIC1a	?	∇ I _{max}
5HT3-R	Canal ionique sérotoninergique	ASIC3	?	↗ I _{max}
P2X3	Canal ionique purinergique sensible à l'ATP	ASIC1a, 2a, 3	?	∇ I _{max} P2X3 via ASIC1a, 3 ∇ I _{max} ASIC1a, 2a, 3 via P2X3
P2X5	Canal ionique purinergique sensible à l'ATP	ASIC3	?	↗ I _{max} , ↗ sensibilité aux protons

ENaCa	Canal sodique épithélial	ASIC1a	Hétéromérisation ?	↗ conductance
CFTR	Canal chlore épithélial sensible à l'ATP et AMPc	ASIC3	?	↘ I _{max} ASIC3 via CFTR ↘ I _{max} CFTR via ASIC3
BK_{Ca}/Kv_{1.3}	Canal potassique activé par le voltage et le calcium	ASIC1a, 2a, 2b, 3	Boucle extracellulaire	↘ I BKCa/Kv1.3 via ASIC à pH7.4 levé à pH acide ↘ τ inactivation ASIC via BK

Tableau 5 : Modulation des canaux ASIC par des protéines partenaires.

Résumé des effets sur les canaux ASIC (Adapté et complété d'après Cullinan et al., 2021; Zha, 2013; Zhao et al., 2014; Su et al., 2006, 2018; Trac et al., 2017; Birdsong et al., 2010; Petroff et al., 2008, 2012; Stephan et al., 2018).

6.2 Modulateurs exogènes

Depuis la découverte des canaux ASIC dans la superfamille des canaux ENaC/DEG, par homologie nous l'avons vu, l'amiloride est le premier inhibiteur identifié de ces canaux. Depuis la première publication décrivant les canaux ASIC, la recherche pharmacologique a eu le temps de progresser au fil des ans. Depuis de nombreuses molécules ont pu être découvertes et décrites. Il apparaît que les modulateurs des canaux ASIC sont de nature variée, de l'ion pour le plus petit modulateur, jusqu'aux toxines d'animaux, en passant par des petites molécules synthétiques ou naturelles, et les lipides.

Dans cette partie je broserai un portrait des principaux modulateurs des canaux ASIC, et notamment des molécules auxquelles j'ai eu recours lors de ma thèse. La liste des principaux modulateurs couramment retrouvés dans la littérature est répertoriée dans le tableau 6, et le lecteur peut s'il le désire se référer à la revue de Baron and Lingueglia, 2015.

Amiloride

L'amiloride est un médicament prescrit en cas d'hypertension artérielle et d'insuffisance cardiaque. Il s'agit d'un diurétique épargneur de potassium, qui agit de manière aspécifique sur la superfamille des canaux ENaC/DEG/ASIC, de façon réversible et avec une affinité assez faible. En effet, son action inhibitrice sur les canaux ASIC s'exerce aux concentrations de l'ordre du micro-molaire, avec une IC₅₀ de 5 à 100µM selon les assemblages des canaux ASIC.

De façon intéressante, la composante soutenue du courant ASIC3 n'est pas inhibée par l'amiloride (Besson et al., 2017). De plus ce composé à forte concentration (~560µM) provoque une potentialisation des courants ASIC induit par acidification, et active les canaux ASIC3 homomériques et les hétéromères ASIC3+1b (Li et al., 2011).

Il a été montré par co-cristallisation que l'amiloride module les canaux ASIC en obstruant partiellement le pore du canal dans le vestibule extracellulaire (Bacongus et al., 2014). Cependant la découverte d'amiloride cristallisé dans la poche acide d'ASIC1a pourrait expliquer l'effet activateur de l'amiloride sur les canaux ASIC (Bacongus et al., 2014; Yu et al., 2011). De plus, il a été montré que cet effet activateur serait dépendant de l'intégrité du domaine de détection de ligands non protoniques, situé au niveau du domaine palme du canal ASIC3 (Li et al., 2011).

GMQ

Le 2-guanidine-4-méthylquinazoline (GMQ) est une molécule synthétique, possédant un groupe guanidinium et un noyau hétérocyclique. Il a été décrit comme activateur du canal ASIC3 à pH physiologique (i.e., 7,4) avec une EC_{50} de $\sim 1\text{mM}$, et notamment capable de générer un courant soutenu non inactivant. Son effet serait porté par le domaine de détection de ligands non protoniques du canal, situé au niveau du domaine palme, également impliqué dans l'effet d'activation des canaux ASIC par l'amiloride à forte concentration (Besson et al., 2017; Yu et al., 2010, 2011).

De manière générale le GMQ va provoquer un décalage acide de la courbe d'inactivation pH-dépendante des canaux ASIC1a, 1b, 2a, et 3. Et dans le même temps va provoquer un décalage alcalin pour ASIC3 et acide pour ASIC1a et 1b, de la courbe d'activation pH dépendante du canal. Ainsi à pH physiologique le GMQ va provoquer un courant de fenêtre spécifique d'ASIC3. Ces effets spécifiques du GMQ selon les sous unités ASIC suggère un autre site d'interaction possible (Alijevic and Kellenberger, 2012; Besson et al., 2017).

6.3 Toxines

Les peptides de manière générale et particulièrement les toxines issues des venins, ont toujours été des sources riches de composés pharmacologiques agissant sur les canaux ioniques. A ce titre les canaux ASIC ne font pas exception à la règle.

Psalmotoxine (PcTx1)

La PcTx1 est un peptide de 40 acides aminés isolé du venin de la mygale sud-américaine *Psalmopoeus cambridgei* (Escoubas et al., 2000). A pH physiologique cette toxine est capable d'inhiber le canal ASIC1a et l'hétéromère ASIC1a+2b à une concentration de l'ordre du nanomolaire (Escoubas et al., 2000; Sherwood et al., 2011).

Il provoque à l'inverse une activation du canal ASIC1b et ASIC1a+2a à plus forte concentration (~100nM) (Joeres et al., 2016; Liu et al., 2018). Ces effets seraient dus au mode d'action de la toxine sur les canaux ASIC. Il a été montré que la PcTx1 se fixe au niveau de la poche acide du canal et ainsi stabilise son état fermé, ce résultat a été confirmé par co-cristallisation d'un complexe cASIC1a-PcTx1 (Salinas et al., 2006; Bacongus and Gouaux, 2012).

Mambalgines

Le groupe des mambalgines rassemblent 3 peptides, sobrement appelés mambalgine 1, 2 et 3, tous identifiés dans les fractions de venin du mamba noir *Dendroaspis polylepis* et la mambalgine 3 chez le mamba vert *Dendroaspis angusticeps* avec une abondance de moins d'1% dans la totalité du venin (Diochot et al., 2012; Baron et al., 2013). Ces trois mambalgines sont composés de 57 acides aminés dont seul un résidu diffère entre les trois peptides. Chacun d'eux ayant les mêmes propriétés on parlera dorénavant de la mambalgine sans distinction entre les trois peptides.

La mambalgine est un inhibiteur des canaux ASIC1 homomériques (ASIC1a ou 1b) et des hétéromères contenant ASIC1+2, avec une affinité allant de 11 à 250nM. L'effet de la mambalgine serait dû à sa fixation dans la poche acide du canal, provoquant un shift de la courbe d'activation pH dépendante rendant le canal beaucoup moins sensible à l'acidification (Diochot et al., 2012). Son application dans les modèles de douleurs impliquant ASIC1a et/ou ASIC1b produit un effet analgésique fort (pour revue voir Baron and Lingueglia, 2015; Heusser and Pless, 2021).

APETx2

Cette toxine de 42 acides aminés est issue de venin d'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Diochot et al., 2004). APETx2 est capable d'inhiber les canaux ASIC3 homomériques avec une affinité de l'ordre de ~ 50 nM et plusieurs canaux hétéromériques contenant ASIC3 avec une affinité oscillant entre $IC_{50} \sim 117$ nM pour ASIC3+2b et $IC_{50} \sim 2$ μ M pour ASIC3+1a. Cette toxine est capable à la fois d'inhiber le courant transitoire d'ASIC3 mais aussi la composante soutenue à pH7,0 (Deval et al., 2011). Cependant la composante soutenue du courant ASIC3 à pH5,0 qui dépendent d'un mécanisme différent (vu dans la partie 4.3) n'est pas affectée par APETx2 (Diochot et al., 2004).

Cette toxine n'est pas exclusivement spécifique à ASIC3, elle affecte d'autres canaux ioniques comme le $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$ (Peigneur et al., 2012), et le canal potassique hERG (Kv11.1) (Jensen et al., 2014). L'application d'APETx2 chez l'animal produit un effet analgésique réversible dans beaucoup de modèles de douleur (pour revue voir Dulai et al., 2021).

MitTx

Cette toxine a été identifiée et isolée à partir de venin de serpent corail du Texas *Micrurus tener tener* connu pour sa morsure provoquant une douleur violente. Cette toxine hétérodimérique est composée de deux sous unités associées de façon non covalente, MitTx- α de 60 acides aminés et MitTx- β de 120 acides aminés. Ce peptide contrairement aux autres toxines décrites ici, induit un effet activateur sur les canaux ASIC et plus particulièrement les canaux homomériques ASIC1a et ASIC1b avec une forte affinité (EC_{50} 9 et 23nM respectivement) et ASIC3 à plus forte concentration (EC_{50} 830nM).

La MitTx est aussi capable d'activer les canaux hétéromériques contenant ASIC1a (EC_{50} 75nM) et de potentialiser les courants ASIC2a à la même concentration. Cette activation des canaux ASIC par la MitTx est particulièrement longue à laver (Bohlen et al., 2011). Ses domaines d'interaction avec le canal ASIC ont pu être mis au jour grâce aux expériences de co-cristallisation cASIC1a-MitTx (Baconguis et al., 2014).

Il apparait que cette toxine interagit avec chacune des sous unités du canal ASIC, formant un contact depuis le poignet jusqu'au domaine de l'articulation et pouce. Ces travaux ont aussi permis d'avoir une structure cristallisée du canal à l'état ouvert, étant donné que cette toxine bloque les canaux ASIC dans cet état (Baconguis et al., 2014). Une injection de MitTx en intra plantaire *in vivo* chez la souris induit une douleur spontanée. Ce comportement douloureux est abolie chez les souris ASIC1a KO (Bohlen et al., 2011).

6.4 Modulateurs endogènes

De nombreuses molécules endogènes associées à la douleur et à l'inflammation ont été décrites comme modulateurs des canaux ASIC. Parmi ces composés on retrouve des polyamines, des neuropeptides, des médiateurs inflammatoires et, plus récemment, des lipides.

Amines et polyamines

La découverte du GMQ, précédemment décrit, a donné lieu à un criblage des molécules associées pouvant agir sur le domaine de détection de ligands non protoniques des canaux ASIC. Il en est ressorti que dans ces modulateurs possibles certaines amines et polyamines étaient capables de moduler les canaux ASIC. L'agmatine et l'arcaïne son analogue, sont des polyamines endogènes initialement décrites comme inhibiteurs des récepteurs NMDA, qui sont capables d'activer les canaux ASIC3 et ASIC3+1b à pH physiologique à des concentrations assez élevées de ~1-10mM (Yu et al., 2010).

La spermine, un agoniste des récepteurs NMDA est capable quant à elle de potentialiser les canaux ASIC1 et ASIC1a+2a avec une concentration de l'ordre de 500µM (Babini et al., 2002; Duan et al., 2011). Enfin la sérotonine serait capable de potentialiser la composante soutenue des courants ASIC3 et ASIC3+1 (EC_{50} 40µM). Bien qu'elles soient plus décrites comme modulateurs endogènes qu'activateur, du fait que la plupart du temps ces amines et polyamines ne sont pas retrouvés dans de telles concentrations *in situ*. Cependant il a été montré que les actions combinées de différents modulateurs peuvent avoir un effet synergique sur les canaux ASIC et nécessiterait donc une concentration moindre de chacun de ces composés dans un mélange. Ces observations renforcent l'idée que le canal ASIC3 serait un détecteur de coïncidence (Deval et al., 2008; Peng et al., 2015).

ATP et lactate

Ces composés sont retrouvés dans l'organisme à la suite d'une ischémie ou à un effort violent notamment dans le muscle. Lors de ces conditions nous l'avons vu le pH devient plus acide, il s'accompagne souvent de la production de ces deux médiateurs (Immke and McCleskey, 2001a, 2001b). L'acide lactique à un effet potentialisateur sur les canaux ASIC1a et 3, dont la potentialisation du courant soutenu d'ASIC3 pourrait être impliqué dans les phénomènes d'angine de poitrine (Immke and McCleskey, 2001b; Sutherland et al., 2001; Yagi et al., 2006). Cet acide lactique n'interagit pas directement avec les canaux ASIC qu'il module, il agit en chélatant les ions cationiques bivalents extracellulaires levant ainsi le blocage des canaux ASIC par le calcium.

Le cas de l'ATP est assez intéressant, du fait de son effet sur les complexes ASIC/P2X. Il aurait des effets dichotomiques selon le canal P2X avec lequel les canaux ASIC sont associés. Via l'interaction des canaux ASIC1a et 3 avec P2X5, l'ATP est capable de potentialiser les courants ASIC natifs en provoquant un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus basiques (Birdsong et al., 2010; Light et al., 2008).

En revanche, l'association des canaux ASIC1a, 2a et surtout ASIC3 avec P2X3 réduit fortement la sensibilité des deux canaux du complexe pour leur agoniste (protons et ATP respectivement). Ainsi les canaux ASIC3 associés à P2X3 produisent des courants plus faibles lors d'acidification, et P2X3 aussi en réponse à l'ATP. Dans ce cas, l'application d'ATP avec un pH acide réduit la réponse des canaux P2X3 uniquement en présence d'ASIC3, alors que la réciproque n'est pas observée. Toutefois, l'application d'ATP en pH acide semble produire une hyperalgie cutanée chez le rat plus forte qu'à pH physiologique, suggérant une interaction additive des deux canaux produisant un effet algogène plus fort (Stephan et al., 2018).

Activateurs lipidiques

Comme je viens de l'évoquer dans la partie précédente, certains composés sont retrouvés en forte concentration dans l'inflammation. Parmi eux, certains lipides comme l'acide arachidonique (AA), et la lysophosphatidylcholine (LPC), qui sont des métabolites de l'homéostasie membranaire et sont produit lors de la dégradation de phosphocholine membranaire notamment.

L'AA est capable de potentialiser les courants ASIC1a, 2a, 3 et les courants ASIC natifs à une concentration de 1-10 μ M (Smith et al., 2007). Cet effet est retrouvé pour un lipide proche de l'AA, l'anandamide, un composé cannabinoïde possédant la même chaîne carbonée. Ces lipides agissent vraisemblablement de la même manière directement via le canal et non pas par une déformation de la membrane. Ils induisent un décalage de la courbe d'activation vers un pH plus alcalin et décalent le courant de fenêtre d'ASIC3 jusqu'à un pH proche du pH physiologique (Deval et al., 2008).

La LPC, un lipide retrouvé en forte concentration dans les liquides synoviaux de patients souffrant de douleurs articulaires chroniques, a été décrit comme activateur direct du canal ASIC3 à pH physiologique dans le même ordre de concentration que l'AA. La LPC induit donc une potentialisation des courants ASIC3 induit par acidification (1-10 μ M) et produit un courant non inactivant à pH7,4 (5-10 μ M). De plus sa co-injection intraplantaire chez l'animal avec de l'AA, induit une douleur spontanée en aiguë, réduite en présence d'amiloride ou APETx2, et chez les souris ASIC3 KO (Marra et al., 2016).

Les effets des activateurs lipidiques seront plus détaillés dans le chapitre suivant qui leur est entièrement consacré.

Nature des modulateurs		Concentration effective	Canaux ASICs modulés
Ions	Cations métalliques (Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Gd ²⁺)	IC ₅₀ 1,5µM-1mM	Tous
	Calcium (Ca ²⁺)	IC ₅₀ 1-10mM	Tous
	Zinc (Zn ²⁺)	IC ₅₀ 10nM-60µM EC ₅₀ 120µM	Bloquage ASIC1a(10nM), ASIC1b, ASIC3 Potentialise les hétéromères ASIC2a
	Chlore (Cl ⁻)	IC ₅₀ 10-150mM	ASIC1a
Molécules exogènes	Amiloride	IC ₅₀ 5µM-100µM EC ₅₀ ~560µM	Tous ASIC3, ASIC3+1b
	GMQ	EC ₅₀ 1mM	Tous (ASIC3 particulièrement)
	AINS (aspirine, ibuprofène)	IC ₅₀ 90-350µM	ASIC1a, ASIC2a, ASIC3
	CHF5074	IC ₅₀ ~50nM	ASICs natifs du SNC
	Propofol	IC ₅₀ 30-300µM	ASIC1a, ASIC3
	A-317567	IC ₅₀ ~2-30µM	ASIC3
	Streptomycine, neomycine	IC ₅₀ ~32-44µM	ASICs natifs du SNP
Molécules endogènes	Agmatine, arcaïne (polyamines)	EC ₅₀ ~1-10mM	ASIC3, ASIC3+1b
	Spermine (polyamines)	EC ₅₀ ~495µM	ASIC1a, ASIC1b, ASIC1a+2a
	Sérotonine	EC ₅₀ ~41µM	ASIC3
	Dynorphine	EC ₅₀ ~26-33nM	ASIC1a, ASIC1b
	Endomorphine	EC ₅₀ 25-50µM	ASIC3
	Histamine	EC ₅₀ 200µM-1mM	ASIC1a
	FMRFamide et peptides like	IC ₅₀ ~10-50µM	ASIC1a, ASIC1b, ASIC3
	NO et donneurs de NO	EC ₅₀ 10-100µM	Tous
	LPC & AA (lipides)	EC 1-10µM	ASIC3
	Lactate	EC 15mM	Tous
	ATP	IC 1-100µM via P2X3 EC 1-100µM via P2X5	ASIC1a, ASIC2a, ASIC3 ASIC1a, ASIC3
	Trypsine (protéase)	IC 1,5-7µM	ASIC1a particulièrement, ASIC1b
Toxines	PcTx1	IC ₅₀ ~0,4-4nM EC ₅₀ 25-150nM	ASIC1a, ASIC1a+2b ASIC1b, ASIC1a+2a
	APETx2	IC ₅₀ ~37nM-2µM	ASIC3, ASIC3+1, ASIC3+2b
	MitTx	EC ₅₀ 9-830nM	Tous (ASIC1 particulièrement)
	Mambalgines	IC ₅₀ ~11-250nM	ASIC1, ASIC1a+2
	Ugr9-1	IC ₅₀ ~1,5-10µM	hASIC3
	PhcTx1	IC ₅₀ ~100nM	Canaux natifs du SNP

Tableau 6 : Principaux modulateurs des canaux ASIC.
(Adapté et complété d'après Baron and Lingueglia, 2015).

III. Les activateurs lipidiques des canaux ASIC

1. Structure et caractérisation

Les différents activateurs lipidiques des canaux ASIC sont des médiateurs issus de la dégradation des lipides constituant la membrane lipidique des cellules. Parmi ceux que je détaillerai, nous retrouvons l'acide arachidonique (AA), la lysophosphatidylcholine (LPC), le facteur d'activation plaquettaire (PAF), et son précurseur le LysoPAF. Parmi ces lipides nous pouvons les classer en 3 sous types : les acides gras polyinsaturés (PUFA), les ester-lipides ou plus précisément les acyl-lipides, et les éther-lipides ou plus précisément encore les alkyl-lipides.

1.1 Découverte et caractérisation

C'est en 1847 que Théodore Nicolas Gobley décrit une matière phosphorée issue de tissus cérébraux et d'œufs de carpe. Il décrit ainsi la structure chimique de cette substance et l'appellera alors lécithine, dérivé à l'origine du mot grec « *lekithos* » (λεκιθος, jaune d'œuf). C'est en 1862 qu'Adolph Strecker, travaillant sur la caractérisation de la bile de porc et de bœuf, découvrit que la lécithine de la bile une fois bouillie générait un nouveau produit chimique azoté. Il nomma cette substance choline dérivé du mot grec « *chole* » (χολή, bile). C'est en 1874 par Gobley lui-même que cette substance initiale de lécithine fut caractérisée chimiquement comme étant de la phosphatidylcholine (PC) (Zeisel, 2012).

Les PC font partie des glycérophospholipides (GPL) membranaires les plus abondants des cellules animales et végétales, et forment un réservoir important de seconds messagers lipidiques. La LPC, autrefois appelé lysolécithine, est le dérivé de ces PC par clivage de l'acide gras présent en position *sn2* du noyau glycérol via la PLA2 et/ou du transfert des AG au cholestérol libre par la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT).

La première étude qui décrit la présence de LPC en 1946 fait état de taux plasmatiques élevés dans des conditions pathologiques telles que l'arthrite rhumatoïde et la jaunisse, mais aussi en cas de grossesse (Kuzell and Davison, 1946). En 1960, la LPC est identifiée comme produit métabolique de PC hydrolysé par la phospholipase A de venin de serpents *Crotalus adamanteus* (Marinetti et al., 1960).

Les alkyl-lipides ont été eux découverts en 1909 par Charles Dorée, dans une extraction lipidique d'étoile de mer. Il s'est avéré qu'une partie des lipides extraits étaient non seulement non saponifiables, mais qu'en plus de cela ils se comportaient comme des alcools (Dorée, 1909). C'est en 1924 que Robert Feulgen et K. Voit découvrent des éther-lipides particuliers, les plasmalogènes (alkényl lipides présentant une liaison vinyl-éther) (Feulgen and Voit, 1924). Résultat repris quelques années plus tard en 1957 par Guido V Marinetti et Joseph Erbland, qui parviennent à isoler et caractériser des plasmalogènes à partir de cœur de porc (Marinetti and Erbland, 1957).

Ces résultats ont permis de certifier que les éther-lipides n'étaient pas spécifiques seulement des animaux marins, ce qui a laissé le champ libre à de nouvelles études depuis lors dans la physiologie et la physiopathologie de ces lipides chez l'homme, et sur les mécanismes sous-jacents.

C'est notamment en 1966, que J.F. Barbaro et N.J. Zvaifler décrivent une substance provoquant une libération d'histamine induite par l'antigène, via les plaquettes productrices d'anticorps chez le lapin dans le cadre d'anaphylaxie cutanée passive (Barbaro and Zvaifler, 1966). Par la suite en 1971 Reuben P. Siraganian et Abraham G. Osler démontrent l'existence d'un « facteur soluble » capable d'activer les plaquettes (Siraganian and Osler, 1971).

C'est enfin un an plus tard que le groupe de Jacques Benveniste pousse l'étude un peu plus loin, et met en évidence ce fameux facteur induisant l'agrégation plaquettaire et la sécrétion d'histamine par ces dernières chez le lapin. C'est grâce à ce rôle que cette molécule obtiendra son nom de facteur d'agrégation plaquettaire (PAF) (Benveniste et al., 1972). Ce sera 2 ans plus tard que le même groupe mettra en lumière la nature lipidique du PAF (Benveniste, 1974), et déterminera par la suite par différentes digestions que le PAF est un lipide assimilé à la LPC, et que leurs propriétés structurales étaient très similaires.

Comme nous le verrons par la suite, le nom de PAF est finalement assez réducteur, car ses effets et ses actions au niveau physiologique et physiopathologique vont bien au-delà de ce rôle premièrement décrit.

1.2 Structure des lipides

Pendant longtemps, il a rarement été fait de distinction entre les acyl-lipides et les alkyl-lipides alors que leurs rôles, fonctions et biodisponibilités sont bien différents. Les acyl- et alkyl-lipides partagent des caractéristiques communes. Leur structure est composée autour d'un squelette glycérol que ce soit pour les acyl-lipides ou les alkyl-lipides. Ils vont être présents sous forme de GPL et aussi dans le cas qui nous intéresse de lyso-phospholipide.

Leur structure particulière va donner aux lyso-phospholipides (alkyl, acyl ou alkényl), une forme conique (contrairement aux phospholipides possédant deux chaînes d'acide gras qui ont une forme cylindrique) présentant une « queue » non polaire et un groupement de « tête » en position *sn3* (Figure 8). Cette « tête » est principalement de la choline ou de l'éthanolamine, et dans une moindre mesure l'inositol, la sérine ou encore plus rarement la thréonine. Pour les lyso-lipides qui nous intéressent il s'agit d'une tête polaire choline. Cela les dote de propriétés semblables à celles des détergents.

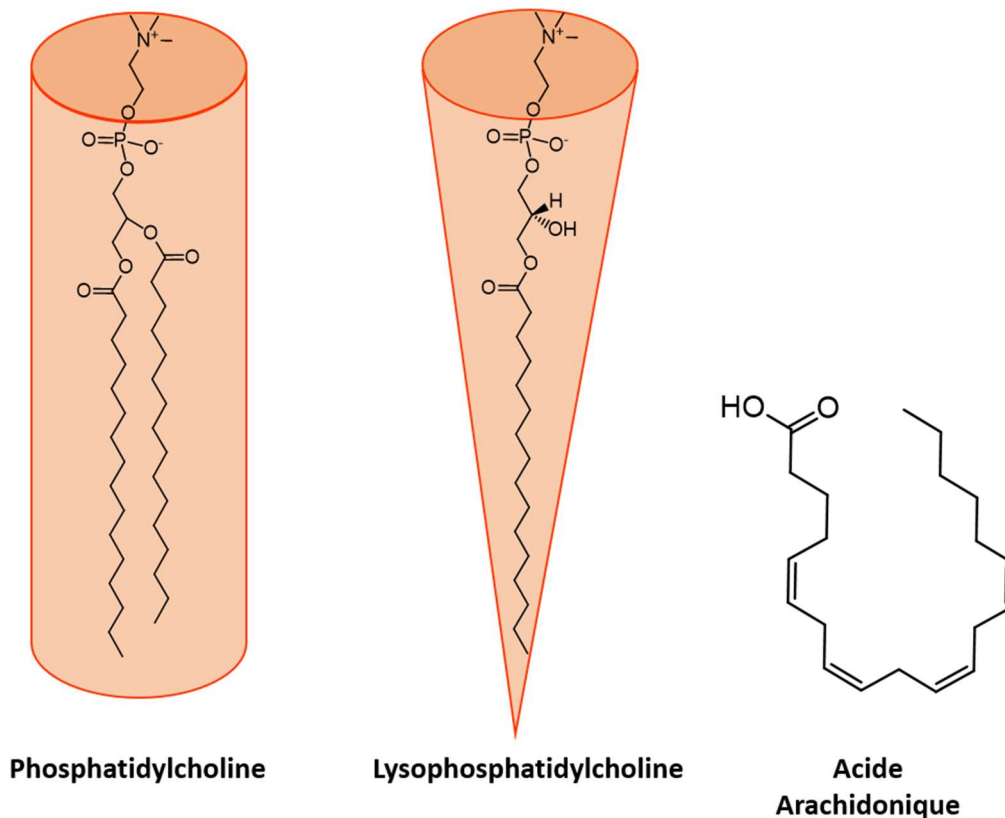


Figure 8 : Schéma des formes effectives des phospholipides.

A gauche la phosphatidylcholine présentant une forme de cylindre. Au centre la lysophosphatidylcholine possédant un seul acide gras présentant une forme de cône. A droite la structure de l'acide arachidonique possédant quatre insaturations présentant une forme d'épingle à cheveux.

La LPC qui a pour précurseur métabolique les PC, n'a donc qu'un seul AG (en position *sn1*) sur son squelette glycérol via une liaison ester. Alors que pour le cas du PAF ou du lysoPAF qui ont pour précurseurs les alkyl-lipides, ils vont présenter la particularité de posséder une liaison éther en position *sn1* du glycérol, en lieu et place d'une liaison ester dans le cas des acyl-lipides présentés plus loin. Ce qui induit par la même, la présence d'un alcool gras chez les alkyl-lipides à la place d'un acide gras pour les acyl-lipides.

La géométrie du lyso-lipide est aussi en grande partie due aux propriétés de cette « queue » présente dans sa structure. La combinaison de la longueur et de la saturation de cette « queue » peut modifier les propriétés biophysiques ainsi que l'activité du lyso-lipide. Le PAF présente l'exacte même structure que son précurseur le lysoPAF, à la seule différence qu'il présente un groupe acétyle en position *sn2*, introduit par la PAF acétyle transférase et l'acétyle CoA.

Les PC ou les alkyl-PC (comprenant alors les plasmanyl-PC contenant une liaison éther et les plasményl-PC possédant une liaison vinyl-éther) sont des constituants majoritaires des membranes cellulaires. À ce titre ils servent de précurseurs et vont avoir un rôle dans le stockage de second messagers lipidiques, car s'ils possèdent majoritairement en position *sn1* du glycérol, des AG C16:0, C18:0 ou C18:1 (ou alcool gras dans le cas des alkyl-lipides) (Ford and Gross, 1989; Wallner and Schmitz, 2011), ils présentent en position *sn2* toutefois une composition riche en PUFA, et particulièrement en AA (C20:4 ; ω -6) ou en acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 ; ω -3) (Braverman and Moser, 2012).

L'AA et le DHA sont relargués lors du clivage des PC via la PLA2 (Yang et al., 1996). L'AA est un médiateur lipidique et il est lui-même précurseur des eicosanoïdes via les cyclooxygénases ou les lipoxygénases-5 & -15 (Sharma and McHowat, 2011; Johnson et al., 2020). Sa structure présente 4 insaturations sous forme *cis* lui donnant une forme d'épingle à cheveux (Figure 8). Le DHA est lui aussi un précurseur, celui des docosanoïdes via les lipoxygénases-5 & -15 ou le cytochrome p450 (Pham and Bazan, 2021).

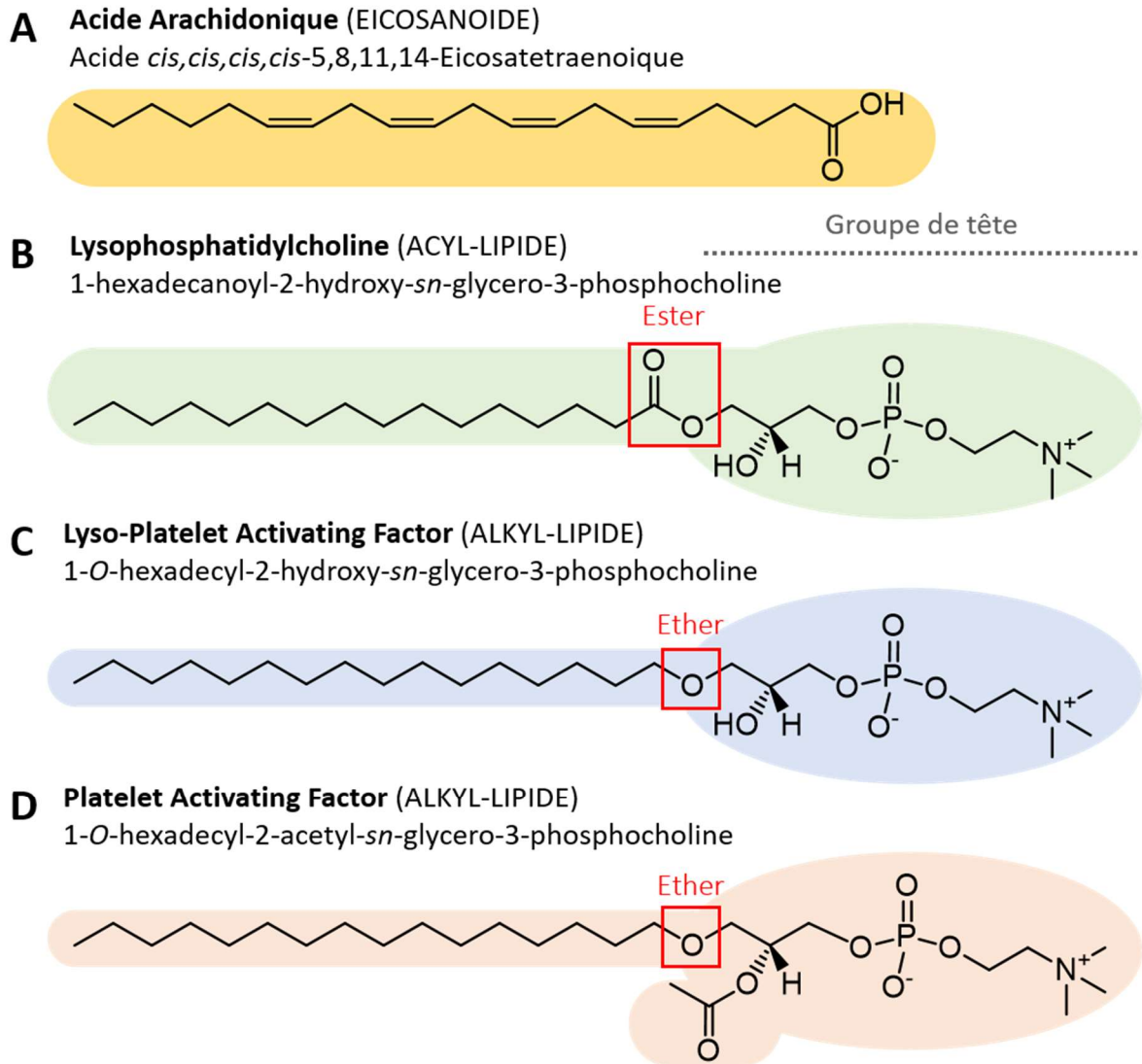


Figure 9 : Représentation 2D des structures des différents lipides activateurs des canaux ASIC.

A. Représentation de l'AA, un PUFA (20:4). **B.** Représentation de la LPC, un acyl lyso-phospholipide avec une liaison ester entre le *sn*1 du glycérol et l'acide gras (ici du de l'acide palmitique (C16:0)), et une tête polaire phosphocholine en position *sn*3. **C.** Représentation du lysoPAF, un alkyl lyso-phospholipide analogue de la LPC avec une liaison éther entre le *sn*1 du glycérol et le palmitate. **D.** Représentation du PAF, un alkyl lyso-phospholipide résultant de l'acétylation du lysoPAF en position *sn*2 du glycérol.

2. Métabolisme et répartition

2.1 Biosynthèse

Les voies métaboliques des lipides qui nous intéressent, qu'il s'agisse d'acyl-GPL ou d'alkyl-GPL, trouvent leur origine en un précurseur commun, le glycérol-3-phosphate (G3P) (Figure 10 & 14). Cette voie commune débute donc par cette molécule présente dans le peroxyosome, servant de base aux différents lipides possédant un squelette glycérol.

La première étape est de retirer un hydrogène présent en *sn2* du G3P pour générer du dihydroacétone phosphate (DHAP) via la G3P déshydrogénase. L'acétylation du DHAP en position *sn1* avec un acyl-CoA, sous l'action de la glycéron phosphate O-acyl transférase (GNPAT) va produire un acyl-DHAP. L'acyl-DHAP possédant à cette étape un AG va être le dernier précurseur commun aux voies métaboliques des acyl/alkyl-GPL (Figure 10 & 14).

Concernant les acyl-GPL, la sortie de l'acyl-DHAP du peroxyosome s'accompagne d'une réduction. Elle se produit via l'acyl/alkyl DHAP réductase produisant du 1-acyl-G3P, autrement connu sous le nom d'acide lysophosphatidique (LPA). La voie des alkyl-GPL, dont les étapes sont communes avec la voie des acyl-GPL jusqu'à l'acyl-DHAP, va subir une étape supplémentaire avant de sortir du peroxyosome. En effet, l'acyl-DHAP va transférer son AG par un alcool gras, via l'alkyl glycéron phosphate synthase (AGPS), formant ainsi de l'alkyl-DHAP. Sa sortie du peroxyosome va s'accompagner d'une réduction par la PexRAP pour former de l'alkyl-G3P (ou 1-O-alkyl-*sn*-G3P) (Figure 10 & 14).

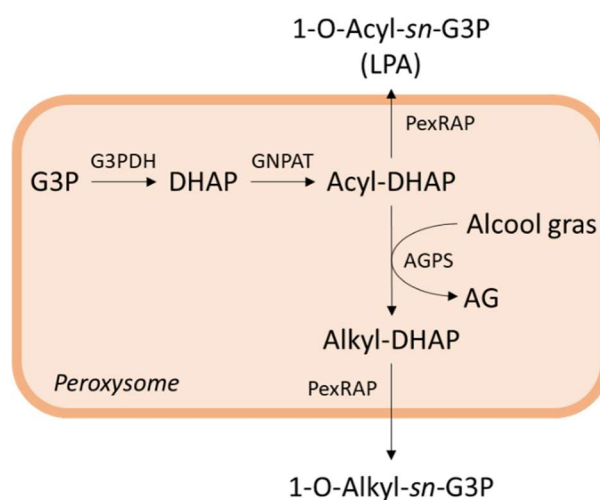


Figure 10 : La biosynthèse des éther- et ester-lipides dans le peroxyosome.

G3P, Glycérol-3-Phosphate ; G3PDH, G3P O-acyl transférase ; DHAP, Dihydroxyacétone-phosphate ; GNPAT, Glycéron phosphate O-acyl transférase ; AGPS, Alkyl glycéron phosphate synthase ; PexRAP, Alkyl/Acyl DHAP réductase ; LPA, Acide lysophosphatidique ; AG, Acide gras (D'après Dean and Lodhi, 2018)

La suite de la biosynthèse des ester-lipides se poursuit par une insertion d'un AG en position *sn2* du LPA, avec un acyl-CoA par l'intermédiaire de la 1-acyl-*sn*-glycérol-3-phosphate acyl transférase (AGPAT), produisant ainsi de l'acide phosphatidique. De cet acide phosphatidique, l'acide phosphatidique phosphatase va cliver le groupement phosphate présent en *sn3* pour ainsi produire du diacylglycérol (DAG).

Cette étape est réversible grâce à l'intervention d'une DAG kinase. A la suite de la formation du DAG, la choline phosphotransférase va venir greffer une tête phosphocholine en position *sn3*, formant ainsi de la phosphatidylcholine et plus précisément de la diacyl-phosphatidylcholine (1-O-Acyl-2-Acyl-*sn*-PC), un lipide membranaire très abondant. Cette réaction peut être reversée par l'intervention d'une phospholipase C ou d'une phosphodiesterase afin de reformer du DAG, libérant ainsi un groupement phosphocholine (Figure 11 & 14).

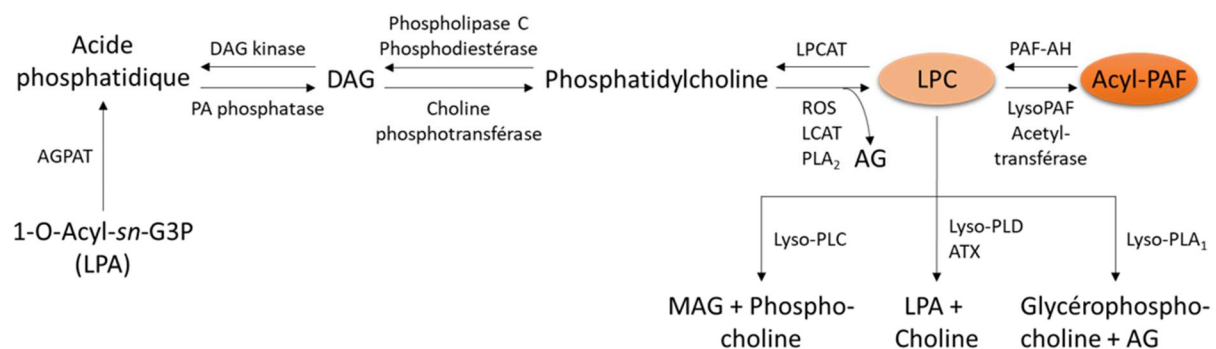


Figure 11 : Voie de biosynthèse et de dégradation de la LPC et de l'acyl-PAF.

LPA, Acide lysophosphatidique ; AGPAT, Acyl glycérol-3-phosphate acyl transférase ; DAG, Diacylglycérol ; AG, Acide gras ; ROS, Espèces réactive de l'oxygène ; LCAT, Lécithine acyl transférase ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; LPC, Lysophosphatidylcholine ; LPCAT, LPC acyl transférase ; PAF-AH, PAF acétylhydrolase ; LysoPLC, D, A₁, Lyso phospholipase C, D, A₁ ; ATX, Autotaxine ; MAG, Monoacylglycérol. (D'après Dean and Lodhi, 2018; Harayama and Riezman, 2018; Law et al., 2019).

A partir de l'acyl-PC il va être possible de former de la LPC par l'action de différents acteurs. Le premier de ces acteurs est la PLA₂, clivant l'AG gras présent en position *sn2* de l'acyl-PC. Le second de ces acteurs est la lécithine acyl transférase (LCAT), qui va littéralement transférer l'AG présent en *sn2* sur un cholestérol libre dans le plasma, qui résulte en la formation de LPC et d'ester de cholestérol (Calabresi et al., 2012; Subbaiah et al., 1985).

Le troisième acteur possible de cette étape métabolique n'est autre que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées en situations pathologiques. Parmi ces ROS dérivés de l'H₂O₂, une espèce semble prépondérante dans le cas qui nous intéresse, l'acide hydrochlorique (HOCl). Cet acide a été décrit *in vitro* comme capable de générer de la LPC à partir de PC isolé (Arnhold et al., 2002).

Il semble également que dans les conditions testées les AG insaturés présent en position *sn2* de l'acyl-PC, majoritairement de l'AA et du DHA *in vivo*, sont particulièrement sensibles à l'action des ROS. Ce qui suggère que cette voie de formation de la LPC par le HOCl et les ROS de manière plus générale, serait importante en situation d'inflammation (Figure 11 & 14) (Arnhold et al., 2002; Choi et al., 2011).

À la suite de la formation de LPC, une dernière étape est effectuée via l'acétyltransférase, greffant un groupe acétyle en position *sn2* de la LPC, formant de l'acyl-PAF. Cette réaction peut être reversée par la PAF-AH reformant alors de la LPC et libérant un groupe acétyle. Le pool de LPC est aussi la cible de différentes enzymes de dégradation, et chacune d'elle va produire des composés différents.

Il existe la voie de la lyso-phospholipase D (lyso-PLD) et de l'autotaxine (ATX), qui dégradent la LPC en clivant sa tête choline pour reformer du LPA. La voie de la lyso-phospholipase C (lyso-PLC) va cliver directement la tête phosphocholine et produire du mono acyl glycérol (MAG). La 3^{ème} voie fait intervenir une lyso-PLA₁, produisant de la glycéro-phosphocholine et libérant de ce fait un AG (Figure 11 & 14).

A la sortie du péroxysome, la biosynthèse des éther-lipides prends place à partir de l'alkyl-G3P, une acyl transférase greffe un AG en position *sn2* pour former de l'alkyl-acyl-G3P (ou 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-G3P). Ensuite la voie enzymatique afin de produire de l'alkyl-acyl-PC (ou 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-PC) est sensiblement la même et emprunte les mêmes enzymes que pour produire de l'acyl-acyl-PC. A la différence près qu'un alcool gras est présent en position *sn1* en lieu et place d'un AG (Figure 13 & 14). C'est ainsi que l'on se retrouve avec l'alkyl-acyl-PC, qui va subir l'action des PLA₂ ou des ROS afin de produire du lysoPAF en retirant l'AG gras présent en *sn2*.

Un autre procédé appelé transacylation peut avoir lieu à cette étape afin de produire du lysoPAF. En effet il est possible de faire intervenir une phospholipase/acytransférase (P/AT), qui va pouvoir transférer l'AG présent en *sn2* du l'alkyl-acyl-PC, sur un lyso-GPL accepteur (Figure 12, 13 & 14). Ce lyso-GPL peut être de différentes natures, acyl-, alkyl- ou alkényl-lyso-GPL (dans le cas des alkényl-lyso-GPL il s'agit souvent de plasményl éthanolamine), qui à la suite de cette étape métabolique reformera un GPL (Figure 12) (Blank et al., 1995; Harayama and Riezman, 2018; Kell et al., 2003; McHowat et al., 2001; Svetlov et al., 1997).

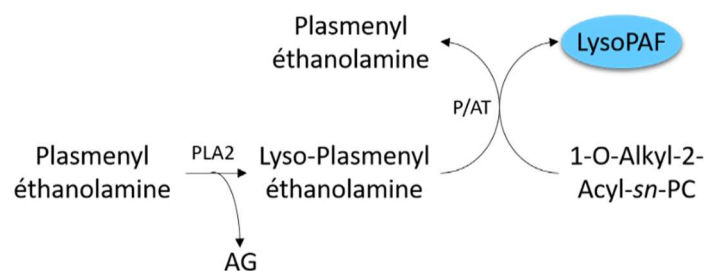


Figure 12. Biosynthèse du lysoPAF par transacylation.

AG, Acide gras ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; P/AT, phospholipase/acyltransférase (Adaptée d'après McHowat et al., 2001).

Cette étape métabolique est réversible par la participation d'une acyl-transférase, venant lier un groupement acyl en *sn2* du lysoPAF. Une fois le lysoPAF produit, il ne reste qu'une étape finale avant d'obtenir du PAF par l'action de l'acétyltransférase et plus précisément de la lysoPAF acétyltransférase, c'est ce que l'on appelle la voie par remodelage (Figure 13 & 14). La reformation du stock de lysoPAF à partir du PAF est possible via l'intervention d'une PAF acétylhydrolase (PAF-AH), inactivant ainsi le PAF et reformant un stock de son précurseur.

Par cette voie il est possible aussi de produire de l'alkényl-PAF (ou plasményl-PAF). En faisant intervenir une $\Delta 1$ désaturase sur l'akyl-acyl-PC, cela génère de l'alkényl-acyl-PC (1-O-Alkényl-2-Acyl-*sn*-PC). A partir de cette molécule, il est alors possible de continuer en suivant les mêmes étapes métaboliques de la biosynthèse du PAF, produisant alors de l'alkényl-lysoPAF, puis de l'alkényl-PAF (Gallego-García et al., 2019; Wallner and Schmitz, 2011; Werner et al., 2020). Une voie de dégradation spécifique des plasményl-lipides existe via le cytochrome c, qui possède une activité plasmalogénase lors de stress oxydatif, clivant spécifiquement la liaison vinyl-éther en position *sn1* (Jenkins et al., 2018).

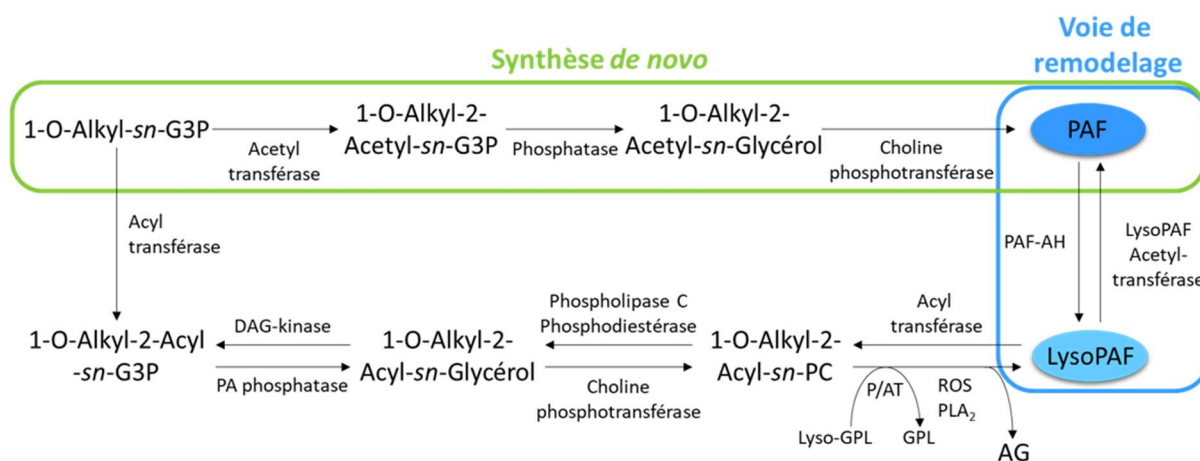


Figure 13 : Biosynthèse du PAF par la voie de novo et la voie de remodelage.

AG, Acide gras ; ROS, Espèce réactive de l'oxygène ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; PAF-AH, PAF acétylhydrolase ; P/AT, phospholipase/acyltransférase. (D'après Dean and Lodhi, 2018; Harayama and Riezman, 2018; Law et al., 2019; Lordan et al., 2019a; Rangholia et al., 2021).

Il existe une seconde voie de biosynthèse appelée synthèse *de novo*, qui prends comme origine la molécule d'alkyl-G3P. A partir de cette molécule, via l'action d'une acétyltransférase la cellule forme de l'alkyl-acétyl-G3P (ou 1-O-alkyl-2-acétyl-*sn*-G3P), qui peut être reversé par l'action d'une acétylhydrolase. L'étape suivante consiste à retirer le groupement phosphate présent sur l'alkyl-acétyl-G3P par l'intervention d'une phosphatase, formant ainsi de l'alkyl-acétyl-glycérol (ou 1-O-alkyl-2-acétyl-*sn*-Glyérol).

La dernière étape avant de former du PAF est d'ajouter un groupement de tête phosphocholine via la choline phosphotransférase. Le PAF ainsi formé entre dans la voie du remodelage permettant à la cellule de réguler la balance PAF/lysoPAF, et de conserver en permanence un stock de lysoPAF (Figure 13 & 14).

