



HAL
open science

Etude des canaux ioniques TREK 1 et HCN dans la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine.

Laura Poupon

► **To cite this version:**

Laura Poupon. Etude des canaux ioniques TREK 1 et HCN dans la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT : 2015CLF1MM11 . tel-01529442

HAL Id: tel-01529442

<https://theses.hal.science/tel-01529442>

Submitted on 30 May 2017

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2015

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° d'Ordre :

ECOLE DOCTORALE
Des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présenté à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Neurophysiologie & Pharmacologie

Soutenue le 18 septembre 2015

Laura POUPON

**ETUDE DE L'IMPLICATION DE CANAUX IONIQUES, CIBLES MOLECULAIRES
POUR LE DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX ANTALGIQUES DANS LE
TRAITEMENT DE LA NEUROPATHIE CHIMIO-INDUITE A L'OXALIPLATINE**

Président : Dr. Serge Richard (CERB, Baugy)
Membres : Pr. Alain Eschalier (UdA, Clermont Ferrand)
Dr. Jérôme Busserolles (UdA, Clermont Ferrand)
Rapporteurs : Dr. Marc Borsotto (IMPC, Nice)
Dr. Cyril Goudet (IGF, Montpellier)

INSERM U1107 – NEURODOL – Université d'Auvergne – Clermont Ferrand

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2015

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° d'Ordre :

ECOLE DOCTORALE

Des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présenté à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Neurophysiologie & Pharmacologie

Soutenue le 18 septembre 2015

Laura POUPON

**ETUDE DE L'IMPLICATION DE CANAUX IONIQUES, CIBLES MOLECULAIRES
POUR LE DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX ANTALGIQUES DANS LE
TRAITEMENT DE LA NEUROPATHIE CHIMIO-INDUITE A L'OXALIPLATINE**

Président : Dr. Serge Richard (CERB, Baugy)

Membres : Pr. Alain Eschalièr (UdA, Clermont Ferrand)

Dr. Jérôme Busserolles (UdA, Clermont Ferrand)

Rapporteurs : Dr. Marc Borsotto (IMPC, Nice)

Dr. Cyril Goudet (IGF, Montpellier)

INSERM U1107 – NEURODOL – Université d'Auvergne – Clermont Ferrand

Remerciements

Aux membres du jury

A Monsieur le Professeur Alain Eschalier, merci pour votre accueil au sein de l'unité INSERM 1107. Je vous remercie pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordée pour la réalisation de cette thèse. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jérôme Busseroles, merci pour ton soutien scientifique mais aussi humain qui a été plus que nécessaire pour la réussite de ce travail de thèse. Je te remercie également pour ton encadrement quotidien, ta patience à toute épreuve, ton écoute et tes conseils pertinents.

A Monsieur le Docteur Serge Richard, je vous remercie d'avoir immédiatement accepté de présider ce jury de thèse et de me faire l'honneur d'évaluer et de critiquer ce travail de thèse.

A Monsieur le Docteur Cyril Goudet, encore merci d'avoir accepté de juger et critiquer mes travaux de thèse suivi depuis le début lors de mes comités de thèse et d'en être le rapporteur.

A Madame le Docteur Marc Borsotto, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèses en tant que rapporteur et surtout en tant que spécialiste du canal TREK-1 et notamment de son inhibiteur, la spadine.

Aux financeurs

Aux Fonds européen de développement régional (FEDER), pour m'avoir financé pendant ces 3 années de thèse.

Au Conseil Régional d'Auvergne, pour le soutien financier dans la réalisation de ce travail et pour m'avoir permis de présenter mes résultats au 15^e Congrès Mondial de la Douleur à Buenos Aires.

Veillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A l'équipe Neurodol U1107

Au personnel de l'animalerie, merci au **Docteur Karim Alloui** pour la gestion de l'animalerie, à **Franck** et **Didier**, ainsi qu'une dédicasse spéciale à **Alexandra** sans qui les longues heures passées à l'animalerie n'auraient pas été pareilles.

Merci à nos secrétaires **Gwenaëlle** et **Sylvie** pour leur soutien logistique et administratif. Pour votre soutien, merci également à **Anne-Marie** sans qui les commandes seraient un vrai casse-tête, **Eric** pour ses blagues toujours bien placées (il faut dire qu'il a un bon public), **Julie B** venue agrandir les rangs des techniciens, **Maryse** pour sa bonne humeur contagieuse et nos discussions de couloir, & **Mireille** pour sa gestion impeccable des salles de manip', son aide technique à l'animalerie, sa curiosité et bien sûr son sourire qui met de bonne humeur tôt le

matin. Un merci spécial pour **Laëtitia**, pour ton soutien, ton aide, notre duo de choc va me manquer.

Un clin d'œil à la « team viscéral » : **Agathe, Amandine, Denis, Fred, Ludivine** dont vos sujets de recherches me laisseront toujours *perplexe*.

A **Alice, Christine, Mélina & Laurence**, les mamans et futures mamans du laboratoire.

A **David** pour sa passion pour la rédaction de review et dont l'oxaliplatine n'a plus de secret, à **Fabien** qui croit encore que je vis la nuit, à **YouYou** qui sait que la simple utilisation de ce surnom signifie que j'ai quelque chose à lui demander, à **Christophe**, ne t'en fais pas avec Maryse, on finira par la trouver pour toi, à **Madhy** pour qui le Mud Day s'avère être autant un sport que la zumba, à **Julie V**, à **Benoît**.

Une pensée aux anciens thésards, **Amandine, Jérémy, Nico, Mathieu** et **Véro** qui ont su nous montrer le chemin plus ou moins périlleux qui conduit à la réussite d'une thèse.

A **Alisson**, entre litres de Guinness (pinte 275) et séances sportives diverses et variées, merci de m'avoir supportée tout au long de ma thèse en tant que voisine de bureau mais pas seulement ... Même si je me plaignais de ton statut de râleuse professionnelle, tes jérémiades arriveraient presque à me manquer ☺.

A **David** (Barrière de la clôture, pinte 99), qui par son raisonnement toujours sans faille selon lui, reste la seule personne capable de m'énerver au point d'utiliser des kits de MTT comme arme de combat mais également de me faire rire à n'en plus finir. Dernier point pour mettre un terme à cette discussion ridicule : NON, le Cantal n'est pas le centre du monde.

A **Maily & Vanessa**, ♥ Busserolles Team forever ♥, merci d'avoir été mes "mamans" de thèse, un savant mélange de Mojito non assimilés lié à l'absence d'une enzyme et de goûts douteux pour le R'n'B et les chaussures compensées.

A **Radhoun**, pour ton goût prononcé pour la stévia, les post-it et le denim, grâce à toi, cela me reconforte dans l'idée que la fin de la thèse n'est pas si terrible.

A **Stéphane** à qui je prouve aujourd'hui qu'un piou-piou devient toujours un jour ... grand !

Aux thésards actuels, votre moment viendra plus vite que vous ne le pensez :

A **Sylvain**, Thésardinus Caius Pupus, roi de l'organisation selon sa définition, un jour tu accepteras que le riluzole est une molécule fabuleuse. Dans tous les cas, merci d'avoir été là, mon cher voisin de bureau.