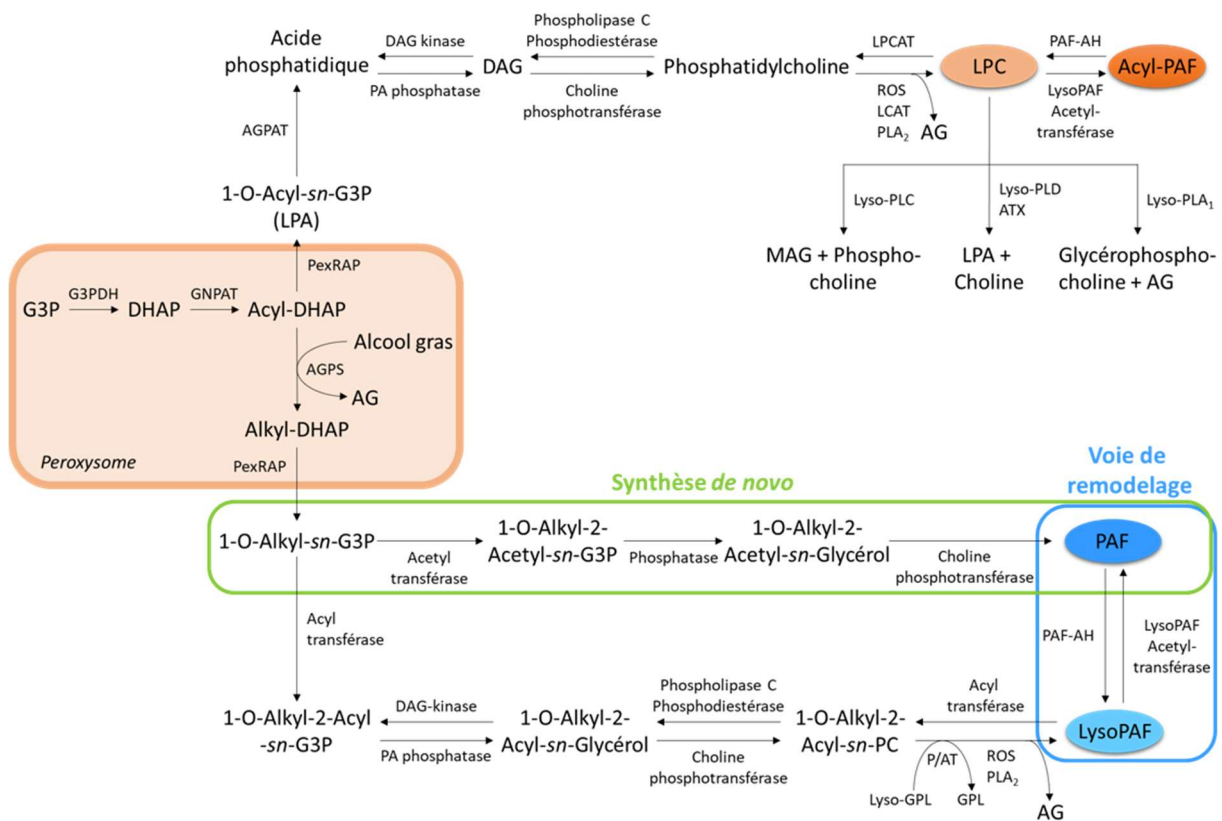


Figure 14 : Ensemble des voies métaboliques simplifiées de l'acyl-PAF et de l'alkyl-PAF chez les mammifères.

Voies métaboliques de synthèse, remodelage et dégradation de l'alkyl-PAF et acyl-PAF. Les cofacteurs ont été omis pour plus de simplicité. G3P, Glycérol-3-Phosphate ; G3PDH, G3P O-acyl transférase ; DHAP, Dihydroxyacétone-phosphate ; GNPAT, Glycéron phosphate O-acyl transférase ; AGPS, Alkyl glycérone phosphate synthase ; PexRAP, Alkyl/Acyl DHAP réductase ; LPA, Acide lysophosphatidique ; AGPAT, Acyl glycérol-3-phosphate acyl transférase ; DAG, Diacylglycérol ; AG, Acide gras ; ROS, Espèces réactive de l'oxygène ; LCAT, Lécithine acyl transférase ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; LPC, Lysophosphatidylcholine ; LPCAT, LPC acyl transférase ; PAF-AH, PAF acétylhydrolase ; P/AT, phospholipase/acetyltransférase ; LysoPLC, D, A₁, Lyso phospholipase C, D, A₁ ; ATX, Autotaxine ; MAG, Monoacylglycérol. (D'après Dean and Lodhi, 2018; Harayama and Riezman, 2018; Lordan et al., 2019; Rangholia et al., 2021).

2.2 Régulation de la biosynthèse

Il est important de noter que la voie de synthèse par remodelage est considérée comme la voie de production pro-inflammatoire du PAF dans les cas d'inflammation aiguë et chronique. Et à *contrario* la voie de synthèse *de novo* du PAF est une voie activée de façon constitutive, responsable du maintien du taux basal du PAF (Venable et al., 1993). La dernière étape de chaque voie de biosynthèse du PAF est limitée par la disponibilité et l'activité des enzymes mais aussi de la disponibilité de leurs substrats.

Dans le cas de la voie de synthèse *de novo* (Figure 13 & 14), le substrat est la cytidine-diphosphate-choline (CDP-choline) qui apporte le groupement phosphocholine, afin qu'il soit transféré, comme nous l'avons vu, sur l'alkyl-acétyl-glycérol lors de l'étape finale de la biosynthèse du PAF. Cette CDP-choline est produite par la CTP : choline cytidyltransferase à partir de la phosphocholine et de la cytidine-triphosphate (CTP) et est considérée comme l'étape limitante.

L'étape finale de la voie de synthèse *de novo* du PAF, mais aussi de la formation de PC, est donc sous le contrôle direct de la CTP:choline cytidyltransferase, ce qui souligne d'autant plus l'importance de cette étape limitant la vitesse de biosynthèse du PAF et du PC (Blank et al., 1988). De plus il a été reporté que la choline phosphotransférase, la dernière enzyme de la voie *de novo*, semble avoir son activité régulée positivement dans des conditions inflammatoires chroniques. Ce qui par conséquent produit une hausse des niveaux basaux de PAF (Detopoulou et al., 2009; Tsoupras et al., 2007, 2012).

En ce qui concerne la voie du remodelage du PAF, la réaction est catalysée par la lysoPAF acétyltransferase, à partir de lysoPAF avec de l'acétyl-CoA. Cette acétyltransferase semble être régulée par phosphorylation par la protéine kinase C dans le tissu nerveux et les leucocytes (Hayashi et al., 1991). Cependant dans les autres tissus, d'autres kinases pourraient être impliquées à leur tour, comme la protéine kinase A (Nieto et al., 1988), la Ca²⁺-calmoduline protéine kinase (Domenech et al., 1987), et la p38 MAPK (Nixon et al., 1999; Shindou et al., 2007).

De plus il est maintenant reconnu que l'acétyltransferase est capable non seulement de métaboliser le lysoPAF en PAF mais aussi la LPC en acyl-PAF (Lee, 1985; Wang and Tontonoz, 2019). Une voie alternative de genèse du lysoPAF est possible par trans-acylation. Cette alternative fait intervenir le lyso-alkényl-éthanolamine, précédemment produit à partir de plasmalogènes éthanolamine par la PLA2, et agit comme accepteur de groupement acyl de l'alkyl-acyl-PC. La production de facteurs inflammatoires va augmenter la quantité de plasményl-éthanolamine, et par conséquent de lyso-plasményl-éthanolamine.

Ces réactions mènent à une production accrue de lysoPAF, promouvant ainsi la voie de remodelage du PAF (Blank et al., 1995; Collado et al., 2003; Kell et al., 2003; McHowat et al., 2001)

Dans un autre cas pathologique, lors d'une infection, la lysoPAF acétyltransférase va à nouveau jouer un rôle de régulation. En effet, cette enzyme a la particularité d'avoir le lysoPAF et de l'acétyl-CoA ou arachidonoyl-CoA comme substrat, et donc de posséder à la fois une activité acyl-transférase et acétyltransférase (Shindou et al., 2007). En condition de repos l'enzyme va favoriser l'arachidonoyl-CoA afin de produire de l'alkyl-acyl-PC, un lipide membranaire qui va servir de précurseur de lysoPAF en cas d'inflammation.

C'est justement en cas d'inflammation aiguë, par activation du *toll like receptor 4* (récepteurs des lipopolysaccharides) puis des voies p38 MAPK et JNK, que la lysoPAF acétyltransférase va préférer l'acétyl-CoA comme substrat, et ainsi augmenter la production de PAF (Shindou et al., 2007). Dans ces conditions les cellules vont produire du PAF mais aussi de l'acyl-PAF, moins affiné pour le PAFR. Pour contrôler ce ratio les cellules vont produire une lysophospholipase de type A1 intracellulaire afin que la LPC soit dégradé en épargnant le lysoPAF qui possède alors une liaison éther en *sn1* (Nakagawa et al., 1992; Sturk et al., 1989).

La concentration calcique intracellulaire est aussi un facteur important dans la régulation de la biosynthèse du PAF. Une concentration calcique intracellulaire de l'ordre du micro molaire permet à l'acétyltransférase, à la PLA2 cytoplasmique (cPLA2) et à la PLA2 sécrétée (sPLA2) d'être plus actives et de fournir une contribution plus importante dans la biosynthèse du PAF mais aussi de la LPC (Francescangeli et al., 2000).

Une autre importance majeure entre les deux voies de biosynthèse du PAF est le coût énergétique. La voie *de novo* a elle besoin d'ATP et de CTP, alors qu'à *contrario* la lysoPAF acétyltransférase est inhibée en présence d'ATP (Baker and Chang, 1994; Francescangeli et al., 2000). Ces résultats suggèrent que dans des conditions de faible énergie cellulaire, comme dans le cas d'une ischémie, la raréfaction de l'ATP et l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire favorise la voie de biosynthèse par remodelage du PAF plutôt que la voie *de novo* (Francescangeli et al., 2000).

La PAF-AH est semble-t-il une enzyme primordiale dans le contrôle de la concentration de PAF. Il en existe trois isoformes, la PAF-AH (I), la PAF-AH (II) et la PAF-AH plasmatique autrement appelé PLA2 associée aux lipoprotéines (lp-PLA2). La PAF-AH (II) et la PAF-AH plasmatique sont capables de cliver le groupe acétyle présent en *sn2* du PAF mais aussi de l'acyl-PAF (Kono and Arai, 2019).

Les PAF-AH (I) et (II) sont intracellulaires et sont nécessaires au contrôle de la concentration en PAF en contrebalançant la production continue de ce dernier. La forme plasmatique est responsable quant à elle du contrôle des niveaux de PAF extracellulaire (Kono and Arai, 2019). Cela permet le maintien de la concentration en PAF nécessaire aux fonctions physiologiques tout en évitant son accumulation qui serait quant à elle délétère.

2.3 Répartition dans l'organisme

Pour comprendre l'importance des médiateurs lipidiques, il est important de comprendre d'où ils viennent et comment ils sont générés. Tout commence par la biodisponibilité des lipides eux-mêmes au sein des cellules. D'après le long répertoire lipidomique, les cellules eucaryotes investissent beaucoup de leurs ressources dans la genèse de cette diversité lipidique. Selon la maxime de biologie fondamentale « la structure sert la fonction », cela expliquerait pourquoi la répartition de ces nombreux lipides n'est pas homogène dans l'entièreté de l'organisme. Leur grande diversité va différer d'un organe à l'autre et va conférer une spécialisation et un rôle spécifique selon chacune de leur composition.

Les principaux constituants des membranes sont des acyl-GPL, ils diffèrent entre eux par le groupement de tête comme nous l'avons explicité dans la partie sur la structure. Les lipides qui nous intéressent descendent en majorité des PC, et dans le cas des PAF et lysoPAF ils peuvent en partie provenir de la métabolisation des plasményl-éthanolamines (ou plasmalogènes éthanolamines). Ces derniers représentent à eux seuls plus de 50% des lipides de la membrane des cellules eucaryotes (van Meer et al., 2008).

En plus de leur grande diversité de groupement de tête, les acyl-GPL présentent entre eux une diversité d'assemblage d'AG. Par exemple, la répartition de ces AG dans le groupe des PC n'est pas homogène, et on retrouvera des profils lipidiques différents selon la structure étudiée. Ainsi, on retrouvera majoritairement du PC(C16:0-18:1) dans le cerveau, du PC(16:0-16:0) dans les poumons, du PC(16:0-18:2) dans le foie, ou encore une majorité de PC(C16:0-22:6) dans le cœur (Figure 15) (Harayama and Riezman, 2018).

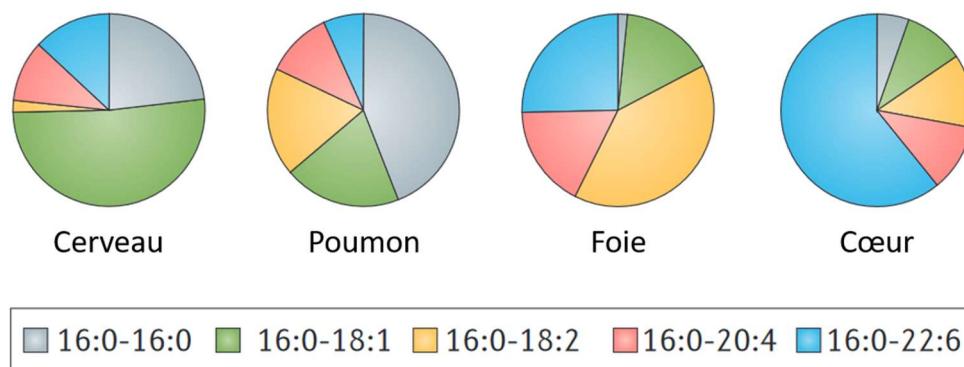


Figure 15 : Diversité de composition et répartition des différentes espèces de phosphatidylcholine.
(Figure modifiée d'après Harayama and Riezman, 2018).

Les alkyl-GPL possèdent la même richesse d'assemblage que leur homologue acyl-GPL, avec toutefois une répartition et des rôles différents. En effet, on considère de manière générale que les éther-GPL ne représentent que 20% des phospholipides totaux. Les taux les plus importants de ces lipides sont retrouvés dans le cœur, le cerveau, la rate, les muscles squelettiques, les reins et les globules blancs (Braverman and Moser, 2012; Dean and Lodhi, 2018).

L'hydrolyse des GPL et particulièrement des PC, induite par la signalisation produit des messagers lipidiques. Parmi ces messagers nous retrouvons la LPC et le lysoPAF, qui du fait de leur perte de leur AG en *sn2*, vont facilement quitter la membrane et générer de l'AA ou du DHA majoritairement. L'AA est lui-même un médiateur avant même sa métabolisation, et induit des effets biologiques à une concentration de l'ordre de 1-10 μ M. Cependant en conditions pathologiques sa concentration peut très vite augmenter à 50-100 μ M, et jusqu'à 500 μ M dans certaines conditions (Pompeia et al., 2003).

Les profils de la LPC et du lysoPAF sont quelque peu différents de leurs précurseurs. La LPC par exemple est présente dans le plasma humain à une concentration de ~140-150 μ M en condition physiologique (Subbaiah et al., 1985; Rabini et al., 1994; Kim et al., 2007). La LPC est principalement liée à l'albumine et la partie restante est liée aux lipoprotéines (Gillett and Besterman, 1975; Taylor et al., 2007). Toutefois la balance LPC libre/LPC liée peut-être altérée en situation physiopathologique, comme dans des cas d'inflammation ou de mort cellulaire, soit en augmentant la production de LPC ou bien en diminuant les concentrations des séquestrants de la LPC (Andreoli et al., 1973; Joles et al., 1997; Vuong et al., 1999, 2001, 2003; Lauber et al., 2003).

C'est le cas notamment dans de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer, les pathologies cardiaques et vasculaires (crise cardiaque, AVC), les pathologies inflammatoires (ostéoarthrite, hépatite, jaunisse et cirrhose du foie, obésité), le diabète ou encore certains cancers (Engel et al., 2021; Knuplez and Marsche, 2020; Liu et al., 2020; Law et al., 2019). La perturbation de cette balance de LPC libre/LPC lié semble associée à un risque accru de mortalité.

Le PAF quant à lui ne semble être présent qu'à faible concentration et de manière ponctuelle. En effet, dans une étude récente sur l'urticaire, la concentration de PAF plasmatique a été mesurée chez des patients sains à une concentration moyenne de ~6,22nM (3256.4pg/ml) (Ulambayar et al., 2019).

Une autre étude a quant à elle mesuré le temps de demi-vie de 10nM de [³H]PAF dans le plasma ou le sang de sujets sains, qui serait d'environ 5 minutes. Cependant il est intéressant de noter que ce temps de demi-vie ne prend en compte que la disparition de [³H]PAF dans l'échantillon. Par conséquent on ne sait pas si cette disparition rapide de PAF est due à son catabolisme ou de sa redistribution dans les tissus environnant.

Le PAF agissant comme messager intercellulaire il peut facilement disparaître de la circulation sanguine sans pour autant être dégradé. De plus concernant la dégradation, en supplément de la déacétylation du PAF par la PAF-acétylhydrolase (PAF-AH) pour reformer un pool de son précurseur le lysoPAF, il existe d'autres voies de catabolisme impliquant les phospholipases C, D et A1 (Law et al., 2019).

Cependant un bémol est à souligner, il faut prendre en considération que les effets observés sont grandement dépendants de la présence ou l'absence de séquestrant des médiateurs lipidiques. De plus dans certains cas de préparations commerciales il a été reporté des contaminations d'échantillons de la LPC et de lysoPAF avec du PAF (Marathe et al., 2001).

Enfin il est nécessaire d'aborder les travaux réalisés avec pragmatisme, il n'est pas rare que ces différents lipides très proches les uns des autres au niveau structural soient rassemblés sous la même bannière. De ce fait certains travaux associent des effets à un de ces lipides alors qu'il s'agit d'un ensemble de lipides n'ayant pas tous la même fonction et/ou action.

3. Fonctions cellulaires

3.1 PAF

Le PAF est premièrement et majoritairement décrit comme médiateur inflammatoire produit par de nombreuses cellules du système immunitaires, les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages mais aussi les cellules endothéliales et les plaquettes (Triggiani et al., 1991). La signalisation du PAF débute par la liaison du PAF à son récepteur (PAFR). Ce récepteur joue un rôle central dans les réponses physiologiques et physiopathologiques du PAF (Figure 16) (Honda et al., 2002; Ishii et al., 2002; Prescott et al., 2000).

Il s'agit d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à des protéines G, fortement exprimé par les cellules du système immunitaire inné et du système cardiovasculaire (Montrucchio et al., 2000). L'initiation de la voie de signalisation du PAF par liaison à son récepteur va activer la protéine Gq associée, et produire par quelques intermédiaires du DAG, de l'IP3 et une augmentation de calcium intracellulaire (Figure 16).

Cette hausse de calcium va à activer la PLA2 cytosolique, et produire des lyso-lipides précurseurs du PAF, libérant du même coup de l'AA et du DHA, eux même substrats des eicosanoïdes et des docosanoïdes. De plus juxtaposée à cette protéine Gq, une protéine Gi liée au PAFR vient inhiber l'adénylate cyclase et donc la conversion d'ATP en AMPc (Figure 16). Cela a pour conséquence de prévenir l'activation de la PKA et des effets anti-inflammatoires associés.

Il résulte de cette voie du PAF/PAFR une amplification de la réponse inflammatoire initiale et une augmentation de la production de PAF ainsi que l'expression de gènes pro-inflammatoires. Plus concrètement au niveau cellulaire cela va induire l'activation et l'agrégation des plaquettes et des leucocytes et favorise l'adhésion, la motilité, la chimiotaxie, l'invasion, la migration des leucocytes et des plaquettes, la génération de ROS et la formation de PAF.

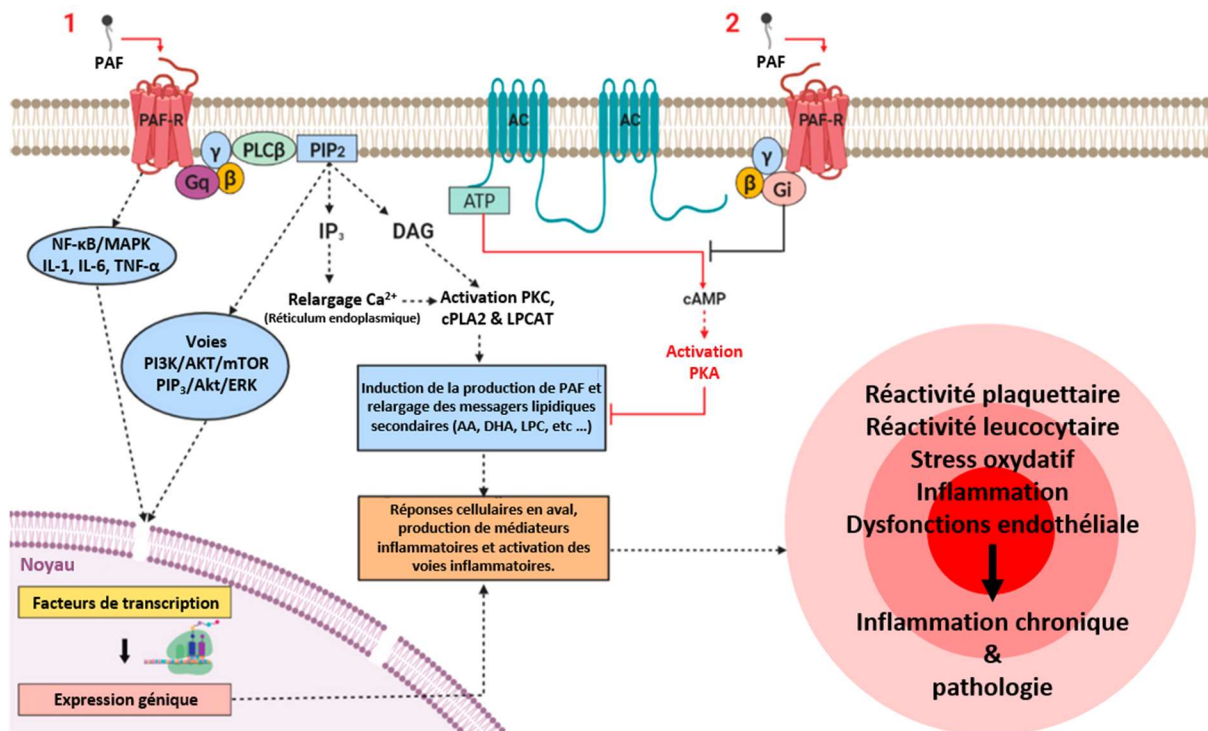


Figure 16 : Schéma simplifié illustrant les principales voies de signalisation pro-inflammatoires induites par la liaison du PAF à son récepteur (PAFR).

Ces voies sont initiées par la liaison du PAF au PAFR sous certains stress ou stimuli. Ces cascades moléculaires sont impliquées dans le développement de troubles inflammatoires chroniques (Figure modifiée d'après Lordan et al., 2019a).

Outre son rôle majeur dans l'inflammation, le PAF possède d'autres rôles assez inattendus, notamment dans la biologie de la reproduction. Il intervient dans la reproduction chez les femelles où il participe à l'ovulation, la fécondation, la préimplantation, l'implantation et la parturition. Dans le pendant masculin on retrouve du PAF dans les spermatozoïdes où il interviendrait dans la mobilité de ces derniers (Angle et al., 1993; Kumar and Sharma, 2005; Minhas et al., 1989; O'Neill, 2005).

Dans le SNC, on retrouve à la fois la présence du PAF sécrété par les cellules neuronales et de son récepteur (Domingo et al., 1988; Sogos et al., 1990). L'activité cérébrale du PAF ne se cantonne pas à son effet inflammatoire, apoptotique et neurotoxique, il lui est imputé d'autres rôles dont certains effets neurotrophiques (Goracci et al., 2009; Liu et al., 2017). Dans la transmission synaptique par exemple, il est impliqué dans la genèse de la potentialisation à long terme (LTP) où il a été montré qu'en présence d'antagoniste du PAFR, cette dernière était bloquée ou grandement réduite (Arai and Lynch, 1992).

De plus le nombre de PA générés lors de la stimulation haute fréquence (HFS) se retrouve augmenté par deux en présence de 100nM de PAF (Wieraszko et al., 1993). L'effet du PAF sur la HFS est causé par l'augmentation de calcium qu'il induit lors de son relargage. Cette augmentation de calcium à son tour va augmenter la voie de remodelage du PAF et produire encore plus de PAF.

Même si très peu de travaux ont été menés sur le PAF en électrophysiologie, quelques-uns semblent attribuer au PAF la capacité de moduler l'activité cellulaire en interagissant directement ou indirectement avec des canaux ioniques. C'est notamment le cas des canaux TREK-1 et TRAAK qui sont activés par la LPC18:1, le PAF16:0 et le lysoPAF16:0, en imitant l'effet de l'étirement membranaire, ce qui en font des activateurs des canaux K^{2P} TREK-1 et TRAAK (Maingret et al., 2000).

C'est encore le cas du canal chlore calcium dépendant ClC-3 qui est exprimé dans les cellules de l'épithélium intestinal, qui une fois activé par le PAF va induire une acidose intracellulaire. Cette acidose intracellulaire va à son tour provoquer l'activation de la caspase 3 conduisant à une apoptose cellulaire (Claud et al., 2008).

De façon indirecte, le PAF par son interaction avec son récepteur serait capable d'induire un relargage calcique intracellulaire. Cela a pour conséquence de réguler l'activation des canaux potassiques calcium dépendant des cellules lymphoblastoïdes B humaine (Di Berardino et al., 1993). Par une action similaire, le PAF est capable de moduler l'excitabilité des myocytes par l'inhibition d'un canal K⁺ à deux domaines de pores, et plus exactement le canal potassique de fond sensible à l'acide (TASK-1). Ce canal une fois inhibé par une voie intracellulaire dépendante de la PKC, va rendre les myocytes hyperexcitables et provoquer une activité arythmogène dans le cœur sein (Barbuti et al., 2002).

Dans les neurones toutefois, le PAF a un rôle neurotrophique particulier. En effet, dans le cas de neurones en cultures ou de cultures primaires de neurones de rat, il induirait la différenciation morphologique neuronale et l'extension des neurites (Kornecki and Ehrlich, 1988; Ved et al., 1991).

De façon intéressante le PAF induit une sécrétion dose dépendante de NGF dans les cultures d'astrocytes corticaux, et cet effet semble amplifié en présence de TNF α . Cette étude suggère donc que le rôle neurotrophique du PAF passerait par les astrocytes en augmentant la production de NGF (Brodie, 1995). Dans la cascade de la voie de signalisation du PAF, ses effets se répercutent aussi sur l'expression génique.

Il a été reporté qu'il était à la fois capable d'activer c-fos et c-jun dans une lignée de neuroblastomes humains, ou encore c-fos et zif/268 (facteur de transcription à doigt de zinc) dans les cellules astrogliales de rat (Dell' Albani et al., 1993; Squinto et al., 1989). De plus le PAF et l'acide rétinoïque activent en synergie l'expression de la prostaglandine synthase 2 dans d'autres lignées cellulaires (Bazan et al., 1994).

L'induction de l'expression de ces gènes par le PAF prouve encore une fois, son importance sur les changements à long terme qu'il est capable d'induire en tant que médiateur. Un exemple récent est une étude parue en 2019 qui décrit le PAF sécrété par les macrophages du tissu adipeux de manière autocrine, afin de stimuler la production d'interleukine-6. Cette cascade d'effets induit le brunissement des adipocytes par la voie JAK/STAT3 (Yu et al., 2019).

Comme nous venons de le voir, le PAF est un facteur clé au niveau de la jonction de plusieurs voies inflammatoires (cytokines, stress oxydatif, eicosanoïdes, docosanoïdes, etc...). C'est sa position à la jonction critique de ces différentes voies que le PAF intervient dans les processus physiopathologiques. C'est le cas notamment pour de nombreuses maladies où il est produit par différentes lignées cellulaires stimulées par différents médiateurs, comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α ou le PAF lui-même de façon autocrine.

C'est dans ce contexte d'inflammation systémique que le PAF et le PAFR interviennent dans de nombreuses pathologies, comme cause sous-jacente ou comme moteur de la maladie. C'est notamment le cas pour une pléthore de maladies inflammatoires comme les allergies et l'anaphylaxie, les infections virales et bactériennes (septicémie, parodontite, VIH, etc...), les pathologies pulmonaires et respiratoires (asthme, bronchopneumopathie chronique obstructive, comorbidités pulmonaires liées au tabagisme), et les pathologies rénales (Ashraf and Nookala, 2022; Lordan et al., 2019).

De plus le PAF semble impliqué dans de nombreux cancers, pour lesquels plusieurs études indiquent qu'ils sont des composants critiques des processus moléculaires dans le développement et la progression du cancer du sein, colorectal, de l'œsophage, du poumon, du foie, du pancréas, de la peau, et de divers autres (Lordan et al., 2019; Tsoupras et al., 2009). Comme nous venons de le voir, le PAF participe aux processus physiologiques du SNC, il n'est donc pas surprenant de le retrouver dans les pathologies associées, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou encore l'épilepsie (Goracci et al., 2009).

Dû à sa présence dans le système vasculaire, on retrouve aussi le PAF et le PAFR impliqués dans les pathologies cardiaques et vasculaires, comme l'athérosclérose, et de manière plus générale l'ischémie et l'hypoxie (Montrucchio et al., 2000). C'est dans le contexte de lésions nerveuses qu'un rôle indirect du PAF a été proposé dans la douleur et plus particulièrement dans la douleur neuropathique (Hasegawa et al., 2010; Shindou et al., 2017) ainsi qu'à la douleur viscérale et à l'hyperalgésie pelvienne (Hellman et al., 2018) chez les rongeurs.

En effet, le mécanisme proposé stipule que la production et la sécrétion de PAF à la suite de telles lésions vont activer les macrophages, qui vont à leur tour, comme nous l'avons vu, sécréter de l'IL-1 β et du TNF α . Cette sécrétion de cytokines va produire une hyperexcitabilité des neurones DRG, qui expriment les récepteurs au PAF, associée à une allodynie mécanique (Tsuda et al., 2011).

3.2 LysoPAF

Le lysoPAF est le précurseur inactif du PAF dans la voie du remodelage n'interagissant pas sur le PAFR, et c'est souvent dans ces termes qu'il est décrit. Pourtant certains travaux ne sont pas aussi catégoriques sur l'activité du lysoPAF. Dans une étude de 2009, Welch et al. auraient décrit le lysoPAF comme ayant des activités opposées au PAF. Notamment la capacité du lysoPAF à inhiber de manière dose dépendante la NADPH oxydase et augmenter la concentration en AMPc dans les neutrophiles et les plaquettes, inhibant ainsi la dégranulation et l'agrégation respectivement sans passer par le PAFR (Welch et al., 2009).

Ces travaux mettent en avant la fine et complexe régulation des voies métaboliques du PAF et l'importance de son précurseur. Cependant très peu d'étude sont portées sur le lysoPAF hors du cadre de la biosynthèse du PAF. A ce jour seul le cas des canaux TREK-1 et TRAAK activés par la LPC18:1, le PAF16:0 et le lysoPAF16:0 a été reporté. Ils agiraient sur ces canaux mécanosensibles en imitant l'effet de l'étirement membranaire (Maingret et al., 2000).

3.3 Acide arachidonique

L'AA, comme cela a été abordé plus haut est le précurseur des eicosanoïdes et participe grandement aux réactions inflammatoires. Cependant il possède des rôles avant même sa transformation métabolique et peut agir en tant que PUFA (Tallima and El Ridi, 2018). Du fait que l'AA possède quatre doubles liaisons *cis* dans sa structure lui donnant une forme particulière, cela le dote d'un rôle dans les membranes, leur flexibilité et leur fluidité (Brash, 2001; Pompéia et al., 2000). La présence d'AA dans les membranes influence la fonction de protéines membranaires spécifiques (Brash, 2001; Pompéia et al., 2000) et joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité des cellules, des organites et de la perméabilité vasculaire (Beck et al., 1998).

L'AA libre possède aussi des rôles quant à la régulation des canaux ioniques, comme pour la plupart des canaux ioniques dépendant du voltage, responsables de la régulation de l'activité électrique des tissus excitables tels que les neurones, le cœur et autres muscles (Börjesson et al., 2008; Elinder and Liin, 2017; Villarroel and Schwarz, 1996; Yazdi et al., 2016). L'AA est décrit comme capable d'activer différents canaux potassiques, comme les canaux potassiques calcium dépendant (BK) à large conductance, impliqués dans certaines fonctions du SNC comme le sommeil, et la régulation neuronale du cœur (Denson et al., 2000; Kirber et al., 1992). Les canaux potassiques à deux domaines pores (K₂P) voltage indépendant, jouant un rôle clé dans la création et le maintien du potentiel de membrane en tant que canaux de fond, sont eux aussi activés par l'AA (Kim, 2003; Patel et al., 2001).

Toutefois l'AA a été décrit comme capable d'activer les canaux potassiques cardiaques insensibles à l'ATP, mais aussi dans un même temps, d'inhiber les canaux potassiques sensibles à l'ATP (Kim and Duff, 1990). D'autres canaux potassiques sont inhibés par l'AA, les canaux potassiques voltage dépendant 4 (K_v4) présent dans le cerveau et le cœur, sont fortement réprimés en présence d'AA (Villarroel and Schwarz, 1996). Il en va de même pour le canal potassique calcium dépendant à conductance intermédiaire (hK1), jouant un rôle important de la sécrétion de chlore dans les épithéliums des voies intestinales et respiratoires (Devor and Frizzell, 1998; Tallima and El Ridi, 2018).

Les canaux potassiques ne sont pas les seuls canaux ioniques modulés par l'AA. Ainsi nous le retrouvons impliqué dans la régulation des canaux sodiques dépendant du voltage cardiaques, responsables de l'excitabilité des myocytes, où la présence d'AA induit une hypoexcitabilité des cellules cardiaques, les protégeant en conditions ischémiques (Kang and Leaf, 2000). Le canal sodique rNa_v1.4 présent dans les muscles squelettiques de rat est aussi modulé par l'AA, mais son action activatrice ou inhibitrice sur le canal va dépendre du potentiel membranaire (Gu et al., 2009).

L'AA est décrit comme modulateur de la conductance des ions chlore, où il exerce un effet activateur sur le canal ClC-2, ou inhibiteur sur le canal CFTR, présent dans les tissus épithéliaux (Cuppoletti et al., 2001; Tewari et al., 2000; Zhou and Linsdell, 2007). Les canaux protoniques voltage dépendant (H_v), jouent un rôle prépondérant dans la production de ROS dans les phagocytes en régulant le pH et le potentiel membranaire. La présence d'AA va augmenter les courant H_v et favoriser la production de ROS via l'activation de la NADPH oxydase (Elinder and Liin, 2017; Henderson et al., 1997; Kawanabe and Okamura, 2016; Shiose and Sumimoto, 2000).

En plus des rôles précédemment décrits, l'AA est aussi capable de moduler l'interaction entre les ligands et leurs récepteurs. C'est notamment le cas du récepteur à l'acide γ -amino butyrique (GABA-R), où la présence d'AA favorise l'interaction du GABA avec son récepteur (Antollini and Barrantes, 2016; Witt et al., 1996, 1999). Au contraire le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est inhibé une fois exposé à l'AA (Antollini and Barrantes, 2002, 2016; Fernández Nievas et al., 2007; Nievas et al., 2008).

L'AA est impliqué dans un dernier processus physiologique, celui de la mort cellulaire par apoptose. Cette apoptose induite par l'AA serait associée à un stress oxydatif et/ou un changement de fluidité membranaire (Beck et al., 1998; Cao et al., 2000; Chilton et al., 1996; Pompeia et al., 2003; Surette et al., 1999).

Les canaux potassiques à deux domaines pores (K2P) comme les canaux mécanosensibles TREK-1 & 2 et TRAAK, et les canaux à potentiel de récepteur transitoire ou TRP, sont des senseurs physico-chimiques de l'environnement et sont pour la plupart modulés par l'AA. C'est le cas notamment des canaux TREK-1 & 2 et TRAAK qui sont activés en présence d'AA mais aussi de LPC (Lesage et al., 2000; Maingret et al., 2000). Ce cas est valable aussi pour les canaux TRP vanilloïde 1-4 (TRPV 1-4) (Tallima and El Ridi, 2018), impliqués dans la perception de la chaleur, y compris la chaleur nocive, qui semblent être activés en présence d'AA.

D'autres membres de différentes sous familles des canaux TRP sont activés par l'AA tels que les canaux TRPA1 (Bandell et al., 2004), senseur du froid nocif et de certains agents chimiques, et le canal TRP cationique de la sous-famille des mélastatine-like membre 2 (TRPM2) (Togashi et al., 2006), jouant un rôle dans la sécrétion d'insuline et de la réponse inflammatoire au TNF- α .

D'autre part, le canal senseur du froid activé par le menthol TRPM8, semble quant à lui inhibé par l'AA (Andersson et al., 2007). Enfin, l'AA associé à la LPC16:0, a été décrit comme capable d'activer les canaux ASIC3 *in vitro* et *in vivo*, un canal fortement exprimé dans les nocicepteurs (voir chapitre II.5.). La co-injection de LPC et d'AA est capable produire un comportement douloureux spontané chez les animaux, qui est fortement atténué chez les animaux ASIC3KO, en présence d'APETx2, un inhibiteur du canal ASIC3, ou en présence d'amiloride, un inhibiteur non sélectif des canaux ASIC (Figure 17) (Marra et al., 2016). Toutes ces modulations apportées par l'AA sur les senseurs de l'environnement peuvent conduire à une perte de sensibilité, ou au contraire à une hypersensibilité à un ou différents stimuli.

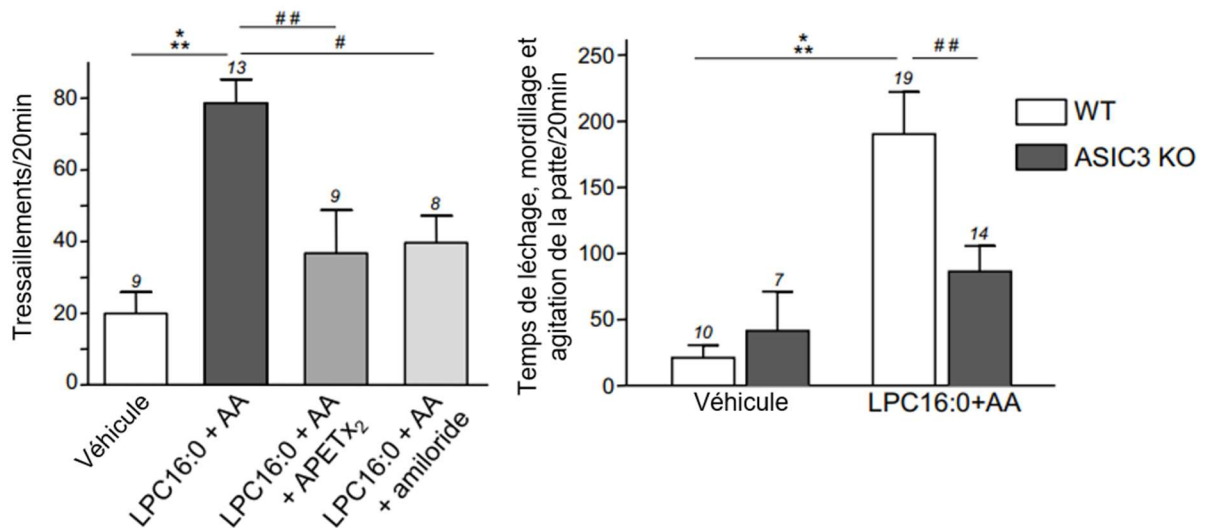


Figure 17 : L'injection de LPC16:0 et d'AA produit un comportement douloureux spontané chez les animaux, via un mécanisme ASIC3 dépendant.

A gauche, mesure du comportement douloureux chez les animaux co-injectés dans la patte avec de la LPC16:0 et de l'AA, en présence ou en absence d'APETx₂, un inhibiteur spécifique d'ASIC3, et d'amiloride un inhibiteur non sélectif des canaux ASIC. A droite, mesure du comportement douloureux chez les animaux WT ou ASIC3KO co-injectés dans la patte avec de la LPC16:0 et de l'AA (Figure modifiée de Marra et al., 2016).

3.4 Lysophosphatidylcholine

Lysophosphatidylcholine et physiopathologie

La LPC possède avant tout des rôles physiopathologiques et les taux circulants de LPC sont modulés dans plusieurs maladies (Law et al., 2019). Bien que de nombreuses études ont décrit la LPC comme ayant des activités pro-inflammatoires, voir même comme marqueur clé de pathologies cardiovasculaires et neurodégénératives, certains travaux lui attribuent pourtant des effets anti-inflammatoires, poussant les conclusions à controverse (Knuplez and Marsche, 2020). Cette ambiguïté peut trouver ses sources dans les expérimentations *in vivo*, car dans ces conditions la génération de la LPC par la PLA2 induit de concert la génération d'AG libre, majoritairement de l'AA.

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, l'AA possède des effets inflammatoires, et il est aussi précurseur de myriade de composés immuno-modulateurs. De plus, la LPC peut être métabolisé par l'autotaxine en LPA, un lipide décrit dans la littérature comme médiateur lipidique important. Tout ceci pourrait expliquer la controverse dont la LPC fait preuve concernant ses actions intrinsèques ou association, et concernant ses implications anti- ou pro-inflammatoires. Cependant un nombre de plus en plus important de travaux sont au fait de ces ambiguïtés et font le nécessaire pour écarter toutes autres éventualités.

Certaines études soutiennent un rôle direct de la LPC, l'associant à différentes pathologies, comme notamment les maladies cardiovasculaires. Sous cette dénomination se rassemble différentes pathologies comme l'athérosclérose, l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, le diabète et le syndrome métabolique. L'athérosclérose est une pathologie caractérisée par l'accumulation de plaques dans la paroi des artères, rétrécissant ainsi le lumen et provoquant de nombreuses complications comme de l'hypertension, un risque accru d'infarctus et de l'arythmie cardiaque.

L'augmentation des taux de LPC circulant sont associés à l'altération du fonctionnement des cellules endothéliales et à la formation des plaques d'athérome (Gonçalves et al., 2012; Lavi et al., 2007; Li et al., 2016; Mannheim et al., 2008). De plus la LPC aurait un puissant effet chimio-attractant pour les cellules immunitaires comme les lymphocytes T (Radu et al., 2004), les monocytes (Quinn et al., 1988), les cellules natural killer (Jin et al., 2005). Cela contribuerait à l'expansion des plaques d'athéromes et à la progression de la maladie. Dans le cas de l'infarctus du myocarde, certaines espèces de LPC servent de marqueurs de risque, sont concernées plus particulièrement la LPC18:2 (Ward-Caviness et al., 2017).

Dans le cas du diabète et d'hyperlipidémie familiale, les taux de LPC et de lipoprotéines de basse densité (LDL) sont en hausse dans le plasma des patients (Han et al., 2011; Sonoki et al., 2009; Stübiger et al., 2012). Cependant ces résultats sont encore controversés, la corrélation entre les taux de LPC et ces pathologies étant contredite par d'autres travaux (Barber et al., 2012; Wang-Sattler et al., 2012; Ward-Caviness et al., 2017).

La LPC paraît jouer un rôle majeur dans les maladies neurodégénératives, où elle semble induire la perte de péricytes, une démyélinisation, et impacte l'intégrité de l'endothélium vasculaire (Muramatsu et al., 2015; Qiao et al., 2006). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer sa présence, montrée par une colocalisation via spectrométrie de masse, induit une hausse de la production des oligomères A β 1-42, induisant de fait une hausse de la neurotoxicité associée (Kaya et al., 2017; Sheikh et al., 2015). Cependant, comme pour la plupart des études concernant la LPC, les résultats ne sont pas confirmés par d'autres travaux. Certains observent une réduction du taux plasmatique de LPC chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lin et al., 2017). D'autres encore, mesurant le ratio LPC/PC montrent une réduction de cette balance à la fois dans le plasma des patients, mais aussi dans le liquide cébrospinal (Klavins et al., 2015; Mulder et al., 2003).

Dans le cadre des pathologies hépatiques, de plus faibles concentrations plasmatiques en LPC16:0 semblent corrélées à un profil de stéatose hépatique bénigne, associée avec une insulino-sensibilité sauvegardée chez les patients (Lehmann et al., 2013). Il semble en être de même en ce qui concerne la stéatohépatite non alcoolique, où une réduction importante de LPC16:0, 18:0 et 18:1 a été mesurée dans le sérum chez un modèle murin, associée à une up-régulation des enzymes de dégradation de la LPC (Tanaka et al., 2012).

Dans le cadre de la cirrhose, le constat semble similaire, les espèces saturées de LPC16:0 et 18:0 sont corrélées négativement avec un modèle d'insuffisance hépatique terminale. De faibles taux de ces espèces de LPC semblent être un bon marqueur de la sévérité des pathologies hépatiques (Krautbauer et al., 2016).

Dans le contexte du vieillissement, l'étude longitudinale du vieillissement de Baltimore inclut un criblage plasmatique de 148 métabolites chez un panel de 385 participants. Dans cette étude de 2019, Semba et al., mettent en évidence un profil lipidique plasmatique où une majorité des espèces de LPC sont présentes dans des concentrations plus faibles (LPC16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:3). Cette étude parvient à corrélérer ce profil lipidique à une capacité oxydative mitochondriale altérée, affectant la force musculaire et les performances physiques chez les personnes âgées (Semba et al., 2019).

De plus, au sein de la même étude, les auteurs associent la baisse des taux plasmatiques de LPC18:2 comme facteur prédictif du déclin de la vitesse de marche chez les personnes âgées (Gonzalez-Freire et al., 2019). Ces résultats sont confortés par une autre étude portant sur le vieillissement et la sarcopénie chez le rat. Dans cette étude, les auteurs montrent que la diminution des taux de LPC20:5 et 20:3 sont corrélés à la baisse d'amplitude des courants en réponse à la stimulation électrique du nerf sciatique. La LPC20:3 est aussi corrélé avec la perte musculaire. Cette diminution est par ailleurs corrélée avec une augmentation des taux de PC à longues chaînes, mettant en avant une altération du métabolisme lipidique dans le développement du phénotype sarcopénique chez le rat (Siddharth et al., 2017).

Lysophosphatidylcholine et douleur

La présence de LPC semble corrélée à des pathologies douloureuses, associée à sa capacité à activer/potentialiser certains canaux ioniques impliqués dans la douleur (Figure 17) (Andersson et al., 2007; Flemming et al., 2006; Gentry et al., 2010; Maingret et al., 2000; Marra et al., 2016; Rimola et al., 2020; Sadler et al., 2021).

La LPC a été décrit comme capable d'activer le canal TRPC5 et TRPM8 des canaux sensibles au stimulation par le froid non nocif, indépendamment de son effet détergeant (Bernal et al., 2021; Flemming et al., 2006; Zimmermann et al., 2011). Plus récemment des travaux ont décrit TRPC5 comme contributeur clé de la douleur tactile persistante, l'activation du canal TRPC5 humain et de souris par l'application exogène de LPC. induisant une hausse de l'excitabilité des neurones nocicepteurs dans lesquels le canal TRPC5 est exprimé (Sadler et al., 2021).

Concernant le canal TRPM8, ce dernier est sensibilisé par la LPC en élevant le seuil de température vers la température corporelle normale, induisant son activation. Alors même que l'AA produit l'effet inverse, l'effet sensibilisant de la LPC est tel qu'à concentration équimolaire, le canal TRPM8 est tout de même activé. Ainsi la LPC jouerait un rôle de régulateur de la sensibilité au froid au niveau de la peau et des autres tissus exposés à l'extérieur, mais aussi de réguler l'activité des neurones TRPM8+ innervant les tissus plus profond comme les intestins et la vessie (Andersson et al., 2007; Gentry et al., 2010).

Comme je l'ai évoqué précédemment les canaux TREK-1 et TRAAK sont activés par la LPC en imitant l'effet de l'étirement membranaire (Lesage et al., 2000; Maingret et al., 2000). Plus récemment une étude a identifié la LPC18:1 comme nouvel agent pruritogène choléstatique. De façon approfondie, les auteurs ont mis en évidence l'activation des canaux TRPV4 présent dans les kératinocytes de la peau par la LPC18:1. Cette activation induit la libération rapide de microARN-146a, capable d'activer à son tour les neurones sensoriels pruricepteurs TRPV1⁺, ayant pour conséquence de provoquer des démangeaisons chez les primates non humains (Chen et al., 2021a)

La LPC a récemment été montré comme jouant un rôle important dans la douleur des tissus profonds tels que les muscles ou les articulations (Hung et al., 2020; Jacquot et al., 2022; Marra et al., 2016; Zhai et al., 2019). Récemment, dans un modèle de stress psychologique induit chez la souris, les auteurs ont constaté une hausse du stress oxydatif et des taux de LPC16:0 concomitante. Une hyperalgie chronique a été induite chez ces animaux par la présence de LPC16:0, et elle a pu être atténuée en inhibant la production de LPC. Les auteurs ont réussi au niveau clinique à montrer que le stress oxydatif et les taux de LPC16:0 excessif étaient présent chez les patients atteints de fibromyalgie. Les taux de LPC16:0 ont été corrélé aux symptômes douloureux chez ces patients présentant un stress oxydatif élevé et la sévérité de la maladie (Hung et al., 2020).

En 2022, l'équipe travaillant sur la polyarthrite rhumatoïde (PR) a constaté une déconnexion entre l'inflammation, l'érosion osseuse et la douleur, cette dernière pouvant apparaître des années avant l'apparition des autres symptômes. Leur démarche fût d'isoler les anticorps monoclonaux issus des cellules B de patients atteints de PR, et de les injecter chez la souris.

Ils ont constaté une activation des ostéoclastes qui a induit la production de sPLA2 et de LPC16:0. La LPC16:0 fût alors décrit comme capable d'activer les canaux ASIC3 présent dans les terminaisons nerveuses innervant les os et les articulations, et de provoquer une hypersensibilité mécanique ASIC3 dépendante (Jurczak et al., 2022).

Une autre étude portant sur les patients atteints de l'arthrose, a souligné la corrélation entre la hausse du rapport de la LPC18:2/PC44:3 via une augmentation métabolique de la voie de conversion du PC en LPC via la PLA2 et la LPCAT, et la baisse du volume du cartilage. L'hypothèse mise en avant est que l'association des effets détergents de la LPC, combinés au signaux pro-inflammatoires qu'il induit en plus de la genèse d'AA conduisant à la production d'eicosanoïdes, semblent conduire à la dégénérescence de la structure articulaire (Zhai et al., 2019). Des ratios PC/LPC plasmatiques semblent être un indicateurs de la sévérité de l'arthrite rhumatoïde (Fuchs et al., 2005).

Dans d'autres études, les taux de LPC et plus particulièrement de la LPC16:0, ont été mesuré en forte concentration dans les liquides synoviaux de patients atteints de différentes pathologies articulaires douloureuses (Jacquot et al., 2022; Marra et al., 2016). Dans cette étude de 2022, d'un point de vue clinique il a été possible de mettre en évidence une corrélation entre les scores de douleur des patients et les taux de LPC16:0. De plus la LPC et l'AA induisent une douleur spontanée lors de leur co-injection sous cutanée chez l'animal, comportement douloureux qui est fortement réduit en présence d'un inhibiteur du canal ASIC3, ou chez les animaux ASIC3 KO (Marra et al., 2016).

La LPC16:0 est un activateur des canaux ASIC3, comme je l'ai évoqué précédemment (Jacquot et al., 2022; Jurczak et al., 2022; Marra et al., 2016), et ils ont été plusieurs fois été incriminé dans le contexte de l'arthrose (Hsieh et al., 2017; Jurczak et al., 2022). A partir de ses observations, ces travaux ont pu mettre au point un modèle animal de douleurs articulaires chroniques via une double injection intra-articulaire de LPC16:0 (Jacquot et al., 2022). La caractérisation de ce modèle a pu mettre en évidence les comorbidités anxieuses associées à l'état douloureux chronique. De plus ses travaux ont démontré que la présence de LPC16:0 n'induit pas de bourgeonnement nerveux, d'inflammation ou de remodelage osseux (Jacquot et al., 2022). L'application de LPC16:0 active ASIC3 induisant de concert une sensibilisation des neurones DRG nociceptif, jouant ainsi un rôle important dans l'établissement de l'état douloureux chronique.

Contexte et Objectifs de la thèse

Les canaux ASIC sont impliqués dans les mécanismes de la douleur. Les différents membres de cette famille sont exprimés tout le long du neuraxe de la douleur. Au sein de cette famille des canaux ASIC, je me suis avant tout intéressé au canal ASIC3 spécifique du SNP. Ce dernier joue un rôle majeur dans la perception nociceptive et la genèse de signaux douloureux. En plus de ses rôles supposés dans la mécano-perception, ce canal est capable de détecter les variations de pH les plus infimes, mais aussi des molécules inflammatoires. On le retrouve impliqué dans de nombreux processus douloureux, et il pourrait contribuer à la transition de l'état douloureux aiguë à chronique.

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe venait de démontrer la présence de LPC dans des liquides synoviaux de patients souffrant des troubles articulaires douloureux, et que ce LPC était un nouvel activateur/modulateur des canaux ASIC3. Cependant le rôle de la LPC dans l'établissement d'un état douloureux chronique d'origine articulaire n'avait pas encore été explorée, et son mécanisme d'action sur le canal ASIC3 restait mal compris.

Dans la première partie de ma thèse je me suis tout d'abord intéressé aux effets de la LPC sur le canal ASIC3 en réalisant des études électrophysiologique (patch clamp) sur des lignées cellulaires transfectées et sur des neurones sensoriels en culture primaire. J'ai pu non seulement quantifier les effets spécifiques de la LPC sur les canaux ASIC3 recombinants et natifs, mais également étudier les conséquences de ces effets sur l'excitabilité neuronale.

Dans une seconde partie de ma thèse, j'ai pu grâce à des approches biochimiques et électrophysiologiques, étudier le mécanisme d'action de la LPC sur le canal ASIC3. J'ai pour cela essayé de comprendre dans quel état la LPC16:0 agissait sur le canal ASIC3. J'ai donc testé différentes natures de solvant pour solubiliser la LPC et mesurer son impact sur la force d'activation du canal ASIC3. J'ai de plus effectué des expériences visant à modifier l'environnement lipidique membranaire, et mesuré l'impact que cela avait sur l'activation du canal ASIC3 par la LPC.

Par d'autres approches biochimiques, j'ai tenté sur la base de la structure du canal ASIC3 et de la LPC, d'identifier les segments nécessaires à l'activation du canal par cette dernière. Pour se faire j'ai eu recours aux canaux chimériques entre le canal ASIC3 et ASIC1a, permettant de déterminer les domaines structuraux sont impliqués dans la sensibilité du canal ASIC3 à la LPC. Enfin dans une approche électrophysiologique, cela m'a mené à tester d'autres lipides endogènes analogues de la LPC, le lysoPAF et le PAF. J'ai pu caractériser leurs effets électrophysiologiques sur les canaux ASIC clonés et natifs comparativement à la LPC.

J'ai également mesuré l'implication du récepteur au PAF dans les effets électrophysiologiques observés sur les canaux ASIC. Ainsi l'implication du PAF et du lysoPAF dans l'activation du canal ASIC3 ouvre de nouvelles perspectives des canaux ASIC dans l'inflammation et la douleur associée.

Résultats

Modulation d'ASIC3 par les lipides

Des résultats obtenus et publiés en 2016 (Marra et al., 2016) par l'équipe, montrent que des lipides endogènes tels que la LPC et l'AA étaient capables de moduler positivement l'activité des canaux ASIC3, avec une activation au pH physiologique de 7,4, sans acidification extracellulaire.

Dans cette étude en collaboration le service de rhumatologie du CHU de Nice, il a été possible, grâce à une approche translationnelle inverse, de mettre en évidence de nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC3. Il s'agit de deux lipides, l'AA et la LPC, présents dans les liquides synoviaux d'une dizaine de patients souffrants de différentes pathologies articulaires douloureuses. Ces deux lipides sont capables d'activer les canaux ASIC3 à pH physiologique et de générer un comportement douloureux aiguë chez les animaux via les canaux ASIC3. L'ensemble de ces résultats a été publié dans l'article « *Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids* » en 2016. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de ces recherches.

Lors de ma thèse j'ai participé à un projet impliquant plusieurs équipes de recherche en France et en Suède, visant à étudier le rôle de la LPC et du canal ASIC3 dans la douleur articulaire chronique associée aux maladies rhumatismales. Ce projet a donné lieu à une publication dans PAIN® intitulée « *Lysophosphatidylcholine 16: 0 mediates chronic joint pain associated to rheumatic diseases through acid-sensing ion channel 3* » (Jacquot et al., 2022) dont je suis signataire.

Dans ce travail, une approche translationnelle inverse a été développée à plus grande échelle, en débutant par l'analyse lipidomique des liquides synoviaux humains (HSF) issus de différentes cohortes de patients, obtenues grâce des collaborations avec le CHU de Nice et l'institut Karolinska en Suède. Une première cohorte comportant 35 patients souffrants d'ostéoarthrite (OA) présentait des concentrations de LPC significativement plus élevées que chez les témoins (sujets *postmortem* sans antécédents d'arthrose ou de pathologies s'en rapprochant) ($77,4 \pm 5,0 \mu\text{M}$ et $40,0 \pm 3,4 \mu\text{M}$, respectivement ; Figure 18.A).

La distribution des chaînes acyles au sein de cette classe de lipides a mis en évidence que la LPC16:0, portant du palmitate sur son squelette glycérol était l'espèce la plus représentée à la fois chez les témoins et chez les individus OA (Figure 18.B). De plus, seule la LPC16:0 présente des taux significativement plus élevés chez les patients OA que chez les individus témoins ($35,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$ contre $16,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$; Figure 18.B). Ces résultats indiquent que la hausse des taux de LPC dans les HSF des patients OA est principalement portée par une seule espèce de LPC, la LPC16:0.

Comme cela a été abordé dans l'introduction, la production de LPC est connue pour être régulée par des processus inflammatoires (Sevastou et al., 2013). La suite logique était donc de savoir si l'augmentation des taux de LPC dans les HSF était spécifique des pathologies articulaires associées ou non à une véritable inflammation. Ainsi, le dosage de la LPC a été effectué sur une seconde cohorte hétérogène de patients, présentant diverses maladies articulaires inflammatoires ou non inflammatoires (Figure 18.C&D).

Cette nouvelle cohorte regroupant 50 patients, a montré une augmentation de LPC similaire à la première cohorte de patients OA, comparativement aux contrôles *postmortem*. La concentration moyenne de LPC totaux de $93,6 \pm 6,7 \mu\text{M}$ (Figure 18.C, encart) est significativement plus élevée que dans le groupe témoin (Figure 18.A, $p=0,0007$, t-test non apparié). L'espèce majoritaire de LPC était également de la LPC16:0 dans cette cohorte de patients, avec une concentration moyenne de $41,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$ (Figure 18.C), résultats similaires à la première cohorte. Ces concentrations en LPC16:0 étaient significativement plus élevées que les échantillons contrôles (Figure 18.B, $p=0,0006$, t-test non apparié).

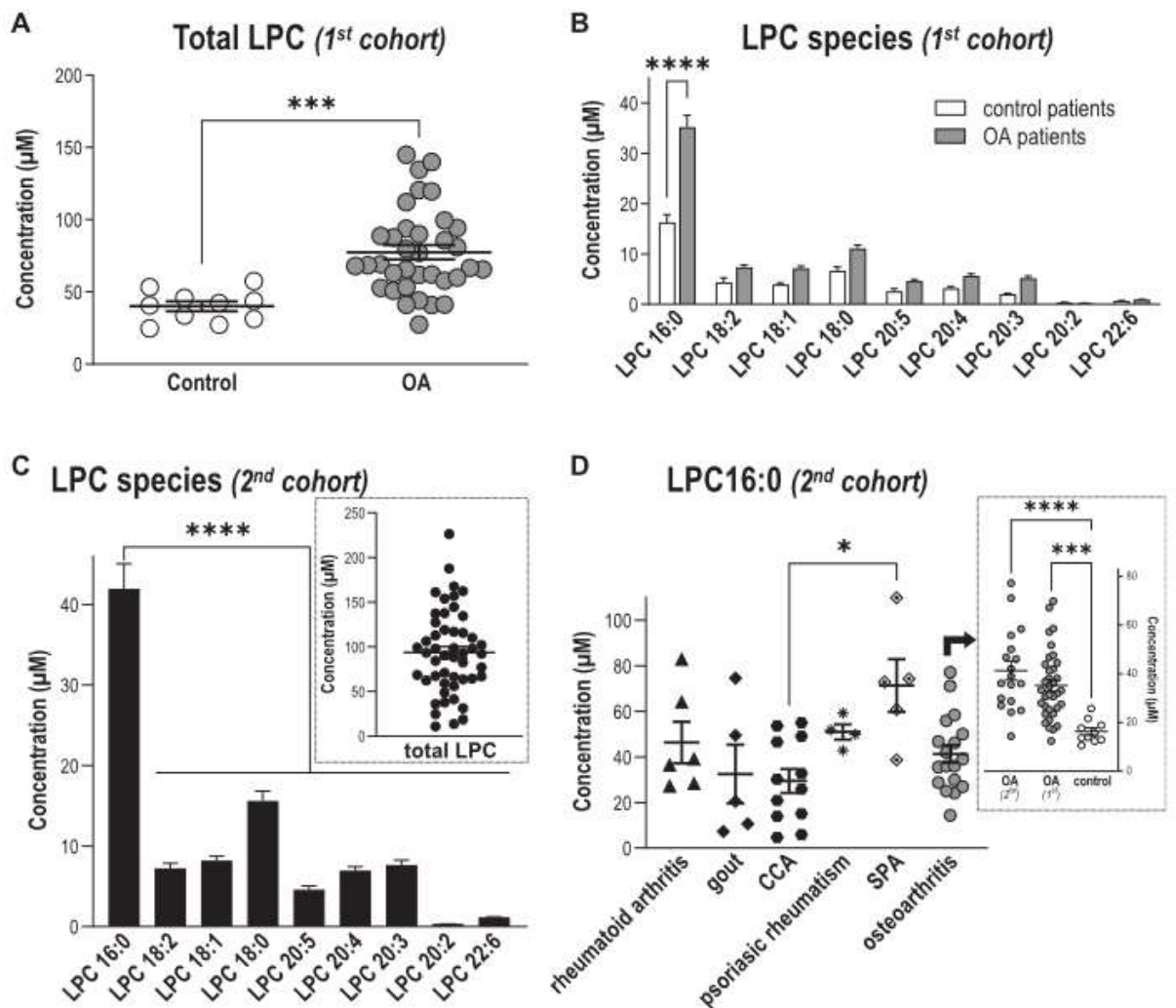


Figure 18 : Les niveaux de LPC16:0 sont augmentés dans les fluides synoviaux des patients souffrant de douleurs articulaires.

Des quantifications des espèces de LPC ont été réalisées dans des échantillons de liquides synoviaux humains (HSF) de genoux. Les lipides totaux ont été extraits des échantillons de HSF et analysés par infusion directe en spectrométrie de masse (MS) à l'aide d'une source d'ionisation électrospray (ESI) en mode ion positif (voir la section "Méthodes" de l'article 1 en annexes pour plus de détails). A. Comparaison des concentrations totales de LPC (mM) entre une première cohorte de patients atteints d'arthrose (OA, n=35 patients) et des sujets témoins post-mortem (n=10), montrant des niveaux significativement plus élevés de LPC chez les patients par rapport aux témoins (***P=0,0003, t-test non apparié). B. Distribution des concentrations des différentes espèces de LPC (mM) dans les HSF des patients atteints d'arthrose et de spécimens témoins post-mortem. Bien que les concentrations moyennes de la plupart des espèces de LPC étaient plus élevées dans les HSF des patients atteints d'arthrose, la LPC16:0 était la plus abondante et la seule à être significativement élevée par rapport aux sujets témoins post-mortem (***P<0,0001, Two-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Sidak). C. Distribution des concentrations des différentes espèces de LPC (mM) dans les HSF d'une deuxième cohorte de patients souffrant de différentes pathologies articulaires (n=50), montrant un niveau significativement plus élevé de LPC16:0 par rapport aux autres espèces (****P<0,0001, One-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Dunnet). **Encart** : Concentration totale de LPC dans

les HSF de la deuxième cohorte de patients. D. Concentrations de LPC16:0 dans les différents sous-groupes de patients de la deuxième cohorte : polyarthrite rhumatoïde (PR, n=6), goutte (n=5), ACC (n=12), rhumatisme psoriasique (n=4), SPA (n=5) et arthrose (n=18). Les concentrations de LPC16:0 dans tous les différents sous-groupes de patients sont comparables, à l'exception d'une différence entre l'ACC et l'APS (* $P < 0,05$, test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn). **Encart** : Les concentrations de LPC16:0 dans les HSF des patients atteints d'arthrose de la première et de la deuxième cohorte sont similaires et supérieures à celles des contrôles postmortem (** $P < 0,001$ et **** $P < 0,0001$, One-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey). ANOVA, analyse de la variance ; CCA, chondrocalcinose ; HSF, liquide synovial humain ; LPC, lysophosphatidylcholine ; OA, arthrose ; SPA, spondylarthrite (Jacquot et al., 2022).

De façon importante, une analyse statistique réalisée au Karolinska Institute a montré que les taux synoviaux de LPC16:0 étaient corrélés aux scores de douleurs (VAS genou et VAS global ; VAS : Visual Analogue Scale) chez les patients ostéoarthritiques de la première cohorte, indépendamment de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporel (IMC) et du taux d'IL6 (Supplementary figure 2 de l'article 1).

Ces observations cliniques sur la LPC, et plus particulièrement la LPC16:0, ont ensuite été modélisées *in vivo* chez la souris, en effectuant de injections intra-articulaires de LPC16:0 (Figures 2, 5 et 6 de l'article 1 + supplementary figure 2, 5 et 6), et en mesurant les comportements douloureux et anxieux. Les résultats montrent que la LPC16:0 induit un état douloureux chronique associé à des comorbidités anxiodépressives chez les souris sauvages, sans dimorphisme sexuel.

A l'inverse les souris invalidées pour le gène ASIC3 (ASIC3 KO ou ASIC3^{-/-}) sont, au moins en partie protégées de ces effets (Figures 5 et 6 et supplementary figures 5 et 6 de l'article 1). Pour ma part, dans le cadre de ces recherches, j'ai effectué des expériences d'électrophysiologie *in vitro*, sur des cellules transfectées et des neurones DRG de souris en culture primaire, afin d'étudier respectivement les effets de la LPC16:0 sur les canaux ASIC3 recombinants et natifs.

J'ai pu mettre en évidence que la perfusion de LPC16:0, dans la solution extracellulaire à pH7,4, sur des cellules HEK293 transfectées avec des canaux ASIC3 de rat ou humains, produisait un courant entrant progressif et non inactivant sans aucune modification du pH extracellulaire. Inversement, aucun courant significatif activé par la LPC16:0 n'a été observé dans les cellules transfectées avec ASIC1a, ni dans les cellules non transfectées (Figure 19).

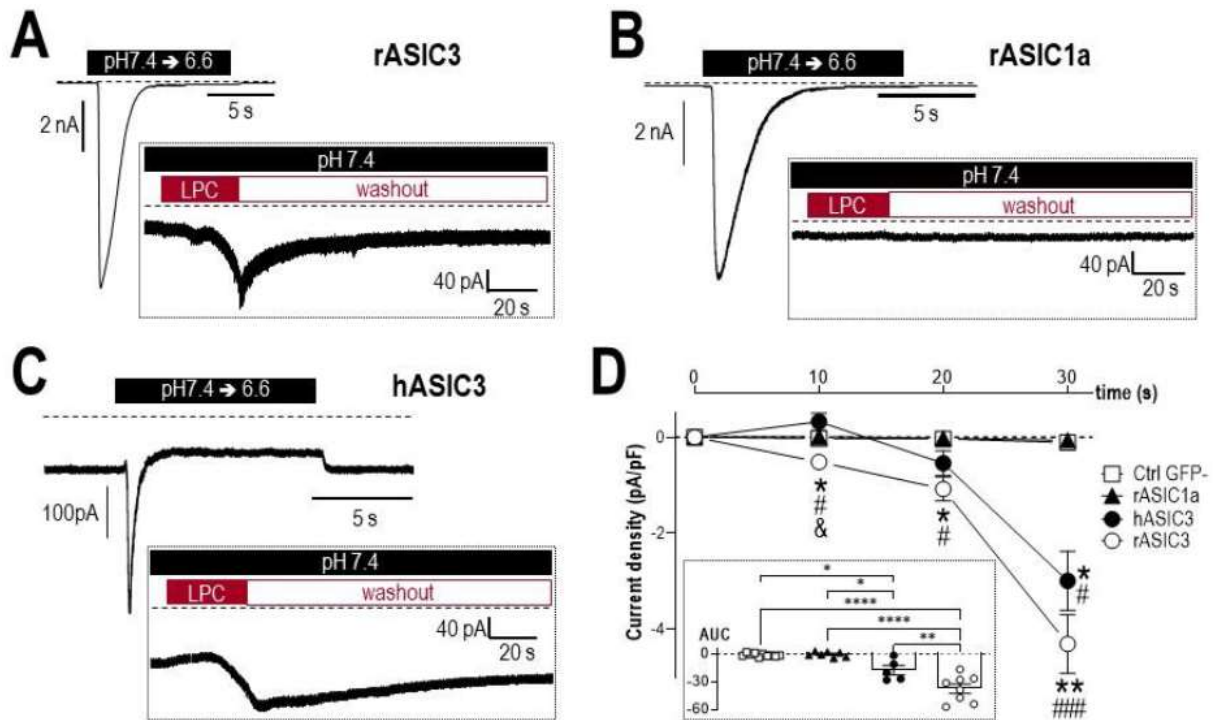


Figure 19 : La LPC16:0 induit un courant ASIC3 non inactivant dans un système d'expression recombinant.
A-C. Traces de courant ASIC typiques enregistrées en patch-clamp (HP -50mV) à partir de cellules HEK293 transfectées avec l'ASIC3 de rat (rASIC3, A), l'ASIC1a de rat (rASIC1a, B) ou l'ASIC3 humain (hASIC3, C), stimulé par une acidification extracellulaire de pH 7,4 à pH 6,6. Les **encarts** montrent les effets de la LPC16:0 (5 μ M) appliqué pendant 30 secondes à pH 7,4. **D.** Analyse des densités de courant mesurées après des applications de 10, 20 et 30 secondes de LPC16:0 (5 μ M) sur des cellules HEK non transfectées (Ctrl GFP-, n=10) ou transfectées avec rASIC1a (n=7), hASIC3 (n=5) ou rASIC3 (n=8). Une Two-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey ont été utilisés (*p<0,05 et ** p<0,01 par rapport à Ctrl GFP-, # p<0,05 et ### p<0,001 par rapport à ASIC1a, & p<0,05 par rapport à hASIC3). L'**encart** montre l'aire sous la courbe (AUC) obtenue pour les différentes conditions de transfection (Ctrl GFP-, rASIC1a, hASIC3 et rASIC3). Les AUC ont été calculé à l'aide du logiciel GraphPad Prism sur des périodes de 30 secondes à partir de la ligne de base fixée à 0 (n=5-10, * p<0,05, ** p<0,01 et **** p<0,0001, One-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey) (Jacquot et al., 2022).

Suite à ces résultats, j'ai voulu vérifier si l'application de LPC16:0 était capable d'induire le même effet sur ASIC3 dans un système natif. Ainsi, j'ai pu observer un courant induit par la LPC16:0 dans des neurones DRG de souris en culture primaire (Figure 20). Ce courant avait une densité significativement plus élevée dans les neurones de type sauvage qui exprimaient un courant ASIC natif induit à pH6,6 (WT ASIC+) par rapport aux neurones sans courant ASIC natif (WT ASIC-), et aux neurones isolés de souris knockout ASIC3, exprimant (KO ASIC+) ou n'exprimant pas (KO ASIC-) de courants ASIC à pH 6,6 (Figure 20.A-C). ASIC3 contribue donc significativement aux courants induits par l'application de LPC16:0 dans les neurones DRG de souris.

Un petit courant indépendant d'ASIC3 a tout de même été observé, suggérant un effet de la LPC16:0 sur d'autres canaux ioniques, comme cela a été rapporté dans la littérature (Andersson et al., 2007; Flemming et al., 2006; Gentry et al., 2010). Quoi qu'il en soit, j'ai pu observer qu'une dépolarisation membranaire des neurones DRG était associée à l'application de LPC16:0. Cette dépolarisation induite par la LPC16:0 était significativement plus élevée dans les neurones WT ASIC+ que dans les neurones WT ASIC-, KO ASIC+ ou KO ASIC-, ce qui confirme le rôle prépondérant d'ASIC3 dans l'effet excitateur de LPC16:0 des neurones DRG (Figure 20.D).

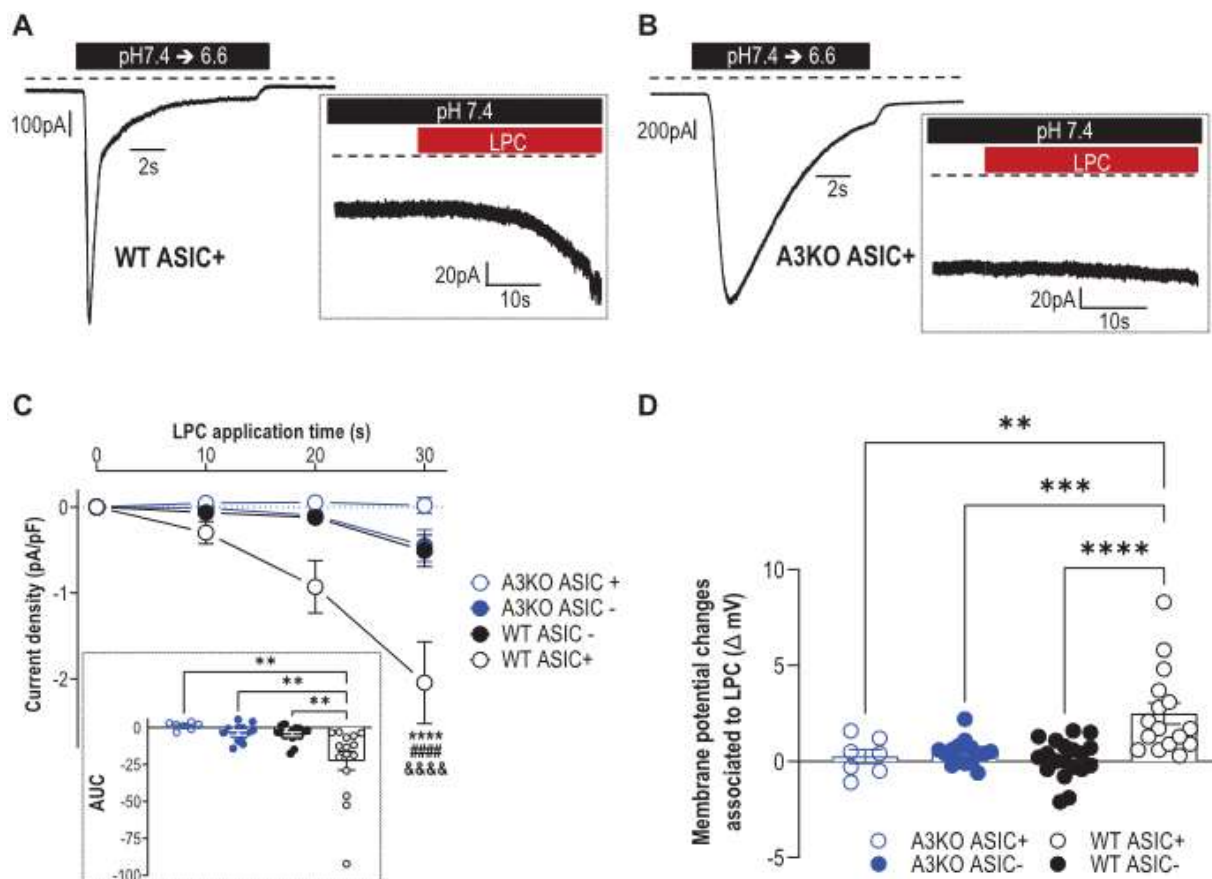


Figure 20 : La LPC16:0 induit un courant non inactivant, dépendant de l'ASIC3, associé à la dépolarisation de la membrane dans les neurones DRG de souris.

Expériences de patch clamp en conformation cellule entière réalisées sur des neurones DRG WT et ASIC3 knockout (A3KO) exprimant (ASIC+) ou n'exprimant pas (ASIC-) un courant ASIC provoqué par pH6,6. **A-B.** Courants ASIC natifs induit à pH6,6 enregistrés à -80 mV dans des neurones DRG de souris de type sauvage (WT ASIC+, A) et de souris knock out ASIC3 (A3KO ASIC+, B). Les **encarts** montrent l'effet de la LPC16:0 (5 μ M) appliqué pendant 30 secondes sur les mêmes neurones. **C.** Analyse des densités de courant mesurées après des applications de 10, 20 et 30 secondes de LPC16:0 sur des neurones WT ASIC+, WT ASIC-, A3KO ASIC+ et A3KO ASIC- (voir la section "Méthodes" de l'article 1 en annexes pour plus de détails, $n = 7-16$; **** $P < 0,0001$ par rapport aux WT ASIC-, ##### $P < 0,0001$ par rapport aux A3KO ASIC+ et &&&& $P < 0,0001$ par rapport à A3KO ASIC- ; Three-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey). L'**encart** montre l'AUC calculée à l'aide du logiciel GraphPad Prism sur une période de 30 secondes à partir de la ligne de base fixée à 0 ($n=7-16$, ** $P < 0,01$, One-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey). **D.** Modifications du potentiel membranaire associées à une application de 30 secondes de LPC16:0 sur des neurones ASIC+ WT, ASIC- WT, ASIC+ A3KO et ASIC- A3KO ($n=7-19$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ et **** $P < 0,0001$, One-way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey). ANOVA, analyse de la variance ; ASIC3, canal ionique sensible à l'acide 3 ; DRG, ganglions de la racine dorsale ; LPC, lysophosphatidylcholine ; WT, type sauvage (Jacquot et al., 2022).

Le lyso platelet-activating factor (lysoPAF) et le platelet-activating factor (PAF) sont deux nouveaux modulateurs endogènes des canaux ASIC3 (Article 2)

Contexte

Pour donner suite aux études publiées par notre équipe en 2016 et en 2022 (Marra et al., 2016 ; Jacquot et al., 2022) je me suis intéressé aux effets potentiels d'autres lipides endogènes présentant des analogies structurales avec la LPC : le lysoPAF et le PAF. Le lysoPAF est l'analogue structural éther-lipide de la LPC, avec une liaison alkyl à la place de la liaison acyl en *sn1* du glycérol (Marathe et al., 2020).

Il est généralement considéré comme le précurseur inactif du PAF, qui est synthétisé suite à l'action d'une lysoPAF acétyl transférase (Chapitre III.2.1). Mais le PAF peut aussi conduire en retour à la formation de lysoPAF, par l'action d'une PAF acétyl hydrolase. Il existe donc dans les tissus un équilibre entre PAF et lysoPAF et, de façon intéressante, leurs précurseurs éther-lipides, incluant les plasmalogènes, sont prépondérants dans le dans le cœur, le cerveau, la rate, les muscles squelettiques, les reins et les globules blancs (Braverman and Moser, 2012; Dean and Lodhi, 2018).

Mes travaux sur les effets de ces lipides, comparativement à ceux de la LPC, sur les canaux ASIC3 natifs et recombinants sont décrits dans l'article qui suit. Il s'agit d'une publication sous forme de « draft » dont je suis le premier auteur.

Ether lipids modulating Acid-Sensing Ion Channel 3

Kevin Delanoe¹, Miguel Salinas¹, Lucile Fleuriot¹, Delphine Debayle¹, Fabien Marchand², Eric Lingueglia¹ and Emmanuel Deval^{1,*}

¹ *Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, LabEx ICST, FHU InovPain, France*

² *Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France*

* To whom correspondence should be addressed: E. Deval, IPMC, UMR 7275 CNRS/Université Côte d'Azur, 660 route des lucioles, 0650 Valbonne, France. deval@ipmc.cnrs.fr

Introduction

Lysophosphatidyl-choline (LPC), and more specifically the LPC16:0 species, is an endogenous lipid that has recently emerged as a potential biomarker and a triggering factor of chronic pain associated to rheumatic diseases in humans (Hung et al., 2020; Jacquot et al., 2022). Indeed, LPC levels in human samples have been correlated with pain symptoms in patients suffering from fibromyalgia (Hung et al., 2020) and osteoarthritis (Jacquot et al., 2022). LPC belongs to the family of lysolipids, which can be produced following hydrolysis of the different glycerophospholipids (GPL) species by phospholipase A2 (PLA2) enzymes (Harayama and Riezman, 2018). The great diversity of GPL species not only lies on the different polar head that can be found at the *sn*-3 position of the glycerol backbone (*e.g.*, choline, ethanolamine, inositol or serine), but also on the large variety of saturated/unsaturated fatty acids (FA) they can bear at the *sn*-1 and *sn*-2 positions, as well as on the chemical structure of the bonds by which these FA are linked to the glycerol (Braverman and Moser, 2012). Importantly, diacyl and ether GPL, which includes plasmalogens, can be distinguished upon these chemical bonds that can be either acyl ester, alkyl ether or vinyl ether (alkenyl) bonds. LPC derived from diacyl GPL with a choline head (GPL*Cho*), but it also has ether lipid analogs bearing an alkyl bond (lysoplatelet activating factor, lyso-PAF) or an alkenyl bond that are precursors of the well-known PAF or its alkenyl analog, respectively (for reviews, see (Dean and Lodhi, 2018; McManus and Pinckard, 2000).

LPC has been reported to modulate pain-related ion channels, including the two-pore domain (K2P) potassium channel TREK1 (Maingret et al., 2000), the calcium channel TRPC5 (Flemming et al., 2006; Sadler et al., 2021), the cold sensor TRPM8 (Andersson et al., 2004; Gentry et al., 2010), the heat-activated TRPV1 (Rimola et al., 2020) and the proton-gated acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) (Jacquot et al., 2022; Marra et al., 2016; Pidoux et al., 2020). Different proalgetic effects have been reported following LPC injections in rodents, including both acute (Gentry et al., 2010; Rimola et al., 2020; Sadler et al., 2021) and persistent (Hung et al., 2020; Jacquot et al., 2022) pain-like behaviors. Interestingly, ASIC3 is playing a determinant role in the development of LPC-induced chronic pain arising from deep tissues such as joints or muscles in mice, and potentially in humans (Hung et al., 2020; Jacquot et al., 2022).

If effects of LPC on pain-related channels have been documented, little is known about its ether lipid analogs that belong to the lyso-PAF/PAF family. Lyso-PAF, which is generally considered as the inactive precursor of PAF, has been shown to positively modulate the mechano-gated two-pore-domain potassium channels TREK1 and TRAAK (Maingret et al., 2000). PAF is a potent proinflammatory phospholipid mediator that elicits various cellular functions and promotes several pathological events (for reviews, see Dorninger et al., 2020; Liu et al., 2017; Travers et al., 2021), including neuropathic

(Hasegawa et al., 2010; Shindou et al., 2017; Tsuda et al., 2011) and uterine pain (Hellman et al., 2018). Most, if not all, of the effects of PAF are associated to its receptor (PAF-R), which is a G protein-coupled receptor (Honda et al., 1991; Hwang, 1988; Ishii et al., 1996; Nakamura et al., 1991). In this work, we investigate the capacity of PAF and lyso-PAF to modulate pain-related ASIC3 channels. We show that the two lipids both have positive effects on ASIC3 activity, with the stimulation of a non-inactivating current at resting physiological pH 7.4, and the potentiation of acid-evoked currents. These effects are similar to those observed for LPC, and does not appear to depend on the PAF-R. Our data indicate that lyso-PAF, PAF and LPC most probably act directly on ASIC3 channels, or in its very close membrane vicinity. PAF and lyso-PAF thus appear as new potential endogenous pain-triggering factors acting through ASIC3 channels independently of PAF-R.

Materials and methods

HEK293 cells' culture and transfection

HEK293 cell line was grown in DMEM medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (BioWest) and 1% of antibiotics (penicillin + streptomycin, BioWhittaker). One day after plating, cells were transfected with either pIRES2-rASIC1a-EGFP (rat ASIC1a) or pIRES2-rASIC3-EGFP (rat ASIC3) vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2–4 days after transfection.

Animals

Experiments were performed on adult male C57Bl6J wild-type mice (WT, Janvier labs) as well as ASIC3 knockout (ASIC3^{-/-}) and wild-type littermates (ASIC3^{+/+}), bred in animal facilities of IPMC and UCA Medicine School with agreements n°C061525 and n°C63115.15, respectively. Animals were kept with a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water and were acclimated to housing and husbandry conditions for at least 1 week before experiments. All experiments followed guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983). All the protocols used were approved by the local ethical committees (CIEPAL-Azur and CEMEA-Auvergne) and the French government (agreements APAFIS#13499, APAFIS#17387) in accordance with European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC).

Primary culture of DRG neurons

Lumbar dorsal root ganglia (DRG L1 to L6) were rapidly dissected out from euthanized adult male C57Bl6J (Janvier Lab, at least 8 weeks of age) and ASIC3^{-/-} mice, and placed in cold Ca²⁺-free/Mg²⁺-free HBSS medium (Corning®) supplemented with 10mM glucose, and 5mM HEPES (pH7.5 with NaOH). After removing the roots, DRGs were enzymatically dissociated at 37°C for 2 x 20min in the HBSS solution supplemented with calcium (CaCl₂ 5 mM) and containing collagenase type II (Gibco, France) and dispase (Gibco, France). DRGs were then mechanically triturated and washed in a complete neurobasal A medium (NBA, Gibco® Invitrogen™ supplemented with 2% B27, 2mM L-glutamine and 1% antibiotics: penicillin + streptomycin, Lonza™ BioWhittaker™), before being plated in 35-mm petri dishes. Neurons were then kept in culture at 37°C for one week with 1/3 of the culture medium renewed every 2 days (complete NBA supplemented with 10ng/ml NT3, 2ng/ml GDNF, 10ng/ml BDNF, 100ng/ml NGF and 100nM retinoic acid), and were used for patch-clamp experiments at least 2 days after plating.

Patch-clamp experiments

Whole cell configuration of the patch clamp technique was used to record membrane currents at a holding potential of -80mV (voltage-clamp mode). Recordings were made at room temperature using an axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) with a 2 kHz low-pass filter. Data were digitized by a Digidata 1550 A-D/D-A converter (Axon Instruments), sampled at 20 kHz and recorded on a hard disk using pClamp software (version 11; Axon Instruments). The patch pipettes (2–6 M Ω) were filled with an intracellular solution containing (in mM): 135 KCl, 2 MgCl₂, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.3 with KOH). The extracellular solution bathing the cells contained (in mM) the following: 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.4 with N-methyl-D-glucamine); This extracellular medium was supplemented with 10mM glucose for DRG neurons. ASIC currents were induced by shifting one out of eight outlets of a homemade microperfusion system driven by solenoid valves, from a holding control solution (i.e., pH 7.4) to an acidic test solution (pH 7.0 or pH 6.6). Cells were considered as positively transfected when they exhibited a visible GFP fluorescence and a significant pH6.6-evoked current of at least 200pA (I_{pH6.6} \geq 200pA). Non-transfected (NT) cells were used as controls and they were selected in Petri dishes having undergone the transfection protocol described above, but with no visible GFP fluorescence and no significant pH-6.6-evoked current. DRG neurons were considered as ASIC+ when they exhibited a transient pH6.6-evoked current with a peak amplitude \geq 20pA, otherwise they were considered as ASIC-.

Intramuscular injections of lyso-PAF and von Frey experiments in mice

Lyso-PAF (10 nmole) or its vehicle were diluted in NaCl 0.9% and two injections were performed in the gastrocnemius muscle of anesthetized mice (isoflurane). The two injections were made 5 days apart, and the first injection corresponded to day 1 of the protocol. Mechanical sensitivity was evaluated by performing von Frey test, using the classical up-down method of Dixon (Dixon, 1965) modified by Chaplan (Chaplan et al., 1994) with von Frey filaments (Bioseb, France), before and after intramuscular lyso-PAF injections. Freely moving animals were placed in individual plastic boxes on a wire mesh surface, so that von Frey mechanical stimuli could be applied to the plantar surfaces of their hindpaws. Animals followed an habituation period before a set of calibrated von Frey filaments ranging from 0.02 to 1.4g was applied to the plantar surface of each hindpaw, alternatively or only on the ipsilateral hindpaw, until withdrawal or licking of the paw to the stimulus. The 50% paw mechanical threshold was evaluated before (Baseline) and at different time points after the first and second lysoPAF or vehicle intramuscular injections.

Lipids

Lyso-PAF, PAF and LPC16:0 were purchased from Avanti (Coger, France), prepared as stock solutions in either ethanol or methanol, and diluted at their final concentration on either medium or NaCl 0.9%. For patch-clamp experiments ethanol or methanol were diluted in extracellular pH7.4 medium (0.01 to 0.02%) to serve as vehicle control solutions. For intramuscular lyso-PAF injections, vehicle corresponded to ethanol 2% in NaCl 0.9%.

PAF-R-Inhibitor

The ginkgolid B and the Apafant (or WEB2086) were purchased from Sigma (Merck KGaA, Allemagne) prepared as stock solutions in DMSO, and diluted at their final concentration in extracellular medium at pH7.4.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Measurements were determined by dynamic light scattering using a ProteinsSolution DynaPro and a ProteinsSolution temperature-controlled MicroSamples, with recording by Dynamics V5 software. The samples (50µl) were placed in a quartz cell maintained at 25°C, and measured for 120 seconds.

Lipid extraction and lipidomic analysis of HEK293 fatty acid-treated cells

Acetonitrile (ACN) and isopropanol (IPA) were purchased from Carlo Erba. Chloroform (CHCl₃) was purchased from Merck. These solvents were LC-MS grade. Methanol (MeOH) was from VWR. Formic acid Optima LC-MS quality was purchased from ThermoFisher. Ultrapure water was from Purelab flex (Veolia Water), and formate ammonium (99%) was from Acros Organics.

The extraction was performed using 1.5 mL solvent-resistant plastic Eppendorf tubes and 5 mL glass hemolyse tubes to avoid contamination. Methanol, chloroform and water should each be cooled down on wet ice before the lipid extraction.

A modified Bligh and Dyer was used for lipid extraction. One million cells were collected and pelleted in an eppendorf and 200 µl of water was added. After vortexing (30s), the sample was transferred in a glass tube. 500 µl of methanol were used to rinse the Eppendorf tube and then transferred in the glass tube to which 250 µl of chloroform were finally added. The mixture was vortexed for 10 min before a new addition of 250 µl of water and 250 µl of chloroform. The mixture was vortexed again for 10 min and finally centrifuged (2.500 rpm, 4°C, 10 minutes). Then, 400 µL of the organic phase was collected in a new glass tube and dried under a stream of nitrogen. The dried extract was resuspended in 60 µL of methanol/chloroform 1:1 (v/v) and transferred in an injection vial.

Reverse phase liquid chromatography was selected for separation with an UPLC system (Ultimate 3000, ThermoFisher). Lipid extracts were separated on an Accucore C18 (150x2.1, 2.5 μ m) column (ThermoFisher) operated at 400 μ l/ minutes flow rate. The injection volume was 3 μ l. Eluent solutions were ACN/H₂O 50/50 (V/V) containing 10mM ammonium formate and 0.1% formic acid (solvent A) and IPA/ACN/H₂O 88/10/2 (V/V) containing 2mM ammonium formate and 0.02% formic acid (solvent B). The step gradient of elution was in %B: 0.0 min, 35%; 0.0-4.0 min, 35 to 60%; 4.0-8.0 min, 60 to 70%; 8.0-16.0 min, 70 to 85%; 16.0-25.0 min, 85 to 97%; 25-25.1 min 97 to 100% B, 25.1-31 min 100% B and finally the column was reconditioned at 35% B for 4 min. The UPLC system was coupled with a Q-exactive Mass Spectrometer (thermofisher, CA); equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe. This spectrometer was controlled by Xcalibur software (version 4.1.31.9.) and operated in electrospray positive mode.

Data were acquired with dd-MS² mode. MS spectra were acquired at a resolution of 70 000 (200 m/z) in a mass range of 250–1200 m/z with an AGC target 1e6 value of and a maximum injection time of 100ms. The 15 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 1 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with normalized collision energy (NCE) of 25 and 30 eV. MS/MS spectra were acquired in the ion trap with an AGC target 1e5 value, the resolution was set at 35.000 at 200 m/z combined with an injection time of 80 ms.

Data were reprocessed using Lipid Search 4.2.21 (ThermoFisher). The product search mode was used and the identification was based on the accurate mass of precursor ions and MS² spectral pattern. The parameters for the ion identification and alignment were set up as follow: ion precursor tolerance 5 ppm; ion product tolerance 5 ppm; ion and adducts searched [H⁺], [NH₄⁺] and [Na⁺]; alignment retention time tolerance 0.4 min; ID quality filters A, B and C.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.21 software and data are presented as mean \pm SEM, unless otherwise stated. Differences between datasets were considered significant when *p*-values, which were calculated using either parametric or non-parametric tests followed by adequate *post-hoc* tests, were less or equal to 0.05. The statistical tests used are indicated in the figure legends.

Results

Lyso-PAF and PAF are new lipid modulators of ASIC3 channels

Lyso-PAF is the ether-lipid analog of LPC, bearing an alkyl-bond FA in the *sn*-1 position, and is generally considered as the inactive precursor of PAF. Indeed, PAF can be biosynthesized from lyso-PAF through a lyso-PAF acetyl-transferase, and PAF can in turn give back lyso-PAF through a PAF acetyl-hydrolase (McManus and Pinckard, 2000). When lyso-PAF (Fig. 1A) or PAF were applied extracellularly, *i.e.* in the pH7.4-bathing solution, onto ASIC3-expressing HEK293 cells, activating effects of both lipids were observed on ASIC3 currents. Lipids were applied at 5 μ M, and 30-second applications were sufficient to activate a significant, progressive and non-inactivating ASIC3 current, as compared to non-transfected cells (Fig. 1B-C). Conversely, lyso-PAF or PAF at 5 μ M had no activating effects on ASIC1a-expressing cells (Fig. 1A-C).

Effects of lyso-PAF and PAF were next compared to those of LPC (Fig. 2). Lyso-PAF and PAF were not only able to activate ASIC3 channels at resting pH 7.4 as shown above (Fig. 1 and Fig. 2A-C), but also to potentiate the pH7.0-evoked activity (Fig. 2A, D-E), with effects generally similar to those of LPC. Comparatively, at the concentration of 5 μ M, none of these three lipids were able to activate an ASIC1a current at resting pH 7.4 (Fig. 2C and Fig. 1), and we did not observed any significant potentiating effect of the pH6.6-evoked ASIC1a current (Fig. 2E). Activation of ASIC3 by the three different lipids at pH7.4 was similar at 5 μ M (Fig. 2B-C), but had some differences at 1 μ M and 10 μ M (Fig. 2C). Indeed, lyso-PAF and mainly PAF had a small ASIC3-activating effect at 1 μ M (Fig. 2C) whereas LPC had no effect. Moreover, the effects of lyso-PAF and PAF were bell-shaped, with a maximal effect observed at 5 μ M that decreased at 10 μ M, while those of LPC increased up to 10 μ M (Fig. 2C). Similar observations were made for the potentiating effects of lyso-PAF or LPC on the acid-evoked ASIC3 currents (Fig. 2A, D-E), with a maximal effect of lyso-PAF at 5 μ M that slightly decreased at 10 μ M, and an increasing effect of LPC up to 10 μ M (Fig. 2E). However, the potentiating effect of PAF on pH7.0-evoked ASIC3 current was smaller than those of lyso-PAF and LPC (Fig. 2D-E). For instance, PAF at 5 μ M only induced a 1.67 ± 0.68 -fold increase of the current after a 30s-application compared to 2.55 ± 1.3 to 2.71 ± 1.3 -fold increases for lyso-PAF and LPC, respectively (Fig. 2D).

Altogether, these data demonstrate that lyso-PAF and PAF are lipid modulators of ASIC3 channels able to both activate the channel at resting pH7.4, *i.e.*, without any extracellular acidification, and to potentiate its acid-evoked activity. Although these effects appear to be comparable to those of LPC, we pointed out some differences between lipids, with PAF being the least efficient of the three lipids acting on ASIC3, and lyso-PAF appearing to be the most potent at the concentration of 5 μ M. Finally,

no activating/potentiating effects of lyso-PAF, PAF and LPC were observed on ASIC1a at the same 5 μ M concentration, but this does not preclude possible effects at higher concentrations.

The effects of lyso-PAF and PAF on ASIC3 are not dependent on the PAF receptor

Most, if not all, of the biological effects described for PAF have been associated to the binding to its receptor PAF-R (Honda et al., 1991; Hwang, 1988; Ishii et al., 1996; Nakamura et al., 1991). The affinity of PAF for its PAF-R is very high (nanomolar range). The affinity of lyso-PAF for PAF-R is much lower (Blank et al., 1982), and to test whether the effects of lipids on ASIC3 could be mediated by PAF-R, we performed experiments with PAF-R inhibitors, *i.e.*, Ginkgolid B (Hwang et al., 1985) or Apafant (Casals-Stenzel et al., 1987). The activating (Fig 3A, B) and potentiating (Fig. 3A, C) effects of lyso-PAF, PAF or LPC at 5 μ M on ASIC3 currents were not altered by the presence of 10 μ M ginkgolid B or of 10 μ M apafant. These data indicate that the effects of PAF and lyso-PAF on the ASIC3 activity were not mediated by the PAF receptor, at least at the concentration of 5 μ M, suggesting another mechanism of action of lipids on the channel.