A **Elodie**, la tête dans les nuages et le sourire aux lèvres, merci pour ces pauses cafés, tes discours farfelus après quelques pintes Berthomesques et ta prise d'otage dans les escaliers du Still.

Aux nouveaux thésards, **Amélie, Lauriane & Pierre-Yves**, je vous souhaite une belle réussite mais également plein de courage, n'oubliez pas qu'un piou-piou devient toujours grand !

A l'U990, pour avoir agrandi les rangs et ajouté de la vie au laboratoire du 6^e étage, avec un merci tout particulier à **Tiffany** et **Claire** pour leur sourire, leur bonne humeur et les soirées passées ensemble.

A mes proches

A **mes parents**, à **Céline**, que le titre de ma thèse laisse certainement sans voix mais pour toutes les fois où ils m'ont dit qu'ils étaient fiers de moi. Merci pour votre soutien et d'avoir été là pour moi. A **Catherine**, pour sa joie rien qu'à l'idée de la préparation des festivités.

A **Charlotte, Emy, Fredo, Gary, Ion-Ion, Nas, Nico** (Rémy), **Paulo, Popo, Romain, Sam** un grand merci pour toutes ces soirées, ces folies parisiennes, ces descentes à ski et j'en passe.

A **Brice**, merci de ton soutien et l'enthousiasme que tu as su m'exprimer à l'égard des mes travaux et pour cette dernière ligne droite qui a été la rédaction de cette thèse.

A **Jean-Phi** et **Marlène**, je pourrais en écrire des pages mais vous comprendrez que certaines choses doivent rester secrètes. Merci d'avoir été là à grand renfort de discours bien pensés et de Gin tonic.

Pour finir, j'en oublie certainement et je m'en excuse & encore merci à tous pour m'avoir conduit jusqu'ici.

Résumé

L'oxaliplatine, anticancéreux utilisé en première intention dans le traitement du cancer colorectal, engendre des neuropathies qui se caractérisent par des dommages du système nerveux périphériques responsables de l'apparition de troubles sensitifs douloureux dès la première cure ainsi que de troubles moteurs mais également des comorbidités qui s'installent avec la répétition des cures. Les traitements actuellement disponibles sont peu efficaces pour traiter ces neuropathies qui sont à l'origine d'une altération de la qualité de vie des patients et peuvent conduire à une diminution des doses de chimiothérapie utilisées voire même à l'arrêt du traitement, compromettant ainsi les chances de guérison. Des données du laboratoire ont mis en avant plusieurs canaux ioniques comme étant des cibles moléculaires potentielles pour le traitement de la neuropathie aigue. Le but de ce travail de thèse a été de poursuivre les études permettant de comprendre le mécanisme de survenue de ces effets indésirables et de rechercher les canaux dont la modulation pharmacologique permettrait un traitement efficace et bien toléré pour ces neuropathies.

Pour se faire nous avons décidé de mieux caractériser un modèle murin de neuropathie douloureuse aigue et de mettre au point et caractériser un modèle de neuropathie chronique induites respectivement, par des injections unique ou répétées d'oxaliplatine. Un travail éthologique a été entrepris chez ces modèles afin d'évaluer la survenue et le suivi longitudinal des symptômes retrouvés en clinique : symptômes douloureux céphaliques et extracéphaliques, déficits moteurs, dépression, anxiété. Chez ces mêmes animaux, des analyses moléculaires nous ont permis de sélectionner des gènes codant pour des canaux ioniques impliqués dans la physiologie et la pharmacologie de la douleur (canaux potassiques TREK et TRAAK, canaux HCN1 & HCN2). Nous avons parallèlement entrepris de valider pharmacologiquement ces cibles chez l'animal. Les résultats de nos travaux sont présentés séquentiellement et concernent : l'étude de l'implication des canaux HCN dans l'hypersensibilité douloureuse céphalique et extracéphalique induite par l'oxaliplatine ; l'étude de l'implication des canaux TREK et TRAAK dans la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine et la validation pharmacologique de ces cibles chez un modèle murin de cancer colorectal.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de neuropathie aigue induit par une unique injection d'oxaliplatine (6mg/kg), et avons caractérisé les symptômes décrits en clinique au niveau du territoire céphalique. Nous avons observé l'existence de symptômes douloureux au niveau orofacial et nous avons pu les corrélés à une surexpression des canaux HCN1 & HCN2. Il avait précédemment été démontré une surexpression de ses mêmes canaux au niveau extracéphalique, ce qui en fait des cibles particulièrement pertinentes compte tenu des différences anatomiques et pharmacologiques connues entre ces deux territoires somatiques. De plus, l'utilisation d'ivabradine (Procoralan®), antagoniste non sélectif de ces canaux, a permis de réverser l'hypersensibilité douloureuse chez ce modèle animal de neuropathie douloureuse aigue.

Dans un second temps, nous avons mis en place et caractérisé un modèle de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine. Nous avons pu mettre en évidence l'apparition de symptômes douloureux apparaissant à court terme et, à plus long terme, le développement de troubles moteurs et de comorbidités tel que l'anxiété et la dépression. De nombreuses propriétés du canal TREK-1 nous ont laissés penser qu'il apparaissait comme une cible

intéressante pour le traitement de cette neuropathie de par son rôle connu notamment dans la physiologie et la pharmacologie de douleur ou encore la neuroprotection. Afin de valider cette cible, nous avons donc utilisé deux approches : une approche génétique avec l'utilisation de souris KO TREK-1 et une approche pharmacologique avec l'utilisation du riluzole (Rilutek®), activateur non spécifique du canal TREK-1. Les résultats montrent que le riluzole prévient la quasi-totalité des symptômes douloureux, moteurs ainsi que la dépression induits par des administrations répétées d'oxaliplatine. De plus, le canal TREK-1 est impliqué dans les effets thérapeutiques du riluzole. Il est également remarquable que l'effet neuroprotecteur observé du riluzole n'entrave pas l'effet anticancéreux de l'oxaliplatine, ceci ayant été observé *in vivo* chez un modèle murin de cancer colorectal.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats expérimentaux a permis l'identification de nouvelles pistes pour la compréhension et le traitement des douleurs chimio-induites à l'oxaliplatine. Dans une perspective de recherche translationnelle, cette approche préclinique est en cours de transposition dans un protocole de recherche clinique. Un essai clinique de phase II (RILUZOX) devrait débuter prochainement afin de confirmer l'intérêt du riluzole chez des patients recevant une chimiothérapie à base d'oxaliplatine.

Mots clés : oxaliplatine, neuropathie, TREK-1, HCN, riluzole, ivabradine

Abstract

Oxaliplatin causes neuropathies which are characterized by damage of peripheral nervous system responsible for the onset of disorders such as neuropathic pain, sensory and motor symptoms and comorbidities. Currently, available treatments are not very effective for treating these symptoms in acute or chronic form. However, these symptoms are the consequence of an impaired quality of life for patients and can lead to a decrease of chemotherapy doses used or even stopping treatment, compromising the chances of surviving. Therefore, it appears essential for further studies to understand the mechanism of occurrence of these pains and identify potential targets for the development of new analgesics.