The lipid effects on ASIC3 do not depend on the lipid membrane composition

Because LPC and related lipids have been reported to act as membrane crenators (Lundbaek and Andersen, 1994), we next tested whether the membrane lipid composition could have an impact on the LPC effects on ASIC3 (Fig. 4). HEK293 cells transfected with ASIC3 were treated for 24 hours with different FA (see methods), including the saturated palmitic acid (PA, C16:0) or the unsaturated docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). These treatments enriched cell membrane phospholipid content in PA or DHA, respectively (Supplementary Fig. 1), although the enrichment in C22:6 was most efficient. These treatments had no significant impacts on both the pH-dependent activation and inactivation of ASIC3 current (Supplementary Fig. 1B), although the activation curve was slightly shifted toward acid pH values, leading to a slight, but not significant reduction of the ASIC3 window current in PA treated cells (Supplementary Fig. 1C). At a 5 μ M concentration, 30-second applications of LPC kept the same efficiency to activate ASIC3 at resting pH7.4 in both PA and DHA treated cells, as compared to vehicle-treated cells (Fig. 4A). At a 1 μ M concentration, LPC still failed to activate ASIC3 in both C16:0 and C22:6 treated cells compared to vehicle-treated cells (Fig. 4B). These data show that changing the fatty acid content of the cell plasma membrane, which most probably impacts the way LPC and related lipids interact with the membrane, did not change the ability of LPC to activate ASIC3, suggesting direct effects on the channel or in its close membrane vicinity.

To further characterize these effects, we performed experiments using ASIC3 mutants, to determine which channel domains are important for the lipid effects to occur (Fig. 4C). As LPC, lyso-PAF and PAF had no effects on ASIC1a (at least at the concentration of 5 μ M), we constructed chimeras between ASIC1a and ASIC3. Replacing the transmembrane and intracellular domains of ASIC3 by those of ASIC1a (A1a/loop3) reduced the ability of LPC to activate the channel (Fig. 4C). Conversely, replacing the transmembrane and intracellular domains of ASIC1a by those of ASIC3 (A3/loop1a) potentiated the activating effect of LPC compared to its effect of wild-type ASIC3. Although it is difficult to draw definitive conclusions about effects of LPC on ASIC3 using these chimeras, the results seemed to indicate that the ASIC3 transmembrane and intracellular domains are important for the effect of lipids.

In another set of experiment, we assessed whether the lipid structure was determinant to produce effects on ASIC3 (Fig. 4D-F). First, we demonstrated that, in the concentration range modulating the ASIC3 activity (1-10 μ M), lipids most probably produced their effects on the channel as individual molecules and not as lipid aggregates. Indeed, amphiphilic molecules such as LPC and related lipids can be organized in aggregates such as micelles in aqueous solutions (Robinson and Saunders, 1958). We thus determined whether lipids were aggregated in our experimental conditions, *i.e.*, lipids prepared as stock solutions in ethanol and diluted at a final maximum concentration of 10 μ M in extracellular-mimicking saline pH7.4 medium (see methods). As a positive control, a 1mM LPC solution prepared in water was used, clearly showing the formation of lipid aggregates (Fig. 4D), as expected. Conversely, no aggregates were detected when LPC was dissolved at 10 μ M in saline extracellular pH7.4 medium, indicating that the effect on ASIC3 is most probably supported by individual lipid molecules.

LPC and lyso-PAF are lysolipids classically considered as bearing their single FA chain in *sn-1* position, *i.e.*, produced following hydrolysis of membrane GPL*Cho* by PLA2 (Dennis et al., 2011). PLA1 enzymes (Richmond and Smith, 2011) are also able to produce lysolipids, leading to lysolipids bearing their FA chain in *sn-2* position. We thus tested whether LPC compounds bearing either a palmitic acid in *sn-1* or *sn-2* position have the same potency to modulate ASIC3 channel activity (Fig. 4E-F). Interestingly, at 5 μ M, LPC with the palmitic acid in *sn-2* position failed to activate ASIC3 at resting pH7.4 (Fig. 4E), and it only modestly potentiated the pH7.0-evoked ASIC3 current (Fig. 4F), compared to its *sn-1* analog. These data indicate that, although belonging to the same lipid family, the FA position on the glycerol backbone of LPC is critical for the lysolipid effect on ASIC3 channels.

Lyso-PAF depolarizes DRG neurons and induces a long-lasting pain-like behavior in mice in an ASIC3-dependent manner

LPC was recently shown to generate an ASIC3 depolarizing component in mouse DRGs (Jacquot et al., 2022), and to provoke long-lasting pain-like behaviors when injected within joints (Jacquot et al., 2022) or skeletal muscle (Hung et al., 2020). When 5 μ M lyso-PAF was applied extracellularly at resting pH7.4 for 30 seconds onto mouse DRG neurons in primary culture, it induced a significant ASIC3-dependent inward current (Fig. 5A), which was associated to a membrane depolarization (Fig. 5B). Lyso-PAF generated currents (Fig. 5A) were similar to the currents observed in ASIC3-transfected HEK293 cells (Fig. 1), and had a significantly higher density in wild-type neurons displaying a native pH6.6-evoked ASIC current (WT ASIC+) compared to wild-type neurons not displaying this native current (WT ASIC-), and to ASIC3 knockout neurons that displayed or not native pH6.6-evoked ASIC current (A3KO ASIC+ and A3KO ASIC-). This current was associated to a membrane depolarization that was significantly higher in WT ASIC+ neurons compared to WT ASIC-, A3KO ASIC+ and A3KO ASIC- neurons (Fig. 5B). Interestingly, in some WT ASIC- and A3KO ASIC+ neurons, the 30-second application of lyso-PAF was associated to a clear membrane hyperpolarization (Fig. 5B), indicating effects of the lysolipid on other ion channels in DRGs, possibly the mechano-sensitive potassium channels TREK1 or TRAAK (Maingret et al., 2000). Finally, lyso-PAF was injected into the gastrocnemius muscle in mice, while their mechanical and thermal sensitivities were measured before and after muscle injections (Fig. 4C). The data clearly show that two intramuscular injections of lyso-PAF induced long-lasting secondary mechanical allodynia (Fig. 4C), but not thermal hyperalgesia (Fig. 4C, inset), in WT mice, while ASIC3 KO mice were protected from this effect. All together, these data suggest that intra-muscular lyso-PAF injections most probably sensitize ASIC3-expressing sensory neurons innervating muscle *in vivo*, ultimately leading to persistent pain behaviors in mice.

Discussion

Platelet-activating factor (PAF) is a well-known lipid involved in several biological processes, including pain (Hasegawa et al., 2010; Hellman et al., 2018; Shindou et al., 2017). For instance, it has been proposed to participate to tactile allodynia following peripheral nerve injury (Hasegawa et al., 2010; Shindou et al., 2017), as well as to visceral pain and pelvic hyperalgesia (Hellman et al., 2018) in rodents. Importantly, all these effects are associated to the binding of PAF to its high affinity receptor, namely PAF-R. The present work describes new potential pain-related effects of PAF, but also of its precursor lyso-PAF, through the acid-sensing ion channel 3 (ASIC3). Both lipids are able to positively modulate ASIC3 activity, inducing its activation at resting physiological pH7.4, and potentiating its pH7.0-evoked current, independently of the PAF-R.

The effects of PAF and lyso-PAF on ASIC3 are comparable to those of lysophosphatidyl-choline (LPC), another endogenous lipid we recently propose to trigger chronic joint pain through ASIC3 in both rodents and humans (Jacquot et al., 2022; Marra et al., 2016). However, although the three lipids globally affect ASIC3 in a similarly way, we pointed out some interesting differences, especially between LPC and lyso-PAF/PAF, which may be related to a better solubility of lyso-PAF and PAF at the concentration of 5 μ M. Although PAF, lyso-PAF and LPC share common structural elements, *i.e.*, glycerol backbone, choline head in *sn*-3 and fatty acid in *sn*-1, lyso-PAF and LPC belongs to the lysolipid family, contrary to PAF, which is a phospholipid. On the other hand, LPC is an acyl GPL whereas PAF and lysoPAF belongs to the ether-lipid family due to their alkyl-bond fatty acids in *sn*-1. Based on their structural analogies, but also on the fact that their effects on ASIC3 do not depend on PAF-R, we hypothesize that the three lipids have a similar mechanism of action on the channel. Previously, we reported that both the choline head and the *sn*-1 fatty acid chain length of LPC were key elements for its efficiency to modulate ASIC3 (Marra et al., 2016). We now demonstrate that the *sn*-1 or *sn*-2 position is also crucial. Indeed, the LPC species bearing a C16:0 (palmitic acid) in *sn*-2 position loses its ability to activate ASIC3 at resting pH, compared to its *sn*-1 C16:0 analog. Theoretically, both *sn*-1 and *sn*-2 lysolipid species are endogenously synthesized following GPL*Cho* hydrolysis by PLA2 and PLA1 enzymes, respectively (Dennis et al., 2011; Richmond and Smith, 2011). The fact that only LPC-*sn*-1-C16:0 is able to modulate ASIC3 suggests a difference between PLA1 and PLA2 in their ability to be associated to pain, at least through an effect on ASIC3 channels, by producing two analogs of the same lysolipid.

Lyso-PAF, PAF, LPC, but also AA, are amphipathic molecules and, as such, there are considered as able to induce membrane curvature changes (Lundbaek and Andersen, 1994; Pascher et al., 1992; Sheetz and Singer, 1974). We already proposed that the effects of LPC and AA on ASIC3 are probably not due

to plasma membrane deformations by the lipids, but rather to a more direct effects onto the channel or in its close vicinity (Marra et al 2016). We now report that changing the fatty acid content of plasma membrane phospholipids, *i.e.*, enrichment with either the saturated palmitic acid (C16:0) or the unsaturated docosahexaenoic acid (C22:6), has almost no effect on the ASIC3 pH-dependence and, importantly, does not change the ability of LPC to positively modulate the channel activity. These results further support a possible effect of the lipids directly on the channel, or in its close membrane vicinity, an hypothesis reinforced by the identification of ASIC3 transmembrane domains as key elements for the effect of lipids. Interestingly, particular transmembrane domains corresponding to lipid binding sites have been identified in the ASIC structure (Yoder and Gouaux, 2020).

In this work, we identify two endogenous lipids, namely PAF and lyso-PAF, as new positive modulators of pain-related ASIC3 channels. These two lipids are closely linked, with PAF being produced from lyso-PAF through an acetyl-transferase and giving back lyso-PAF through an acetyl-hydrolase (McManus and Pinckard, 2000). Many biological effects have been described for PAF, including effects in pain (Hasegawa et al., 2010; Hellman et al., 2018; Shindou et al., 2017), but all these effects are associated to its high affinity receptor PAF-R. By contrast, lyso-PAF is generally considered as the inactive precursor of PAF because of its much lower affinity for PAF-R. Our data thus open new perspectives on a possible involvement of lyso-PAF in pain independently of PAF-R and through its positive modulatory effects on pain-related ASIC3 channels.

Acknowledgements

We thank Drs A. Baron, S. Diochot, J. Noel, and M. Salinas for helpful discussions, V. Friend and J. Salvi-Leyral for technical support, and V. Berthieux for secretarial assistance. We also thank Mr A. Reynaud and Dr B. Antony for helpful discussion about lipids and their expertise for DLS experiments. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM grants #19618 and #23731), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0015-01 and ANR-17-CE16-0018) and the NeuroMod Institute of University Côte d'Azur (UCA).

Author Contributions

Kevin Delanoe designed, performed and analyzed electrophysiological experiments; Miguel Salinas designed and constructed the ASIC1a/ASIC3 chimeras; Lucile Fleuriot and Delphine Debayle performed lipidomic analysis of HEK293 cells; Fabien Marchand conceived, designed and analyzed behavioral experiments; Eric Lingueglia helped in experimental design and critical reading of the manuscript; Emmanuel Deval conceived, designed and analyzed experiments, and wrote the manuscript. All authors participated in the critical reading of the manuscript and give their consent for this final draft.

Conflict of interest

Authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- Andersson, D.A., Chase, H.W.N., and Bevan, S. (2004). TRPM8 Activation by Menthol, Icilin, and Cold Is Differentially Modulated by Intracellular pH. *J. Neurosci.* *24*, 5364–5369.
- Blank, M.L., Cress, E.A., Lee, T.C., Malone, B., Surlles, J.R., Piantadosi, C., Hajdu, J., and Snyder, F. (1982). Structural features of platelet activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) required for hypotensive and platelet serotonin responses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* *38*, 3–20.
- Braverman, N.E., and Moser, A.B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1822*, 1442–1452.
- Casals-Stenzel, J., Muacevic, G., and Weber, K.H. (1987). Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther* *241*, 974–981.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* *53*, 55–63.
- Dean, J.M., and Lodhi, I.J. (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* *9*, 196–206.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011). Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* *111*, 6130–6185.
- Dixon, W.J. (1965). The Up-and-Down Method for Small Samples. *Journal of the American Statistical Association* *60*, 967–978.
- Dorninger, F., Forss-Petter, S., Wimmer, I., and Berger, J. (2020). Plasmalogens, platelet-activating factor and beyond – Ether lipids in signaling and neurodegeneration. *Neurobiology of Disease* *145*, 105061.
- Fleming, P.K., Dedman, A.M., Xu, S.-Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C.D., Bateson, A.N., Muraki, K., and Beech, D.J. (2006). Sensing of Lysophospholipids by TRPC5 Calcium Channel *. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 4977–4982.
- Gentry, C., Stoakley, N., Andersson, D.A., and Bevan, S. (2010). The Roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in Chemically Induced Cold Hypersensitivity. *Mol Pain* *6*, 1744-8069-6–4.
- Harayama, T., and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *19*, 281–296.
- Hasegawa, S., Kohro, Y., Shiratori, M., Ishii, S., Shimizu, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2010). Role of PAF Receptor in Proinflammatory Cytokine Expression in the Dorsal Root Ganglion and Tactile Allodynia in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *PLOS ONE* *5*, e10467.
- Hellman, K.M., Yu, P.Y., Oladosu, F.A., Segel, C., Han, A., Prasad, P.V., Jilling, T., and Tu, F.F. (2018). The Effects of Platelet-Activating Factor on Uterine Contractility, Perfusion, Hypoxia, and Pain in Mice. *Reprod Sci* *25*, 384–394.
- Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., et al. (1991). Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* *349*, 342–346.

- Hung, C.-H., Lee, C.-H., Tsai, M.-H., Chen, C.-H., Lin, H.-F., Hsu, C.-Y., Lai, C.-L., and Chen, C.-C. (2020). Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- Hwang, S.B. (1988). Identification of a second putative receptor of platelet-activating factor from human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 263, 3225–3233.
- Hwang, S.-B., Lam, M.-H., and Shen, T.Y. (1985). Specific binding sites for platelet activating factor in human lung tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 128, 972–979.
- Ishii, S., Matsuda, Y., Nakamura, M., Waga, I., Kume, K., Izumi, T., and Shimizu, T. (1996). A murine platelet-activating factor receptor gene: cloning, chromosomal localization and up-regulation of expression by lipopolysaccharide in peritoneal resident macrophages. *Biochemical Journal* 314, 671–678.
- Jacquot, F., Khoury, S., Labrum, B., Delanoe, K., Pidoux, L., Barbier, J., Delay, L., Bayle, A., Aissouni, Y., Barriere, D.A., et al. (2022). Lysophosphatidyl-choline 16: 0 mediates chronic joint pain associated to rheumatic diseases through acid-sensing ion channel 3. PAIN.
- Liu, Y., Shields, L.B.E., Gao, Z., Wang, Y., Zhang, Y.P., Chu, T., Zhu, Q., Shields, C.B., and Cai, J. (2017). Current Understanding of Platelet-Activating Factor Signaling in Central Nervous System Diseases. *Mol Neurobiol* 54, 5563–5572.
- Lundbaek, J.A., and Andersen, O.S. (1994). Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *Journal of General Physiology* 104, 645–673.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000). Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* 275, 10128–10133.
- Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebille, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *The EMBO Journal* 35, 414–428.
- McManus, L.M., and Pinckard, R.N. (2000). PAF, a Putative Mediator of Oral Inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11, 240–258.
- Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., and Noma, M. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 266, 20400–20405.
- Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm, P.-G., and Sundell, S. (1992). Crystal structures of membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1113, 339–373.
- Pidoux, L., Delanoe, K., Liguèglia, E., and Deval, E. (2020). ASIC3-dependent spinal cord nociceptive signaling in cutaneous pain induced by lysophosphatidyl-choline. *BioRxiv* 2020.12.28.424561.
- Richmond, G.S., and Smith, T.K. (2011). Phospholipases A1. *Int J Mol Sci* 12, 588–612.
- Rimola, V., Hahnefeld, L., Zhao, J., Jiang, C., Angioni, C., Schreiber, Y., Osthues, T., Pierre, S., Geisslinger, G., Ji, R.-R., et al. (2020). Lysophospholipids contribute to oxaliplatin-induced acute peripheral pain. *J. Neurosci.*
- Robinson, N., and Saunders, L. (1958). THE PHYSICAL PROPERTIES OF LYSOLECITHIN AND ITS SOLS: Part I.—Solubilities, Surface and Interfacial Tensions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 10, 384–391.

Sadler, K.E., Moehring, F., Shiers, S.I., Laskowski, L.J., Mikesell, A.R., Plautz, Z.R., Brezinski, A.N., Mecca, C.M., Dussor, G., Price, T.J., et al. (2021). Transient receptor potential canonical 5 mediates inflammatory mechanical and spontaneous pain in mice. *Science Translational Medicine* *13*, eabd7702.

Sheetz, M.P., and Singer, S.J. (1974). Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *71*, 4457–4461.

Shindou, H., Shiraishi, S., Tokuoka, S.M., Takahashi, Y., Harayama, T., Abe, T., Bando, K., Miyano, K., Kita, Y., Uezono, Y., et al. (2017). Relief from neuropathic pain by blocking of the platelet-activating factor-pain loop. *The FASEB Journal* *31*, 2973–2980.

Travers, J.B., Rohan, J.G., and Sahu, R.P. (2021). New Insights Into the Pathologic Roles of the Platelet-Activating Factor System. *Frontiers in Endocrinology* *12*, 210.

Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2011). Platelet-Activating Factor and Pain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* *34*, 1159–1162.

Yoder, N., and Gouaux, E. (2020). The His-Gly motif of acid-sensing ion channels resides in a reentrant 'loop' implicated in gating and ion selectivity. *ELife* *9*, e56527.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *PAIN* *16*, 109–110.

Figure legends

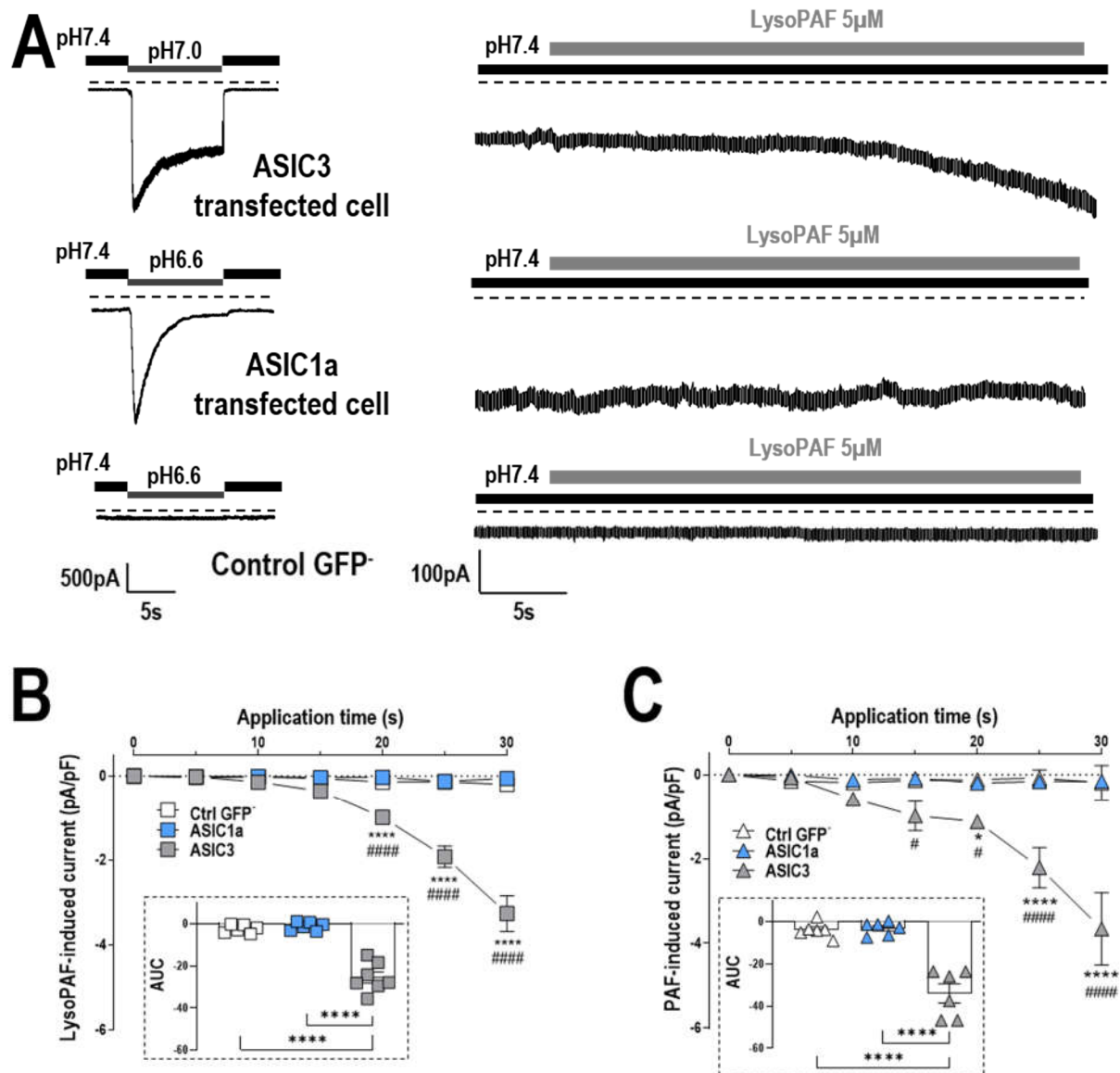


Figure 1: Activating effect of Lyso-PAF and PAF on ASIC3 currents. (A) Representative current traces obtained following 30-second application of lyso-PAF and recorded at -50mV from HEK293 cells transfected with rat ASIC3 (ASIC3), rat ASIC1a (ASIC1a) or control GFP- (Ctrl GFP-). Analysis of the current densities measured every 5 seconds for applications of (B) Lyso-PAF and (C) PAF at 5 μ M onto HEK293 cells transfected with ASIC1a (n=6), or ASIC3 (n=6-7) or control GFP- (Ctrl GFP-, n=6 ; * p<0.05 ; **** p<0.0001 as compared to control GFP- ; # p<0.05 ; ##### p<0.0001 as compared to ASIC1a, Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=6-7 ; ****p<0.0001, significantly different with ASIC3, One-way ANOVA test followed by a Tukey's post hoc test).

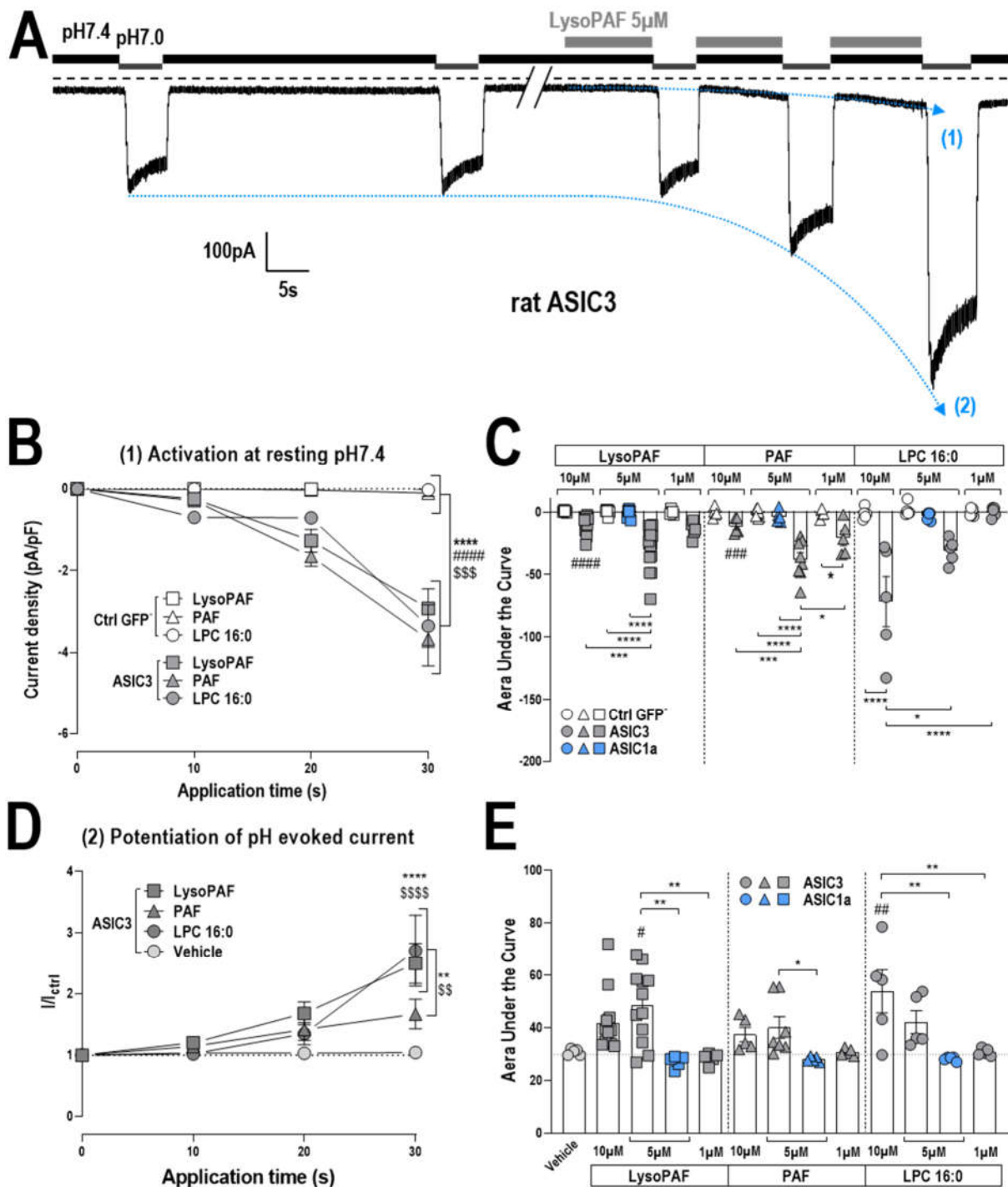


Figure 2: Comparison of lyso-PAF, PAF and LPC effects on ASIC3 channels. (A) Representative current traces recorded at -80mV from HEK293 cells transfected with rat ASIC3 channels. Currents were elicited by repetitive extracellular pH drops from pH7.4 to pH7.0 every 10 s and lyso-PAF (5µM) was applied extracellularly for 30 seconds, as indicated above each traces. This protocol allowed studying the effects of LPC on both the basal activation (1) and the potentiation (2) of acid-evoked ASIC currents.

(B) Analysis of the current densities measured after 10, 20 and 30 second-applications of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 (5 μ M) onto HEK293 cells either Ctrl GFP- (n=5-8) or transfected with rat ASIC3 (n=5-12 ; ****p<0.0001, #####p<0.0001, \$\$\$ p<0.001 for lyso-PAF, PAF and LPC16:0 significantly different to their GFP- control respectively, Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). (C) Bar graphs showing the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 of currents activated by different concentrations of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 (1 μ M, 5 μ M and 10 μ M) on Ctrl GFP- or ASIC1a and ASIC3 transfected cells (n=5-12 ; *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001 as compared to other conditions ; ###p<0.001, #####p<0.0001 as compared to control LPC16:0 10 μ M, One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). (D) Analysis of the potentiation of pH7.0-evoked ASIC3 currents by application of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 at 5 μ M after 10-, 20- and 30-second application on ASIC3 transfected cells. The pH-evoked current amplitudes are normalized (I/I_{ctrl}) to the current measured before extracellular application of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 (n=5-12 ; ****p<0.0001, \$\$\$p<0.001 lysoPAF and LPC16:0 as compared to vehicle ; **p<0.01, \$\$p<0.01 lysoPAF and LPC16:0 as compared to PAF, Two-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). (E) Bar graphs showing the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 of potentiation of pH-evoked ASIC currents (pH7.0 for ASIC3 and pH6.6 for ASIC1a) by different concentrations of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 (1 μ M, 5 μ M and 10 μ M) on ASIC1a and ASIC3 transfected cells (n=5-12 ; *p<0.05, **p<0.01 as compared to other conditions and #p<0.05, ##p<0.01 as compared to control vehicle ; One-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison tests).

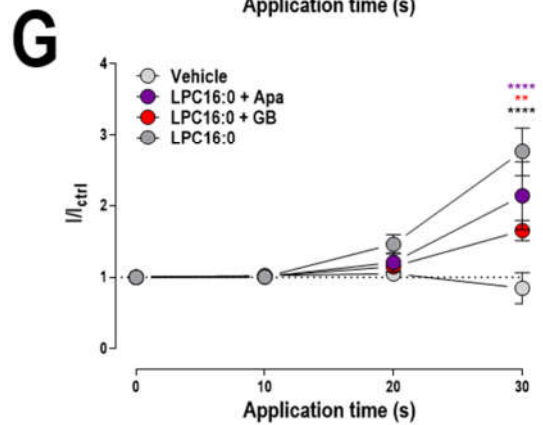
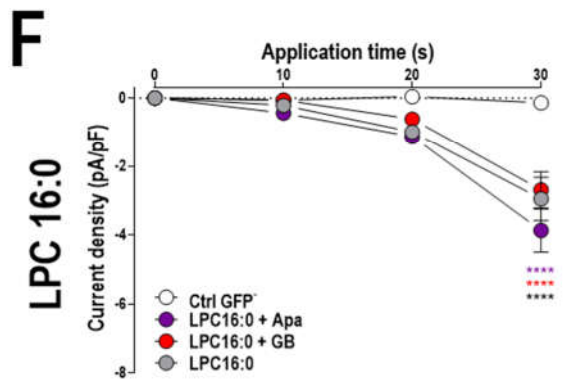
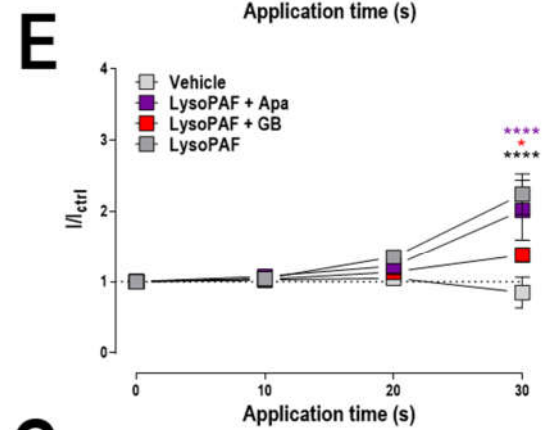
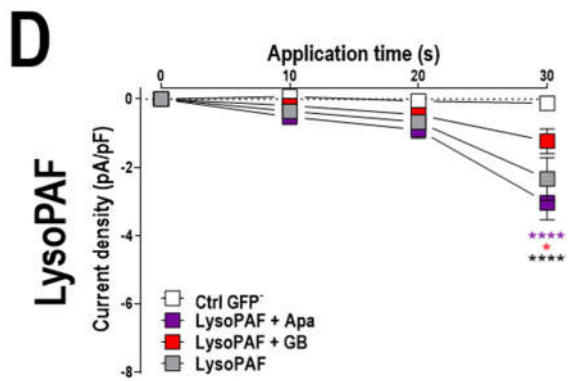
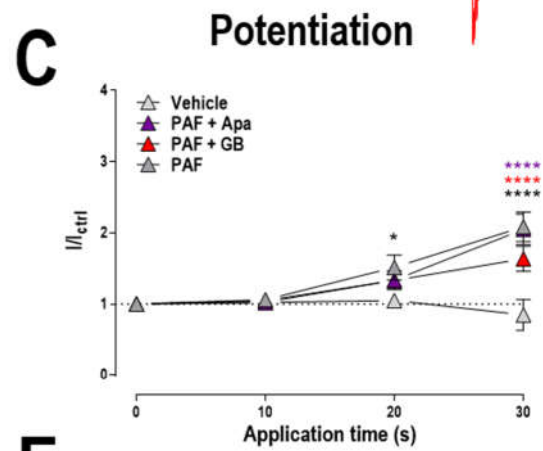
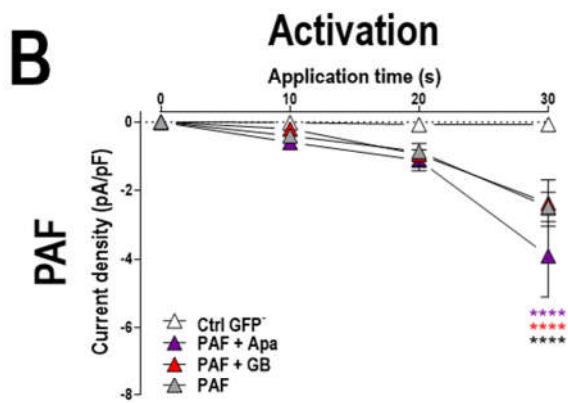
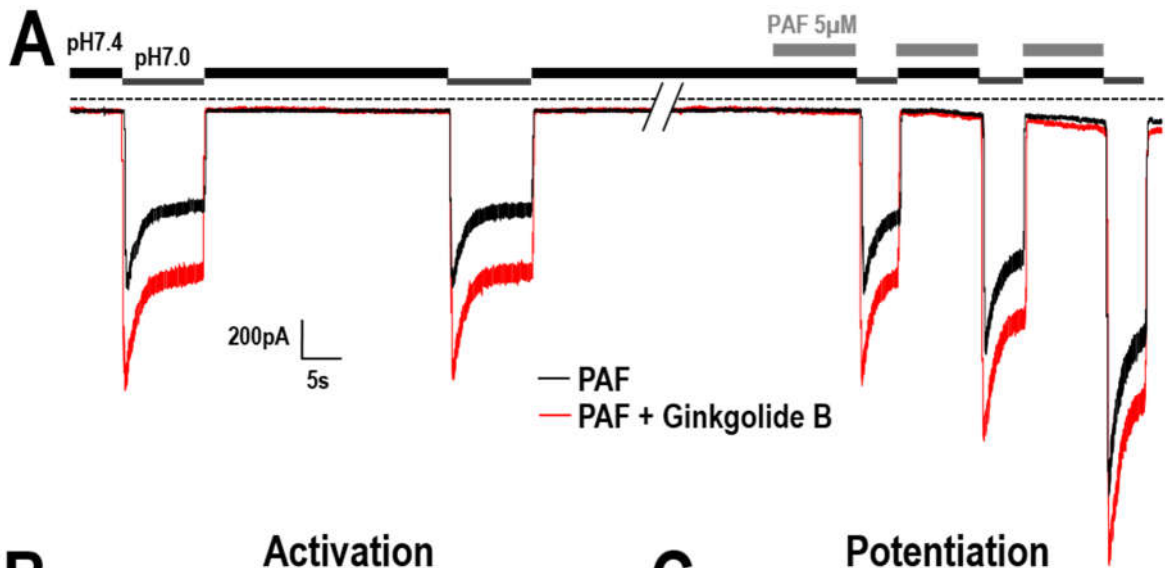


Figure 3: The effects of PAF and Lyso-PAF on ASIC3 channels are not mediated by the PAF-R. (A) Representative current traces recorded at -50mV from HEK293 cells transfected with rat ASIC3 channels. Currents were elicited by repetitive extracellular pH drops (from pH7.4 to pH7.0 every 10s) PAF (5 μ M ; red trace) or PAF + ginkgolide B (5 μ M and 10 μ M respectively ; black trace) were applied extracellularly for 30 seconds, as indicated above each traces. These protocols allowed studying the effects of PAF with or without PAFR inhibitor both on the basal activation and the potentiation of acid-evoked ASIC currents. (B-D-F) Analysis of the current densities measured every 10 seconds-applications of PAF, lyso-PAF and LPC at 5 μ M (n=10), or co-application with PAFR inhibitor ginkgolide B (10 μ M) or apafant (10 μ M) onto HEK293 cells transfected with ASIC3 (n=5) or control GFP- (n=5 ; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 as compared to vehicle, Two-way ANOVA test followed by a Dunnett's multiple comparison test). (C-E-G) Analysis of the potentiation of pH-evoked ASIC3 currents (pH7.0) by application of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 at 5 μ M, or co-application with PAF-R inhibitor ginkgolide B or apafant after 10-, 20- and 30-second application on ASIC3 transfected cells. The pH-evoked current amplitudes are normalized (I/I_{ctrl}) to the current measured before extracellular application of lyso-PAF, PAF and LPC16:0 (n=5-10 ; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 as compared to vehicle, Two-way ANOVA test followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test).

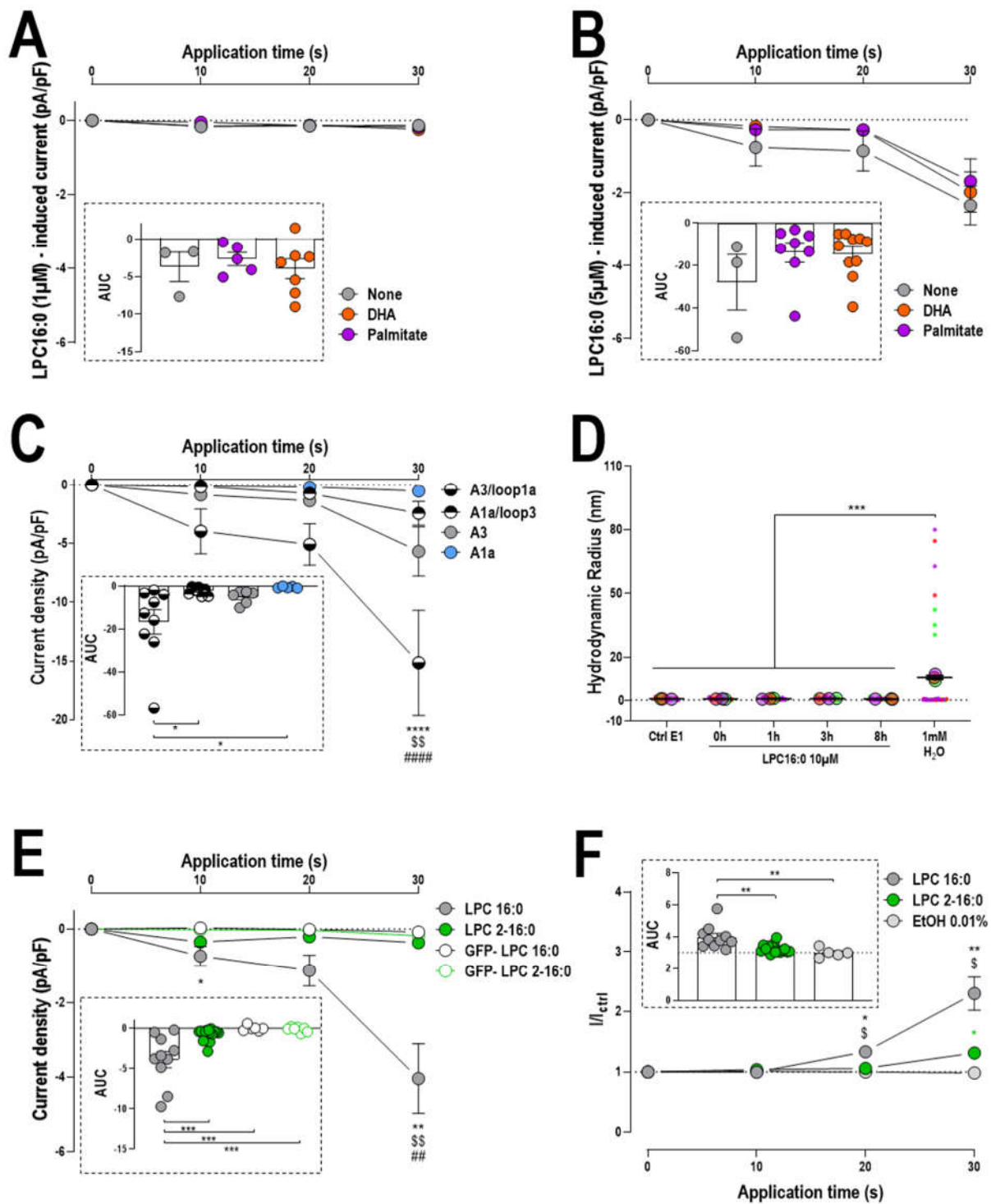


Figure 4: Impact of the lipid environment, the channel domains and the lipid structure on the ASIC3 modulation by lipids. (A-B) Analysis of the current densities measured every 10 seconds-applications of LPC at (A) 1 μ M and (B) 5 μ M onto HEK293 cells transfected with ASIC3 and enriched with either palmitate or docosahexaenoic acid (DHA) (n=3-10). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=3-10). (C) Analysis of the current densities measured every 10 seconds-applications of LPC 10 μ M at pH7.4 onto HEK293 cells transfected with ASIC3 (n=6) or ASIC1a (n=5), or LPC16:0 10 μ M at pH7.2 onto HEK293 cells transfected with the ASIC3/loop1a chimeric

channel (n=8), or LPC16:0 10 μ M at pH6.7 + GMQ 1mM onto HEK transfected with the ASIC1a/loop3 chimeric channel (n=9 ; ****p<0.001, \$\$p<0.01, ####p<0.0001 as compared to ASIC1a/loop3, ASIC3 and ASIC1a respectively, Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=3-10 ; *p<0.05, One-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison tests). (D) Quantification of experiments using Superplot representation of the average size of the hydrodynamic radius (Rh) and polydispersity of particle in suspension. Each dot represents one measure that is color-coded according to the biological replicate it comes from. The large circles represent the mean of each replicate. The three means were then used to calculate the average \pm SEM (black bars) (**p<0.001 as compared to LPC16:0 1mM in H₂O, Two-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison tests). (E) Analysis of the current densities measured every 10 seconds-applications of LPC16:0 (black) and LPC2-16:0 (green) at 5 μ M onto HEK293 cells either non-transfected (Ctrl GFP-, n=6-7) or transfected with rat ASIC3 (n=10-15; *p<0.05, ** p<0.01 as compared to control GFP-; \$\$ p<0.01 as compared to LPC2-16:0 ASIC3, ## p<0.01 as compared to LPC2-16:0 GFP-, significantly different from LPC16:0 ASIC3, Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=6-15 ; ****p<0.0001, significantly different with ASIC3, One-way ANOVA test followed by a Tukey's post hoc test). (F) Analysis of the potentiation of pH-evoked ASIC3 currents (pH7.0) by application of LPC16:0 or LPC2-16:0 at 5 μ M or vehicle after 10-, 20- and 30-second application on ASIC3 transfected cells. The pH-evoked current amplitudes are normalized (I/I_{ctrl}) to the current measured before extracellular application of LPC16:0, LPC2-16:0 or vehicle (n=5-15 ; *p<0.05 **p<0.01, LPC16:0 as compared to vehicle ; \$ p<0.05 LPC16:0 as compared to LPC2-16:0, Two-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=5-15 ; **p<0.01, One-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison tests).

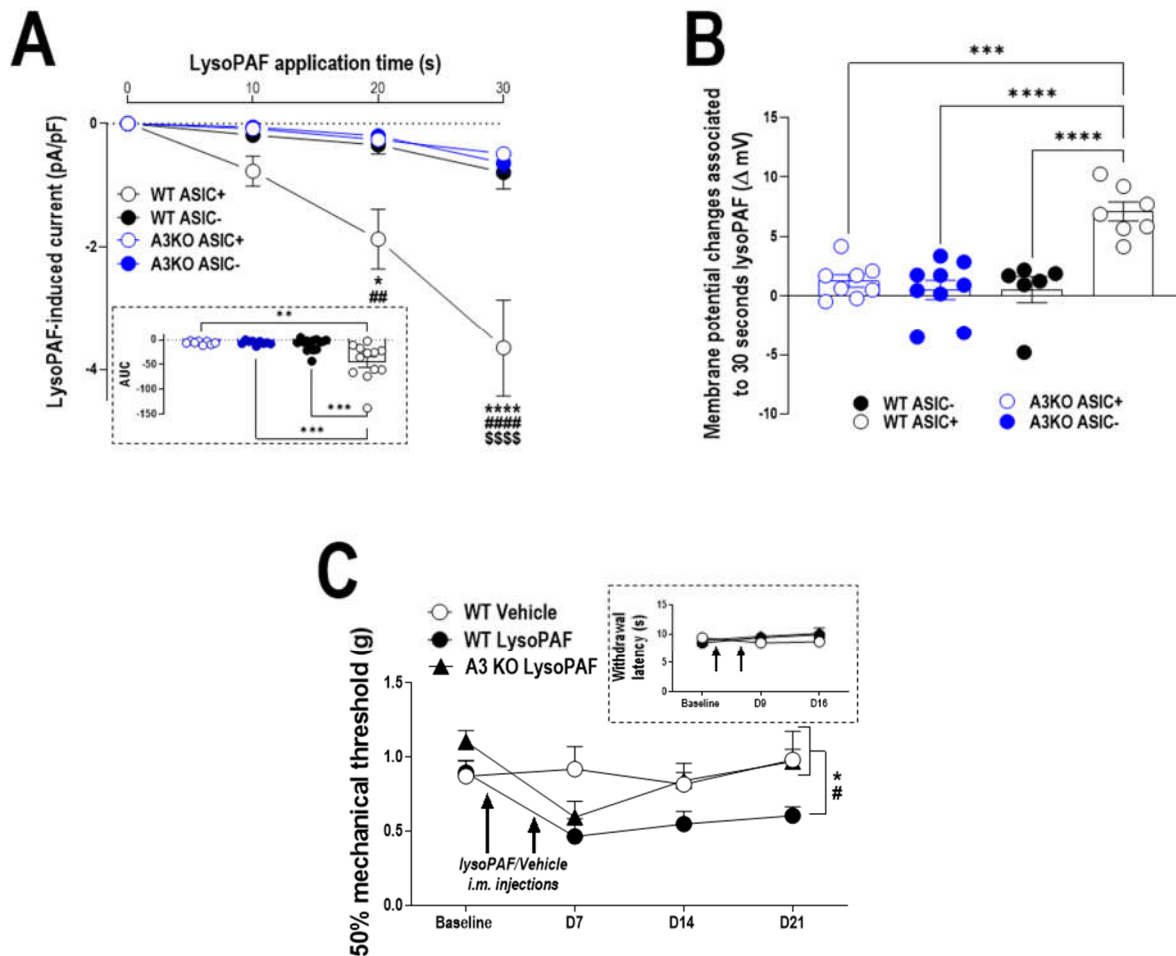


Figure 5: Lyso-PAF generates an ASIC3-dependent inward current associated to membrane depolarization in mouse DRG neurons and long-lasting mechanical allodynia after intramuscular injections in mice. (A) Analysis of the current densities measured after 10-, 20-, and 30-second applications of lyso-PAF at $5\mu\text{M}$ onto WT and ASIC3 knockout (A3KO) DRG neurons expressing (ASIC+) or not expressing (ASIC-) a pH6.6-evoked ASIC current (see methods, $n=8-15$; $*p<0.05$, $****p<0.0001$ compared with WT ASIC-, $##p<0.01$, $####p<0.0001$ compared with A3KO ASIC+ and $$$$$p<0.0001$ compared with A3KO ASIC-; Three-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). Inset shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 ($n=8-15$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). (B) Membrane potential changes associated with 30-second application of lyso-PAF on WT ASIC+, WT ASIC-, A3KO ASIC+, and A3KO ASIC- neurons ($n=6-9$; $***p<0.001$, $****p<0.0001$, One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test). (C) Effect of intra-muscular administrations of lyso-PAF (10 nmol), or vehicle on mechanical pain in male mice. Mechanical withdrawal threshold was assessed using the von Frey filament test ($n=6-7$ mice per group; $*p<0.05$, $#p<0.05$ as compared to WT mice injected with lysoPAF curve; Two-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test). Inset shows the thermal heat sensitivity of animals measured using the paw-flick test.

Supplementary figure legends

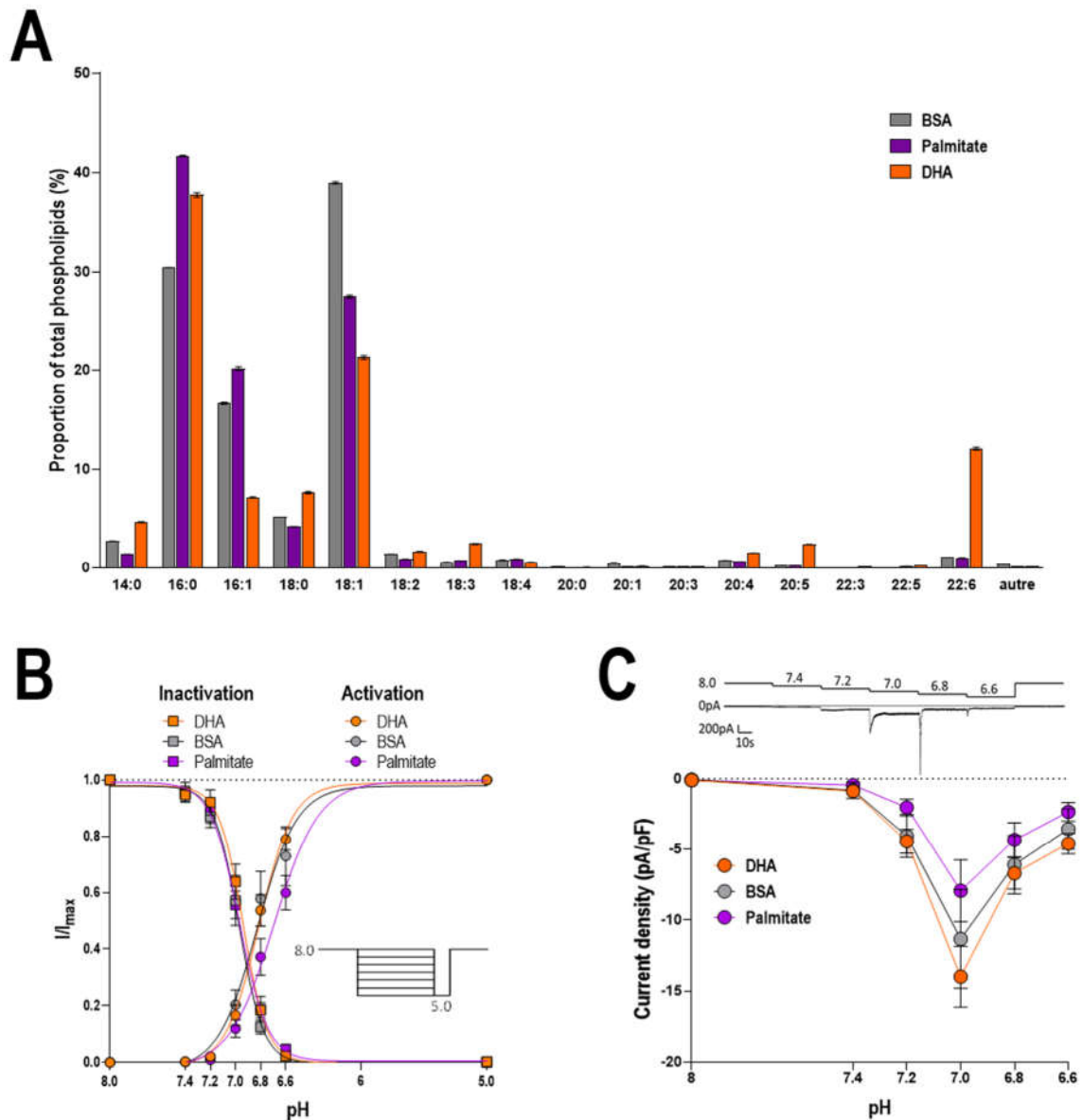


Figure sup 1: Lipid enrichment of membranes does not impact the ASIC3 intrinsic properties. (A) Lipidomic analysis of fatty acid proportion in the total phospholipids population from HEK293 cells enriched with palmitate, docosahexaenoic acid (DHA) or vehicle. (B) Effect of each lipid enrichment on the pH-dependent activation and inactivation curves of ASIC3 channels expressed in HEK293 cells (n=8-14). Acid-induced ASIC3 currents are normalized to their maximal peak amplitude measured at pH 5.0, and the protocol used to obtain the curves is shown in the inset. (C) Effect of each lipid enrichment on the ASIC3 window current (n=10-16). The protocol used to obtain the curves is shown on the upper inset, with a typical ASIC3 trace below.

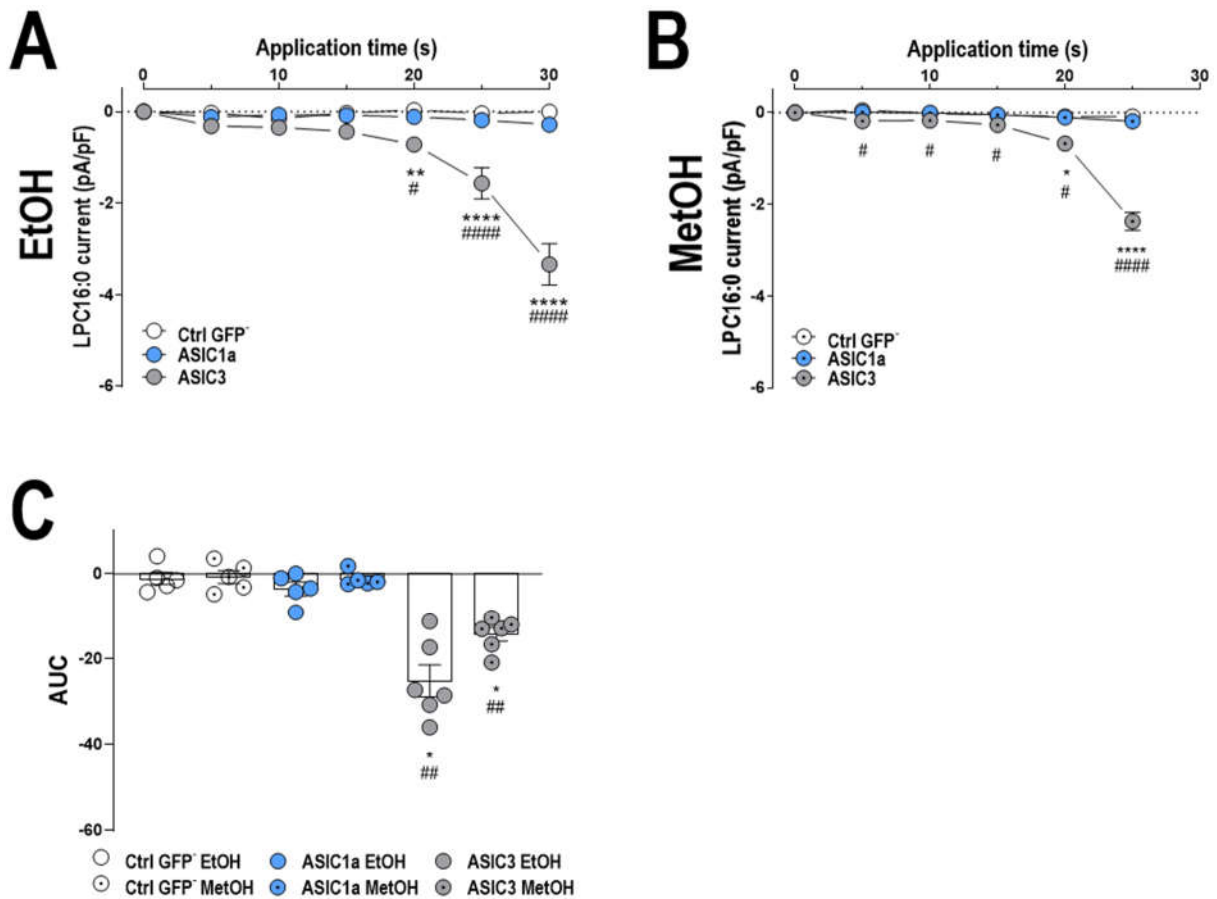


Figure sup 2: Impact of the LPC16:0 solvent on ASIC3 channel activation. (A-B) Analysis of the current densities measured every 5 second-applications of LPC16:0 at 5 μ M onto HEK293 cells transfected with ASIC1a, ASIC3 or control GFP-. LPC16:0 was prepared as stock solution using either (A) ethanol (EtOH, n=5-6) or (B) methanol (MetOH, n=5-6) (Ctrl GFP-; *p<0.05, **p<0.01; ****p<0.0001 as compared to Ctrl GFP-; # p<0.05; ##### p<0.0001 as compared to ASIC1a, Two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test). (C) The bar graph shows the AUC calculated over 30-second period from the baseline fixed at 0 (n=5-6; *p<0.05 as compared to Ctrl GFP-; ## p<0.01 as compared to ASIC1a, One-way ANOVA test followed by a Tukey's post hoc test).

Implication d'ASIC3 dans la perception du froid

Durant ma thèse j'ai également travaillé sur la perception froide, et les implications d'ASIC3. Le constat est parti du simple fait que les souris ASIC3 KO présentent un déficit de perception des températures froides (résultats non publiés), suggérant un rôle des canaux ASIC3 dans la thermoperception au froid. Différentes données avaient été générées avant mon arrivée dans l'équipe, et j'ai pu compléter ces travaux pendant ma thèse.

J'ai dans un premier temps complété les travaux portant sur l'impact du refroidissement sur les propriétés intrinsèques des canaux ASIC3. En effet, un refroidissement de 30°C à 15°C entraîne une augmentation de l'amplitude et un ralentissement de l'inactivation des courants des différents clones du canal ASIC3 (Figure 21.A&B). Le Q10 est un coefficient mesurant la fluctuation d'un paramètre pour une variation de température de 10°C. Ici, comme il s'agit d'une chute de température on parle de Q-10. Par convention, il est considéré qu'un Q10 supérieur à 3 démontre une forte sensibilité du paramètre mesuré à la température.

Dans les expériences de patch clamp, afin de s'affranchir des variations de pH lors du refroidissement de la solution extracellulaire, nous avons titrés les solutions à la température testée. Les taux de variation de l'inactivation du clone de rat (Q-10 : $4,19 \pm 0,54$; n=10) et du clone humain (Q-10 : $4,01 \pm 0,70$; n=8) ont montré une forte sensibilité à la baisse de température, tandis que le clone de souris (Q-10 : $2,75 \pm 0,86$; n=8) semble moins impacté par le refroidissement (Figure 21.A&B). L'amplitude des courants ASIC3 de rat (Q-10 : $0,98 \pm 0,06$; n=10), humain (Q-10 : $1,89 \pm 0,21$; n=7) et de souris (Q-10 : $2,06 \pm 0,17$; n=7) semble aussi impactée, dans une moindre mesure, lors du refroidissement avec une hausse à faible température (Figure 21.A & B).

L'activité des canaux ASIC3 est donc sensible au refroidissement, ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude et de la cinétique d'inactivation des courants. Ces deux effets conduisent à une forte augmentation de la quantité de courant ASIC3 pour une acidification donnée, *i.e.*, pH6,6 dans le cas de mes enregistrements (Figure 21.A & B). Les canaux ASIC3 étant fortement exprimés dans les neurones DRG (Price et al., 2001), on peut donc émettre l'hypothèse que le refroidissement et/ou les températures froides provoquent une augmentation de l'excitabilité neuronale.

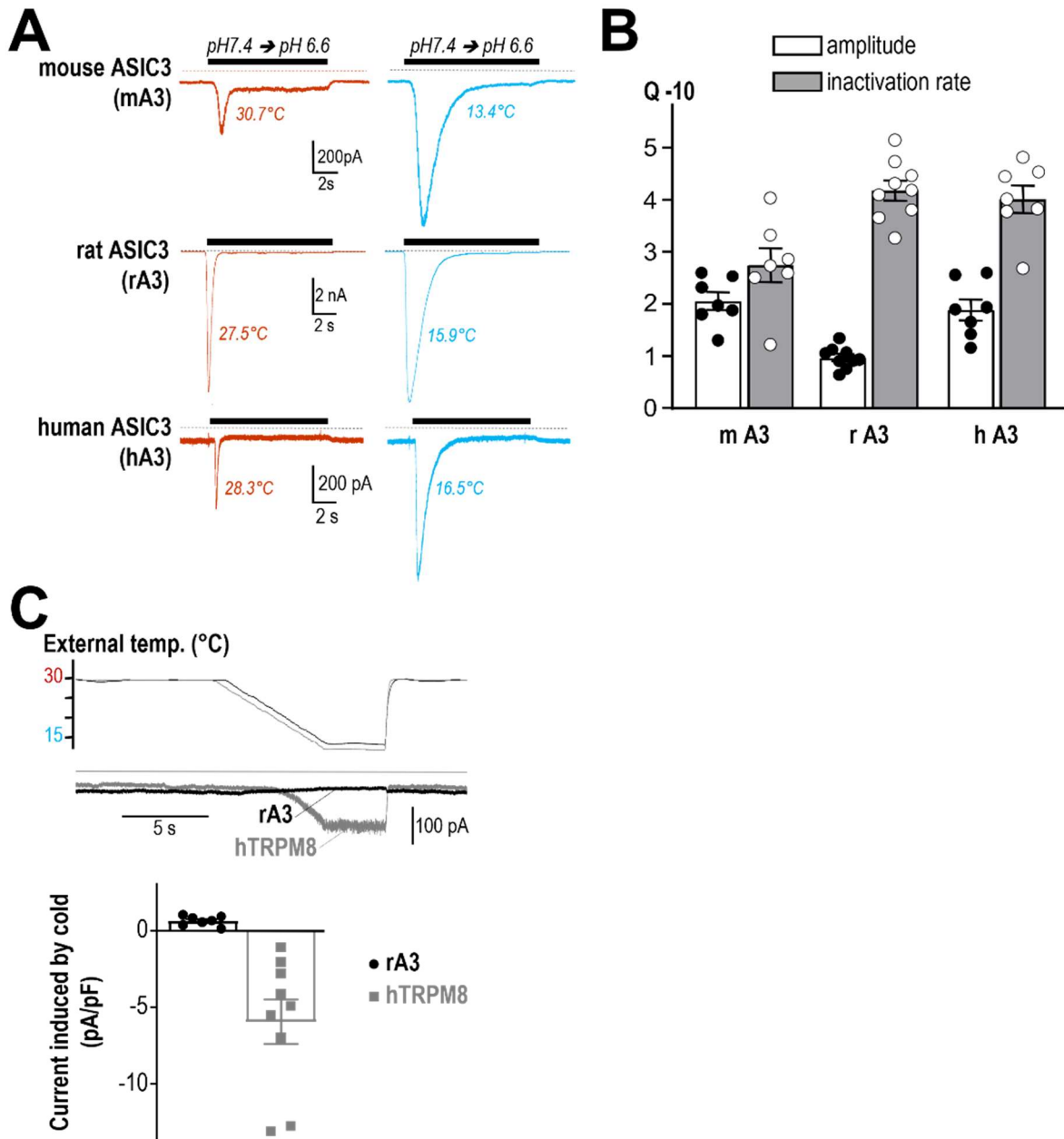


Figure 21 : Effets des températures froides sur l'activité des canaux ASIC3 exprimés dans des cellules HEK 293.

A. Traces représentatives de courants ASIC3 humain de rat ou de souris exprimés dans des HEK 293, induit par une acidification du pH physiologique de 7,4 à pH6,6 (HP= -80mV). B. Mesure des Q-10 des amplitudes et des constantes de temps d'inactivation des différents clones des canaux ASIC3 entre 30 et 15°C. C. Mesure des courants ASIC3 et TRPM8 exprimés dans les cellules HEK 293, en réponse à une rampe de refroidissement allant de 30°C à 15°C (HP= -80mV).

Etant donné les effets du froid sur ASIC3, l'hypothèse d'une activation du canal à pH physiologique, *i.e.*, pH7,4 sans acidification extracellulaire, a été envisagée. J'ai donc comparé son activité à un canal thermosensible au froid connu ; le canal TRPM8 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). J'ai appliqué une rampe de refroidissement de 30°C à 15°C correspondant aux gammes de sensibilité du canal TRPM8, sur les canaux ASIC3 et TRPM8 exprimés en système hétérologue, à pH7,4 et sans aucune acidification du pH extracellulaire. J'ai pu constater une activation des canaux TRPM8, mais pas d'activation des canaux ASIC3 dans les mêmes conditions (Figure 21.C).

Pour donner suite à ces résultats j'ai poursuivi mes investigations sur les canaux ASIC natifs, afin de mesurer l'impact des températures froides sur les neurones DRG. Pour se faire j'ai mesuré les effets de la température sur les courants ASIC natifs évoqués à la suite d'une acidification de pH7,4 à pH6,6 sur des neurones DRG de souris WT ou ASIC3 KO (Figure 22.D). Nous n'observons pas d'effet du refroidissement (30°C vs. 14°C) sur l'amplitude des courants ASIC natifs dans les neurones WT, ni dans les neurones ou ASIC3 KO (Figure 22.A).

De plus, l'amplitude des courants ASIC natifs à une température donnée est identique dans les deux types de neurones (Figure 22.A). En revanche, le refroidissement provoque un ralentissement significatif des cinétiques d'inactivation des courants ASIC natifs, à la fois dans les neurones WT et les neurones ASIC3 KO (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$) (Figure 22.B). On remarque également que l'inactivation des courants ASIC WT est beaucoup plus rapide que chez les ASIC3 KO (##### $p < 0.0001$) démontrant que la délétion de la sous unité ASIC3 ralentit l'inactivation des courants ASIC natifs (Figure 22.B).

Les canaux ASIC3 ne semblent donc pas jouer un rôle majeur dans la modulation par le froid des courants ASIC natifs induits par un pH acide dans les neurones DRG de souris. Cependant, ils sont significativement modulés par le froid en systèmes d'expression hétérologue et des données non publiées du laboratoire indiquent clairement des déficits de perception au froid des animaux ASIC3 KO par rapport aux animaux WT.

Pour aller plus loin dans mes recherches, j'ai eu recours à une approche par fluorimétrie calcique. Pour cela, j'ai utilisé la vidéo-microscopie avec la sonde FURA-2, un fluorophore ratiométrique sensible au calcium afin de mesurer l'activité calcique des neurones (Figure 22.C & D). J'ai pu discriminer les neurones parmi les autres types cellulaires en générant un choc extracellulaire Hyper K (100mM) afin de dépolariser les neurones et d'obtenir une réponse considérée comme maximale (Figure 22.C). Les cellules non-répondantes à cette stimulation n'ont pas été considérées comme des neurones et ont été exclues de mes analyses.

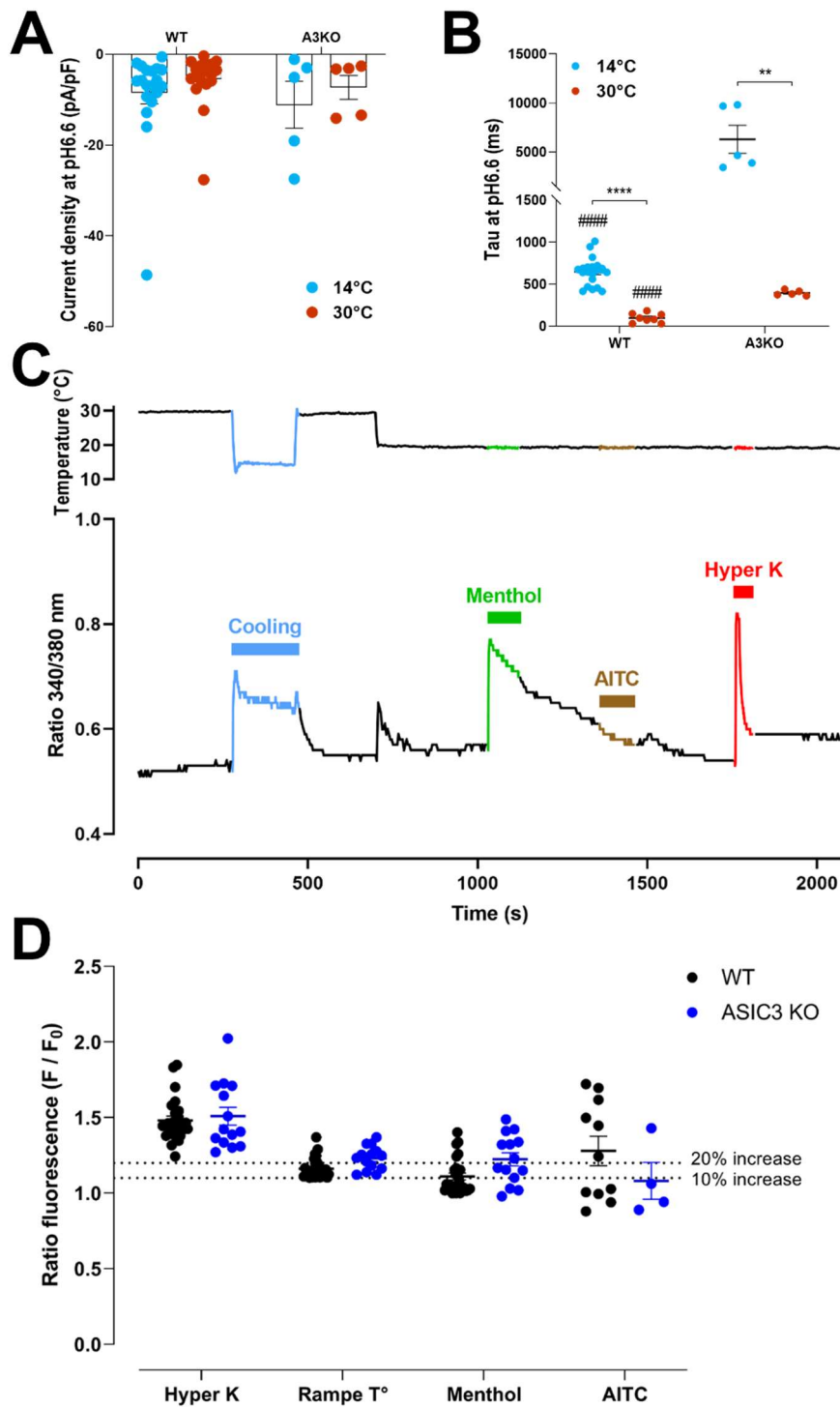


Figure 22 : Effets des températures froides sur l'activité des canaux ASIC natifs des neurones DRG de souris WT et ASIC3 KO.

A-B. Effets des températures froides sur l'amplitude (A) et la cinétique d'inactivation (B) des courants ASIC natifs de neurones DRG de souris WT et ASIC3 KO. ($n = 5-21$; $**P < 0,01$, et $****P < 0,0001$ par rapport à 30°C , $#####p < 0.0001$ par rapport à A3KO, t-test non apparié). C. Trace représentative de la variation du ratio de fluorescence (340/380nm) d'un neurone DRG de souris WT répondant à une rampe de refroidissement, au menthol et à l'hyper K. D. Amplitudes normalisées des variations de fluorescence (F/F_0) des neurones DRG WT et ASIC3 KO, stimulés avec une rampe de refroidissement ($30^{\circ}\text{C} \rightarrow 14^{\circ}\text{C}$), du menthol ($250\mu\text{M}$), de l'AITC ($50\mu\text{M}$) et un choc hyper K (100mM K^+).

Je me suis alors focalisé sur les neurones DRG répondant au froid, en appliquant une rampe de refroidissement de 30°C jusqu'à 14°C (Figure 22.C). De plus, afin de discriminer les neurones exprimant les canaux connus pour être sensibles aux froids (TRPM8 ou TRPA1), j'ai appliqué du menthol (250µM) ou de l'AITC (50µM), respectivement (Figure 22.C).

La mesure des réponses calciques des neurones DRG de souris sensibles au froid ne montrent pas de différences entre les neurones WT ou ASIC3 KO, qu'ils soient stimulés par une rampe de refroidissement (WT : $1,16 \pm 0,01$; ASIC3 KO : $1,23 \pm 0,02$), l'application de menthol (WT : $1,11 \pm 0,02$; ASIC3 KO : $1,22 \pm 0,04$) ou d'AITC (WT : $1,28 \pm 0,10$; ASIC3 KO : $1,08 \pm 0,12$) (Figure 22.D). L'ensemble des mesures réalisées a permis de mettre en évidence que la même proportion de neurones répond au froid, 4,48% pour les neurones WT (n=26/580) et 4,04% chez les neurones ASIC3 KO (n=14/347).

Dans les neurones DRG répondant au froid, 42,31% (n=11/26 ; soit 1.89% des neurones totaux n=11/580) et 78.57% (n=11/14 ; soit 3.17% des neurones totaux n=11/347) répondent au menthol, chez les WT et ASIC3 KO, respectivement. De plus, dans ces mêmes neurones 54,55% (n=6/11 ; soit 1.25% des neurones totaux n=6/481) et 25% (n=1/4 ; soit 0.36% des neurones totaux n=1/275) répondent à l'AITC, chez les WT et ASIC3 KO, respectivement. L'ensemble de ces données suggèrent qu'ASIC3 ne semble pas impacter les amplitudes des réponses au froid, au menthol ou à l'AITC, ni la proportion de neurones répondants aux froids, au menthol ou à l'AITC (Figure 22.D).

Discussion

Nouveaux activateurs lipidiques endogènes des canaux ASIC3

La LPC16:0 a été identifiée comme espèce principale de LPC dans les liquides synoviaux de patients souffrant de douleurs articulaires chroniques. En effet, des analyses lipidomiques ciblées ont été menées sur des cohortes indépendantes de patients. Le groupe témoin est constitué des sujets *post-mortem* ne possédant aucun historique d'ostéoartrrose ou de maladies rhumatismales. Les deux autres cohortes sont constituées de patients souffrant de pathologies articulaires chroniques. La première cohorte comporte uniquement des patients atteints d'ostéoartrrose, et la seconde est constituée de patients souffrant de différentes pathologies articulaires chroniques, dont l'ostéoartrrose et d'autres pathologies comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde.

Les analyses lipidomiques des liquides synoviaux de genoux ont alors mis en évidence dans la première cohorte la présence d'une forte teneur en LPC16:0. Cette forte quantité de LPC16:0 a également été corrélée au score de douleur du genou et de douleur globale (VAS genou et VAS global ; VAS : Visual Analogue Scale), indépendamment de l'âge, du sexe, de l'IMC et des niveaux d'IL6 dans les articulations des patients (Jacquot et al., 2022). Une augmentation spécifique de la LPC16:0 a été observée dans les fluides synoviaux de la seconde cohorte de patients, de manière quasi indépendante de la pathologie articulaire. Ces résultats suggèrent que la LPC16:0 ne semble pas être le marqueur d'une pathologie articulaire en particulier, mais plutôt un marqueur douloureux de pathologies touchant les tissus profonds comme les muscles ou les articulations (Hung et al., 2020; Jacquot et al., 2022; Marra et al., 2016; Zhai et al., 2019).

Nos travaux révèlent que la LPC16:0 est capable d'activer de manière spécifique et constitutive les canaux ASIC3 exprimés en système hétérologue et dans les neurones DRG de souris en culture. Cette activation induit dans les neurones nociceptifs une dépolarisation constitutive dépendante d'ASIC3, qui a déjà été montrée comme sensibilisant ces neurones (Deval et al., 2003). Il est donc probable que la stimulation des canaux ASIC3 par la présence de LPC16:0 sensibilise les afférences nociceptives, et participe au comportement douloureux associé. Ces résultats sont confortés par différentes études lipidomiques indiquant de fortes concentrations de LPC dans les liquides synoviaux ou dans le plasma de patients souffrant de douleurs musculosquelettiques (Hung et al., 2020; Kosinska et al., 2013, 2016; Zhai et al., 2019).

Les sources de LPC lors de ces situations pathologiques ne sont pas toujours précisées. Cependant, certaines études suggéreraient l'acteur d'une étape clé pour la genèse de la LPC, la sPLA2. Cette sPLA2 intervient dans la production de LPC en clivant l'AG présent en *sn2* du groupe glycérol de la PC. Cette sPLA2, ayant comme préférence de substrat les PC possédant une chaîne d'AG de petite taille en position *sn2* (Min et al., 1999; Wardlow et al., 1986), favoriserait la production de LPC à partir de PC oxydée dans le muscle dans un modèle murin d'hyperalgie chronique induite par des sons stressants répétées et intermittents.

De plus, dans ce modèle, une voie non enzymatique de déacylation est présente lors de stress oxydatif formant spontanément de la LPC dans les muscles (Hung et al., 2020). Des travaux récents effectués en collaboration avec notre équipe, ont montré chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde la présence de deux anticorps monoclonaux spécifiques, B02 et B09 issus de cellules B. L'injection de ces deux anticorps B02/B09 chez la souris produit alors une hyperalgie mécanique, via des processus non inflammatoires.

De façon intéressante, dans ce modèle murin il a été constaté des niveaux accrus d'ARNm pour deux isoformes de sPLA2 (Pla2g2 et Pla2g5) dans les articulations de la cheville, couplé à une augmentation des taux de LPC16:0. La LPC16:0 ainsi produite est alors capable d'activer les canaux ASIC3. De plus, leur inhibition empêcherait le développement de cette hyperalgie mécanique chez la souris. Toutes ces observations soulignent le rôle central de l'activation d'ASIC3 par la LPC16:0, dans le développement de l'état douloureux chronique dans ce modèle murin de polyarthrite rhumatoïde (Jurczak et al., 2022).

La publication des travaux de l'équipe en 2016 sur la LPC, a permis de mettre en évidence un nouvel activateur endogène des canaux ASIC3 à pH physiologique. Durant ma thèse nous avons pu mettre en évidence deux autres activateurs lipidiques endogènes des canaux ASIC3, le lysoPAF et le PAF. Ces alkyl-lipides endogènes sont des analogues structuraux de la LPC. J'ai montré que ces lipides étaient capables d'activer spécifiquement le canal ASIC3 à pH physiologique. Cette activation par les lipides semble similaire au mécanisme décrit pour la LPC. L'application de lipide à pH physiologique produit un décalage de la courbe d'activation des canaux ASIC3 vers des pH plus alcalins induisant un courant entrant non inactivant à pH7,4 (Deval et al., 2008; Marra et al., 2016).

Certaines nuances sont toutefois à apporter pour ces deux alkyl-lipides. En effet, contrairement à la LPC leur concentration effective maximale est à 5µM, contre 10µM pour la LPC. De plus le PAF semble potentialiser les courants ASIC3 évoqués à pH7,0 de façon moins importante que le lysoPAF pour les mêmes concentrations. Cette différence trouve probablement son origine dans la structure des lipides, car le PAF possède un groupe acétyle en *sn2* de son glycérol, pouvant alors changer ses propriétés sur le canal ASIC3.

Par la suite, étant donné l'implication du récepteur au PAF (PAFR) dans les processus inflammatoires médiés par le PAF, il était intéressant de tester son implication dans les effets observés sur ASIC3. De plus, les concentrations que nous utilisons sont supérieures aux concentrations nécessaires à l'activation du PAFR par le PAF en condition physiopathologique (gamme nanomolaire) (Blank et al., 1982).

Le ginkgolide B et l'apafant, deux inhibiteurs du PAFR, ne semblent pas impacter les effets des lipides sur les canaux ASIC3 lors de leur co-application à pH physiologique, suggérant que les effets portés par le PAF, le lysoPAF et la LPC sur ASIC3, sont indépendant du PAFR à la concentration de 5µM. Ces résultats suggèrent également que les lipides agissent très probablement sur le canal d'une manière plus directe que par un récepteur associé. Ainsi l'implication du PAF et du lysoPAF dans l'activation du canal ASIC3 ouvre de nouvelles perspectives quant au(x) rôle(s) des canaux ASIC dans l'inflammation et la douleur associée.

Par la suite, j'ai testé les effets du lysoPAF sur les canaux ASIC natifs, en utilisant des cultures primaires de neurones DRG. Le lysoPAF est capable de générer un courant entrant non inactivant dans les neurones WT ASIC+ spécifiquement, et entraînant de concert une dépolarisation chez ces neurones. Il a récemment été démontré que la LPC génère une composante dépolarisante ASIC3 dans les DRG de souris (Jacquot et al., 2022) et provoque des comportements douloureux de longue durée lorsqu'il est injecté dans les articulations (Jacquot et al., 2022) ou les muscles squelettiques (Hung et al., 2020).

En collaboration avec l'institut NeuroDol à Clermont Ferrand, des données préliminaires sur les effets de l'injection intramusculaire de lysoPAF ont pu être obtenues. La double injection de lysoPAF dans le muscle gastrocnémien induit une allodynie mécanique pérenne dépendante d'ASIC3 chez les souris, sans produire d'hyperalgie thermique. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles perspectives concernant le lysoPAF et ses implications dans la douleur. Le lysoPAF étant majoritairement impliqué lors de situations inflammatoires, cela ouvre de nouvelles perspectives concernant ses rôles dans la douleur et l'inflammation.

Ainsi la question du mécanisme d'action de ces lipides sur le canal ASIC3 a fait partie de mes travaux de thèse. Il avait précédemment été montré que l'AA, la LPC, le PAF et le lysoPAF était capable d'imiter l'étirement membranaire, activant ainsi les canaux mécano-sensibles TREK-1 et TRAAK (Maingret et al., 2000). Cette hypothèse de la déformation de la membrane pour l'activation d'ASIC3 par la LPC a été testé en 2016 par microscopie de conductance ionique à balayage couplé à des enregistrements électrophysiologiques.

Dans ces expérimentations l'effet de l'AA et de la LPC ont été comparé au trinitrophénol, un composé connu pour déformer la membrane. Les applications de trinitrophénol n'induisent pas d'activation du canal ASIC3 contrairement à l'AA et la LPC (Marra et al., 2016). Nous avons alors émis l'hypothèse que les caractéristiques de l'environnement lipidique sont importantes pour l'effet de la LPC sur les canaux ASIC3. Nous avons alors modifié la composition membranaire en enrichissant les membranes cellulaires avec du palmitate, un AG court et complètement saturé, ou de l'acide docosahexaénoïque (DHA), un AG long comportant six insaturations.

L'enrichissement des membranes cellulaires avec ces différents AG modifie la fluidité de la membrane, la rendant plus rigide avec du palmitate et plus fluide avec du DHA (Mason et al., 2016; Romero et al., 2019). Les différentes conditions d'enrichissement de la membrane avec les AG n'ont pas eu d'impact sur l'effet activateur de la LPC sur ASIC3, suggérant que la nature de l'environnement lipidique du canal ASIC3 de conditionne pas les effets de la LPC sur ce dernier.

Par la suite nous avons utilisé une autre approche en modifiant cette fois ci la structure du canal plutôt que son environnement. Pour se faire j'ai eu recours aux canaux chimériques entre le canal ASIC3 et ASIC1a, le canal ASIC1a n'étant pas sensible à l'application de LPC. Cela m'a permis par une approche électrophysiologique de déterminer quels domaines structuraux sont impliqués dans la sensibilité du canal ASIC3 à la LPC. Seule la chimère ASIC3/loop1a à produit une activation lors de l'application extracellulaire de LPC, indiquant que la sensibilité du canal ASIC3 à la LPC est portée par les segments transmembranaires et intracellulaires.

Afin d'aller plus avant il conviendrait de disséquer plus finement la structure du canal ASIC3 au niveau des segments transmembranaires et intracellulaires. De plus, très récemment des travaux portant sur la structure des canaux ASIC ont mis en évidence de multiples densités lipidiques allongées situées le long des domaines transmembranaires (TMD) du canal cASIC1a pouvant correspondre à des lipides liés (Figure 23) (Yoder and Gouaux, 2020).

Ces densités sont spatialement distinctes (Figure 23.B) et sont présentes entre les hélices TM2a et TM1 (Figure 23.C) et près du côté cytoplasmique de la membrane, entre TM1 et TM2b (Figure 23.D). Ces travaux pourraient donner les futures indications concernant les domaines précis impliqués dans les effets de la LPC sur les canaux ASIC3.

Dans de précédents travaux, il a été montré que la structure du lipide est importante pour son activité sur le canal ASIC3, notamment le groupe de tête en position *sn3* du glycérol. Ainsi les effets sur ASIC3 de l'acide lysophosphatidique (LPA), la lysophosphatidyléthanolamine (LPE), lysophosphatidylsérine (LPS), et la lysophosphatidylinositol (LPI), ont été comparé au LPC. Dans cette étude seule la LPC est capable de produire une activation des canaux ASIC3, indiquant que le groupement de tête choline est important pour l'effet du lipide sur ASIC3 (Marra et al., 2016).

Différentes longueurs de chaîne d'acide gras de la LPC ont également été testé. Leurs résultats ont mis en évidence que les formes 16:0 et 18:1 de la LPC semblaient être les plus efficaces produire une activation significative des canaux ASIC3 à pH physiologique (Marra et al., 2016). Cependant, la position de la chaîne d'acide gras sur la LPC n'avait pas été testé, et j'ai ainsi pu tester une application de LPC2-16:0 (acide palmitique présent en *sn2* du squelette glycérol) sur les canaux ASIC3 à pH physiologique.

Mes résultats indiquent que la position de l'AG en *sn1* du glycérol de la LPC est déterminante pour que le lysolipide produise une activation des canaux ASIC3 à pH physiologique. Dans la continuité de ces résultats, il serait maintenant intéressant de tester l'effet d'autres analogues de la LPC, les alkényl-lysoPC. En effet ces alkényl-lipides (ou plasmalogènes) sont une part importante des lipides présents dans les membranes de certains tissus, dont certains sont impliqués dans les processus inflammatoires comme la rate et les globules blancs (Braverman and Moser, 2012; Dean and Lodhi, 2018), pouvant alors produire de l'alkényl-PC (Pinckard et al., 1994).

Enfin, afin de déterminer la forme dans laquelle la LPC agit sur les canaux ASIC3, j'ai eu recours à des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) mesurant alors le rayon hydrodynamique des agrégats présents dans les solutions. Ces mesures ont pu mettre en évidence que la solution de LPC à 10µM dans notre solution de patch à pH7,4, ne forme pas d'agrégats, indiquant que la LPC agirait sous forme libre plutôt que sous forme d'agrégat. De plus, j'ai également pu montrer que le solvant utilisé pour resuspendre la LPC en solution, qu'il s'agisse d'éthanol ou de méthanol, n'altère en rien l'effet d'activation des canaux ASIC3 par la LPC.

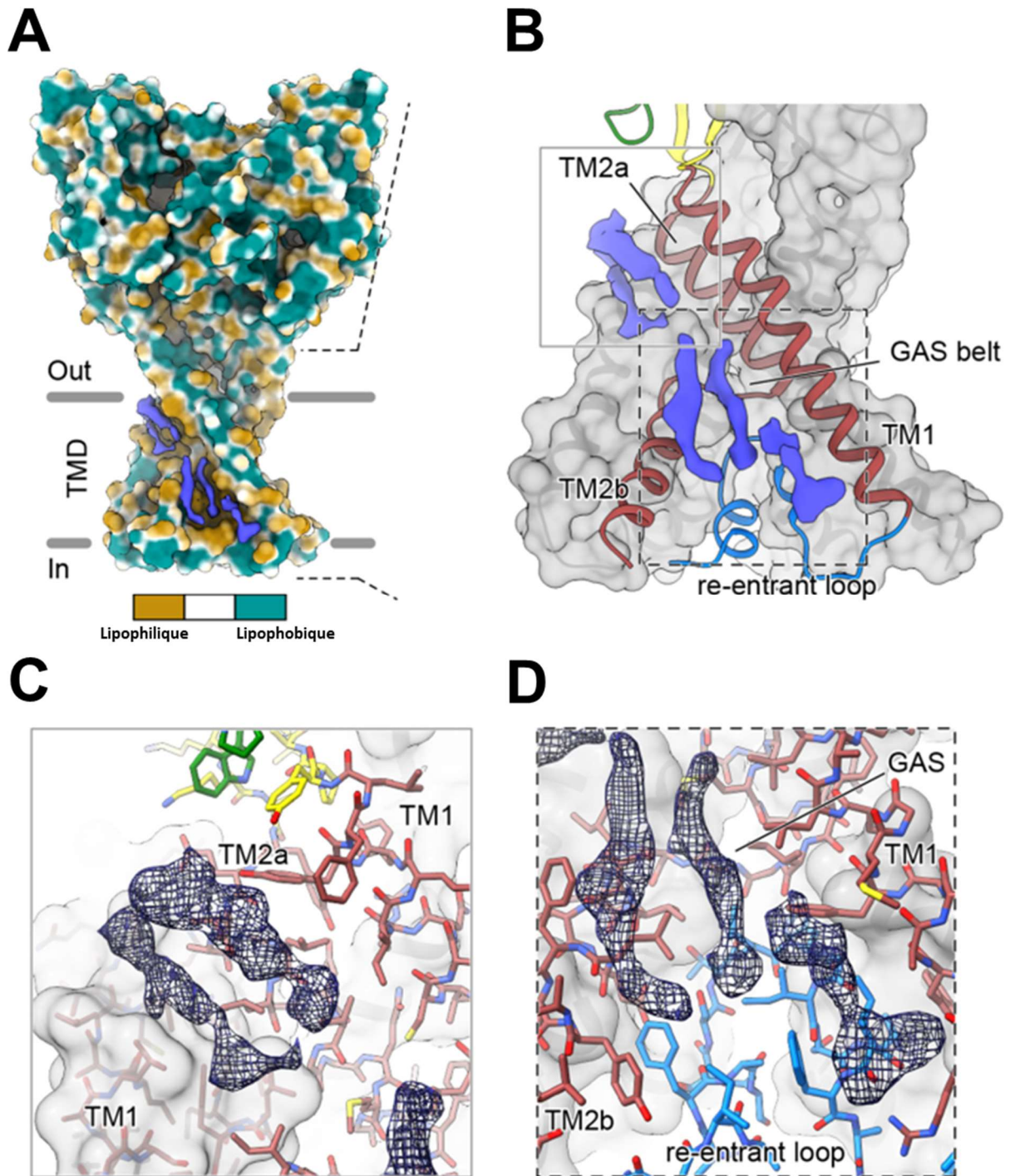


Figure 23 : Densité allongée au sein de la structure des canaux cASIC1.

A. Représentation de la surface de cASIC1 à l'état désensibilisé colorée par le potentiel de lipophilie. **B.** Cartoon hybride et représentation de surface des sites lipidiques au niveau du domaine transmembranaire. **C-D.** Densités lipidiques entre TM1 et TM2a (C) et entre TM1 et TM2b adjacentes à la boucle réentrant (D) de cASIC1. (D'après Yoder and Gouaux, 2020).

Modulation d'ASIC3 dans les réponses au froid

La perception du froid et du froid nocif est majoritairement portée par les canaux TRPM8 et TRPA1 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Story et al., 2003). Cependant la présence seule de ces deux canaux ne suffit pas à expliquer l'intégralité des réponses au froid observés *in vivo* et *in vitro*. Il a notamment été mis évidence par hybridation *in situ*, que 56,5% des neurones DRG de souris expriment le canal TRPA1 (Nagata et al., 2005). Alors que d'un point de vue fonctionnel par imagerie calcique, seuls 3.6% des neurones DRG génèrent une réponse lors d'un refroidissement nocif (Story et al., 2003).

Ces résultats sont confortés par une autre étude mettant en évidence une population de neurones produisant une réponse calcique lors de refroidissement, sans présenter de réponse aux agonistes de TRPA1 ou TRPM8 (Munns et al., 2007). De plus l'invalidation chez la souris des gènes codant pour ces deux canaux n'abolit pas complètement la réponse au froid nocif *in vivo* (Knowlton et al., 2010). Preuve que la complexité des réponses au froid n'est pas encore bien comprise, et suggère d'autres acteurs dans cette perception particulière.

Les résultats préliminaires obtenus au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence la sensibilité au froid du canal ASIC3. En effet, les différentes valeurs de Q-10 mesurées pour l'amplitude des courants et la constante d'inactivation des différents clones d'ASIC3, démontrent une forte sensibilité de ses paramètres à la chute de température (Figure 21.A & B). Des effets similaires sur la constante d'inactivation ont été retrouvés pour les canaux ASIC natifs exprimés dans les neurones DRG de souris WT et ASIC3KO (Figure 22.A & B), démontrant que les canaux ASIC natifs sont modulés par le froid.

Cependant, contrairement aux canaux TRPM8, ASIC3 n'est pas activé directement par le refroidissement (Figure 21.C) et nécessite une acidification extracellulaire (Askwith et al., 2001). Ces canaux ASIC3 sont, comme je l'ai évoqué précédemment, très présent dans les neurones DRG, y compris dans les neurones nociceptifs de petit diamètre (Price et al., 2000, 2001; Voilley et al., 2001). Les canaux TRPA1 et TRPM8 sont eux aussi exprimés dans cette population neuronale (Kobayashi et al., 2005; Nagata et al., 2005). Il est alors possible d'envisager qu'ASIC3 pourrait jouer un rôle modulateur de ces canaux sensibles au froid dans les neurones nociceptifs.

La proportion des neurones DRG générant ces réponses calciques lors de refroidissement ne semble pas être impactée par la présence ou l'absence d'ASIC3. De plus la proportion de neurones produisant des réponses aux agonistes des canaux TRPM8 et TRPA1 reste inchangée chez les souris ASIC3 KO par rapport au WT. Ces résultats suggèrent que la présence d'ASIC3 ne semble pas avoir d'impact sur les réponses au froid des neurones DRG, ni sur les populations de neurones exprimant TRPM8 et TRPA1.

Cependant, des résultats non publiés obtenu au laboratoire montrent un déficit de perception du froid chez les souris KO ASIC3 comparativement aux souris sauvages. Ceci suggère que la modulation de la perception froide par ASIC3 nécessiterait un environnement natif, et probablement une organisation tissulaire particulière. Cette organisation nécessaire serait alors altérée lors de la remise en culture des neurones DRG.

C'est dans cette perspective qu'une étude récente a été menée sur les canaux TRPC5, des canaux calciques exprimés dans les neurones sensitifs de petits diamètres, aussi impliqués dans la perception du froid (Bernal et al., 2021; Zimmermann et al., 2011). Dans l'étude de 2021, les auteurs utilisent une technique semblable à la technique de nerf-peau pour enregistrer l'activité des fibres nerveuses et permettre l'examen fonctionnel de l'ensemble du système sensoriel de la dent (Bernal et al., 2021). Dans ces travaux les auteurs mettent évidence que la transduction sensorielle des stimuli froids dans les dents nécessite des odontoblastes. Ainsi, les modèles de neurones en culture primaires, abolissant l'organisation des différents acteurs cellulaires, sont insuffisants pour rendre compte des complexités fonctionnelles de la détection du froid.

Conclusion générale

Les douleurs chroniques sont aujourd'hui encore mal comprises et il y a un réel besoin de nouveaux traitements pour les patients qui en souffrent. Dans deux cohortes indépendantes de patients souffrant de différentes pathologies articulaires chroniques, des taux importants de LPC16:0 ont été mesurés dans les liquides synoviaux. Cette découverte a permis d'identifier la LPC16:0 comme facteur déclencheur de la douleur articulaire, et de corrélérer sa concentration au score de douleur des patients.

La double injection intra-articulaire de LPC16:0 chez l'animal, est capable d'induire une hyperalgie mécanique durable chez ces animaux, et de provoquer des comorbidités anxieuses, sans dimorphisme sexuel. Il a alors été possible à partir de ce modèle animal de montrer que ces effets sont dépendants des canaux ASIC3.

C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont pris place et ont permis de mettre en évidence de nouveaux modulateurs lipidiques des canaux ASIC3. En effet, j'ai pu montrer que l'application de la LPC16:0, du lysoPAF ou du PAF est capable d'activer spécifiquement les canaux ASIC3 à pH physiologique exprimés en système hétérologue. De plus mes travaux démontrent que l'application d'un de ces trois lysolipides potentialise les courants ASIC3 induit par acidification. Ces lysolipides semblent agir sur le canal ASIC3 de façon indépendante du PAFR et sous leur forme libre, vraisemblablement en interagissant avec les domaines transmembranaires et/ou intracellulaires du canal.

L'application de la LPC16:0 ou du lysoPAF est capable d'activer les canaux ASIC3 natifs et d'induire une dépolarisation chez ces mêmes neurones. La double injection intra-musculaire de lysoPAF dans le muscle gastrocnémien de l'animal est capable d'induire une hyperalgie mécanique persistante. Les canaux ASIC3 sont aussi modulés par les températures froides et la délétion de ces canaux altérerait la perception du froid chez les animaux.

Ses différents résultats ont permis de faire le lien entre la LPC16:0, les canaux ASIC3 et les douleurs articulaires chroniques. De plus, la découverte du lysoPAF comme nouveau modulateur des canaux ASIC3, a permis de suggérer son rôle potentiel dans les douleurs chroniques d'origine musculaire. L'activation des canaux ASIC3 par le PAF et le lysoPAF ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes des douleurs inflammatoires. Enfin, ces travaux suggèrent un rôle central du canal ASIC3 dans différents types de douleurs et renforcent l'hypothèse selon laquelle ce canal est un détecteur de coïncidence (Figure 24) (Deval et al., 2008).

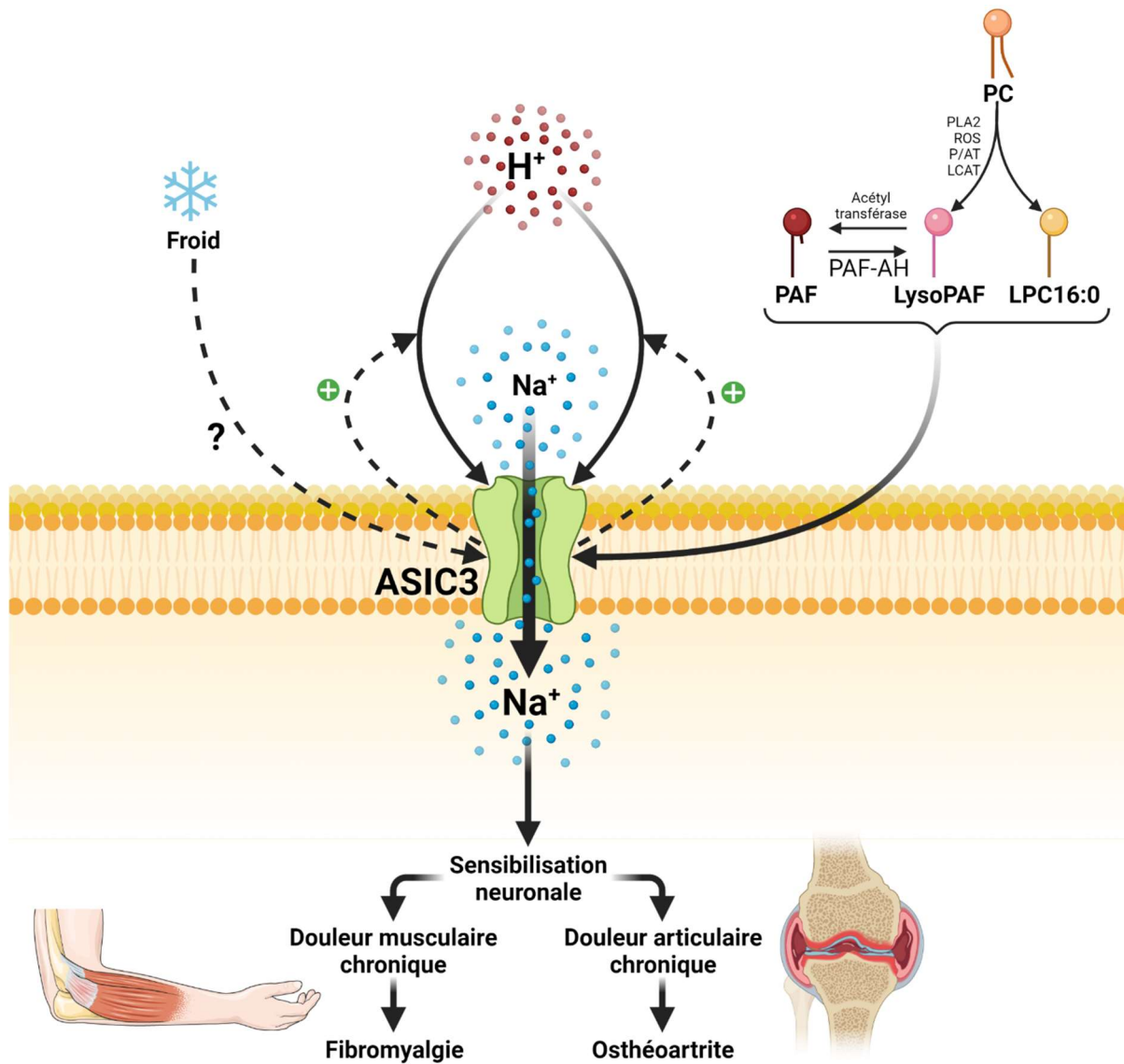


Figure 24 : Schéma bilan de la modulation d'ASIC3 par les lipides et la température.