We decided to further characterize a mouse model of acute painful neuropathy and to develop and characterize a chronic neuropathy model induced respectively by single or repeated injections of oxaliplatin. An ethological work was realized in these models to assess the occurrence of clinical symptoms: painful symptoms at cephalic and extracephalic levels, motor deficits, depression, anxiety. In these animals, molecular analyzes allowed us to select the genes encoding ion channels involved in the physiology and pharmacology of pain (potassium channel TREK and TRAAK, HCN1 & HCN2 channels). We undertook to pharmacologically validate these targets in animal. The results of our work are presented sequentially and concern: the study of the involvement of HCN channels in the cephalic and extracephalic painful hypersensitivity induced by oxaliplatin; the study of the involvement of TREK and TRAAK channels in chronic oxaliplatin-induced neuropathy and pharmacological validation of these targets in a mouse model of colorectal cancer.

Initially, we used a model of acute neuropathy induced by single injection of oxaliplatin (6mg / kg) to study the clinical symptoms described at the orofacial sphere. Indeed, peripheral symptoms had already been studied and the hypothesis of the ion channels expression remodelling was confirmed. So, we verified the existence of orofacial pain symptoms with new behavioral tests and we have correlated these results with an over expression of HCN1 & HCN2 channels. In addition, use of ivabradine (Procoralan®), a non-selective antagonist of these channels, allowed reversing hypersensitivity to cold at low doses and mechanical hypersensitivity when we used higher doses.

Secondly, we first aimed to develop a murine model of oxaliplatin-induced chronic neuropathy reproducing the symptoms observed in patients compared to the acute form which is accompanied in addition to the painful symptoms of sensory disorders, locomotor disorders and comorbidities such as anxiety and depression. Several known properties of TREK-1 channel with its role in pain, depression or neuroprotection suggest that it could be an attractive target for the treatment of this chronic neuropathy. To validate this target, we used two approaches: one genetic approach using knockout mouse TREK-1 and one pharmacological approach with the use of riluzole (Rilutek®), non-specific activator TREK-1 channel. The results showed that TREK-1 channel seemed involved in all symptoms related to chronic neuropathy but also that riluzole appeared as a treatment for this chronic neuropathic both for improving painful symptoms and for sensory disorders, locomotor disorders, and improvement of some comorbidities such as depression.

In conclusion, all of these experimental results allowed the identification of new mechanisms for understanding and treating oxaliplatin-induced neuropathy. First, involvements of HCN1 & HCN2 channels have showed in the acute neuropathy induced by oxaliplatin for both peripheral and oral symptoms. In particular, blocking of these channels by ivabradine has also helped to reverse the cold hypersensitivity. Also, the TREK-1 channel showed great interest in involvement in chronic neuropathy induced by oxaliplatin and riluzole showed many interesting properties to overcome the symptoms described in this neuropathy. From the perspective of translational research, this preclinical approach is being transposed in a clinical research protocol. A phase II clinical trial (RILUZOX) should begin shortly to confirm the interest of riluzole in patients receiving chemotherapy with oxaliplatin.

Keywords: oxaliplatin, neuropathy, TREK-1, HCN, riluzole, ivabradine

Sommaire

Contribution scientifique	19
Abréviations	21
Liste des figures	23
Liste des tableaux.....	25
Introduction	27
Chapitre I :.....	29
Douleur & chimiothérapie	29
<i>Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur.....</i>	29
1) Neurophysiologie de la douleur	31
a) Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs	31
b) Nociception périphérique et extracéphalique	36
c) Nociception trigéminal.....	37
d) Mécanismes physiopathologiques des douleurs neuropathiques.....	39
e) Douleur neuropathique et cancer	40
f) Pharmacologie des douleurs neuropathiques	42
2) Méthodes d'exploration de la douleur chez l'animal	44
a) Animal sain.....	45
b) Animal cancéreux - modèle de cancer colique : Modèle APC ^{Min}	46
Chapitre I :.....	49
Douleur & chimiothérapie	49
<i>Chapitre I-2 : L'oxaliplatine (Eloxatine®)</i>	49
1) Généralités.....	51
a) Origine et structure.....	51
b) Biotransformation.....	52
c) Mécanisme d'action	52
i) Pharmacocinétique	52
ii) Pharmacodynamie.....	54
d) Pharmacologie clinique.....	56
i) Utilisation et posologie	56
ii) Effets indésirables	57
2) Neurotoxicité induite par l'oxaliplatine	57

a) Sémiologie.....	57
i) Neuropathie aiguë	57
(1) Tableau clinique.....	57
(2) Toxicodynamie	58
ii) Neuropathie chronique	60
(1) Tableau clinique.....	60
(2) Toxicodynamie	62
b) Traitements de la neuropathie.....	63
i) Modifications du protocole d'administration.....	64
ii) Approches pharmacologiques.....	64
Objectifs généraux	67
Chapitre II :	69
Canaux ioniques & neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine.....	69
<i>Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN dans l'hypersensibilité céphalique et extracéphalique induite par l'oxaliplatine.....</i>	<i>69</i>
3) Canaux HCN.....	73
a) Classification et structure.....	73
b) Mécanismes de régulation	75
c) Rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux HCN.....	77
i) Rôle dans la physiologie et physiopathologie cardiaque.....	77
ii) Rôle dans l'excitabilité du système nerveux.....	78
(1) Rôle physiologique et physiopathologique des canaux HCN	78
(2) Rôle dans la douleur inflammatoire	79
(3) Rôle dans la douleur neuropathique	80
d) Pharmacologie : Ivabradine (Procoralan®).....	82
ARTICLE 1:.....	83
"ORAL AND PERIORAL HYPERSENSITIVITY INDUCED BY OXALIPLATIN IS MEDIATED BY HCN CHANNELS UPREGULATION IN TRIGEMINAL GANGLIA"	83
Présentation de l'article.....	85
Discussion & Perspectives.....	113
Chapitre II :	119
Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine	119
<i>Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1 dans la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine.....</i>	<i>119</i>
4) Canal TREK-1.....	121

a) Classification et structure.....	121
b) Mécanismes de régulation	123
c) Rôles physiologiques de TREK-1.....	126
i) Neuroprotection.....	127
ii) Anesthésie.....	128
iii) Dépression.....	128
iv) Douleur.....	129
d) Pharmacologie	132
i) Spadine.....	133
ii) Riluzole (Rilutek®).....	135
ARTICLE 2:.....	137
“TREATMENT OF OXALIPLATIN-INDUCED NEUROPATHY BY ORAL RILUZOLE” ...	137
Présentation de l'article.....	139
Discussion & Perspectives.....	179
1) Etude de l'effet antalgique du riluzole et de son mécanisme d'action.....	179
2) Mise au point et caractérisation d'un modèle murin de neuropathie chronique à l'oxaliplatine et des troubles associés	188
3) Influence du riluzole sur les propriétés antiproliférative et cancéreuse de l'oxaliplatine	192
4) Etude clinique : Riluzox.....	193
CONCLUSION GENERALE	197
REFERENCES.....	203
ANNEXES	231
ANNEXE 1.....	233
REVIEW -“MINIMISING CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY: preclinical and clinical development	233
of new perspectives”	233
ANNEXE 2: Synopsis de l'étude RILUZOX.....	249

Contribution scientifique

Publications acceptées

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy: preclinical and clinical development of new perspectives.