H⁺, Proton ; LCAT, Lécithine acyl transférase ; LPC, Lysophosphatidylcholine ; LysoPAF, Lyso Platelet Activating Factor ; Na⁺, Ion sodium ; P/AT, phospholipase/acyltransférase ; PAF, Platelet Activating Factor ; PAF-AH, PAF acétylhydrolase ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; ROS, Espèce réactive de l'oxygène (Créé avec BioRender.com).

Annexes

Mes travaux de thèse ont donné lieu à quatre publications, dont deux en 2^{ème} auteur, une en 5^{ème} auteur, et une en 1^{er} auteur sous forme de draft.

Article 1 : Lysophosphatidylcholine 16:0 mediates chronic joint pain associated to rheumatic diseases through acid-sensing ion channel 3

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

*, co-premiers auteurs.

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

Florian Jacquot^a, Spiro Khoury^b, Bonnie Labrum^c, Kévin Delanoe^c, Ludivine Pidoux^c, Julie Barbier^a, Lauriane Delay^a, Agathe Bayle^a, Youssef Aissouni^a, David A. Barriere^a, Kim Kultima^d, Eva Freyhult^d, Anders Hugo^e, Eva Kosek^{f,g}, Aisha S. Ahmed^h, Alexandra Jurczakⁱ, Eric Lingueglia^c, Camilla I. Svenssonⁱ, Véronique Breuil^l, Thierry Ferreira^b, Fabien Marchand^a, Emmanuel Deval^{c,*}

Abstract

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

PAIN 00 (2022) 1–15

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

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

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

Lysophosphatidylcholine is able to activate and potentiate pain-related acid-sensing ion channel 3 (ASIC3),³² a subtype of the ASIC channel family, widely expressed in nociceptors and also gated by extracellular protons.⁵³ Acid-sensing ion channel 3 have been involved in animal models of inflammatory and noninflammatory pain,^{9,43} especially in the development of chronic pain states originating from joints^{20,23,48} and muscles.^{18,44,45} Genetic deletion of ASIC3 reduced secondary pain behaviors in different models of arthritis, such as intra-articular complete Freund adjuvant (CFA) or carrageenan, and in collagen antibodies-induced arthritis model.^{17,20,21,46} However, its direct role in inflammation is still debated with proresolving and worsening effects reported.^{17,46} Blockade of ASIC3 with APETx2¹⁰ attenuated both disease and pain progression of the early phase in a OA rat model.²³ Finally, ASIC3-dependent pain behaviors can be induced upon injection of LPC in rodent paw or muscle.^{18,32} Here, we investigated the clinical relevance of LPC in chronic joint pain and explored its mechanism of action involving peripheral ASIC3 channels following intra-articular administrations of LPC16:0 in mice.

2. Methods

2.1. Patient cohorts

2.1.1. Cohort of patients with osteoarthritis (first cohort)

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

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

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

2.1.3. Postmortem control subjects

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

2.1.4. Questionnaires

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

2.1.5. Patient demographic data and lysophosphatidylcholine concentrations

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

2.2. Lipidomic analysis of patient samples

2.2.1. Chemical and lipid standards

Chloroform (CHCl_3), methanol (CH_3OH), and formic acid (HCOOH) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin

Fallavier, France). Water (H₂O) used for lipid extraction was from Milli-Q quality. Lysophosphatidylcholine standards were purchased from Avanti Polar Lipids via Sigma Aldrich and then prepared at the appropriate concentration and stored at -20°C .

2.2.2. Lipid extraction

All patients' samples were processed in the same manner by the same laboratory as follow. Extraction of lipids from human synovial fluid (HSF) samples was adapted from the Folch method.¹³ Fifty microliters of each patient sample were diluted with water to a final volume of 1 mL. The diluted samples were then transferred into glass tubes (Pyrex Labware) and vortexed for 1 minute. Lipids were extracted using 4-mL chloroform (CHCl₃)/methanol (CH₃OH) (2:1, vol/vol) and shaken with an orbital shaker (IKA VX basic Vibrax, Sigma-Aldrich) at 1500 rpm for 2 hours at room temperature. After centrifugation for 10 minutes with a swingout centrifuge at 410 g, aqueous phases were eliminated, and lipid-containing organic phases were supplemented with 1 mL of a 4:1 (vol/vol) 2N KCl/CH₃OH solution. Samples were shaken for 10 minutes at 1500 rpm, centrifuged for 5 minutes, and the upper aqueous phases were eliminated. The resulting organic phases were complemented with 1 mL of a 3:48:47 (vol/vol/vol) CHCl₃/CH₃OH/H₂O solution, shaken for 10 minutes and centrifuged for 5 minutes. The aqueous phases were eliminated, and the organic phases containing whole lipids were transferred into new glass tubes. Lipid extracts were then evaporated until dryness at 60°C under a stream of nitrogen, redissolved in 500 μL CHCl₃/CH₃OH (1:2, vol/vol) and stored at -20°C until further analysis.

2.2.3. Mass spectrometry analysis of lysophosphatidylcholine

Lipid extracts were diluted once in CHCl₃/CH₃OH (1:2, vol/vol) before addition of 1% (vol/vol) formic acid. An optimized quantity of the internal standard LPC13:0 (0.1 μg of LPC13:0 for 100 μL of lipid extract) was added to each sample to quantify LPC species. Diluted lipid extracts were analyzed in the positive ion mode by direct infusion on a SYNAPT G2 High-Definition Mass Spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA) equipped with an Electrospray Ionization Source. The flow rate was 5 $\mu\text{L}/\text{minute}$. All High Resolution full-scan mass spectrometry (MS) experiments were acquired in profile mode over 1 minute with a normal dynamic range from 300 to 1200 m/z . Ionization conditions in positive ion mode have been optimized, and all LPC species, including the LPC internal standard, were detected as protonated ions $[\text{M} + \text{H}]^{+}$.

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

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

resolution full-scan experiments was performed with the help of ALEX Software.¹⁹

2.3. Animals and behavioral experiments

2.3.1. Animals

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

2.3.2. Joint pain models

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

2.3.3. Pharmacological experiments

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

2.3.4. Mechanical sensitivity

Mechanical sensitivity was evaluated by performing von Frey tests. Two types of von Frey tests were used, the classical up-down method of Dixon¹¹ modified by Chaplan⁷ with von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) and the dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Gemonio, Italy). For both methods, freely moving animals were placed in individual plastic boxes on a wire mesh surface, so that von Frey mechanical stimuli could be applied to the plantar surfaces of their hind paws. For up-down von Frey experiments, animals followed an habituation period

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

2.3.5. Heat sensitivity

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

2.3.6. Weight-bearing experiments

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

2.3.7. Assessment of anxiety-like behaviors

2.3.7.1. Open field test

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

2.3.7.2. Elevated plus maze

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

2.3.7.3. Marble burying test

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

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

2.3.7.4. Hole board test

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

2.4. Immunohistochemistry on tibiotarsal joints and amygdala

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

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

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

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

2.5. Electronic microscopy

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

2.6. Quantitative Polymerase Chain Reaction

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

2.7. In vivo imaging

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

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

2.8. Cell culture and transfection

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

2.9. Primary culture of dorsal root ganglia neurons

Lumbar dorsal root ganglia (DRG L1-L6) were rapidly dissected out from euthanized adult male C57Bl6J (Janvier Lab, at least 8 weeks of age) and ASIC3^{-/-} mice, and placed in cold Ca-free/Mg-free HBSS medium (Corning) supplemented with 10 mM glucose and 5 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7.5 with NaOH). After removing the roots, DRGs were enzymatically dissociated at 37°C for 2×20 minutes in the HBSS solution supplemented with calcium (CaCl_2 5 mM) and containing collagenase type II (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France) and dispase (Gibco, France). Dorsal root ganglia were then mechanically triturated and washed in a complete neurobasal A (NBA) medium (Gibco Invitrogen supplemented with 2% B27, 2 mM L-glutamine and 1% antibiotics: penicillin + streptomycin, Lonza BioWhittaker), before being plated in 35-mm petri dishes. Neurons were then kept in culture at 37°C for 1 week with one-third of the culture medium renewed every 2 days (complete NBA supplemented with 10 ng/mL NT3, 2 ng/mL glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), 10 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 100 ng/mL nerve growth factor (NGF) and 100 nM retinoic acid) and were used for patch clamp experiments at least 2 days after plating.

2.10. Patch clamp experiments

The whole-cell configuration of the patch clamp technique was used to record either membrane currents (voltage clamp) or membrane potentials (current clamp). The patch pipettes were made by heating and pulling borosilicate glass tubes (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) with a vertical P830 puller (Narishige, Tokyo, Japan), so that the pipette resistances were comprised between 3 and 7 M Ω . Patch pipettes were filled with an intracellular solution containing either 135 mM KCl, 2.5 mM ATP- Na_2 , 2.1 mM CaCl_2 , 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.3 with KOH for DRG neurons or 135 mM KCl, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.3 with KOH for HEK cells. Cells were bathed into an extracellular solution made of 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , and 10 mM HEPES for HEK cells, and this medium was supplemented with 10 mM glucose for DRG neurons. pH of extracellular solutions were adjusted to different values with NMDG-Cl, including the control pH 7.4 solution and the test pH 6.6 solution. During patch-clamp recordings, the cell under investigation was continuously superfused with extracellular solutions using a homemade 8-outlet system digitally controlled by solenoid valves (Warner Instruments, Hamden, CT), allowing rapid changes of the immediate cell environment from control to test solutions. Electrophysiological signals generated by patch-clamped cells were amplified and low-pass

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

2.11. In vivo electrophysiological recordings of spinal dorsal horn neurons

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

2.12. Statistical analysis

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

3. Results

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

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

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

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

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

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

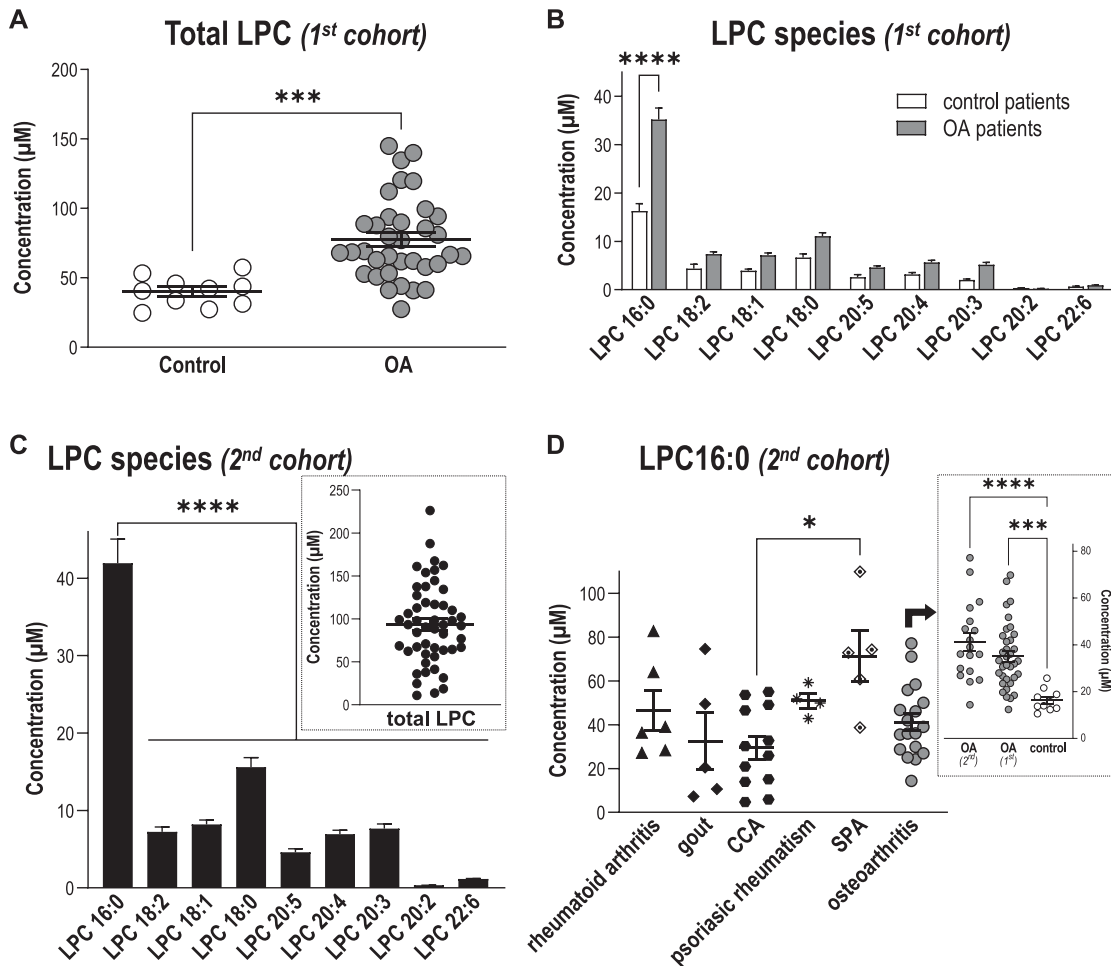


Figure 1. Levels of LPC16:0 are increased in synovial fluids of patients suffering from joint pain. Quantifications of LPC species were performed in knee human synovial fluid (HSF) samples. Total lipids were extracted from HSF samples and analyzed by direct infusion in mass spectrometry (MS) using an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

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

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

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

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

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

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

LPC16:0 activated rat and human ASIC3 in transfected HEK293 cells³² (supplementary Fig. 4A–C, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>) and induced an ASIC3-dependent depolarizing current in mouse DRG neurons (**Figs. 4A–D**). The *in vivo* involvement of this channel in pain and anxiety-like behaviors following intra-articular LPC16:0 injections was thus investigated using wild-type (ASIC3^{+/+}) and ASIC3-knockout (ASIC3^{-/-}) mice (**Fig. 5** and supplementary Fig. 5, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). LPC16:0 injections induced long-lasting mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in both male and female ASIC3^{+/+} mice, indicating no sex dimorphism (**fig. 5A–B** and supplementary Fig. 5A–B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). These pain behaviors were significantly reduced in both male and female ASIC3^{-/-} mice. The persistent LPC16:0-induced pain state was also associated to anxiety-like behaviors assessed between days 19 and 23 in male and female ASIC3^{+/+} mice, which were significantly reduced in ASIC3^{-/-} mice, as shown in the EPM and marble burying tests (**Fig. 5C–F**). Finally, LPC16:0 did not alter locomotor behaviors in both ASIC3^{+/+} and ASIC3^{-/-} mice at day 20 (supplementary Fig. 5C, D, available at <http://links.lww.com/PAIN/B579>). Thus, the development of LPC16:0-induced pain and associated anxiety-like behaviors were mediated by ASIC3 in both sexes.

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

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

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

4. Discussion

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

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

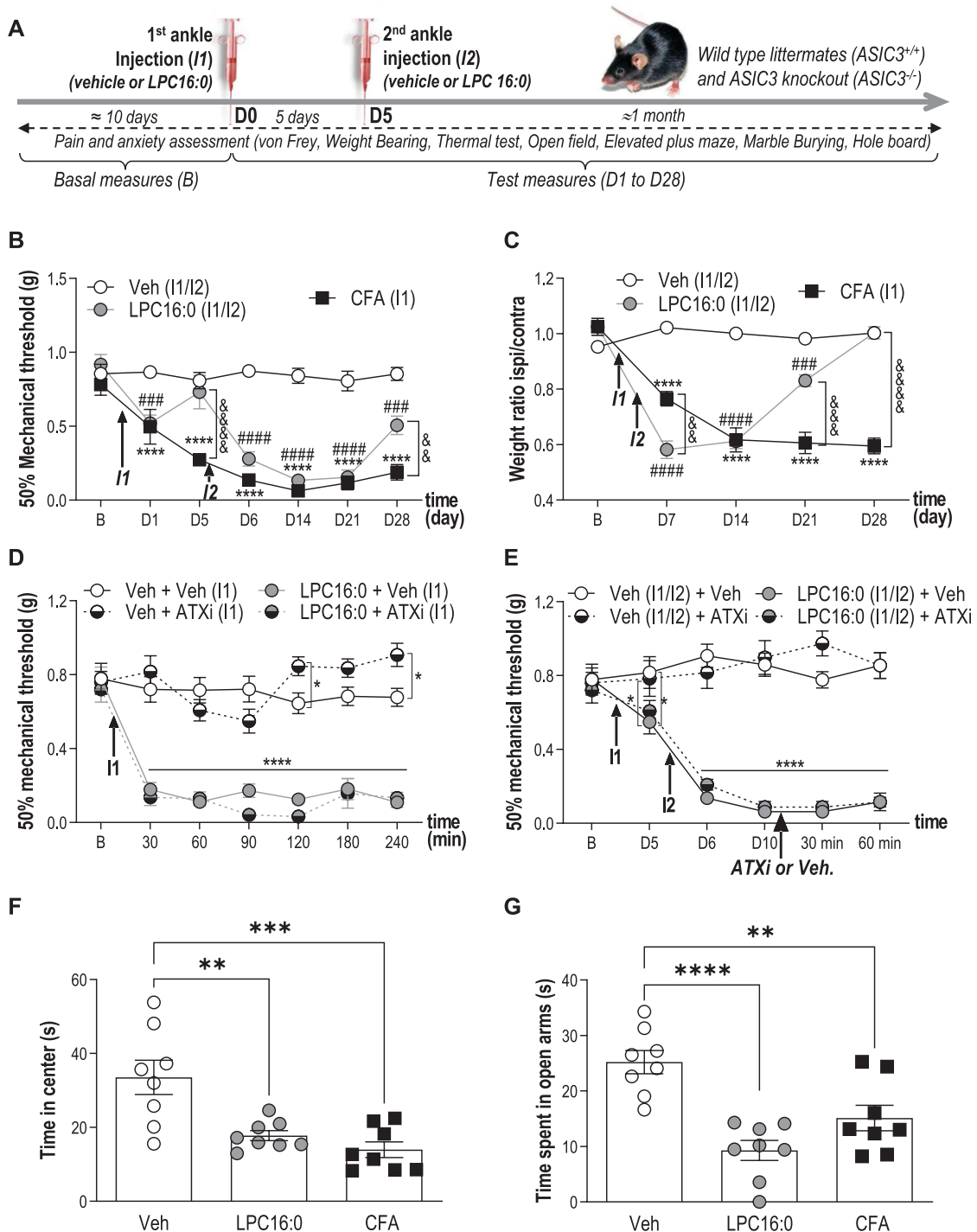


Figure 2. Lysophosphatidylcholine injections into mouse ankle joints produce long-lasting pain-like behaviors associated with anxiety-related behaviors. (A) Timeline of the experimental procedures used. (B) Effect of intra-articular ankle injections of LPC16:0 (10 nmol), CFA or vehicle (Veh) on mechanical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

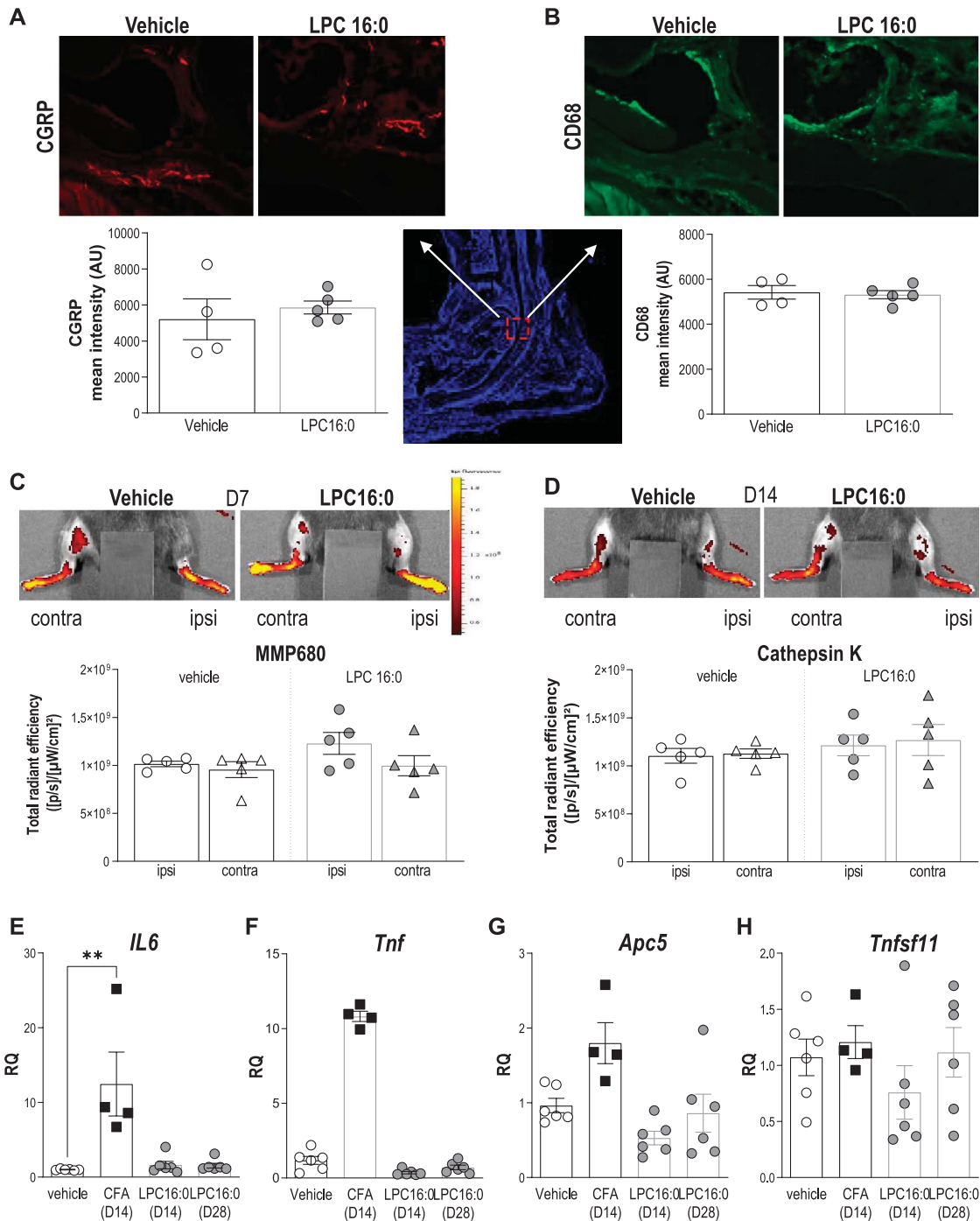


Figure 3. LPC16:0 injections into mouse ankle are not associated to peripheral nerve sprouting, inflammation, nor bone alterations. (A–B) Analysis of CGRP and CD68 expression in the ipsilateral tibiotarsal joint at D28, following intra-articular administrations of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle in male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

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

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

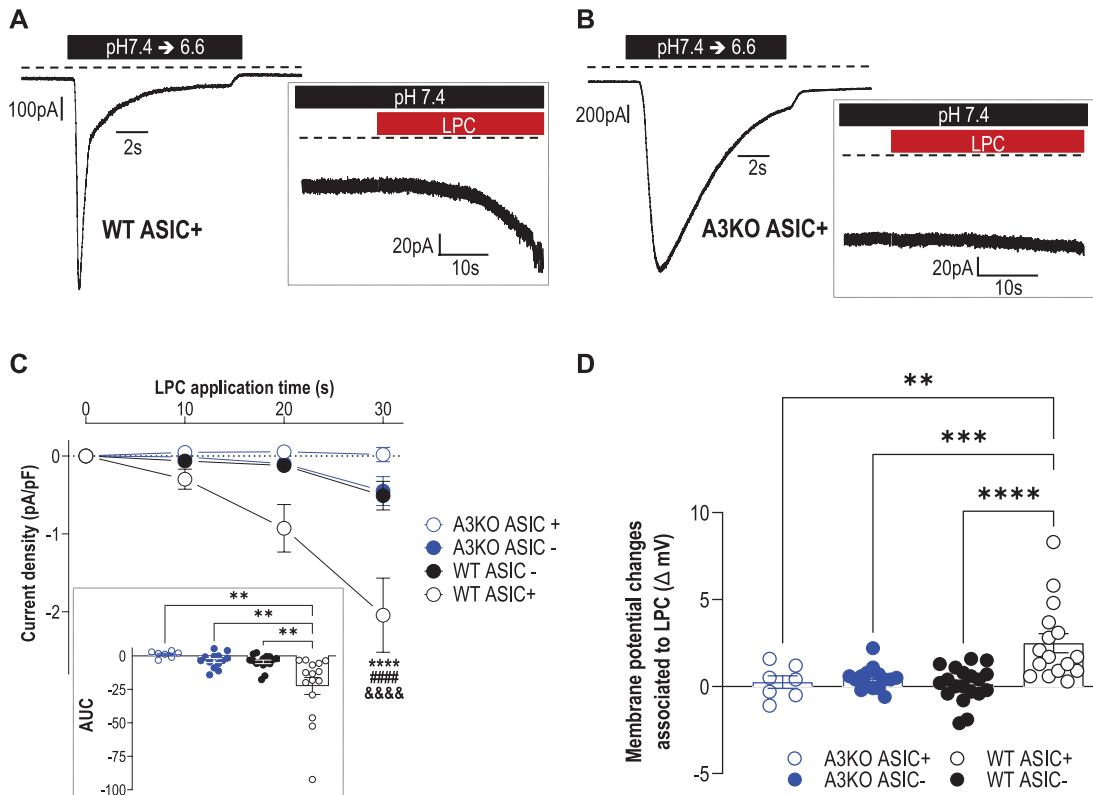


Figure 4. LPC16:0 induces a noninactivating, ASIC3-dependent current associated with membrane depolarization in mouse DRG neurons. Whole-cell patch clamp experiments performed on WT and ASIC3 knockout (A3KO) DRG neurons expressing (ASIC+) or not expressing (ASIC-) a pH6.6-evoked ASIC current. (A–B) Native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

RA.²⁴ This might explain the lack of clear correlation between joint damage and pain in OA.^{3,16}

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

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

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

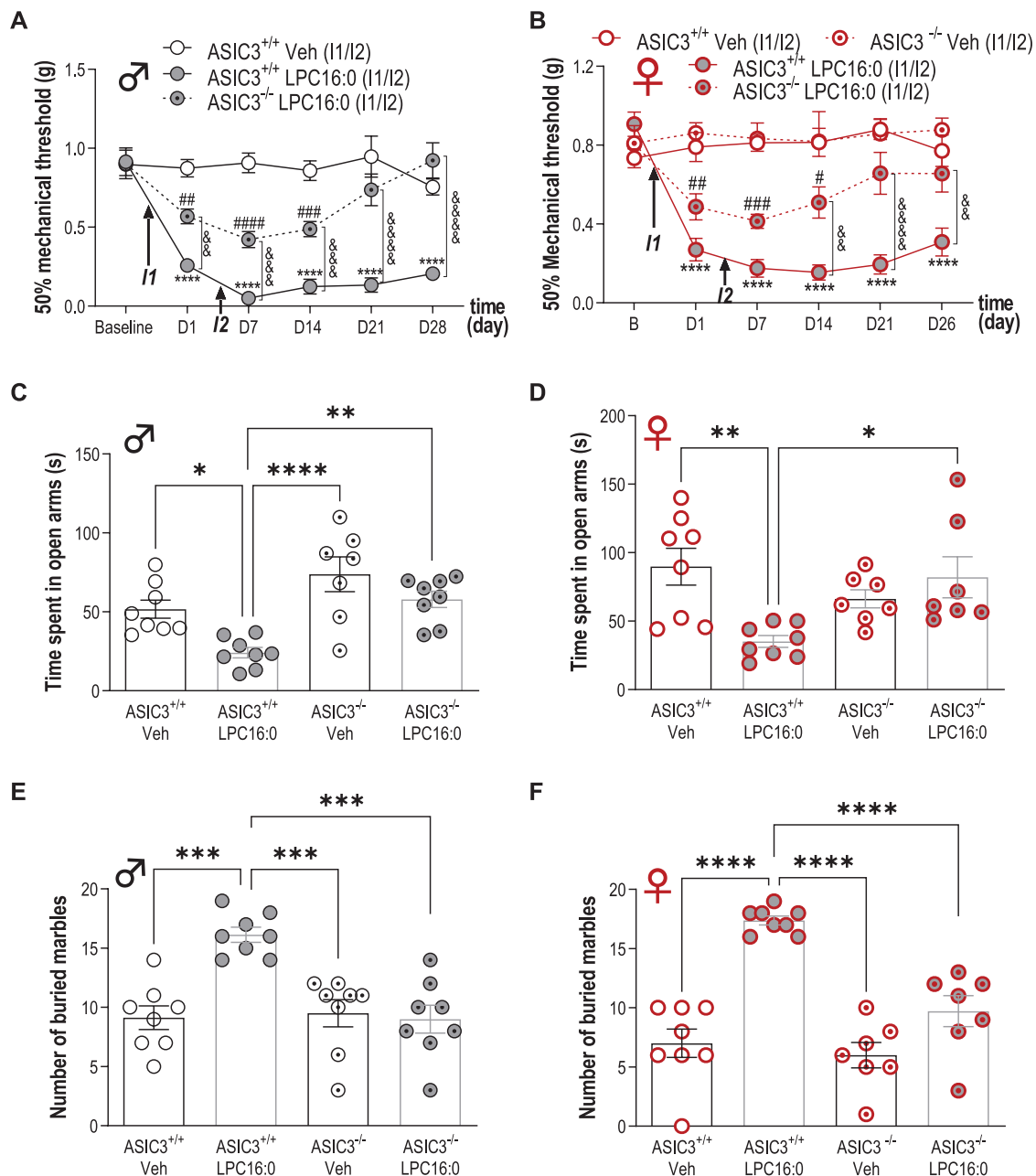


Figure 5. Acid-sensing ion channel 3 is crucial for the development of both pain and anxiety-like behaviors induced by LPC16:0 injections into mouse ankle joints of male and female mice. Time course effect of intra-articular ankle injections of LPC16:0 (10 nmol) or vehicle in male (A) or female (B) ASIC3^{+/+}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

depolarization similar to the ASIC3-dependent depolarization we already shown to sensitize these neurons.⁸ It is thus very likely that intra-articular injections of LPC16:0 could drive an ASIC3-dependent nociceptive input leading to a persistent pain state originating from joints. ASIC3 has been already associated to long-lasting pain states following repeated acid injections in rodent joints⁴⁸ and muscles⁴⁴ and more recently following LPC injections in mouse muscle.¹⁸ The stimulation of ASIC3 channels

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

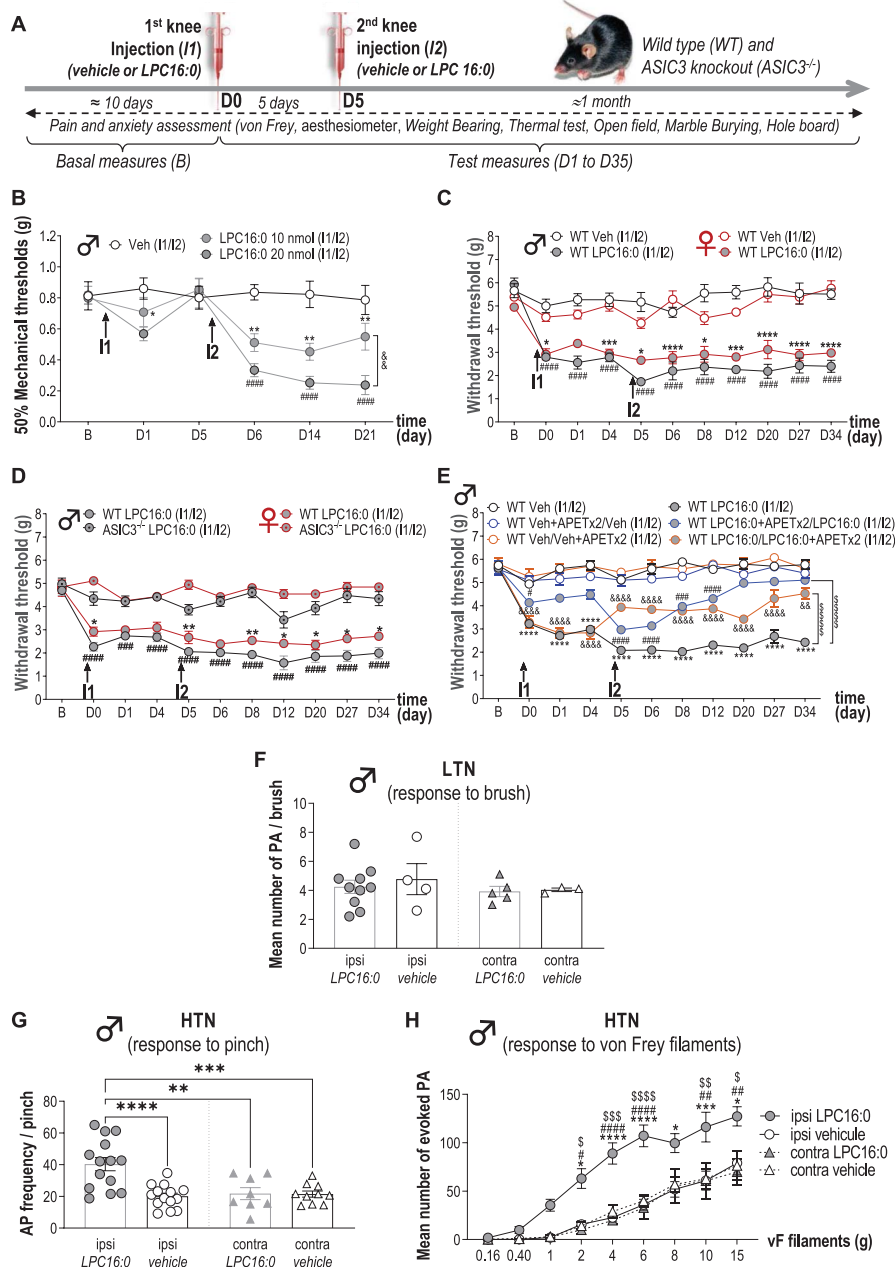


Figure 6. Lysophosphatidylcholine knee injections generate persistent secondary mechanical allodynia associated with sensitization of spinal dorsal horn neuron activity. (A) Timeline of the experimental procedures used. (B) Effect of intra-articular knee administrations of LPC16:0 (10 and 20 nmol), or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

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

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

Conflict of interest statement

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

Acknowledgements

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

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

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

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

Appendix A. Supplemental digital content

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

Article history:

Received 14 September 2021

Received in revised form 7 December 2021

Accepted 8 December 2021

Available online 27 January 2022

References

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

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

Supplementary informations

Supplementary Results

LPC in patients with microcrystalline arthropathies

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

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

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

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

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

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

Supplementary References

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

Supplementary tables and figures

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

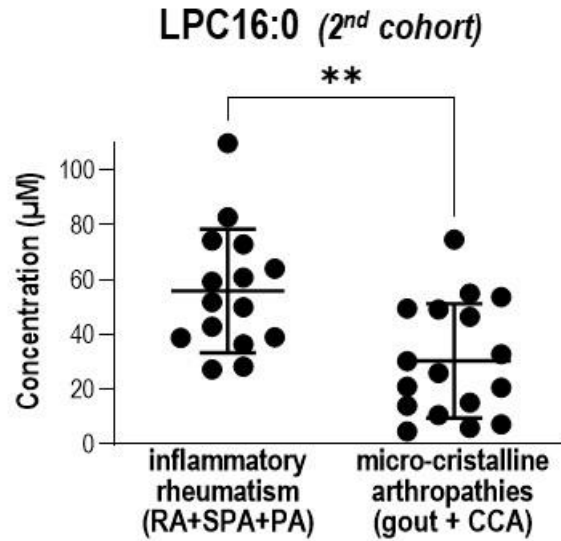
Supplementary Table 1. Subject characteristics and LPC concentrations in the knee synovial fluids of the first patients' cohort. Sexe, age and body mass index (BMI) are reported for each osteoarthritic (OA, n=35) patients. The concentrations of the different lysophosphatidyl-choline (LPC) species (LPC16:0,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

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

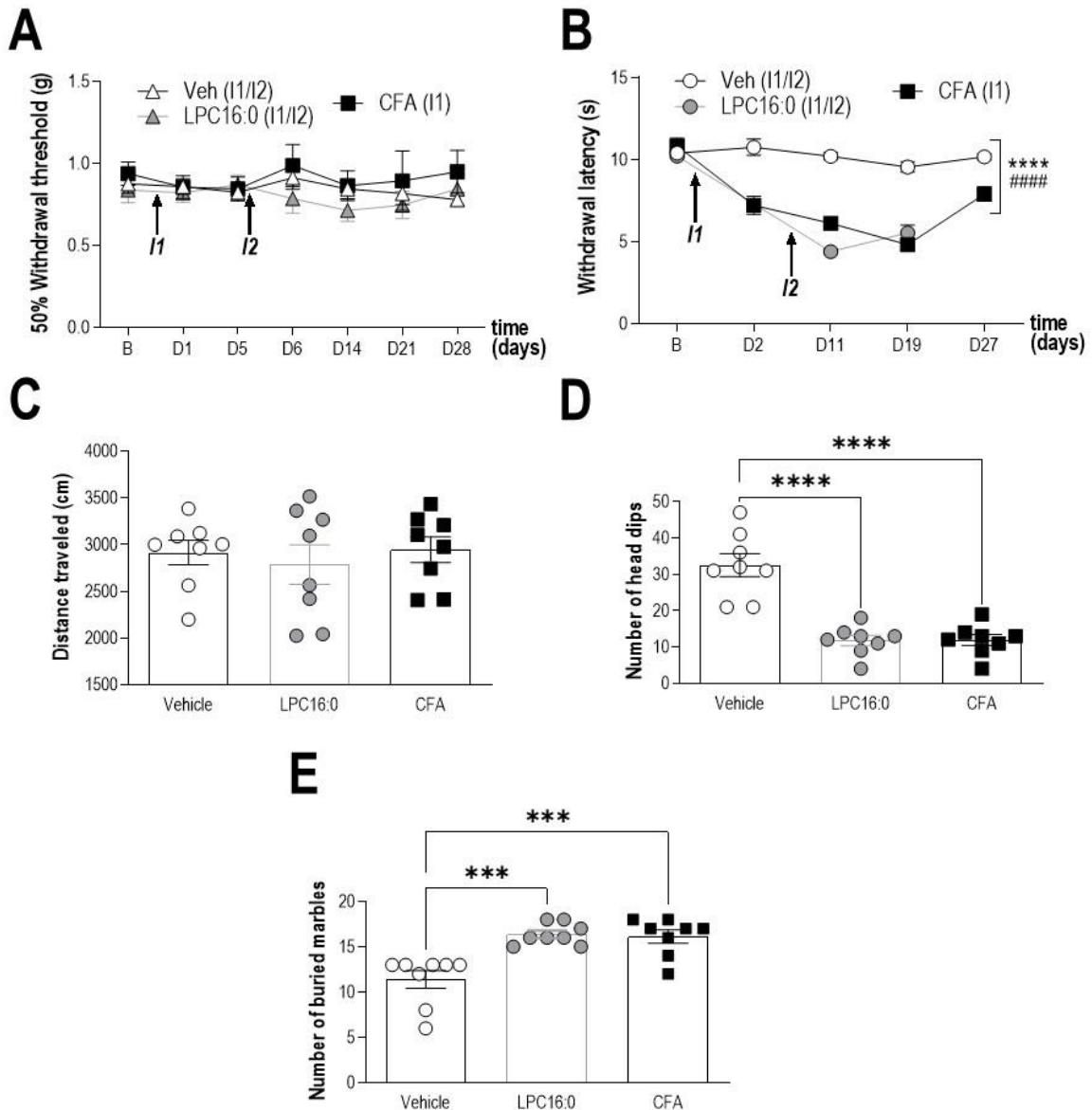
Supplementary Table 2. Statistical analysis of LPC16:0 concentrations in the synovial fluids of OA patients (first cohort) and of their pain outcomes (VAS knee, VAS global and KOOS). Analysis of variance (ANOVA) was made using age, gender, BMI and IL-6 as covariates.

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

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

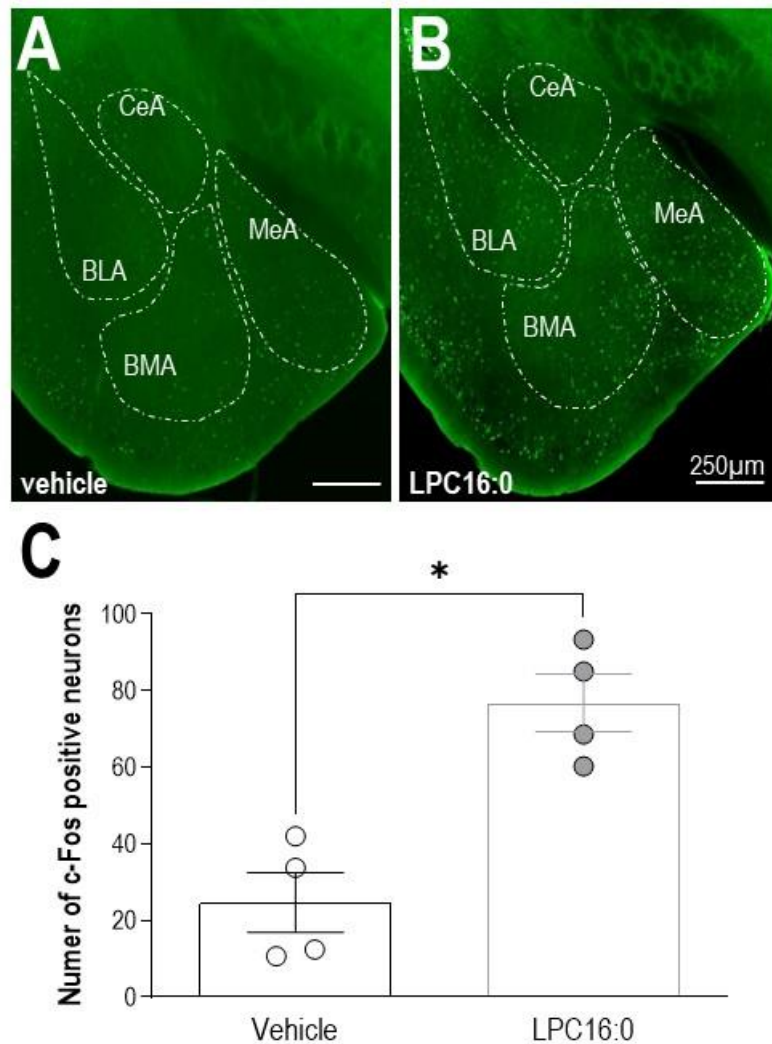


Supplementary Figure 1. LPC16:0 concentrations in knee synovial fluids from patients of the second cohort. LPC16:0 concentrations in the synovial fluids of patients from the second cohort grouped in two main joint pathologies, *i.e.*, inflammatory rheumatism: rheumatoid arthritis (RA) + spondyloarthritis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

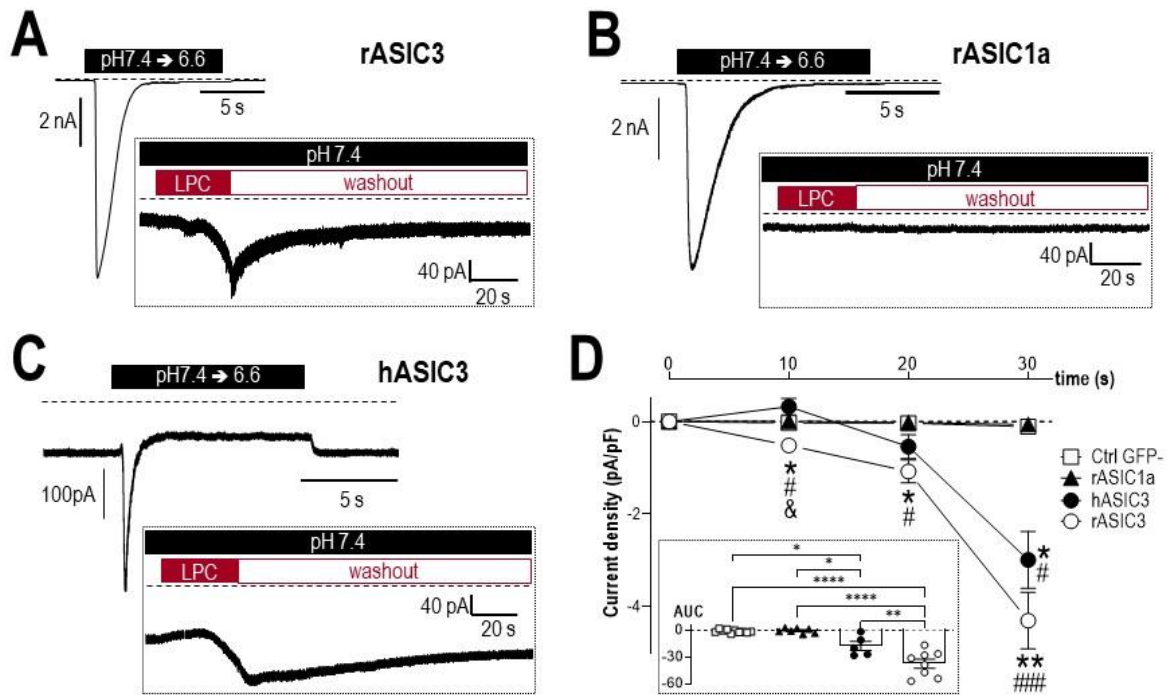


Supplementary Figure 2. LPC injections into mouse ankle produce long-lasting pain-like behaviors associated with anxiety. (A) Effect of intra-articular ankle administrations of LPC16:0 (10 nmol), complete Freund adjuvant (CFA) or vehicle on mechanical allodynia of the contralateral paw of male mice.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

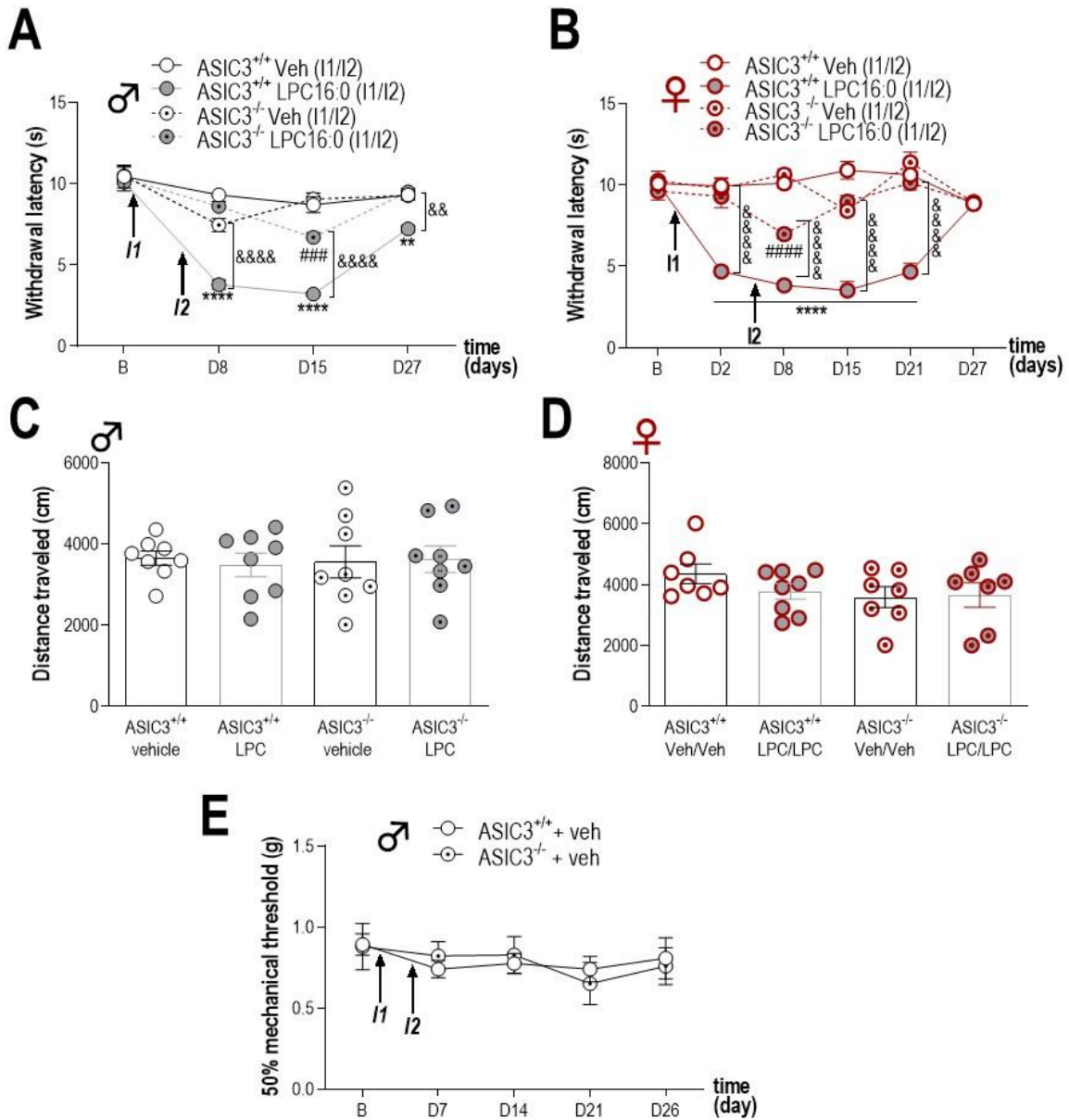
hole board and the marble burying tests lasted 5 and 30 min, respectively, and were analyzed by a blind experimenter (n=8 mice per group; ***p<0.001 and ****p<0.0001, one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test)



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

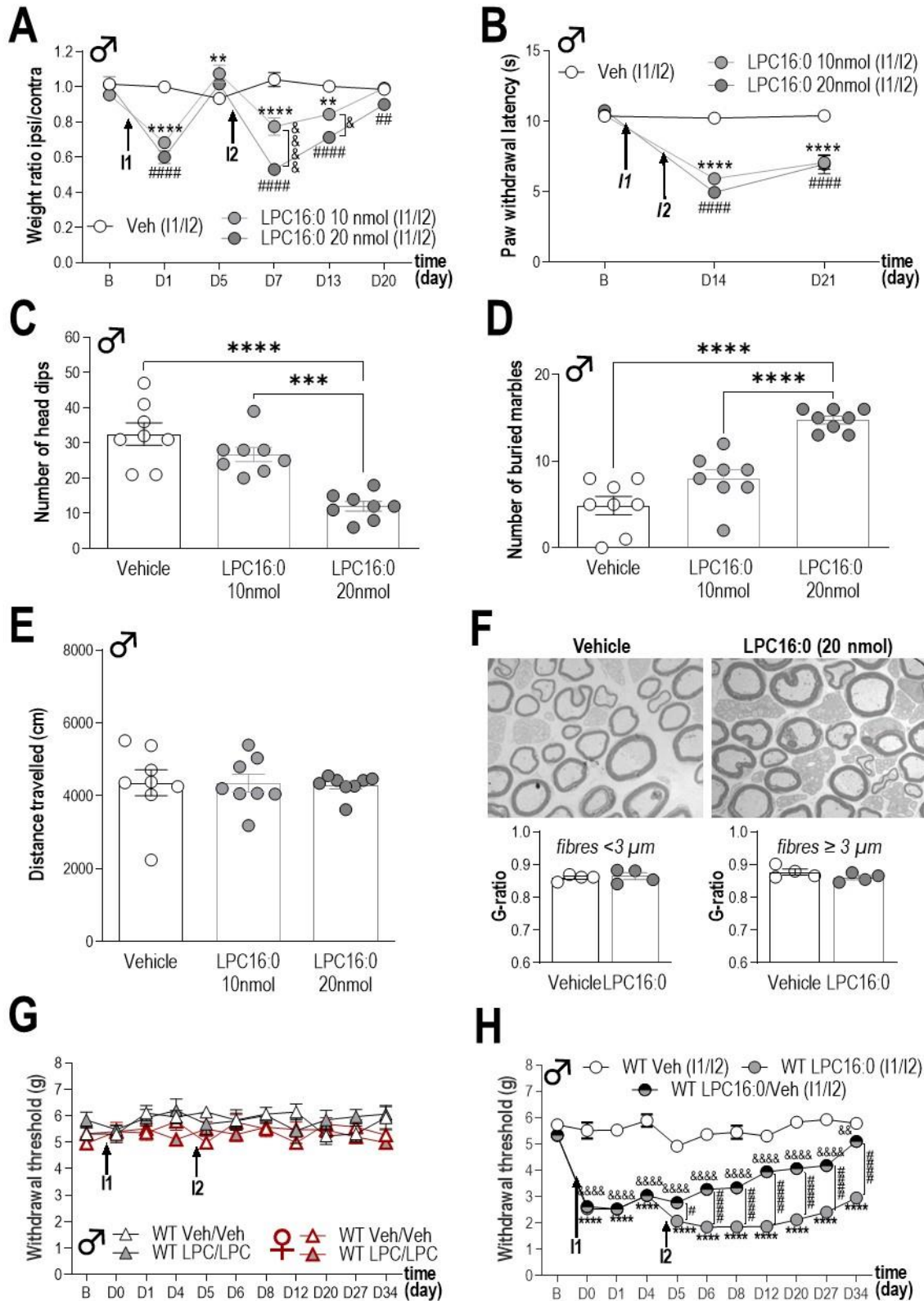


Supplementary Figure 4. LPC16:0 induces a non-inactivating ASIC3 current in a recombinant expression system. (A-C) Typical ASIC current traces recorded in patch-clamp (HP -50mV) from HEK293 cells transfected with rat ASIC3 (rASIC3, **A**), rat ASIC1a (rASIC1a, **B**) or human ASIC3 (hASIC3, **C**), following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



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

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



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

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

Dans le cadre de mes travaux de thèse j'ai participé à deux autres articles, qui ont été publiés dans *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Pidoux et al., 2022) et *BioRxiv* sous forme de preprint (Chafaï et al., 2021) qui est actuellement soumis à la publication.