POUPON L, KERCKHOVE N, VEIN J, LAMOINE S, AUTHIER N, BUSSEROLLES J, BALLYASSAC D.
Expert Opinion on drug safety, 2015.

TREK2 controls innocuous cold and tempered warm perception.

PEREIRA V, BUSSEROLLES J, CHRISTIN M, DEVILLIERS M, **POUPON L**, LEGHA W, ALLOUI A, BOURINET E, LESAGE F, ESCHALIER A, LAZDUNSKI M, NOËL J.
Pain, 2014.

Publications en préparation

Treatment of oxaliplatin-induced chronic neuropathy by oral riluzole.

POUPON L, PEREIRA V, BARRIERE D, LAMOINE S, AISSOUNI Y, ACCARIE A, PRIVAL L, KERCKHOVE N, BALAYSSAC D, ESCHALIERA, BUSSEROLLES J.

Oral and perioral hypersensitivity induced by oxaliplatin is mediated by HCN channels upregulation in trigeminal ganglia.

POUPON L, PEREIRA V, , AISSOUNI Y, CHALUS M, PRIVAL L, DESCHEEMAER A, DALLEL R, ESCHALIERA, BUSSEROLLES J.

Communications Orales

Molecular and behavioral exploration of orofacial hypersensitivity in a model of oxaliplatin-chemotherapy induced acute neuropathy

**9ème Symposium National du Réseau Recherche sur la Douleur
Bordeaux, 22 et 23 mars 2013**

TREK-1 potassium channel as a potential target to alleviate Chronic Neuropathy Induced by Oxaliplatin-Chemotherapy

**P2T, IXème congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique
Poitiers, 22 au 24 avril 2014**

Obtention du prix de la SFPT 2014

Le riluzole, une molécule capable de prévenir la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine sans altérer l'action anti-cancéreuse de la chimiothérapie

**Journée de l'Ecole doctorale (JED)
Clermont Ferrand, 21 et 22 mai 2015**

Obtention du 1^{er} prix de communication orale des JED 2015

Communications Affichées

Le canal TREK-1 : une cible thérapeutique pour le traitement de la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine.

**Journée de l'Ecole Doctorale
Clermont Ferrand, 12 et 13 juin 2014**

TREK-1 potassium channel as a potential target to alleviate Chronic Neuropathy Induced by Oxaliplatin-Chemotherapy.

**IASP - 15th World Congress on Pain
Buenos Aires (Argentina), 6 au 11 octobre 2014**

Implication du canal TREK-1 sur la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine.

**14^e congrès National de la SFETD
Toulouse, 20 au 22 novembre 2014**

TREK-1 potassium channel as a potential target to alleviate Chronic Neuropathy Induced by Oxaliplatin-Chemotherapy.

**NeuPSIG - 5th International Congress on Neuropathic Pain
Nice, 14 au 17 mai 2015**

Financements

Conseil Régional Auvergne, Bourse Recherche Filière (BRF)
Fonds européen de développement régional (FEDER)
Conseil Régional Auvergne, Participation à un colloque à l'étranger en fin de thèse

Encadrements

Mars 2013 à Juin 2013 : 2 Stagiaires Ecole Ingénieur Polytech' Nice,
Implication des canaux HCN dans le modèle de neuropathie aigue chimio-induite à l'oxaliplatine.
Validation d'outils de biologie moléculaire nécessaires à la détection du canal TREK-1

Juin à Juillet 2013 : Stagiaire 2^e année de médecine,
Etude de composés originaux ciblant le récepteur 5-HT7 dans l'antalgie

Janvier à juin 2014 : Stagiaire Master II,
Implication des HDACi dans l'effet anti-prolifératif et dans la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine.

Abréviations

5-FU : 5-Fluorouracil

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AKAP : A-Kinase Anchor Protein

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

Bax : Bcl-2 associated X

BDNF : Derived Neurotrophic Factor

Bpm : battement par minute

CFA : Complete Freund Adjuvant

CIPN : Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy

CNBD : Cyclic Nucleotide Binding Domain

CTR : Copper Transporter

DACH : 1,2-diaminocyclohexane

DAG : Diacylglycerol

DEPC : Diethylpyrocarbonate

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DRG : Dorsal Root Ganglia

DTB : Di-TertButylphenol

EAAT : Excitatory Amino-Acid Transporter

FAP : Fibres Afférentes Primaires

FDA : Food Drug Administration

HCN : Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel

HDAC : Histone DéACétylase

IASP : International Association for the Study of Pain

IB4 : Isolectine B4

IP : Injection IntraPéritonéale

IP3 : Inositol Triphosphate

K₂P : Canaux potassiques à deux domaines transmembranaires

KCNK : Potassium channel subfamily K member

KO : Knock Out

MMR : Mismatch Repair

MTAP : Microtubule-Associated Protein
Nav : Sodium channel voltage-gated
NER : Nucleotide Excision Repair
NP : Neuropathie
OCT : Organic Cation Transporter
OIPN : Oxaliplatin Induced Peripheral Neuropathy
PA : Potentiel d'Action
PAG : Substance Grise PériAqueducal
PB : Phosphate-Buffered
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
Pt : Platine
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
ROS : Reactive Oxygen Species
RVM : Rostral Ventromedial Medulla
SN : Système Nerveux
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
SSRI : Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
TG: Trigeminal Ganglia
TRAAK : TWIK-Related Arachidonic Acid
TREK : TWIK Related K⁺ channel
TRIP8b : Tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-Interacting Protein
TRP : Transient receptor potential
VGLUT : Vesicular Glutamate Transporter
WT : Wild type

Liste des figures

Figure 1 : Expression de certains TRP dans chaque ganglion du TG jusqu'au DRG sacré (S1).	32
Figure 2 : Caractéristiques des différents types de fibres afférentes primaires (ens- lyon.fr/biotic/neuro/douleur).....	33
Figure 3 : Mise en jeu des voies de la douleur suite à un stimulus douloureux (adapté de http://lecerveau.mcgill.ca)	35
Figure 4 : Organisation de l'innervation périphérique par les nerfs spinaux.....	36
Figure 5 : Organisation du complexe trigéminal (Dallel et Lanteri-Minet, 2009).....	38
Figure 6 : Mécanismes physiopathologiques périphériques et centraux à l'origine des douleurs neuropathiques.....	39
Figure 7 : Etiopathogénie des douleurs neuropathiques cancéreuses	42
Figure 8 : Cancérogénèse colique - évolution du polype vers le cancer colorectal	46
Figure 9 : Structure chimique comparée de l'oxaliplatine, du cisplatine et du carboplatine.	51
Figure 10 : Biotransformation et pharmacocinétique de l'oxaliplatine	53
Figure 11 : Formation des adduits oxaliplatine-ADN.....	54
Figure 12 : Les voies de signalisations de l'apoptose (Cotter, 2009)	55
Figure 13 : Toxicodynamie de la neuropathie aiguë et chronique.	60
Figure 14 : Structure des canaux HCN (DeBerg et al., 2015)	74
Figure 15 : Implication des canaux HCN1 et HCN2 dans la douleur inflammatoire et neuropathique.....	81
Figure 16 : Profil d'expression d'un ensemble de canaux ioniques suite à l'injection d'oxaliplatine au niveau du DRG.....	86
Figure 17 : Effet préventif de l'ivabradine sur les symptômes douloureux au niveau de la sphère orofaciale.....	115
Figure 18 : Structure et classification des canaux K2P (adapté de Honoré, 2007).....	122
Figure 19 : Mécanismes de régulation du canal TREK-1	124
Figure 20 : Régulation du canal TREK-1 par les RCPG couplés aux protéines G.	125
Figure 21 : Structure du gène TREK-1 chez la souris et construction du KO correspondant.	126
Figure 22 : Implication du canal TREK-1 dans la perception polymodale de la douleur.....	130
Figure 23 : Effet de l'oxaliplatine chez les animaux KO TREK-1/TRAAK (Descœur et al., 2011)	131
Figure 24 : Implication du canal TREK-1 dans la transmission sérotoninergique (Borsotto et al., 2015).....	134
Figure 25 : Evaluation de l'effet du Riluzole dans différentes conditions pathophysiologiques chez des souris sauvages.	180
Figure 26 : Effet central du Riluzole dans un modèle de douleur inflammatoire induit par l'injection de carragénine.	182
Figure 27 : Effet central du Riluzole dans un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine.....	182
Figure 28 : Implication des canaux K2P et des récepteurs mGluR dans l'effet antalgique du riluzole.....	183
Figure 29 : Tests sur les doses d'antagonistes des récepteurs métabotropiques au glutamate II (LY341495) et III (CPPG).....	184

Figure 30 : Action antalgique de composés activateurs de la classe III des récepteurs métabotropiques au glutamate.....	185
Figure 31 : Etude de la spécificité d'action du riluzole sur les récepteurs métabotropiques au glutamate.....	186
Figure 32 : Le riluzole présente peu d'effets indésirables et une bonne tolérance.....	187
Figure 33 : Le traitement à l'oxaliplatine (6mg/kg) entraîne un état anxieux et dépressif.....	189
Figure 34 : Analyse sanguine dans le modèle de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine.....	190
Figure 35 : Mécanismes d'action de la neurotoxicité aigue et chronique induite par les composés de platine.....	191
Figure 36 : Schéma de l'étude RILUZOX.....	194
Figure 37 : Différentes étapes de l'étude de l'implication des canaux HCN et TREK-1.....	202

Liste des tableaux

Tableau 1 : Grade de la neuropathie selon l'échelle de Lévi ou du NCIC-CTC.....	61
Tableau 2 : Expression et propriétés des canaux HCN (adapté de Benarroch <i>et al.</i> , 2013).....	75
Tableau 3 : Principaux modèles de neuropathies chronique chimio-induites à l'oxaliplatine....	139
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des examens de l'étude RILUZOX	252

Introduction

A ce jour, plusieurs types de traitements existent pour lutter contre le cancer. Parmi eux, les chimiothérapies apparaissent comme le traitement anti-cancéreux le plus utilisé. Il s'agit d'un traitement médicamenteux systémique visant à éliminer les cellules à prolifération rapide dans l'organisme. Les chimiothérapies anticancéreuses se répartissent en deux grandes catégories à savoir la chimiothérapie néo-adjuvante visant à diminuer la taille de la tumeur et la chimiothérapie adjuvante administrée après chirurgie ou radiothérapie permettant de freiner le développement tumoral et d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles.

Le mécanisme de ces chimiothérapies repose sur une action cytotoxique non sélective qui a pour inconvénient majeur de ne pas s'attaquer seulement aux cellules cancéreuses mais également aux cellules saines à prolifération rapide présentes dans l'organisme, engendrant l'apparition d'effets indésirables importants, tels que les neuropathies. L'objectif qui se pose alors en recherche est d'obtenir des molécules moins agressives pour les cellules saines de l'organisme, d'adapter ces traitements afin qu'ils soient mieux tolérés par l'organisme ou de co-administrer d'autres traitements capable de supprimer ou du moins réduire l'apparition de ces effets indésirables.

Parmi les chimiothérapies cytotoxiques, nous pouvons citer l'oxaliplatine (Eloxatine®), sel de platine de troisième génération, utilisé notamment dans le traitement du cancer colorectal. Le nombre de nouveaux cas pour ce cancer est estimé à 40 000 en 2011, il représente le 3^e cancer le plus fréquent et la 2^e cause de décès par cancer en France, d'où la nécessité d'un traitement efficace pour cette pathologie. L'efficacité anti-néoplasique de l'oxaliplatine n'est plus à prouver pour de nombreux cancers notamment digestifs. En revanche, l'utilisation de cette molécule s'accompagne de toxicités hématologique, digestive et neurologique aujourd'hui bien décrites. La toxicité la plus connue de l'oxaliplatine reste la neurotoxicité puisqu'elle touche environ 90% des patients. Cette neurotoxicité existe sous 2 formes : une forme précoce dite aigüe et une forme plus tardive dite chronique. Ces neurotoxicités se manifestent par le développement d'une neuropathie douloureuse, l'apparition de paresthésies/dysesthésies au niveau des extrémités, symptômes souvent exacerbés par l'exposition au froid ainsi que d'une atteinte fonctionnelle dans les cas les plus sévères. Cette neurotoxicité peut donc conduire à la réduction des doses, voire à l'abandon de la chimiothérapie, elle se révèle donc très invalidante et porte atteinte à la qualité de vie des patients. Elle s'explique aujourd'hui par une atteinte nerveuse périphérique dont le mécanisme reste encore peu connu.

A l'heure actuelle, les praticiens restent souvent démunis pour proposer un traitement efficace pour ces neuropathies iatrogènes. Notamment, les douleurs neuropathiques sont souvent décrites comme difficiles à traiter et résistantes aux traitements antalgiques conventionnels. Il existe donc un réel besoin d'innovation thérapeutique que ce soit dans la découverte des mécanismes à l'origine de ces manifestations douloureuses, la découverte de nouvelles cibles moléculaires ou encore dans le développement de nouveaux antalgiques originaux et bien tolérés pour permettre une meilleure prise en charge de ces patients neuropathiques. Les symptômes neuropathiques non douloureux sont également très invalidants et mal pris en charge.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Il a porté sur l'étude de l'action cytotoxique de l'oxaliplatine et tout particulièrement sa neurotoxicité, le but étant de découvrir de nouvelles cibles moléculaires pour le développement de molécules susceptibles de réduire ou supprimer les effets indésirables liés à la toxicité de cette chimiothérapie. L'ensemble de ce travail de thèse s'articule en deux chapitres, chacun subdivisé en deux parties. Le premier chapitre fait l'état de la littérature portant sur la neurophysiologie de la douleur ainsi que l'oxaliplatine et plus particulièrement sur les neuropathies chimio-induites et les traitements proposés à l'heure actuelle. Le deuxième chapitre traite des canaux ioniques susceptibles d'être des cibles moléculaires intéressantes pour le traitement des neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine. En effet, de par leur rôle dans l'activité neuronale, leur localisation, leur variation de niveau d'expression sous l'action de l'oxaliplatine, les canaux HCN1, HCN2 et TREK-1 sont apparus comme des candidats intéressants. La première sous-partie de ce 2^e chapitre sera donc consacrée à l'implication des canaux HCN1 & HCN2 dans la forme aiguë de la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine et la 2^e sous partie à l'implication du canal TREK-1 dans la forme chronique.