Article 3 : Single subcutaneous injection of lysophosphatidyl-choline evokes ASIC3-dependent increases of spinal dorsal horn neuron activity

Ludivine Pidoux, **Kevin Delanoe**, Julie Barbier, Fabien Marchand, Eric Lingueglia et Emmanuel Deval

<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.880651>

La LPC a été proposée comme médiateur de la douleur par l'intermédiaire du canal ionique de détection d'acide 3 (ASIC3), capable de potentialiser les courants ASIC3 évoqués par des acidifications légères, mais également d'activer le canal à un pH physiologique, et son injection locale chez les rongeurs évoque une douleur dépendante d'ASIC3. Nous combinons dans cette étude des enregistrements *in vivo* de l'activité des neurones de la moelle épinière avec une injection sous-cutanée de LPC afin d'analyser le mécanisme d'action associé à la douleur dépendante d'ASIC3 induite par la LPC dans les neurones périphériques et de la moelle épinière.

Au sein de cet article, j'ai réalisé tous les enregistrements électrophysiologiques de patch clamp sur les effets de la LPC sur les différents canaux ASIC exprimés en système hétérologue.

Article 4 : Involvement of ASIC1a channels in the spinal processing of pain information by deep projection neurons

Magda Chafaï, Ariane Delrocq, Perrine Inquimbert, Ludivine Pidoux, Kevin Delanoe, Eric Lingueglia, Romain Veltz, Emmanuel Deval

<https://doi.org/10.1101/2021.08.02.454740>

La tachyphylaxie est un processus bien connu de facilitation de la douleur spinale initialement décrit il y a plusieurs décennies, mais dont le mécanisme exact n'est pas encore totalement compris. Ici, nous combinons à la fois des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* et *in vivo* de neurones spinaux avec la modélisation computationnelle pour démontrer un rôle pour les canaux contenant ASIC1a dans le processus de tachyphylaxie.

Au sein de ces travaux en collaboration avec des mathématiciens, j'ai réalisé les enregistrements électrophysiologiques du canal ASIC1a afin d'analyser les cinétiques du courant et le phénomène de tachyphylaxie (Mendell and Wall, 1965).

Bibliographie

- Aissouni, Y., El Guerrab, A., Hamieh, A.M., Ferrier, J., Chalus, M., Lemaire, D., Grégoire, S., Etienne, M., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2017). Acid-Sensing Ion Channel 1a in the amygdala is involved in pain and anxiety-related behaviours associated with arthritis. *Sci Rep* 7, 43617. <https://doi.org/10.1038/srep43617>.
- Akopian, A.N., Chen, C.-C., Ding, Y., Cesare, P., and Wood, J.N. (2000). A new member of the acid-sensing ion channel family. *NeuroReport* 11, 2217–2222. .
- Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2012). Subtype-specific Modulation of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) Function by 2-Guanidine-4-methylquinazoline*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 36059–36070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360487>.
- Andersson, D.A., Nash, M., and Bevan, S. (2007). Modulation of the Cold-Activated Channel TRPM8 by Lysophospholipids and Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Neurosci.* 27, 3347–3355. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4846-06.2007>.
- Andreoli, V.M., Maffei, F., Tonon, G.C., and Zibetti, A. (1973). Significance of plasma lysolecithin in patients with multiple sclerosis: a longitudinal study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 36, 661–667. <https://doi.org/10.1136/jnnp.36.4.661>.
- Angle, M.J., Tom, R., Jarvi, K., and McClure, R.D. (1993). Effect of platelet-activating factor (PAF) on human spermatozoa–oocyte interactions. *Reproduction* 98, 541–548. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980541>.
- Antollini, S.S., and Barrantes, F.J. (2002). Unique Effects of Different Fatty Acid Species on the Physical Properties of the Torpedo Acetylcholine Receptor Membrane *. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1249–1254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106618200>.
- Antollini, S.S., and Barrantes, F.J. (2016). Fatty Acid Regulation of Voltage- and Ligand-Gated Ion Channel Function. *Frontiers in Physiology* 7. .
- Anzai, N., Deval, E., Schaefer, L., Friend, V., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2002). The Multivalent PDZ Domain-containing Protein CIPP Is a Partner of Acid-sensing Ion Channel 3 in Sensory Neurons*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16655–16661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201087200>.
- Arai, A., and Lynch, G. (1992). Antagonists of the Platelet-activating Factor Receptor Block Long-term Potentiation in Hippocampal Slices. *European Journal of Neuroscience* 4, 411–419. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00890.x>.
- Arnhold, J., Osipov, A.N., Spalteholz, H., Panasenko, O.M., and Schiller, J. (2002). Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1572, 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00271-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00271-4).
- Ashraf, M.A., and Nookala, V. (2022). Biochemistry of Platelet Activating Factor. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Askwith, C.C., Benson, C.J., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2001). DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *PNAS* 98, 6459–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.111155398>.

- Askwith, C.C., Wemmie, J.A., Price, M.P., Rokhlina, T., and Welsh, M.J. (2004). Acid-sensing Ion Channel 2 (ASIC2) Modulates ASIC1 H⁺-activated Currents in Hippocampal Neurons*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18296–18305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312145200>.
- Assmann, M., Kuhn, A., Dürrnagel, S., Holstein, T.W., and Gründer, S. (2014). The comprehensive analysis of DEG/ENaC subunits in Hydrareveals a large variety of peptide-gated channels, potentially involved in neuromuscular transmission. *BMC Biology* 12, 84. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0084-2>.
- Babini, E., Paukert, M., Geisler, H.-S., and Gründer, S. (2002). Alternative Splicing and Interaction with Di- and Polyvalent Cations Control the Dynamic Range of Acid-sensing Ion Channel 1 (ASIC1)*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 41597–41603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205877200>.
- Babinski, K., Lê, K.T., and Séguéla, P. (1999). Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 72, 51–57. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720051.x>.
- Baconguis, I., and Gouaux, E. (2012). Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel–spider toxin complexes. *Nature* 489, 400–405. <https://doi.org/10.1038/nature11375>.
- Baconguis, I., Bohlen, C.J., Goehring, A., Julius, D., and Gouaux, E. (2014). X-Ray Structure of Acid-Sensing Ion Channel 1–Snake Toxin Complex Reveals Open State of a Na⁺-Selective Channel. *Cell* 156, 717–729. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.011>.
- Baker, R.R., and Chang, H. (1994). MgATP inhibits the synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphate by microsomal acetyltransferase of immature rabbit cerebral cortex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1213, 27–33. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90218-6).
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A. (2004). Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00150-3).
- Barbaro, J.F., and Zvaifler, N.J. (1966). Antigen Induced Histamine Release from Platelets of Rabbits Producing Homologous PGA Antibody. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 122, 1245–1247. <https://doi.org/10.3181/00379727-122-31371>.
- Barber, M.N., Risis, S., Yang, C., Meikle, P.J., Staples, M., Febbraio, M.A., and Bruce, C.R. (2012). Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. *PLOS ONE* 7, e41456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041456>.
- Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R.B., and Feinmark, S.J. (2002). Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 282, H2024–H2030. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00956.2001>.
- Baron, A., and Lingueglia, E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels – Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* 94, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.005>.
- Baron, A., Deval, E., Salinas, M., Lingueglia, E., Voilley, N., and Lazdunski, M. (2002). Protein Kinase C Stimulates the Acid-sensing Ion Channel ASIC2a via the PDZ Domain-containing Protein PICK1*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50463–50468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208848200>.

- Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). Acid Sensing Ion Channels in Dorsal Spinal Cord Neurons. *J. Neurosci.* *28*, 1498–1508. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4975-07.2008>.
- Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noël, J., and Lingueglia, E. (2013). Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* *75*, 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.008>.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* *139*, 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- Bassilana, F., Champigny, G., Waldmann, R., de Weille, J.R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The Acid-sensitive Ionic Channel Subunit ASIC and the Mammalian Degenerin MDEG Form a Heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ Channel with Novel Properties*. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 28819–28822. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28819>.
- Bässler, E.-L., Ngo-Anh, T.J., Geisler, H.-S., Ruppertsberg, J.P., and Gründer, S. (2001). Molecular and Functional Characterization of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 1b*. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 33782–33787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104030200>.
- Bazan, N.G., Fletcher, B.S., Herschman, H.R., and Mukherjee, P.K. (1994). Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *PNAS* *91*, 5252–5256. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5252>.
- Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* *8*, 451–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>.
- Beck, R., Bertolino, S., Abbot, S.E., Aaronson, P.I., and Smirnov, S.V. (1998). Modulation of Arachidonic Acid Release and Membrane Fluidity by Albumin in Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Circulation Research* *83*, 923–931. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.9.923>.
- Bennett, D.L., Clark, A.J., Huang, J., Waxman, S.G., and Dib-Hajj, S.D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews* *99*, 1079–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>.
- Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2002). Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *PNAS* *99*, 2338–2343. <https://doi.org/10.1073/pnas.032678399>.
- Benveniste, J. (1974). Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* *249*, 581–582. <https://doi.org/10.1038/249581a0>.
- Benveniste, J., Henson, P.M., and Cochrane, C.G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* *136*, 1356–1377. <https://doi.org/10.1084/jem.136.6.1356>.
- Bernal, L., Sotelo-Hitschfeld, P., König, C., Sinica, V., Wyatt, A., Winter, Z., Hein, A., Touska, F., Reinhardt, S., Tragl, A., et al. (2021). Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth. *Science Advances* *7*, eabf5567. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf5567>.
- Besson, T., Lingueglia, E., and Salinas, M. (2017). Pharmacological modulation of Acid-Sensing Ion Channels 1a and 3 by amiloride and 2-guanidine-4-methylquinazoline (GMQ). *Neuropharmacology* *125*, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.004>.

- Bevan, S., and Yeats, J. (1991). Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology* 433, 145–161. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018419>.
- Birdsong, W.T., Fierro, L., Williams, F.G., Spelta, V., Naves, L.A., Knowles, M., Marsh-Haffner, J., Adelman, J.P., Almers, W., Elde, R.P., et al. (2010). Sensing Muscle Ischemia: Coincident Detection of Acid and ATP via Interplay of Two Ion Channels. *Neuron* 68, 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.029>.
- Björnsdotter, M., Morrison, I., and Olausson, H. (2010). Feeling good: on the role of C fiber mediated touch in interoception. *Exp Brain Res* 207, 149–155. <https://doi.org/10.1007/s00221-010-2408-y>.
- Blank, M.L., Cress, E.A., Lee, T.C., Malone, B., Surles, J.R., Piantadosi, C., Hajdu, J., and Snyder, F. (1982). Structural features of platelet activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) required for hypotensive and platelet serotonin responses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38, 3–20.
- Blank, M.L., Lee, Y.J., Cress, E.A., and Snyder, F. (1988). Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) via cytidylyltransferase activation in cells with minimal endogenous PAF production. *Journal of Biological Chemistry* 263, 5656–5661. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)60615-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60615-5).
- Blank, M.L., Smith, Z.L., Fitzgerald, V., and Snyder, F. (1995). The CoA-independent transacylase in PAF biosynthesis: tissue distribution and molecular species selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1254, 295–301. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00189-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00189-6).
- Bohlen, C.J., Chesler, A.T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzky, K.F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E.E., Burlingame, A.L., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479, 410–414. <https://doi.org/10.1038/nature10607>.
- Börjesson, S.I., Hammarström, S., and Elinder, F. (2008). Lipoelectric Modification of Ion Channel Voltage Gating by Polyunsaturated Fatty Acids. *Biophysical Journal* 95, 2242–2253. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.130757>.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., and Zamponi, G.W. (2014). Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews* 94, 81–140. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2013>.
- Brand, J., Smith, E.S.J., Schwefel, D., Lapatsina, L., Poole, K., Omerbašić, D., Kozlenkov, A., Behlke, J., Lewin, G.R., and Daumke, O. (2012). A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. *EMBO J* 31, 3635–3646. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.203>.
- Brash, A.R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest* 107, 1339–1345. <https://doi.org/10.1172/JCI13210>.
- Braverman, N.E., and Moser, A.B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 1442–1452. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>.
- Brierley, S.M., Hughes, P.A., Harrington, A.M., Rychkov, G.Y., and Blackshaw, L.A. (2010). Identifying the Ion Channels Responsible for Signaling Gastro-Intestinal Based Pain. *Pharmaceuticals* 3, 2768–2798. <https://doi.org/10.3390/ph3092768>.
- Brodie, C. (1995). Platelet activating factor induces nerve growth factor production by rat astrocytes. *Neuroscience Letters* 186, 5–8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11267-Z](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11267-Z).

- Burnes, L.A., Kolker, S.J., Danielson, J.F., Walder, R.Y., and Sluka, K.A. (2008). Enhanced muscle fatigue occurs in male but not female ASIC3^{-/-} mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1347–R1355. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00687.2007>.
- Busserolles, J., Tsantoulas, C., Eschalier, A., and López García, J.A. (2016). Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *PAIN* 157, S7. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000368>.
- Calabresi, L., Simonelli, S., Gomaraschi, M., and Franceschini, G. (2012). Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 222, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.034>.
- Cao, Y., Pearman, A.T., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., and Prescott, S.M. (2000). Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *PNAS* 97, 11280–11285. <https://doi.org/10.1073/pnas.200367597>.
- Carnally, S.M., Dev, H.S., Stewart, A.P., Barrera, N.P., Van Bemmelen, M.X., Schild, L., Henderson, R.M., and Edwardson, J.M. (2008). Direct visualization of the trimeric structure of the ASIC1a channel, using AFM imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, 752–755. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.100>.
- Chafaï, M., Delrocq, A., Inquimbert, P., Pidoux, L., Delanoe, K., Lingueglia, E., Veltz, R., and Deval, E. (2021). Involvement of ASIC1a channels in the spinal processing of pain information by deep projection neurons. 2021.08.02.454740. <https://doi.org/10.1101/2021.08.02.454740>.
- Chang, C.-T., Fong, S.W., Lee, C.-H., Chuang, Y.-C., Lin, S.-H., and Chen, C.-C. (2019). Involvement of Acid-Sensing Ion Channel 1b in the Development of Acid-Induced Chronic Muscle Pain. *Frontiers in Neuroscience* 13, 1247. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01247>.
- Chen, C.-C., and Wong, C.-W. (2013). Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17, 337–349. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12025>.
- Chen, C.-C., England, S., Akopian, A.N., and Wood, J.N. (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *PNAS* 95, 10240–10245. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10240>.
- Chen, W.-N., Lee, C.-H., Lin, S.-H., Wong, C.-W., Sun, W.-H., Wood, J.N., and Chen, C.-C. (2014). Roles of ASIC3, TRPV1, and Nav1.8 in the Transition from Acute to Chronic Pain in a Mouse Model of Fibromyalgia. *Mol Pain* 10, 1744-8069-10–40. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-40>.
- Chen, X., Polleichtner, G., Kadurin, I., and Gründer, S. (2007). Zebrafish Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 4, Characterization of Homo- and Heteromeric Channels, and Identification of Regions Important for Activation by H⁺. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30406–30413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702229200>.
- Chen, Y., Wang, Z.-L., Yeo, M., Zhang, Q.-J., López-Romero, A.E., Ding, H.-P., Zhang, X., Zeng, Q., Morales-Lázaro, S.L., Moore, C., et al. (2021a). Epithelia-Sensory Neuron Cross Talk Underlies Cholestatic Itch Induced by Lysophosphatidylcholine. *Gastroenterology* 161, 301-317.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.03.049>.
- Chen, Y.-J., Huang, C.-W., Lin, C.-S., Chang, W.-H., and Sun, W.-H. (2009). Expression and Function of Proton-Sensing G-Protein-Coupled Receptors in Inflammatory Pain. *Mol Pain* 5, 1744-8069-5–39. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-39>.

- Chen, Y.-J., Deng, S.-M., Chen, H.-W., Tsao, C.-H., Chen, W.-T., Cheng, S.-J., Huang, H.-S., Tan, B.C.-M., Matzuk, M.M., Flint, J., et al. (2021b). Follistatin mediates learning and synaptic plasticity via regulation of Asic4 expression in the hippocampus. *PNAS* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109040118>.
- Cheng, Y.-R., Jiang, B.-Y., and Chen, C.-C. (2018). Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci* 25. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0448-y>.
- Chiang, P.-H., Chien, T.-C., Chen, C.-C., Yanagawa, Y., and Lien, C.-C. (2015). ASIC-dependent LTP at multiple glutamatergic synapses in amygdala network is required for fear memory. *Scientific Reports* 5, 10143. <https://doi.org/10.1038/srep10143>.
- Chilton, F.H., Surette, M.E., and Winkler, J.D. (1996). Arachidonate—Phospholipid Remodeling and Cell Proliferation. In *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2: Roles in Health and Disease*, S. Nigam, G. Kunkel, and S.M. Prescott, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 169–172.
- Cho, C.H., Lho, Y.M., Ha, E., Hwang, I., Song, K.S., Min, B.W., Bae, K.C., and Kim, D.H. (2015). Up-regulation of acid-sensing ion channels in the capsule of the joint in frozen shoulder. *The Bone & Joint Journal* 97-B, 824–829. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.97B6.35254>.
- Choi, J., Zhang, W., Gu, X., Chen, X., Hong, L., Laird, J.M., and Salomon, R.G. (2011). Lysophosphatidylcholine is Generated by Spontaneous Deacylation of Oxidized Phospholipids. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 111–118. <https://doi.org/10.1021/tx100305b>.
- Chu, X.-P., Miesch, J., Johnson, M., Root, L., Zhu, X.-M., Chen, D., Simon, R.P., and Xiong, Z.-G. (2002). Proton-Gated Channels in PC12 Cells. *Journal of Neurophysiology* 87, 2555–2561. <https://doi.org/10.1152/jn.00741.2001>.
- Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* 57, 427–450. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>.
- Claud, E.C., Lu, J., Wang, X.Q., Abe, M., Petrof, E.O., Sun, J., Nelson, D.J., Marks, J., and Jilling, T. (2008). Platelet-activating factor-induced chloride channel activation is associated with intracellular acidosis and apoptosis of intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294, G1191–G1200. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00318.2007>.
- Collado, M.P., Latorre, E., Fernández, I., Aragonés, M.D., and Catalán, R.E. (2003). Endothelin-1 decreases ethanolamine plasmalogen levels and evokes PAF production in brain microvessels. *Microvascular Research* 66, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2003.08.002>.
- Corder, G., Ahanonu, B., Grewe, B.F., Wang, D., Schnitzer, M.J., and Scherrer, G. (2019). An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. *Science* 363, 276–281. <https://doi.org/10.1126/science.aap8586>.
- Coric, T., Zheng, D., Gerstein, M., and Canessa, C.M. (2005). Proton sensitivity of ASIC1 appeared with the rise of fishes by changes of residues in the region that follows TM1 in the ectodomain of the channel. *The Journal of Physiology* 568, 725–735. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087734>.
- Corrow, K., Girard, B.M., and Vizzard, M.A. (2010). Expression and response of acid-sensing ion channels in urinary bladder to cyclophosphamide-induced cystitis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 298, F1130–F1139. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00618.2009>.

Coryell, M.W., Ziemann, A.E., Westmoreland, P.J., Haenfler, J.M., Kurjakovic, Z., Zha, X., Price, M., Schnizler, M.K., and Wemmie, J.A. (2007). Targeting ASIC1a Reduces Innate Fear and Alters Neuronal Activity in the Fear Circuit. *Biological Psychiatry* 62, 1140–1148. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.008>.

Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Haenfler, J.M., Allen, J.E., McBride, J.L., Davidson, B.L., and Wemmie, J.A. (2008). Restoring Acid-Sensing Ion Channel-1a in the Amygdala of Knock-Out Mice Rescues Fear Memory But Not Unconditioned Fear Responses. *J. Neurosci.* 28, 13738–13741. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3907-08.2008>.

Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Haenfler, J.M., Allen, J.E., Schnizler, M., Ziemann, A.E., Cook, M.N., Dunning, J.P., Price, M.P., Rainier, J.D., et al. (2009). Acid-Sensing Ion Channel-1a in the Amygdala, a Novel Therapeutic Target in Depression-Related Behavior. *J. Neurosci.* 29, 5381–5388. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0360-09.2009>.

Cullinan, M.M., Klipp, R.C., and Bankston, J.R. (2021). Regulation of acid-sensing ion channels by protein binding partners. *Channels* 15, 635–647. <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1976946>.

Cuppoletti, J., Tewari, K.P., Sherry, A.M., Kupert, E.Y., and Malinowska, D.H. (2001). ClC-2 Cl⁻ channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281, C46–C54. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.1.C46>.

Dean, J.M., and Lodhi, I.J. (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* 9, 196–206. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5>.

Delaunay, A., Gasull, X., Salinas, M., Noël, J., Friend, V., Lingueglia, E., and Deval, E. (2012). Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *PNAS* 109, 13124–13129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120350109>.

Dell' Albani, P., Condorelli, D.F., Mudò, G., Amico, C., Bindoni, M., and Belluardo, N. (1993). Platelet-activating factor and its methoxy-analogue et-18-OCH₃ stimulate immediate early gene expression in rat astroglial cultures. *Neurochemistry International* 22, 567–574. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(93\)90031-Y](https://doi.org/10.1016/0197-0186(93)90031-Y).

Denson, D.D., Wang, X., Worrell, R.T., and Eaton, D.C. (2000). Effects of fatty acids on BK channels in GH3 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279, C1211–C1219. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.C1211>.

Detopoulou, P., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., Kotroyiannis, I., Vassiliadou, C., Panagiotakos, D.B., Chrysohoou, C., Pitsavos, C., and Stefanadis, C. (2009). Platelet activating factor (PAF) and activity of its biosynthetic and catabolic enzymes in blood and leukocytes of male patients with newly diagnosed heart failure. *Clinical Biochemistry* 42, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.09.113>.

Deval, E., and Lingueglia, E. (2015). Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* 94, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.009>.

Deval, E., Baron, A., Lingueglia, E., Mazarguil, H., Zajac, J.-M., and Lazdunski, M. (2003). Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 44, 662–671. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00047-9).

- Deval, E., Salinas, M., Baron, A., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2004). ASIC2b-dependent Regulation of ASIC3, an Essential Acid-sensing Ion Channel Subunit in Sensory Neurons via the Partner Protein PICK-1*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19531–19539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313078200>.
- Deval, E., Friend, V., Thirant, C., Salinas, M., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2006). Regulation of Sensory Neuron-specific Acid-sensing Ion Channel 3 by the Adaptor Protein Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor-1*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 1796–1807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509669200>.
- Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *The EMBO Journal* 27, 3047–3055. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.213>.
- Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., and Lingueglia, E. (2010). Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacology & Therapeutics* 128, 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.006>.
- Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2011). Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain. *J. Neurosci.* 31, 6059–6066. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5266-10.2011>.
- Devor, D.C., and Frizzell, R.A. (1998). Modulation of K⁺ channels by arachidonic acid in T84 cells. I. Inhibition of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274, C138–C148. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.1.C138>.
- Di Berardino, W., Bourget, I., Schmid-Antomarchi, H., and Cousin, J.-L. (1993). Platelet-activating factor activates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel which is not involved in c-fos expression in human B lymphoblastoid cells. *Cellular Signalling* 5, 623–631. [https://doi.org/10.1016/0898-6568\(93\)90057-S](https://doi.org/10.1016/0898-6568(93)90057-S).
- Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO Journal* 23, 1516–1525. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600177>.
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552–555. <https://doi.org/10.1038/nature11494>.
- Domenech, C., Machado-De Domenech, E., and Söling, H.D. (1987). Regulation of acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O₂-acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands. Evidence for an activation via phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 262, 5671–5676. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45627-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45627-X).
- Domingo, M.T., Spinnewyn, B., Chabrier, P.E., and Braquet, P. (1988). Presence of specific binding sites for platelet-activating factor (PAF) in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151, 730–736. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80341-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80341-3).
- Dorée, C. (1909). The Occurrence and Distribution of Cholesterol and allied Bodies in the Animal Kingdom. *Biochemical Journal* 4, 72–106. <https://doi.org/10.1042/bj0040072>.
- Drew, L.J., Rohrer, D.K., Price, M.P., Blaver, K.E., Cockayne, D.A., Cesare, P., and Wood, J.N. (2004). Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *The Journal of Physiology* 556, 691–710. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058693>.

- Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., and Xu, T.-L. (2007). Upregulation of Acid-Sensing Ion Channel ASIC1a in Spinal Dorsal Horn Neurons Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J. Neurosci.* *27*, 11139–11148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3364-07.2007>.
- Duan, B., Wang, Y.-Z., Yang, T., Chu, X.-P., Yu, Y., Huang, Y., Cao, H., Hansen, J., Simon, R.P., Zhu, M.X., et al. (2011). Extracellular Spermine Exacerbates Ischemic Neuronal Injury through Sensitization of ASIC1a Channels to Extracellular Acidosis. *J. Neurosci.* *31*, 2101–2112. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4351-10.2011>.
- Dulai, J.S., Smith, E.S.J., and Rahman, T. (2021). Acid-sensing ion channel 3: An analgesic target. *Channels* *15*, 94–127. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1852831>.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* *16*, 5464–5471. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5464>.
- Elinder, F., and Liin, S. (2017). Actions and mechanisms of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated ion channels. *Frontiers in Physiology* *8*.
- Emery, E.C., and Ernfors, P. (2018). Dorsal Root Ganglion Neuron Types and Their Functional Specialization. *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain* <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190860509.013.4>.
- Engel, K.M., Schiller, J., Galuska, C.E., and Fuchs, B. (2021). Phospholipases and Reactive Oxygen Species Derived Lipid Biomarkers in Healthy and Diseased Humans and Animals – A Focus on Lysophosphatidylcholine. *Frontiers in Physiology* *12*, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732319>.
- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews* *90*, 559–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2009>.
- Escoubas, P., De Weille, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., and Lazdunski, M. (2000). Isolation of a Tarantula Toxin Specific for a Class of Proton-gated Na⁺ Channels*. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 25116–25121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003643200>.
- Esposito, M.F., Malayil, R., Hanes, M., and Deer, T. (2019). Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med* *20*, S23–S30. <https://doi.org/10.1093/pm/pnz012>.
- Ettaiche, M., Guy, N., Hofman, P., Lazdunski, M., and Waldmann, R. (2004). Acid-Sensing Ion Channel 2 Is Important for Retinal Function and Protects against Light-Induced Retinal Degeneration. *J. Neurosci.* *24*, 1005–1012. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4698-03.2004>.
- Ettaiche, M., Deval, E., Pagnotta, S., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009). Acid-Sensing Ion Channel 3 in Retinal Function and Survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 2417–2426. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3028>.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D., and Lesage, F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *The Journal of Physiology* *593*, 2587–2603. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287268>.
- Fernández Nievas, G.A., Barrantes, F.J., and Antollini, S.S. (2007). Conformation-Sensitive Steroid and Fatty Acid Sites in the Transmembrane Domain of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* *46*, 3503–3512. <https://doi.org/10.1021/bi061388z>.

Feulgen, R., and Voit, K. (1924). Über einen weitverbreiteten festen Aldehyd. *Pflügers Arch.* 206, 389–410. <https://doi.org/10.1007/BF01722779>.

Flemming, P.K., Dedman, A.M., Xu, S.-Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C.D., Bateson, A.N., Muraki, K., and Beech, D.J. (2006). Sensing of Lysophospholipids by TRPC5 Calcium Channel *. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4977–4982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510301200>.

Ford, D.A., and Gross, R.W. (1989). Plasmenylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation. *PNAS* 86, 3479–3483. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3479>.

Foster, V.S., Rash, L.D., King, G.F., and Rank, M.M. (2021). Acid-Sensing Ion Channels: Expression and Function in Resident and Infiltrating Immune Cells in the Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15, 376. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.738043>.

Francescangeli, E., Boila, A., and Goracci, G. (2000). Properties and Regulation of Microsomal PAF-Synthesizing Enzymes in Rat Brain Cortex. *Neurochem Res* 25, 705–713. <https://doi.org/10.1023/A:1007523422825>.

Fuchs, B., Schiller, J., Wagner, U., Häntzschel, H., and Arnold, K. (2005). The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clinical Biochemistry* 38, 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.06.006>.

Gallego-García, A., Monera-Girona, A.J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iñiesta, A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., and Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science* 366, 128–132. <https://doi.org/10.1126/science.aay1436>.

Gannon, K.P., VanLandingham, L.G., Jernigan, N.L., Grifoni, S.C., Hamilton, G., and Drummond, H.A. (2008). Impaired pressure-induced constriction in mouse middle cerebral arteries of ASIC2 knockout mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294, H1793–H1803. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01380.2007>.

García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., and Corey, D.P. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1459–1464. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1459>.

Gasser, H.S. (1941). The classification of nerve fibers. *Ohio Journal of Science* 41, 145–159. .

Gentry, C., Stoakley, N., Andersson, D.A., and Bevan, S. (2010). The Roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in Chemically Induced Cold Hypersensitivity. *Mol Pain* 6, 1744-8069-6–4. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-4>.

Gillett, M.P., and Besterman, E.M. (1975). Plasma concentrations of lysolecithin and other phospholipids in the healthy population and in men suffering from atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 22, 111–124. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(75\)90072-6](https://doi.org/10.1016/0021-9150(75)90072-6).

Gobetto, M.N., González-Inchauspe, C., and Uchitel, O.D. (2021). Histamine and Corticosterone Modulate Acid Sensing Ion Channels (ASICs) Dependent Long-term Potentiation at the Mouse Anterior Cingulate Cortex. *Neuroscience* 460, 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.022>.

- Golubovic, A., Kuhn, A., Williamson, M., Kalbacher, H., Holstein, T.W., Grimmelikhuijzen, C.J.P., and Gründer, S. (2007). A Peptide-gated Ion Channel from the Freshwater Polyp Hydra. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35098–35103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706849200>.
- Gonçalves, I., Edsfeldt, A., Ko, N.Y., Grufman, H., Berg, K., Björkbacka, H., Nitulescu, M., Persson, A., Nilsson, M., Prehn, C., et al. (2012). Evidence Supporting a Key Role of Lp-PLA2-Generated Lysophosphatidylcholine in Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, 1505–1512. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.249854>.
- Gonzales, E.B., Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460, 599–604. <https://doi.org/10.1038/nature08218>.
- Gonzalez-Freire, M., Moaddel, R., Sun, K., Fabbri, E., Zhang, P., Khadeer, M., Salem, N., Jr., Ferrucci, L., and Semba, R.D. (2019). Targeted Metabolomics Shows Low Plasma Lysophosphatidylcholine 18:2 Predicts Greater Decline of Gait Speed in Older Adults: The Baltimore Longitudinal Study of Aging. *The Journals of Gerontology: Series A* 74, 62–67. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly100>.
- Goodwin, G., and McMahon, S.B. (2021). The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain. *Nat Rev Neurosci* 22, 263–274. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00444-w>.
- Goracci, G., Balestrieri, M.L., and Nardicchi, V. (2009). Metabolism and Functions of Platelet-Activating Factor (PAF) in the Nervous Tissue. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, A. Lajtha, G. Tettamanti, and G. Goracci, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 311–352.
- Gottschalk, A., and Smith, D.S. (2001). New Concepts In Acute Pain Therapy: Preemptive Analgesia. *AFP* 63, 1979. .
- Gregory, N.S., Whitley, P.E., and Sluka, K.A. (2015). Effect of Intramuscular Protons, Lactate, and ATP on Muscle Hyperalgesia in Rats. *PLOS ONE* 10, e0138576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138576>.
- Gregory, N.S., Brito, R.G., Fusaro, M.C.G.O., and Sluka, K.A. (2016). ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Mol Neurobiol* 53, 1020–1030. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9055-4>.
- Gründer, S., and Pusch, M. (2015). Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology* 94, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.016>.
- Gründer, S., Geissler, H.-S., Bässler, E.-L., and Ruppersberg, J.P. (2000). A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *NeuroReport* 11, 1607–1611. .
- Gu, H., Fang, Y.-J., He, Y.-L., Sun, J., Zhu, J., and Mei, Y.-A. (2009). Modulation of muscle rNav1.4 Na⁺ channel isoform by arachidonic acid and its non-metabolized analog. *Journal of Cellular Physiology* 219, 173–182. <https://doi.org/10.1002/jcp.21664>.
- Han, M.S., Lim, Y.-M., Quan, W., Kim, J.R., Chung, K.W., Kang, M., Kim, S., Park, S.Y., Han, J.-S., Park, S.-Y., et al. (2011). Lysophosphatidylcholine as an effector of fatty acid-induced insulin resistance [S]. *Journal of Lipid Research* 52, 1234–1246. <https://doi.org/10.1194/jlr.M014787>.
- Harayama, T., and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- Hasegawa, S., Kohro, Y., Shiratori, M., Ishii, S., Shimizu, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2010). Role of PAF Receptor in Proinflammatory Cytokine Expression in the Dorsal Root Ganglion and Tactile Allodynia in a

Rodent Model of Neuropathic Pain. PLOS ONE 5, e10467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010467>.

Hayashi, M., Imai, Y., and Oh-ishi, S. (1991). Phorbol ester stimulates PAF synthesis via the activation of protein kinase C in rat leukocytes. *Lipids* 26, 1054–1059. <https://doi.org/10.1007/BF02536501>.

Hellman, K.M., Yu, P.Y., Oladosu, F.A., Segel, C., Han, A., Prasad, P.V., Jilling, T., and Tu, F.F. (2018). The Effects of Platelet-Activating Factor on Uterine Contractility, Perfusion, Hypoxia, and Pain in Mice. *Reprod Sci* 25, 384–394. <https://doi.org/10.1177/1933719117715122>.

HENDERSON, L.M., THOMAS, S., BANTING, G., and CHAPPELL, J.B. (1997). The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of gp91-phox. *Biochemical Journal* 325, 701–705. <https://doi.org/10.1042/bj3250701>.

Hesselager, M., Timmermann, D.B., and Ahring, P.K. (2004). pH Dependency and Desensitization Kinetics of Heterologously Expressed Combinations of Acid-sensing Ion Channel Subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 11006–11015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313507200>.

Heusser, S.A., and Pless, S.A. (2021). Acid-sensing ion channels as potential therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.09.008>.

Hildebrand, M.S., de Silva, M.G., Klockars, T., Rose, E., Price, M., Smith, R.J.H., McGuirt, W.T., Christopoulos, H., Petit, C., and Dahl, H.-H.M. (2004). Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hearing Research* 190, 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(04\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(04)00015-2).

Hoagland, E.N., Sherwood, T.W., Lee, K.G., Walker, C.J., and Askwith, C.C. (2010). Identification of a calcium permeable human acid-sensing ion channel 1 transcript variant. *J Biol Chem* 285, 41852–41862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171330>.

Hohmann, S.W., Angioni, C., Tunaru, S., Lee, S., Woolf, C.J., Offermanns, S., Geisslinger, G., Scholich, K., and Sisignano, M. (2017). The G2A receptor (GPR132) contributes to oxaliplatin-induced mechanical pain hypersensitivity. *Sci Rep* 7, 446. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00591-0>.

Holzer, P. (2008). The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *British Journal of Pharmacology* 155, 1145–1162. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.351>.

Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002). Platelet-Activating Factor Receptor. *The Journal of Biochemistry* 131, 773–779. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003164>.

Hoshikawa, M., Kato, A., Hojo, H., Shibata, Y., Kumamoto, N., Watanabe, M., and Ugawa, S. (2017). Distribution of ASIC4 transcripts in the adult wild-type mouse brain. *Neuroscience Letters* 651, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.054>.

Hsieh, W.-S., Kung, C.-C., Huang, S.-L., Lin, S.-C., and Sun, W.-H. (2017). TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 7, 8870. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09200-6>.

Huang, C.-W., Tzeng, J.-N., Chen, Y.-J., Tsai, W.-F., Chen, C.-C., and Sun, W.-H. (2007). Nociceptors of dorsal root ganglion express proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36, 195–210. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.06.010>.

- Hung, C.-H., Lee, C.-H., Tsai, M.-H., Chen, C.-H., Lin, H.-F., Hsu, C.-Y., Lai, C.-L., and Chen, C.-C. (2020). Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. *Annals of the Rheumatic Diseases* <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218329>.
- Huque, T., Cowart, B.J., Dankulich-Nagrudny, L., Pribitkin, E.A., Bayley, D.L., Spielman, A.I., Feldman, R.S., Mackler, S.A., and Brand, J.G. (2009). Sour Ageusia in Two Individuals Implicates Ion Channels of the ASIC and PKD Families in Human Sour Taste Perception at the Anterior Tongue. *PLoS One* *4*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007347>.
- Husson, Z., and Smith, E.S.J. (2018). Naked mole-rat cortical neurons are resistant to acid-induced cell death. *Mol Brain* *11*, 26. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0369-4>.
- Immke, D.C., and McCleskey, E.W. (2001a). ASIC3: A Lactic Acid Sensor for Cardiac Pain. *TheScientificWorldJOURNAL* *1*, 510–512. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.254>.
- Immke, D.C., and McCleskey, E.W. (2001b). Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* *4*, 869–870. <https://doi.org/10.1038/nn0901-869>.
- Ishibashi, K., and Marumo, F. (1998). Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* *245*, 589–593. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8483>.
- Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* *68–69*, 599–609. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00058-8).
- Izumi, M., Ikeuchi, M., Ji, Q., and Tani, T. (2012). Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *Journal of Biomedical Science* *19*, 77. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-77>.
- Jacquot, F., Khoury, S., Labrum, B., Delanoe, K., Pidoux, L., Barbier, J., Delay, L., Bayle, A., Aissouni, Y., Barriere, D.A., et al. (2022). Lysophosphatidyl-choline 16: 0 mediates chronic joint pain associated to rheumatic diseases through acid-sensing ion channel 3. *PAIN* <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002596>.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* *449*, 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature06163>.
- Jenkins, C.M., Yang, K., Liu, G., Moon, S.H., Diltthey, B.G., and Gross, R.W. (2018). Cytochrome c is an oxidative stress-activated plasmalogenase that cleaves plasmenylcholine and plasmenylethanolamine at the sn-1 vinyl ether linkage. *Journal of Biological Chemistry* *293*, 8693–8709. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001629>.
- Jensen, J.E., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., Rosengren, K.J., Lau, C.H.Y., Mobli, M., Brust, A., Alewood, P.F., King, G.F., and Rash, L.D. (2014). Understanding the Molecular Basis of Toxin Promiscuity: The Analgesic Sea Anemone Peptide APETx2 Interacts with Acid-Sensing Ion Channel 3 and hERG Channels via Overlapping Pharmacophores. *J. Med. Chem.* *57*, 9195–9203. <https://doi.org/10.1021/jm501400p>.
- Jernigan, N.L. (2015). Smooth muscle acid-sensing ion channel 1: pathophysiological implication in hypoxic pulmonary hypertension. *Experimental Physiology* *100*, 111–120. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.081612>.

- Jin, Y., Damaj, B.B., and Maghazachi, A.A. (2005). Human resting CD16⁻, CD16⁺ and IL-2⁻, IL-12⁻, IL-15⁻ or IFN- α -activated natural killer cells differentially respond to sphingosylphosphorylcholine, lysophosphatidylcholine and platelet-activating factor. *European Journal of Immunology* 35, 2699–2708. <https://doi.org/10.1002/eji.200526129>.
- Joeres, N., Augustinowski, K., Neuhof, A., Assmann, M., and Gründer, S. (2016). Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1. *Sci Rep* 6, 27647. <https://doi.org/10.1038/srep27647>.
- Johnson, A.M., Kleczko, E.K., and Nemenoff, R.A. (2020). Eicosanoids in Cancer: New Roles in Immunoregulation. *Frontiers in Pharmacology* 11, 1756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595498>.
- Joles, J.A., Willekes-Koolschijn, N., and Koomans, H.A. (1997). Hypoalbuminemia causes high blood viscosity by increasing red cell lysophosphatidylcholine. *Kidney International* 52, 761–770. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.393>.
- Jordt, S.-E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *PNAS* 97, 8134–8139. <https://doi.org/10.1073/pnas.100129497>.
- Jurczak, A., Delay, L., Barbier, J., Simon, N., Krock, E., Sandor, K., Agalave, N.M., Rudjito, R., Wigerblad, G., Rogó z, K., et al. (2022). Antibody-induced pain-like behavior and bone erosion: links to subclinical inflammation, osteoclast activity, and acid-sensing ion channel 3-dependent sensitization. *PAIN* <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002543>.
- Kang, J.X., and Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71, 202S-207S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.202S>.
- Kang, S., Jang, J.H., Price, M.P., Gautam, M., Benson, C.J., Gong, H., Welsh, M.J., and Brennan, T.J. (2012). Simultaneous Disruption of Mouse ASIC1a, ASIC2 and ASIC3 Genes Enhances Cutaneous Mechanosensitivity. *PLOS ONE* 7, e35225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035225>.
- Karczewski, J., Spencer, R.H., Garsky, V.M., Liang, A., Leitl, M.D., Cato, M.J., Cook, S.P., Kane, S., and Urban, M.O. (2010). Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *British Journal of Pharmacology* 161, 950–960. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00918.x>.
- Kawanabe, A., and Okamura, Y. (2016). Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. *The Journal of Physiology* 594, 595–610. <https://doi.org/10.1113/JP271274>.
- Kaya, I., Brinet, D., Michno, W., Bařkurt, M., Zetterberg, H., Blenow, K., and Hanrieder, J. (2017). Novel Trimodal MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS3) at 10 μ m Reveals Spatial Lipid and Peptide Correlates Implicated in A β Plaque Pathology in Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 2778–2790. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00314>.
- Kell, P.J., Creer, M.H., Crown, K.N., Wirsig, K., and McHowat, J. (2003). Inhibition of Platelet-Activating Factor (PAF) Acetylhydrolase by Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate Potentiates PAF Synthesis in Thrombin-Stimulated Human Coronary Artery Endothelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 1163–1170. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.055392>.
- Kellenberger, S., and Schild, L. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels and the Epithelial Na⁺ Channel. *Pharmacological Reviews* <https://doi.org/10.1124/pr.114.009225>.

- Khataei, T., Harding, A.M.S., Janahmadi, M., El-Geneidy, M., Agha-Alinejad, H., Rajabi, H., Snyder, P.M., Sluka, K.A., and Benson, C.J. (2020). ASICs are required for immediate exercise-induced muscle pain and are downregulated in sensory neurons by exercise training. *Journal of Applied Physiology* <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00033.2020>.
- Kim, D. (2003). Fatty acid-sensitive two-pore domain K⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences* *24*, 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.10.008>.
- Kim, D., and Duff, R.A. (1990). Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circulation Research* *67*, 1040–1046. <https://doi.org/10.1161/01.RES.67.4.1040>.
- Kim, Y.-L., Im, Y.-J., Ha, N.-C., and Im, D.-S. (2007). Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* *83*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.10.006>.
- Kirber, M.T., Ordway, R.W., Clapp, L.H., Walsh, J.V., and Singer, J.J. (1992). Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* *297*, 24–28. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80319-C](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80319-C).
- Klavins, K., Koal, T., Dallmann, G., Marksteiner, J., Kemmler, G., and Humpel, C. (2015). The ratio of phosphatidylcholines to lysophosphatidylcholines in plasma differentiates healthy controls from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* *1*, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2015.05.003>.
- Knowlton, W.M., Bifolck-Fisher, A., Bautista, D.M., and McKemy, D.D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *PAIN* *150*, 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.05.021>.
- Knuplez, E., and Marsche, G. (2020). An Updated Review of Pro- and Anti-Inflammatory Properties of Plasma Lysophosphatidylcholines in the Vascular System. *International Journal of Molecular Sciences* *21*, 4501. <https://doi.org/10.3390/ijms21124501>.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with a δ /c-fibers and colocalization with trk receptors. *Journal of Comparative Neurology* *493*, 596–606. <https://doi.org/10.1002/cne.20794>.
- Kong, X., Tang, X., Du, W., Tong, J., Yan, Y., Zheng, F., Fang, M., Gong, F., and Tan, Z. (2013). Extracellular acidosis modulates the endocytosis and maturation of macrophages. *Cellular Immunology* *281*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.009>.
- Kono, N., and Arai, H. (2019). Platelet-activating factor acetylhydrolases: An overview and update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1864*, 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006>.
- Korkushko, A.O., and Kryshchal', O.A. (1984). [Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations]. *Neirofiziologiya* *16*, 557–561.
- Kornecki, E., and Ehrlich, Y.H. (1988). Neuroregulatory and Neuropathological Actions of the Ether-Phospholipid Platelet-Activating Factor. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.3381103>.

Kosinska, M.K., Liebisch, G., Lochnit, G., Wilhelm, J., Klein, H., Kaesser, U., Lasczkowski, G., Rickert, M., Schmitz, G., and Steinmeyer, J. (2013). A Lipidomic Study of Phospholipid Classes and Species in Human Synovial Fluid. *Arthritis & Rheumatism* 65, 2323–2333. <https://doi.org/10.1002/art.38053>.

Kosinska, M.K., Mastbergen, S.C., Liebisch, G., Wilhelm, J., Dettmeyer, R.B., Ishaque, B., Rickert, M., Schmitz, G., Lafeber, F.P., and Steinmeyer, J. (2016). Comparative lipidomic analysis of synovial fluid in human and canine osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 1470–1478. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.03.017>.

Kovalchuk, Yu.N., Krishtal, O.A., and Nowycky, M.C. (1990). The proton-activated inward current of rat sensory neurons includes a calcium component. *Neuroscience Letters* 115, 237–242. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90461-H](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90461-H).

Krautbauer, S., Eisinger, K., Wiest, R., Liebisch, G., and Buechler, C. (2016). Systemic saturated lysophosphatidylcholine is associated with hepatic function in patients with liver cirrhosis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 124, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.06.001>.

Kreple, C.J., Lu, Y., Taugher, R.J., Schwager-Gutman, A.L., Du, J., Stump, M., Wang, Y., Ghobbeh, A., Fan, R., Cosme, C.V., et al. (2014). Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. *Nature Neuroscience* 17, 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/nn.3750>.

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 5, 2325–2327. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90149-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90149-9).

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981a). Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Research* 214, 150–154. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90446-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90446-7).

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981b). A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 6, 2599–2601. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90105-6).

Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1981c). A ‘receptor’ for protons in small neurons of trigeminal ganglia: Possible role in nociception. *Neuroscience Letters* 24, 243–246. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(81\)90164-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(81)90164-6).

Kumar, S., and Sharma, A. (2005). Platelet activating factor improves the in vitro penetration of zona free hamster eggs by buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology* 63, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.028>.

Kuzell, W.C., and Davison, R.A. (1946). Serum lysolecithin in rheumatoid arthritis, pregnancy, and jaundice and in normal persons. *J Lab Clin Med* 31, 1223–1226. .

Lapatsina, L., Jira, J.A., Smith, E.St.J., Poole, K., Kozlenkov, A., Bilbao, D., Lewin, G.R., and Heppenstall, P.A. Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons. *Open Biology* 2, 120096. <https://doi.org/10.1098/rsob.120096>.

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S.M., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. (2003). Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* 113, 717–730. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00422-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00422-7).

- Lavi, S., McConnell, J.P., Rihal, C.S., Prasad, A., Mathew, V., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2007). Local Production of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Lysophosphatidylcholine in the Coronary Circulation. *Circulation* 115, 2715–2721. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.671420>.
- Law, S.-H., Chan, M.-L., Marathe, G.K., Parveen, F., Chen, C.-H., and Ke, L.-Y. (2019). An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1149. <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>.
- Lee, T.C. (1985). Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 260, 10952–10955. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39128-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39128-7).
- Lehmann, R., Franken, H., Dammeier, S., Rosenbaum, L., Kantartzis, K., Peter, A., Zell, A., Adam, P., Li, J., Xu, G., et al. (2013). Circulating Lysophosphatidylcholines Are Markers of a Metabolically Benign Nonalcoholic Fatty Liver. *Diabetes Care* 36, 2331–2338. <https://doi.org/10.2337/dc12-1760>.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Human TREK2, a 2P Domain Mechanosensitive K⁺Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq Protein-coupled Receptors *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28398–28405. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002822200>.
- Li, W.-G., Yu, Y., Huang, C., Cao, H., and Xu, T.-L. (2011). Nonproton Ligand Sensing Domain Is Required for Paradoxical Stimulation of Acid-sensing Ion Channel 3 (ASIC3) Channels by Amiloride*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 42635–42646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289058>.
- Li, X., Fang, P., Li, Y., Kuo, Y.-M., Andrews, A.J., Nanayakkara, G., Johnson, C., Fu, H., Shan, H., Du, F., et al. (2016). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Lysophosphatidylcholine-Induced Endothelial Cell Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36, 1090–1100. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306964>.
- Light, A.R., Huguen, R.W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., and Lee, J. (2008). Dorsal Root Ganglion Neurons Innervating Skeletal Muscle Respond to Physiological Combinations of Protons, ATP, and Lactate Mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *Journal of Neurophysiology* 100, 1184–1201. <https://doi.org/10.1152/jn.01344.2007>.
- Lin, B., Alganem, K., O'Donovan, S.M., Jin, Z., Naghavi, F., Miller, O.A., Ortyl, T.C., Ruan, Y.C., McCullumsmith, R.E., and Du, J. (2021). Activation of acid-sensing ion channels by carbon dioxide regulates amygdala synaptic protein degradation in memory reconsolidation. *Molecular Brain* 14, 78. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00786-7>.
- Lin, J.-H., Hung, C.-H., Han, D.-S., Chen, S.-T., Lee, C.-H., Sun, W.-Z., and Chen, C.-C. (2018). Sensing acidosis: nociception or sngception? *Journal of Biomedical Science* 25, 85. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0486-5>.
- Lin, S.-H., Chien, Y.-C., Chiang, W.-W., Liu, Y.-Z., Lien, C.-C., and Chen, C.-C. (2015). Genetic mapping of ASIC4 and contrasting phenotype to ASIC1a in modulating innate fear and anxiety. *European Journal of Neuroscience* 41, 1553–1568. <https://doi.org/10.1111/ejn.12905>.
- Lin, S.-H., Cheng, Y.-R., Banks, R.W., Min, M.-Y., Bewick, G.S., and Chen, C.-C. (2016). Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors. *Nature Communications* 7, 11460. <https://doi.org/10.1038/ncomms11460>.

- Lin, W., Zhang, J., Liu, Y., Wu, R., Yang, H., Hu, X., and Ling, X. (2017). Studies on diagnostic biomarkers and therapeutic mechanism of Alzheimer's disease through metabolomics and hippocampal proteomics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 105, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.003>.
- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing Ion Channels in Sensory Perception*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 17325–17329. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700011200>.
- Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., and Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 378, 730–733. <https://doi.org/10.1038/378730a0>.
- Liu, P., Zhu, W., Chen, C., Yan, B., Zhu, L., Chen, X., and Peng, C. (2020). The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life Sciences* 247, 117443. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117443>.
- Liu, Y., Shields, L.B.E., Gao, Z., Wang, Y., Zhang, Y.P., Chu, T., Zhu, Q., Shields, C.B., and Cai, J. (2017). Current Understanding of Platelet-Activating Factor Signaling in Central Nervous System Diseases. *Mol Neurobiol* 54, 5563–5572. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0062-5>.
- Liu, Y., Hagan, R., and Schoellerman, J. (2018). Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a). *Sci Rep* 8, 7179. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25386-9>.
- Lloyd, D.P.C. (1942). Stimulation of peripheral nerve terminations by active muscle. *Journal of Neurophysiology* 5, 153–165. <https://doi.org/10.1152/jn.1942.5.2.153>.
- Lloyd, D.P.C. (1943). Conduction and synaptic transmission of the reflex response to stretch in spinal cats. *Journal of Neurophysiology* 6, 317–326. <https://doi.org/10.1152/jn.1943.6.4.317>.
- Lloyd, D.P.C. (1944). Functional organization of the spinal cord. *Physiological Reviews* 24, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.1944.24.1.1>.
- Lopes, CoeliM.B., Zilberberg, N., and Goldstein, SteveA.N. (2001). Block of Kcnk3 by Protons: EVIDENCE THAT 2-P-DOMAIN POTASSIUM CHANNEL SUBUNITS FUNCTION AS HOMODIMERS*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24449–24452. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100184200>.
- Lordan, R., Tsoupras, A., Zabetakis, I., and Demopoulos, C.A. (2019). Forty Years Since the Structural Elucidation of Platelet-Activating Factor (PAF): Historical, Current, and Future Research Perspectives. *Molecules* 24, 4414. <https://doi.org/10.3390/molecules24234414>.
- Ludwig, M.-G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J.A., Jones, C.E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R.M., and Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425, 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature01905>.
- Lynagh, T., Mikhaleva, Y., Colding, J.M., Glover, J.C., and Pless, S.A. (2018). Acid-sensing ion channels emerged over 600 Mya and are conserved throughout the deuterostomes. *PNAS* 115, 8430–8435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806614115>.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000). Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* 275, 10128–10133. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10128>.
- Mannheim, D., Herrmann, J., Versari, D., Gössl, M., Meyer, F.B., McConnell, J.P., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2008). Enhanced Expression of Lp-PLA2 and Lysophosphatidylcholine in Symptomatic

Carotid Atherosclerotic Plaques. Stroke 39, 1448–1455.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.503193>.

Marathe, G.K., Silva, A.R., de Castro Faria Neto, H.C., Tjoelker, L.W., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and McIntyre, T.M. (2001). Lysophosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids. *Journal of Lipid Research* 42, 1430–1437. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)30275-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)30275-3).

Marathe, G.K., Chaithra, V.H., Ke, L.-Y., and Chen, C.-H. (2020). Effect of acyl and alkyl analogs of platelet-activating factor on inflammatory signaling. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 151, 106478. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106478>.

Marinetti, G.V., and Erbland, J. (1957). The structure of pig heart plasmalogens. *Biochimica et Biophysica Acta* 26, 429–430. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90028-8).

Marinetti, G.V., Erbland, J., Temple, K., and Stotz, E. (1960). Hydrolysis of lecithins by venom phospholipase A. I. Structure of the enzymically formed lysolecithins. *Biochim Biophys Acta* 38, 524–534. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91287-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91287-7).

Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebillé, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *The EMBO Journal* 35, 414–428. <https://doi.org/10.15252/embj.201592335>.

Mashiko, M., Kurosawa, A., Tani, Y., Tsuji, T., and Takeda, S. (2019). GPR31 and GPR151 are activated under acidic conditions. *The Journal of Biochemistry* 166, 317–322. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz042>.

Mason, R.P., Jacob, R.F., Shrivastava, S., Sherratt, S.C.R., and Chattopadhyay, A. (2016). Eicosapentaenoic acid reduces membrane fluidity, inhibits cholesterol domain formation, and normalizes bilayer width in atherosclerotic-like model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858, 3131–3140. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.002>.

Mathie, A., and Veale, E.L. (2015). Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 467, 931–943. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1655-3>.

Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., et al. (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10, 943–945. <https://doi.org/10.1038/nn1940>.

McHowat, J., Kell, P.J., O'Neil, H.B., and Creer, M.H. (2001). Endothelial Cell PAF Synthesis following Thrombin Stimulation Utilizes Ca²⁺-Independent Phospholipase A2. *Biochemistry* 40, 14921–14931. <https://doi.org/10.1021/bi0156153>.

McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>.

van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.

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

- Min, J.-H., Jain, M.K., Wilder, C., Paul, L., Aritz-Castro, R., Aspleaf, D.C., and Gelb, M.H. (1999). Membrane-Bound Plasma Platelet Activating Factor Acetylhydrolase Acts on Substrate in the Aqueous Phase. *Biochemistry* 38, 12935–12942. <https://doi.org/10.1021/bi991149u>.
- Minhas, B.S., Kumar, R., Ricker, D.D., Roudebush, W.E., Dodson, M.G., and Fortunato, S.J. (1989). Effects of platelet activating factor on mouse oocyte fertilization in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161, 1714–1717. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90956-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90956-3).
- Montalbetti, N., Rooney, J.G., Marciszyn, A.L., and Carattino, M.D. (2018). ASIC3 fine-tunes bladder sensory signaling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 315, F870–F879. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00630.2017>.
- Montrucchio, G., Alloatti, G., and Camussi, G. (2000). Role of Platelet-Activating Factor in Cardiovascular Pathophysiology. *Physiological Reviews* 80, 1669–1699. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1669>.
- Morton, M.J., O'Connell, A.D., Sivaprasadarao, A., and Hunter, M. (2003). Determinants of pH sensing in the two-pore domain K⁺ channels TASK-1 and -2. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 445, 577–583. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0901-2>.
- Mulder, C., Wahlund, L.-O., Teerlink, T., Blomberg, M., Veerhuis, R., van Kamp, G.J., Scheltens, P., and Scheffer, P.G. (2003). Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 110, 949–955. <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0007-9>.
- Munns, C., AlQatari, M., and Koltzenburg, M. (2007). Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium* 41, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.07.008>.
- Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., and Shimizu, T. (2004). G2A Is a Proton-sensing G-protein-coupled Receptor Antagonized by Lysophosphatidylcholine*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 42484–42491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406561200>.
- Muramatsu, R., Kuroda, M., Matoba, K., Lin, H., Takahashi, C., Koyama, Y., and Yamashita, T. (2015). Prostacyclin Prevents Pericyte Loss and Demyelination Induced by Lysophosphatidylcholine in the Central Nervous System *. *Journal of Biological Chemistry* 290, 11515–11525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587253>.
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G., and García-Añoveros, J. (2005). Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing. *J. Neurosci.* 25, 4052–4061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005>.
- Nakagawa, Y., Sugai, M., Karasawa, K., Tokumura, A., Tsukatani, H., Setaka, M., and Nojima, S. (1992). Possible influence of lysophospholipase on the production of 1-acyl-2-acetyl-glycerophosphocholine in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1126, 277–285. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90241-M](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90241-M).
- Nieto, M.L., Velasco, S., and Sanchez Crespo, M. (1988). Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 263, 4607–4611. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68825-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68825-8).

- Nievas, G.A.F., Barrantes, F.J., and Antollini, S.S. (2008). Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Conformational State by Free Fatty Acids and Steroids *. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21478–21486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800345200>.
- Nixon, A.B., O’Flaherty, J.T., Salyer, J.K., and Wykle, R.L. (1999). Acetyl-CoA:1-O-Alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine Acetyltransferase Is Directly Activated by p38 Kinase*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 5469–5473. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5469>.
- Olausson, H., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Vallbo, Å. (2010). The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.09.011>.
- O’Neill, C. (2005). The role of paf in embryo physiology. *Human Reproduction Update* 11, 215–228. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi003>.
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Martinez-Salgado, C., Wemmie, J.A., Brennan, T.J., Symonds, E., Omari, T., Lewin, G.R., Welsh, M.J., et al. (2004). The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous mechanoreceptor function. *Gastroenterology* 127, 1739–1747. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.061>.
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Price, M.P., Symonds, E., Butler, R., Wemmie, J.A., and Blackshaw, L.A. (2005). Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54, 1408–1415. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.071084>.
- Papalamproulou-Tsiridou, M., Labrecque, S., Godin, A.G., De Koninck, Y., and Wang, F. (2020). Differential Expression of Acid – Sensing Ion Channels in Mouse Primary Afferents in Naïve and Injured Conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00103>.
- Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 422–428. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00231-3).
- Pattison, L.A., Callejo, G., and St John Smith, E. (2019). Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374, 20190291. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0291>.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002). A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108, 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9).
- Peigneur, S., Béress, L., Möller, C., Marí, F., Forssmann, W.-G., and Tytgat, J. (2012). A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *The FASEB Journal* 26, 5141–5151. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218479>.
- Peng, Z., Li, W.-G., Huang, C., Jiang, Y.-M., Wang, X., Zhu, M.X., Cheng, X., and Xu, T.-L. (2015). ASIC3 Mediates Itch Sensation in Response to Coincident Stimulation by Acid and Nonproton Ligand. *Cell Reports* 13, 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.002>.
- Petroff, E., Snitsarev, V., Gong, H., and Abboud, F.M. (2012). Acid sensing ion channels regulate neuronal excitability by inhibiting BK potassium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426, 511–515. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.114>.

- Petroff, E.Y., Price, M.P., Snitsarev, V., Gong, H., Korovkina, V., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2008). Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. *PNAS* *105*, 3140–3144. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712280105>.
- Pham, T.L., and Bazan, H.E.P. (2021). Docosanoid signaling modulates corneal nerve regeneration: effect on tear secretion, wound healing, and neuropathic pain. *Journal of Lipid Research* *62*, 100033. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR120000954>.
- Pidoux, L., Delanoe, K., Barbier, J., Marchand, F., Lingueglia, E., and Deval, E. (2022). Single Subcutaneous Injection of Lysophosphatidyl-Choline Evokes ASIC3-Dependent Increases of Spinal Dorsal Horn Neuron Activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *15*.
- Pinckard, R.N., Woodard, D.S., Showell, H.J., Conklyn, M.J., Novak, M.J., and McManus, L.M. (1994). Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin Rev Allergy* *12*, 329–359. <https://doi.org/10.1007/BF02802299>.
- Pompéia, C., Lopes, L.R., Miyasaka, C.K., Procópio, J., Sannomiya, P., and Curi, R. (2000). Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res* *33*, 1255–1268. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000001100001>.
- Pompeia, C., Lima, T., and Curi, R. (2003). Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochemistry and Function* *21*, 97–104. <https://doi.org/10.1002/cbf.1012>.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., and McIntyre, T.M. (2000). Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. *Annual Review of Biochemistry* *69*, 419–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.419>.
- Price, M.P., Snyder, P.M., and Welsh, M.J. (1996). Cloning and Expression of a Novel Human Brain Na⁺ Channel (*). *Journal of Biological Chemistry* *271*, 7879–7882. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.7879>.
- Price, M.P., Lewin, G.R., McIlwrath, S.L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Mannsfeldt, A.G., Brennan, T.J., Drummond, H.A., et al. (2000). The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* *407*, 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35039512>.
- Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC Cation Channel Contributes to the Detection of Cutaneous Touch and Acid Stimuli in Mice. *Neuron* *32*, 1071–1083. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00547-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00547-5).
- Price, M.P., Thompson, R.J., Eshcol, J.O., Wemmie, J.A., and Benson, C.J. (2004). Stomatin Modulates Gating of Acid-sensing Ion Channels*. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 53886–53891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407708200>.
- Price, M.P., Gong, H., Parsons, M.G., Kundert, J.R., Reznikov, L.R., Bernardinelli, L., Chaloner, K., Buchanan, G.F., Wemmie, J.A., Richerson, G.B., et al. (2014). Localization and Behaviors in Null Mice Suggest that ASIC1 and ASIC2 Modulate Responses to Aversive Stimuli. *Genes Brain Behav* *13*, 179–194. <https://doi.org/10.1111/gbb.12108>.
- Qiao, J., Huang, F., Naikawadi, R.P., Kim, K.S., Said, T., and Lum, H. (2006). Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* *291*, L91–L101. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00508.2005>.

- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., and Steinberg, D. (1988). Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *PNAS* *85*, 2805–2809. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2805>.
- Rabini, R.A., Galassi, R., Fumelli, P., Dousset, N., Solera, M.L., Valdiguie, P., Curatola, G., Ferretti, G., Taus, M., and Mazzanti, L. (1994). Reduced Na⁺-K⁺-ATPase Activity and Plasma Lysophosphatidylcholine Concentrations in Diabetic Patients. *Diabetes* *43*, 915–919. <https://doi.org/10.2337/diab.43.7.915>.
- Radu, C.G., Yang, L.V., Riedinger, M., Au, M., and Witte, O.N. (2004). T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *PNAS* *101*, 245–250. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536801100>.
- Rangholia, N., Leisner, T.M., and Holly, S.P. (2021). Bioactive Ether Lipids: Primordial Modulators of Cellular Signaling. *Metabolites* *11*, 41. <https://doi.org/10.3390/metabo11010041>.
- Redd, M.A., Scheuer, S.E., Saez, N.J., Yoshikawa, Y., Chiu, H.S., Gao, L., Hicks, M., Villanueva, J.E., Joshi, Y., Chow, C.Y., et al. (2021). Therapeutic Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a Recovers Heart Function After Ischemia–Reperfusion Injury. *Circulation* *144*, 947–960. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054360>.
- Richter, T.A., Dvoryanchikov, G.A., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (2004). Acid-Sensing Ion Channel-2 Is Not Necessary for Sour Taste in Mice. *J. Neurosci.* *24*, 4088–4091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0653-04.2004>.
- Rimola, V., Hahnefeld, L., Zhao, J., Jiang, C., Angioni, C., Schreiber, Y., Osthues, T., Pierre, S., Geisslinger, G., Ji, R.-R., et al. (2020). Lysophospholipids contribute to oxaliplatin-induced acute peripheral pain. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1223-20.2020>.
- Romero, L.O., Massey, A.E., Mata-Daboin, A.D., Sierra-Valdez, F.J., Chauhan, S.C., Cordero-Morales, J.F., and Vásquez, V. (2019). Dietary fatty acids fine-tune Piezo1 mechanical response. *Nature Communications* *10*, 1200. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09055-7>.
- Sadler, K.E., Moehring, F., Shiers, S.I., Laskowski, L.J., Mikesell, A.R., Plautz, Z.R., Brezinski, A.N., Mecca, C.M., Dussor, G., Price, T.J., et al. (2021). Transient receptor potential canonical 5 mediates inflammatory mechanical and spontaneous pain in mice. *Science Translational Medicine* *13*, eabd7702. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd7702>.
- Salinas, M., Rash, L.D., Baron, A., Lambeau, G., Escoubas, P., and Lazdunski, M. (2006). The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *The Journal of Physiology* *570*, 339–354. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095810>.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14628–14633. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906267106>.
- Schuhmacher, L.-N., and Smith, E.St.J. (2016). Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole rat. *Mol Brain* *9*, 97. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0279-2>.
- Schuhmacher, L.-N., Callejo, G., Srivats, S., and Smith, E.S.J. (2018). Naked mole-rat acid-sensing ion channel 3 forms nonfunctional homomers, but functional heteromers. *J. Biol. Chem.* *293*, 1756–1766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807859>.

- Semba, R.D., Zhang, P., Adelnia, F., Sun, K., Gonzalez-Freire, M., Salem Jr, N., Brennan, N., Spencer, R.G., Fishbein, K., Khadeer, M., et al. (2019). Low plasma lysophosphatidylcholines are associated with impaired mitochondrial oxidative capacity in adults in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Cell* 18, e12915. <https://doi.org/10.1111/accel.12915>.
- Semtner, M., Schaefer, M., Pinkenburg, O., and Plant, T.D. (2007). Potentiation of TRPC5 by Protons. *Journal of Biological Chemistry* 282, 33868–33878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702577200>.
- Sevastou, I., Kaffe, E., Mouratis, M.-A., and Aidinis, V. (2013). Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831, 42–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.019>.
- Sharma, J., and McHowat, J. (2011). PGE2 Release from Tryptase-Stimulated Rabbit Ventricular Myocytes is Mediated by Calcium-Independent Phospholipase A2 γ . *Lipids* 46, 391. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3554-0>.
- Sheikh, A.Md., Michikawa, M., Kim, S.U., and Nagai, A. (2015). Lysophosphatidylcholine increases the neurotoxicity of Alzheimer's amyloid β 1-42 peptide: Role of oligomer formation. *Neuroscience* 292, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.034>.
- Sheng, Y., Wu, B., Leng, T., Zhu, L., and Xiong, Z. (2021). Acid-sensing ion channel 1 (ASIC1) mediates weak acid-induced migration of human malignant glioma cells. *Am J Cancer Res* 11, 997–1008. .
- Sherwood, T.W., Lee, K.G., Gormley, M.G., and Askwith, C.C. (2011). Heteromeric Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) Composed of ASIC2b and ASIC1a Display Novel Channel Properties and Contribute to Acidosis-Induced Neuronal Death. *J. Neurosci.* 31, 9723–9734. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1665-11.2011>.
- Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007). A Single Enzyme Catalyzes Both Platelet-activating Factor Production and Membrane Biogenesis of Inflammatory Cells: CLONING AND CHARACTERIZATION OF ACETYL-CoA:LYSO-PAF ACETYLTRANSFERASE*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 6532–6539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609641200>.
- Shindou, H., Shiraishi, S., Tokuoka, S.M., Takahashi, Y., Harayama, T., Abe, T., Bando, K., Miyano, K., Kita, Y., Uezono, Y., et al. (2017). Relief from neuropathic pain by blocking of the platelet-activating factor-pain loop. *The FASEB Journal* 31, 2973–2980. <https://doi.org/10.1096/fj.201601183R>.
- Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000). Arachidonic Acid and Phosphorylation Synergistically Induce a Conformational Change of p47 phox to Activate the Phagocyte NADPH Oxidase *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 13793–13801. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13793>.
- Siddharth, J., Chakrabarti, A., Pannérec, A., Karaz, S., Morin-Rivron, D., Masoodi, M., Feige, J.N., and Parkinson, S.J. (2017). Aging and sarcopenia associate with specific interactions between gut microbes, serum biomarkers and host physiology in rats. *Aging* 9, 1698–1720. <https://doi.org/10.18632/aging.101262>.
- Siraganian, R.P., and Osler, A.G. (1971). Destruction of Rabbit Platelets in the Allergic Response of Sensitized Leukocytes: I. Demonstration of a Fluid Phase Intermediate. *The Journal of Immunology* 106, 1244–1251.

Sluka, K.A., Price, M.P., Breese, N.M., Stucky, C.L., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106, 229–239. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00269-0).

Sluka, K.A., Radhakrishnan, R., Benson, C.J., Eshcol, J.O., Price, M.P., Babinski, K., Audette, K.M., Yeomans, D.C., and Wilson, S.P. (2007). ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *PAIN* 129, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.09.038>.

Smith, E.S., Cadiou, H., and McNaughton, P.A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145, 686–698. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.024>.

Sogos, V., Bussolino, F., Pilia, E., Torelli, S., and Gremo, F. (1990). Acetylcholine-induced production of platelet-activating factor by human fetal brain cells in culture. *Journal of Neuroscience Research* 27, 706–711. <https://doi.org/10.1002/jnr.490270431>.

Song, N., Lu, Z., Zhang, J., Shi, Y., Ning, Y., Chen, J., Jin, S., Shen, B., Fang, Y., Zou, J., et al. (2019). Acid-sensing ion channel 1a is involved in ischaemia/reperfusion induced kidney injury by increasing renal epithelia cell apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23, 3429–3440. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14238>.

Sonoki, K., Iwase, M., Sasaki, N., Ohdo, S., Higuchi, S., Matsuyama, N., and Iida, M. (2009). Relations of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein with serum lipoprotein-associated phospholipase A2, paraoxonase and homocysteine thiolactonase activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 86, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.08.014>.

Squinto, S.P., Block, A.L., Braquet, P., and Bazan, N.G. (1989). Platelet-activating factor stimulates a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signaling system in human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research* 24, 558–566. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240414>.

Stephan, G., Huang, L., Tang, Y., Vilotti, S., Fabbretti, E., Yu, Y., Nörenberg, W., Franke, H., Gölöncsér, F., Sperlágh, B., et al. (2018). The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. *Nat Commun* 9, 1354. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03728-5>.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2).

Stübiger, G., Aldover-Macasaet, E., Bicker, W., Sobal, G., Willfort-Ehringer, A., Pock, K., Bochkov, V., Widhalm, K., and Belgacem, O. (2012). Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF-MS/MS. *Atherosclerosis* 224, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.010>.

Sturk, A., Schaap, M.C.L., Prins, A., ten Cate, J.W., and van den Bosch, H. (1989). Synthesis of platelet-activating factor by human blood platelets and leucocytes. Evidence against selective utilization of cellular ether-linked phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 993, 148–156. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90157-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90157-8).

Su, X., Li, Q., Shrestha, K., Cormet-Boyaka, E., Chen, L., Smith, P.R., Sorscher, E.J., Benos, D.J., Matalon, S., and Ji, H.-L. (2006). Interregulation of Proton-gated Na⁺ Channel 3 and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36960–36968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608002200>.

- Su, Y.-S., Mei, H.-R., Wang, C.-H., and Sun, W.-H. (2018). Peripheral 5-HT₃ mediates mirror-image pain by a cross-talk with acid-sensing ion channel 3. *Neuropharmacology* *130*, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.044>.
- Subbaiah, P.V., Chen, C.H., Bagdade, J.D., and Albers, J.J. (1985). Substrate specificity of plasma lysolecithin acyltransferase and the molecular species of lecithin formed by the reaction. *J Biol Chem* *260*, 5308–5314. .
- Surette, M.E., Fonteh, A.N., Bernatchez, C., and Chilton, F.H. (1999). Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis* *20*, 757–763. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.5.757>.
- Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., and McCleskey, E.W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 711–716. .
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired Pressure Sensation in Mice Lacking TRPV4*. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 22664–22668. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302561200>.
- Svetlov, S.I., Liu, H., Chao, W., and Olson, M.S. (1997). Regulation of platelet-activating factor (PAF) biosynthesis via coenzyme A-independent transacylase in the macrophage cell line IC-21 stimulated with lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* *1346*, 120–130. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00022-2).
- Syeda, R., Florendo, M.N., Cox, C.D., Kefauver, J.M., Santos, J.S., Martinac, B., and Patapoutian, A. (2016). Piezo1 Channels Are Inherently Mechanosensitive. *Cell Reports* *17*, 1739–1746. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.033>.
- Tallima, H., and El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research* *11*, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>.
- Tanaka, N., Matsubara, T., Krausz, K.W., Patterson, A.D., and Gonzalez, F.J. (2012). Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *56*, 118–129. <https://doi.org/10.1002/hep.25630>.
- Taugher, R.J., Lu, Y., Fan, R., Ghobbeh, A., Kreple, C.J., Faraci, F.M., and Wemmie, J.A. (2017). ASIC1A in neurons is critical for fear-related behaviors. *Genes, Brain and Behavior* *16*, 745–755. <https://doi.org/10.1111/gbb.12398>.
- Taylor, L.A., Arends, J., Hodina, A.K., Unger, C., and Massing, U. (2007). Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids in Health and Disease* *6*, 17. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-17>.
- Tewari, K.P., Malinowska, D.H., Sherry, A.M., and Cuppoletti, J. (2000). PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *279*, C40–C50. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.1.C40>.
- Tian, Y., Bresenitz, P., Reska, A., El Moussaoui, L., Beier, C.P., and Gründer, S. (2017). Glioblastoma cancer stem cell lines express functional acid sensing ion channels ASIC1a and ASIC3. *Scientific Reports* *7*, 13674. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13666-9>.

- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *The EMBO Journal* 25, 1804–1815. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601083>.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21, 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4).
- Tong, J., Wu, W.-N., Kong, X., Wu, P.-F., Tian, L., Du, W., Fang, M., Zheng, F., Chen, J.-G., Tan, Z., et al. (2011). Acid-Sensing Ion Channels Contribute to the Effect of Acidosis on the Function of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 186, 3686–3692. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001346>.
- Trac, P.T., Thai, T.L., Linck, V., Zou, L., Greenlee, M., Yue, Q., Al-Khalili, O., Alli, A.A., Eaton, A.F., and Eaton, D.C. (2017). Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 312, L797–L811. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00379.2016>.
- Triggiani, M., Schleimer, R.P., Warner, J.A., and Chilton, F.H. (1991). Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells. *The Journal of Immunology* 147, 660–666. .
- Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in Neurosciences* 37, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.002>.
- Tsoupras, A.B., Fragopoulou, E., Nomikos, T., Iatrou, C., Antonopoulou, S., and Demopoulos, C.A. (2007). Characterization of the De Novo Biosynthetic Enzyme of Platelet Activating Factor, DDT-Insensitive Cholinephosphotransferase, of Human Mesangial Cells. *Mediators of Inflammation* 2007, e27683. <https://doi.org/10.1155/2007/27683>.
- Tsoupras, A.B., Iatrou, C., Frangia, C., and Demopoulos, C.A. (2009). The Implication of Platelet Activating Factor in Cancer Growth and Metastasis: Potent Beneficial Role of PAF-Inhibitors and Antioxidants. *Infectious Disorders - Drug Targets* 9, 390–399.
- Tsoupras, A.B., Chini, M., Mangafas, N., Tsogas, N., Stamatakis, G., Tsantila, N., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., Gargalianos, P., Demopoulos, C.A., et al. (2012). Platelet-Activating Factor and Its Basic Metabolic Enzymes in Blood of Naive HIV-Infected Patients. *Angiology* 63, 343–352. <https://doi.org/10.1177/0003319711420608>.
- Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2011). Platelet-Activating Factor and Pain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34, 1159–1162. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1159>.
- Ugawa, S., Yamamoto, T., Ueda, T., Ishida, Y., Inagaki, A., Nishigaki, M., and Shimada, S. (2003). Amiloride-Insensitive Currents of the Acid-Sensing Ion Channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b Heteromeric Sour-Taste Receptor Channel. *J. Neurosci.* 23, 3616–3622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03616.2003>.
- Ulambayar, B., Yang, E.-M., Cha, H.-Y., Shin, Y.-S., Park, H.-S., and Ye, Y.-M. (2019). Increased platelet activating factor levels in chronic spontaneous urticaria predicts refractoriness to antihistamine treatment: an observational study. *Clinical and Translational Allergy* 9, 33. <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0275-6>.

- Urbano, F.J., Lino, N.G., González-Inchauspe, C.M.F., González, L.E., Colettis, N., Vattino, L.G., Wunsch, A.M., Wemmie, J.A., and Uchitel, O.D. (2014). Acid-sensing ion channels 1a (ASIC1a) inhibit neuromuscular transmission in female mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306, C396–C406. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00301.2013>.
- de Vallière, C., Wang, Y., Eloranta, J.J., Vidal, S., Clay, I., Spalinger, M.R., Tymbarevich, I., Terhalle, A., Ludwig, M.-G., Suply, T., et al. (2015). G Protein-coupled pH-sensing Receptor OGR1 Is a Regulator of Intestinal Inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases* 21, 1269–1281. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000375>.
- Vann, K.T., and Xiong, Z.-G. (2018). Acid-sensing ion channel 1 contributes to normal olfactory function. *Behavioural Brain Research* 337, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.014>.
- Ved, H.S., Gustow, E., and Pieringer, R.A. (1991). Regulation of neuronal differentiation in neuron-enriched primary cultures from embryonic rat cerebra by platelet activating factor and the structurally related glycerol ether lipid, dodecylglycerol. *Journal of Neuroscience Research* 30, 353–358. <https://doi.org/10.1002/jnr.490300211>.
- Venable, M., Zimmerman, G., McIntyre, T., and Prescott, S. (1993). Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *Journal of Lipid Research* 34, 691–702. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39691-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39691-7).
- Villaruel, A., and Schwarz, T.L. (1996). Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient K⁺ currents by arachidonic acid. *J. Neurosci.* 16, 2522–2532. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02522.1996>.
- Voilley, N., Weille, J. de, Mamet, J., and Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Both the Activity and the Inflammation-Induced Expression of Acid-Sensing Ion Channels in Nociceptors. *J. Neurosci.* 21, 8026–8033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08026.2001>.
- Vralsted, V.C., Price, M.P., Du, J., Schnizler, M., Wunsch, A.M., Ziemann, A.E., Welsh, M.J., and Wemmie, J.A. (2011). Expressing acid-sensing ion channel 3 in the brain alters acid-evoked currents and impairs fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior* 10, 444–450. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00683.x>.
- Vuong, T.D., De Kimpe, S., De Roos, R., Rabelink, T.J., Koomans, H.A., and Joles, J.A. (2001). Albumin restores lysophosphatidylcholine-induced inhibition of vasodilation in rat aorta. *Kidney International* 60, 1088–1096. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0600031088.x>.
- Vuong, T.D., Braam, B., Willekes-Koolschijn, N., Boer, P., Koomans, H.A., and Joles, J.A. (2003). Hypoalbuminaemia enhances the renal vasoconstrictor effect of lysophosphatidylcholine. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18, 1485–1492. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg238>.
- Vuong, T.H.I.D., Stroes, E.S.G., Willekes-Koolschijn, N.E.L., Rabelink, T.O.N.J., Koomans, H.A., and Joles, J.A. (1999). Hypoalbuminemia increases lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein of normocholesterolemic subjects. *Kidney International* 55, 1005–1010. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.0550031005.x>.
- Walder, R.Y., Rasmussen, L.A., Rainier, J.D., Light, A.R., Wemmie, J.A., and Sluka, K.A. (2010). ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia After Inflammatory Muscle Injury. *The Journal of Pain* 11, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.07.004>.

- Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1998). H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 8, 418–424. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80070-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80070-6).
- Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., and Lazdunski, M. (1996). The Mammalian Degenerin MDEG, an Amiloride-sensitive Cation Channel Activated by Mutations Causing Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*(*). *Journal of Biological Chemistry* 271, 10433–10436. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10433>.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997a). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386, 173. <https://doi.org/10.1038/386173a0>.
- Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997b). Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na⁺ Channel Specific for Sensory Neurons*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20975–20978. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20975>.
- Waldmann, R., Champigny, G., Lingueglia, E., Weille, J.R.D., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1999). H⁺-Gated Cation Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 67–76. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11274.x>.
- Wallner, S., and Schmitz, G. (2011). Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 573–589. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008>.
- Wang, B., and Tontonoz, P. (2019). Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology* 81, 165–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114444>.
- Wang, J.-J., Liu, F., Yang, F., Wang, Y.-Z., Qi, X., Li, Y., Hu, Q., Zhu, M.X., and Xu, T.-L. (2020). Disruption of auto-inhibition underlies conformational signaling of ASIC1a to induce neuronal necroptosis. *Nat Commun* 11, 475. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13873-0>.
- Wang, J.-Q., Kon, J., Mogi, C., Tobo, M., Damirin, A., Sato, K., Komachi, M., Malchinkhuu, E., Murata, N., Kimura, T., et al. (2004). TDAG8 Is a Proton-sensing and Psychosine-sensitive G-protein-coupled Receptor*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45626–45633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406966200>.
- Wang, Y., Zhang, J., Jiang, P., Li, K., Sun, Y., and Huang, Y. (2021). ASIC1a promotes acidic microenvironment-induced HCC cells migration and invasion by inducing autophagy. *European Journal of Pharmacology* 907, 174252. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174252>.
- Wang, Y.-Z., Wang, J.-J., Huang, Y., Liu, F., Zeng, W.-Z., Li, Y., Xiong, Z.-G., Zhu, M.X., and Xu, T.-L. (2015). Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction. *ELife* 4, e05682. <https://doi.org/10.7554/eLife.05682>.
- Wang-Sattler, R., Yu, Z., Herder, C., Messias, A.C., Floegel, A., He, Y., Heim, K., Campillos, M., Holzapfel, C., Thorand, B., et al. (2012). Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol Syst Biol* 8, 615. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.43>.
- Ward-Caviness, C.K., Xu, T., Aspelund, T., Thorand, B., Montrone, C., Meisinger, C., Dunger-Kaltenbach, I., Zierer, A., Yu, Z., Helgadottir, I.R., et al. (2017). Improvement of myocardial infarction risk prediction via inflammation-associated metabolite biomarkers. *Heart* 103, 1278–1285. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2016-310789>.

Wardlow, M.L., Cox, C.P., Meng, K.E., Greene, D.E., and Farr, R.S. (1986). Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *The Journal of Immunology* *136*, 3441–3446. .

de Weille, J.R., Bassilana, F., Lazdunski, M., and Waldmann, R. (1998). Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel. *FEBS Lett* *433*, 257–260. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00916-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00916-8).

Welch, E.J., Naikawadi, R.P., Li, Z., Lin, P., Ishii, S., Shimizu, T., Tiruppathi, C., Du, X., Subbaiah, P.V., and Ye, R.D. (2009). Opposing Effects of Platelet-Activating Factor and Lyso-Platelet-Activating Factor on Neutrophil and Platelet Activation. *Mol Pharmacol* *75*, 227–234. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051003>.

Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., et al. (2002). The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. *Neuron* *34*, 463–477. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00661-X).

Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., and Welsh, M.J. (2003). Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. *J. Neurosci.* *23*, 5496–5502. .

Werner, E.R., Keller, M.A., Sailer, S., Lackner, K., Koch, J., Hermann, M., Coassin, S., Golderer, G., Werner-Felmayer, G., Zoeller, R.A., et al. (2020). The TMEM189 gene encodes plasmalogen desaturase which introduces the characteristic vinyl ether double bond into plasmalogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *117*, 7792–7798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917461117>.

Wetzel, C., Hu, J., Riethmacher, D., Benckendorff, A., Harder, L., Eilers, A., Moshourab, R., Kozlenkov, A., Labuz, D., Caspani, O., et al. (2007). A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature* *445*, 206–209. <https://doi.org/10.1038/nature05394>.

Wieraszko, A., Li, G., Kornecki, E., Hogan, M.V., and Ehrlich, Y.H. (1993). Long-term potentiation in the hippocampus induced by platelet-activating factor. *Neuron* *10*, 553–557. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90342-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90342-O).

Witt, M.R., Westh-Hansen, S.E., Rasmussen, P.B., Hastrup, S., and Nielsen, M. (1996). Unsaturated Free Fatty Acids Increase Benzodiazepine Receptor Agonist Binding Depending on the Subunit Composition of the GABAA Receptor Complex. *Journal of Neurochemistry* *67*, 2141–2145. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67052141.x>.

Witt, M.R., Poulsen, C.F., Lükensmejer, B., Westh-Hansen, S.E., Nabekura, J., Akaike, N., and Nielsen, M. (1999). Structural requirements for the interaction of unsaturated free fatty acids with recombinant human GABAA receptor complexes. *Ann N Y Acad Sci* *868*, 697–700. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11349.x>.

Woolf, C.J., and Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* *55*, 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>.

Wu, L.-J., Duan, B., Mei, Y.-D., Gao, J., Chen, J.-G., Zhuo, M., Xu, L., Wu, M., and Xu, T.-L. (2004). Characterization of Acid-sensing Ion Channels in Dorsal Horn Neurons of Rat Spinal Cord*. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 43716–43724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403557200>.

- Wu, W.-L., Wang, C.-H., Huang, E.Y.-K., and Chen, C.-C. (2009). *Asic3*^{-/-} Female Mice with Hearing Deficit Affects Social Development of Pups. *PLOS ONE* 4, e6508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006508>.
- Wu, Y., Gao, B., Xiong, Q.-J., Wang, Y.-C., Huang, D.-K., and Wu, W.-N. (2017). Acid-sensing ion channels contribute to the effect of extracellular acidosis on proliferation and migration of A549 cells. *Tumour Biol.* 39, 1010428317705750. <https://doi.org/10.1177/1010428317705750>.
- Wultsch, T., Painsipp, E., Shahbazian, A., Mitrovic, M., Edelsbrunner, M., Lazdunski, M., Waldmann, R., and Holzer, P. (2008). Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *PAIN* 134, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.04.025>.
- Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004). Neuroprotection in Ischemia: Blocking Calcium-Permeable Acid-Sensing Ion Channels. *Cell* 118, 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.026>.
- Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., and McCleskey, E.W. (2006). Sustained Currents Through ASIC3 Ion Channels at the Modest pH Changes That Occur During Myocardial Ischemia. *Circulation Research* 99, 501–509. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000238388.79295.4c>.
- Yang, F., Sun, X., Ding, Y., Ma, H., Yang, T.O., Ma, Y., Wei, D., Li, W., Xu, T., and Jiang, W. (2016). Astrocytic Acid-Sensing Ion Channel 1a Contributes to the Development of Chronic Epileptogenesis. *Sci Rep* 6, 31581. <https://doi.org/10.1038/srep31581>.
- Yang, H.-C., Farooqui, A.A., and Horrocks, L.A. (1996). Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 14, 9–13. [https://doi.org/10.1016/0929-7855\(96\)01502-7](https://doi.org/10.1016/0929-7855(96)01502-7).
- Yazdi, S., Stein, M., Elinder, F., Andersson, M., and Lindahl, E. (2016). The Molecular Basis of Polyunsaturated Fatty Acid Interactions with the Shaker Voltage-Gated Potassium Channel. *PLOS Computational Biology* 12, e1004704. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004704>.
- Yermolaieva, O., Leonard, A.S., Schnizler, M.K., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *PNAS* 101, 6752–6757. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308636100>.
- Yoder, N., and Gouaux, E. (2020). The His-Gly motif of acid-sensing ion channels resides in a reentrant 'loop' implicated in gating and ion selectivity. *ELife* 9, e56527. <https://doi.org/10.7554/eLife.56527>.
- Yoder, N., Yoshioka, C., and Gouaux, E. (2018). Gating mechanisms of acid-sensing ion channels. *Nature* 555, 397–401. <https://doi.org/10.1038/nature25782>.
- Yu, H., Dilbaz, S., Coßmann, J., Hoang, A.C., Diedrich, V., Herwig, A., Harauma, A., Hoshi, Y., Moriguchi, T., Landgraf, K., et al. (2019). Breast milk alkylglycerols sustain beige adipocytes through adipose tissue macrophages. *J Clin Invest* 129, 2485–2499. <https://doi.org/10.1172/JCI125646>.
- Yu, X.-W., Hu, Z.-L., Ni, M., Fang, P., Zhang, P.-W., Shu, Q., Fan, H., Zhou, H.-Y., Ni, L., Zhu, L.-Q., et al. (2015). Acid-sensing ion channels promote the inflammation and migration of cultured rat microglia. *Glia* 63, 483–496. <https://doi.org/10.1002/glia.22766>.

- Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., Yu, F., Liu, H., Jiang, H., and Xu, T.-L. (2010). A Nonproton Ligand Sensor in the Acid-Sensing Ion Channel. *Neuron* 68, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.001>.
- Yu, Y., Li, W.-G., Chen, Z., Cao, H., Yang, H., Jiang, H., and Xu, T.-L. (2011). Atomic Level Characterization of the Nonproton Ligand-sensing Domain of ASIC3 Channels*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 24996–25006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239558>.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A.C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67, 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>.
- Zeisel, S.H. (2012). A Brief History of Choline. *ANM* 61, 254–258. <https://doi.org/10.1159/000343120>.
- Zha, X. (2013). Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function. *Molecular Brain* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-1>.
- Zha, X., Wemmie, J.A., Green, S.H., and Welsh, M.J. (2006). Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *PNAS* 103, 16556–16561. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608018103>.
- Zhai, G., Pelletier, J.-P., Liu, M., Aitken, D., Randell, E., Rahman, P., Jones, G., and Martel-Pelletier, J. (2019). Activation of The Phosphatidylcholine to Lysophosphatidylcholine Pathway Is Associated with Osteoarthritis Knee Cartilage Volume Loss Over Time. *Sci Rep* 9, 9648. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46185-w>.
- Zhang, H., Gao, G., Zhang, Y., Sun, Y., Li, H., Dong, S., Ma, W., Liu, B., Wang, W., Wu, H., et al. (2017). Glucose Deficiency Elevates Acid-Sensing Ion Channel 2a Expression and Increases Seizure Susceptibility in Temporal Lobe Epilepsy. *Scientific Reports* 7, 5870. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05038-0>.
- Zhao, D., Ning, N., Lei, Z., Sun, H., Wei, C., Chen, D., and Li, J. (2014). Identification of a Novel Protein Complex Containing ASIC1a and GABAA Receptors and Their Interregulation. *PLOS ONE* 9, e99735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099735>.
- Zhou, J.-J., and Linsdell, P. (2007). Molecular mechanism of arachidonic acid inhibition of the CFTR chloride channel. *European Journal of Pharmacology* 563, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.048>.
- Zhou, Z., Song, J., Li, W., Liu, X., Cao, L., Wan, L., Tan, Y., Ji, S., Liang, Y., and Gong, F. (2017). The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36, 130. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0599-9>.
- Ziemann, A.E., Schnizler, M.K., Albert, G.W., Severson, M.A., Howard III, M.A., Welsh, M.J., and Wemmie, J.A. (2008). Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat Neurosci* 11, 816–822. <https://doi.org/10.1038/nn.2132>.
- Ziemann, A.E., Allen, J.E., Dahdaleh, N.S., Drebot, I.I., Coryell, M., Wunsch, A.M., Lynch, C.M., Faraci, F.M., Howard, M.A., Welsh, M.J., et al. (2009). The Amygdala is a Chemosensor that Detects Carbon Dioxide and Acidosis to Elicit Fear Behavior. *Cell* 139, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.029>.

Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *PNAS* *108*, 18114–18119. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115387108>.