Chapitre I :

Douleur & chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

Chapitre I : Douleur & chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

1) Neurophysiologie de la douleur

a) Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs

La perception de la douleur émane d'un système sensoriel chargé d'une fonction spécifique : la conservation de l'intégrité corporelle. Pour cela, le circuit de la douleur emprunte plusieurs voies souvent redondantes opérant selon un mode commun aux systèmes sensoriels. Ces multiples voies nociceptives s'articulent toutes de la même façon et visent à véhiculer un message nociceptif partant d'un stimulus périphérique jusqu'à la perception de la douleur par le cerveau.

Les messages nociceptifs sont générés au niveau des terminaisons libres des fibres nerveuses, constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires ainsi que dans les parois des viscères, par les récepteurs périphériques de la douleur ou « nocicepteurs ». Il existe différents types de nocicepteurs dont les nocicepteurs unimodaux, qui ne sont activés que par des stimulations mécaniques intenses, ce sont des mécanonocicepteurs électivement en relation avec les fibres A δ et les nocicepteurs polymodaux, de loin les plus nombreux qui répondent non seulement aux modalités mécaniques citées précédemment mais également à des stimulations de nature thermique ou chimique.

Le système nociceptif est donc capable de répondre à une grande diversité de stimulations : mécanique, thermique ou encore chimique. Une fois le signal électrique créé, le message nociceptif est alors pris en charge par les fibres nerveuses afférentes primaires, contenues dans les nerfs sensitifs et mixtes. Ces fibres nerveuses correspondent aux prolongements axonaux des premiers neurones ou « protoneurones » dont les corps cellulaires sont situés dans le ganglion spinal (DRG) ou le ganglion trigéminal (TG) en fonction de la zone

(respectivement extracéphalique ou céphalique) recevant la stimulation nociceptive. Ces fibres sensibles ne sont pas uniformes ; elles propagent le signal sensoriel à des vitesses de conduction différentes, proportionnelles à leur diamètre et à l'épaisseur de leur gaine de myéline (Gasser, 1941). La sensation douloureuse résulte de la mise en jeu des fibres à conduction lente : les fibres faiblement myélinisées A δ et les fibres C, non myélinisées. Les fibres C sont les plus nombreuses puisqu'elles constituent la majorité des fibres afférentes cutanées et la quasi-totalité des fibres afférentes viscérales. Cette distribution varie en fonction des structures. Bien que fonctionnellement proches, les TGs et les DRGs ont une origine embryologique distincte et présentent des différences anatomiques notamment avec 50% de fibres afférentes myélinisées pour les TGs et seulement 20% pour les DRGs. Des différences moléculaires existent également avec une différence d'expression de certains canaux ioniques en basal (**Figure 1**)(Vandewauw et al., 2013).

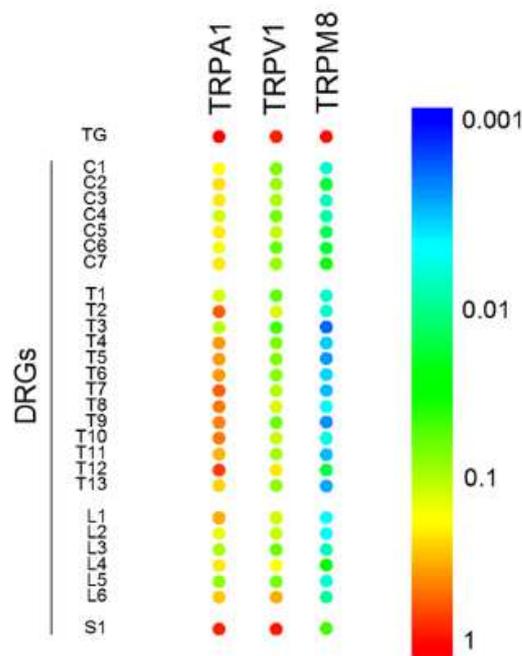


Figure 1 : Expression de certains TRP dans chaque ganglion du TG jusqu'au DRG sacré (S1).

Chaque TG/DRG est représenté par un point et le niveau d'expression est représenté par une couleur allant du bleu (faible expression) au rouge (forte expression) selon l'échelle à droite du schéma (C : cervical ; L : lombaire ; S sacré).

Les 2 types de fibres fines A δ et C sont à l'origine de la perception sensorielle douloureuse. L'activation des fibres A δ provoque une douleur rapide bien localisée permettant le déclenchement immédiat d'un réflexe protecteur de retrait. Les fibres C sont quant à elles,

responsables d'une douleur plus tardive (liée à la vitesse de conduction), à localisation plus diffuse traduisant d'une lésion tissulaire persistante (**Figure 2**) (Guirimand and Le Bars, 1996).

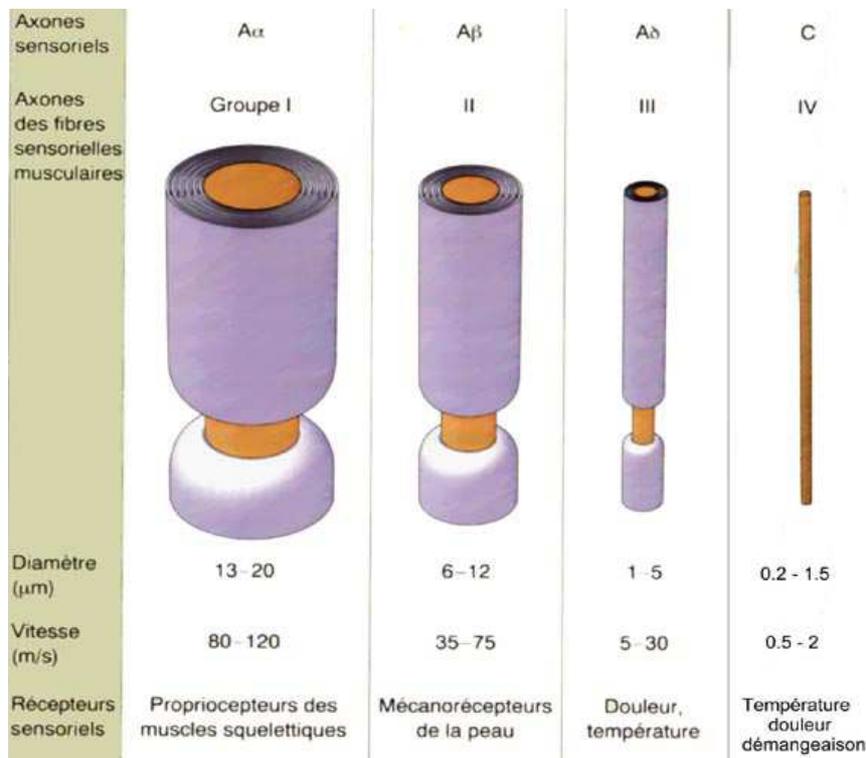


Figure 2 : Caractéristiques des différents types de fibres afférentes primaires (ens-lyon.fr/biotic/neuro/douleur).

Les fibres sont classées en fonction de leur sensibilité en différents groupes de fibres A, B et C (les fibres B ont volontairement été omises). Des sous-groupes existent également répartis en fonction du diamètre avec présence (fibres A) ou non (fibres C) de myéline et leur vitesse de conduction.

Toutes les fibres afférentes possèdent un corps cellulaire au niveau du ganglion spinal situé sur la racine dorsale. L'ensemble de ces afférences du système nerveux périphérique gagnent la moelle spinale par ses racines dorsales ou leurs équivalents au niveau des nerfs crâniens. La terminaison de l'axone du premier neurone se fait donc au niveau de la substance grise spinale, subdivisée en différentes couches (de I à X) selon la nomenclature de Rexed (Rexed, 1952). Ainsi les fibres de gros calibres myélinisées (A α et A β) se projettent dans les couches III, IV et V (Le Bars and Adam, 2002), entraînant ensuite des connexions avec les motoneurones responsables du réflexe de retrait et les neurones du système lemniscal responsable des sensibilités tactiles et proprioceptives. Concernant les fibres de petits calibres A δ et C, elles font synapse avec deux types de neurones : les neurones nociceptifs spécifiques situés dans la couche I et II et les neurones nociceptifs non spécifiques situés dans la couche V.

Les neurones nociceptifs spécifiques sont exclusivement activés par des stimulations nociceptives cutanées, mécaniques et /ou thermiques et les axones de ces neurones se regroupent pour former la voie néospinothalamique. Les neurones nociceptifs non spécifiques reçoivent des informations non nociceptives et nociceptives et sont capables d'augmenter la fréquence des influx nerveux émis en fonction de l'intensité du stimulus. A partir d'un certain seuil d'activité, le message devient nociceptif. Les axones de ces neurones nociceptifs non spécifiques formeront la voie paléospinothalamique. Cette dernière a une origine évolutive plus ancienne que la voie néospinothalamique constituée des neurones spécifiques, toutes les deux moins anciennes que la voie archispinothalamique.

Ces neurones nociceptifs médullaires constituent les 2^e neurones de la voie nociceptive et vont ensuite projeter leurs informations au neurone thalamique (3^e neurone de la voie nociceptive) par l'intermédiaire de leurs axones regroupés en faisceaux nerveux ascendants. Les voies véhiculant le message nociceptif, aussi appelées voies extra-lemnisciales sont composées des 3 voies citées précédemment : les voies archi-, paléo- et néo-spinothalamiques impliquées dans les composantes sensori-discriminatives, végétatives ou encore cognitivo-émotionnelles de la douleur (Le Bars and Adam, 2002; Basbaum et al., 2009).

Phylogénitiquement, la voie archispinothalamique est la plus ancienne et contribue aux réactions viscérales, autonomes et émotionnelles de la douleur. La voie paléospinothalamique est composée de fibres de petit calibre à conduction lente et est impliquée dans l'éveil du système nerveux central par le système réticulaire ascendant et l'activation de certains noyaux du tronc cérébral impliqués dans les voies descendantes du contrôle de la douleur. Les projections de cette voie vont toucher différentes régions corticales à savoir les cortex frontal, cingulaire et insulaire. La voie néospinothalamique (ou spinothalamique) est responsable de la perception de la nature du stimulus douloureux, de sa localisation et véhicule la sensation de température. Contrairement aux deux autres voies, les neurones nociceptifs spécifiques qui composent cette voie spinothalamique vont décussier (croisement sur la ligne médiane) du côté controlatéral de la moelle. La conséquence fonctionnelle de ce croisement anatomique est que le cerveau droit reçoit et perçoit les informations douloureuses provenant de l'hémicorps gauche et inversement. Les deux autres voies archi- et paléospinothalamiques montent directement du même côté (**Figure 3**).

L'ensemble des axones pénètrent ensuite dans le bulbe rachidien où ils sont rejoints par les axones du noyau spinal du trijumeau véhiculant la sensibilité nociceptive de la face ainsi que par la voie lemniscale responsable du toucher et de la proprioception.

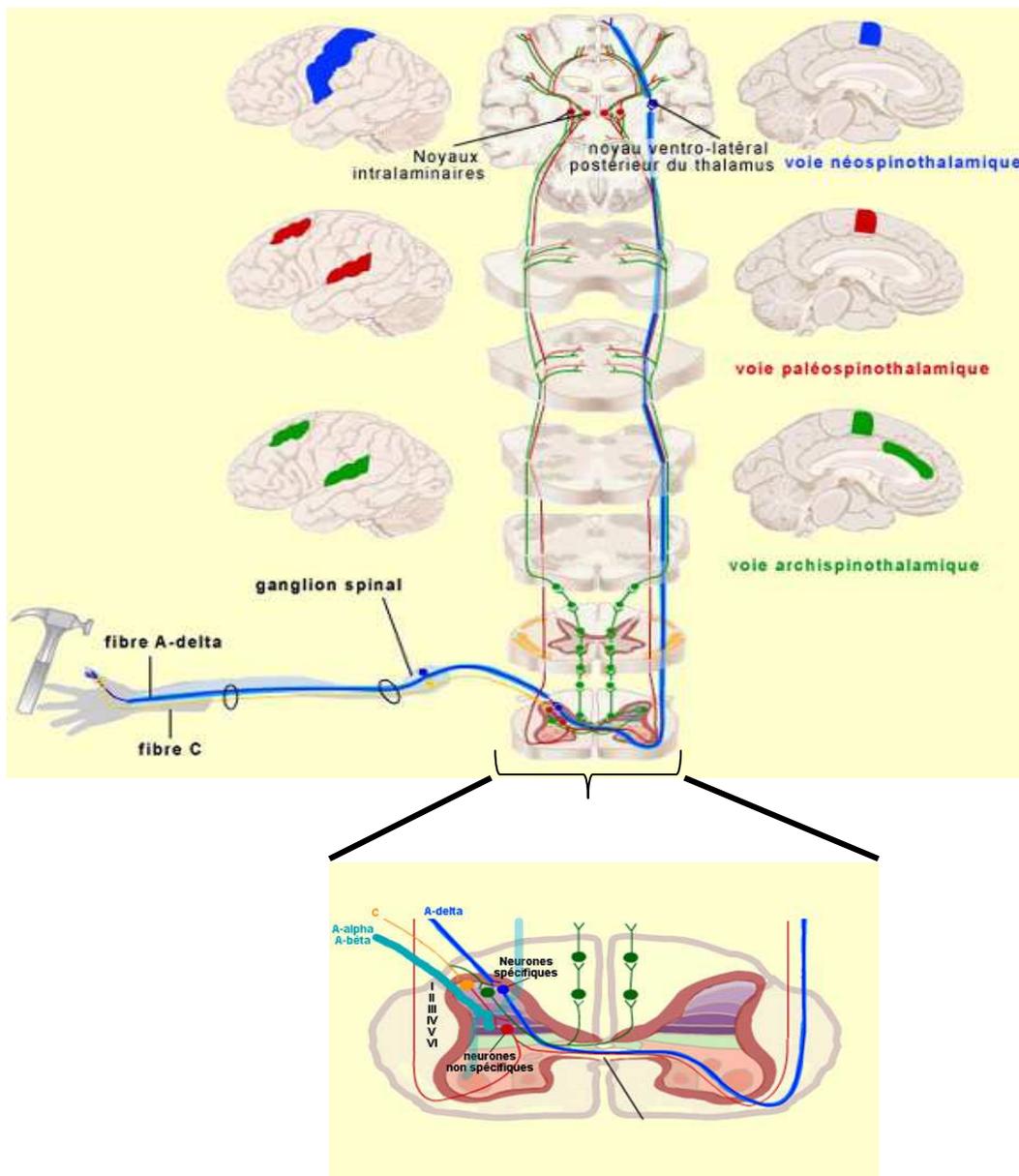


Figure 3 : Mise en jeu des voies de la douleur suite à un stimulus douloureux (adapté de <http://lecerveau.mcgill.ca>)

Sur ce schéma figurent les voies de la douleur, depuis la terminaison cutanée jusqu'aux structures supraspinales. Chaque voie possède 3 niveaux correspondants à un circuit de 3 neurones : le premier étant une FAP, puis le second avec le neurone de second ordre (ou spino-thalamique) et le 3^e appelé neurone de troisième ordre ou thalamo-cortical.

Les structures cérébrales dites supraspinales impliquées dans les mécanismes de transmission et de perception de la douleur, sont multiples. Parmi elles, le thalamus est le lieu de convergence des axones de la voie spinothalamique et est considéré comme un centre de triage de l'information sensitive. L'hypothalamus, le cortex somesthésique ainsi que le système limbique jouent également un rôle important en tant que centres d'intégration, de discrimination, et de mémorisation de la douleur.

b) Nociception périphérique et extracéphalique

Les douleurs périphériques mettent en jeu les nerfs spinaux (anciennement appelés nerfs rachidiens), nerfs émergeant uniquement de la moelle épinière. Chaque nerf spinal est formé par la réunion de deux racines rachidiennes, l'une dorsale sensitive et l'autre ventrale motrice. Il s'agit donc d'une voie nerveuse mixte (nerfs sensitifs et moteurs). Les racines spinales dorsales présentent un renflement appelé ganglion spinal dans lequel se trouvent les corps cellulaires des neurones sensitifs. Chaque ganglion reçoit des afférences d'un territoire cutané délimité sur la surface du corps, ces territoires sont organisés en bandes plus ou moins parallèles, appelées dermatomes sensitifs (Figure 4).

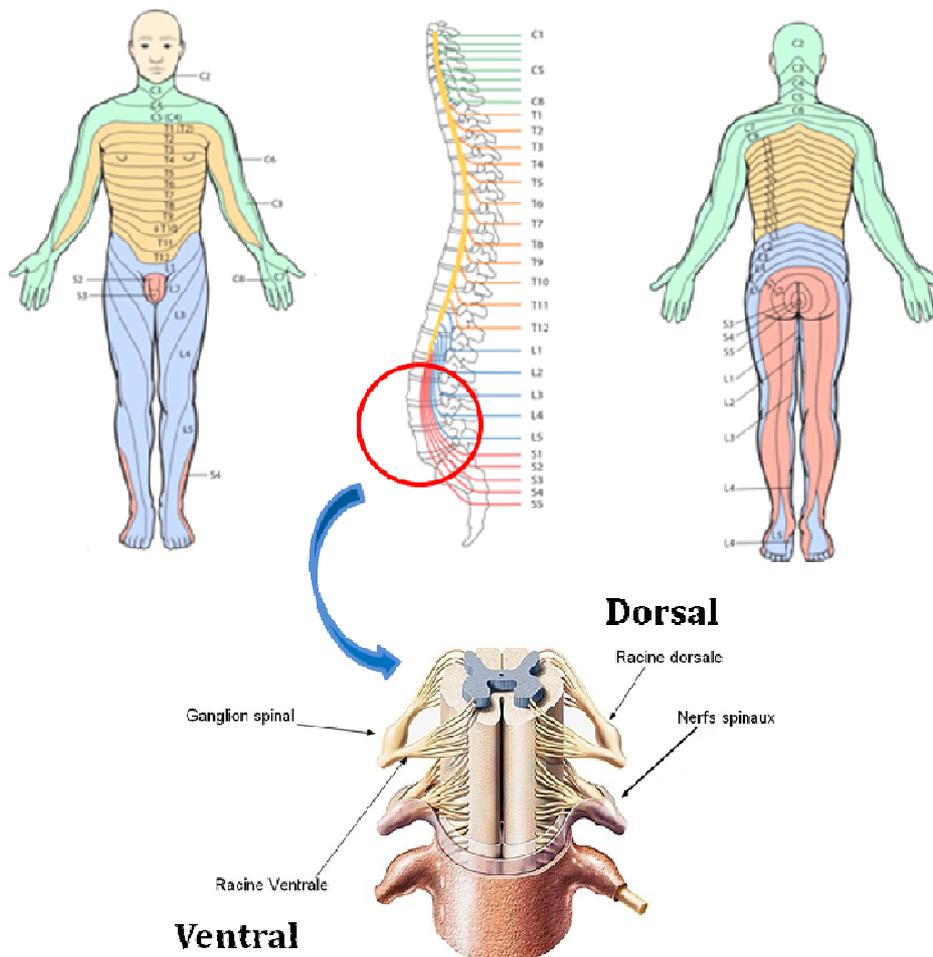


Figure 4 : Organisation de l'innervation périphérique par les nerfs spinaux

Les 31 paires de nerfs rachidiens sont représentées ici au centre de la figure avec la représentation des dermatomes associés. L'agrandissement représente l'innervation de la moelle épinière par les FAP et l'organisation de la structure des nerfs périphériques selon l'axe dorsal/ventral.

Le nerf spinal émerge de la colonne vertébrale, entre deux vertèbres par le foramen intervertébral. Les sept premiers nerfs spinaux (C1 à C7) émergent par le canal vertébral respectif, c'est-à-dire, C1 sort au-dessus de la première vertèbre cervicale, C2 au-dessus de la deuxième, etc. Le nerf spinal C8 sort lui en dessous de la septième et dernière vertèbre cervicale (C7) puis les nerfs spinaux thoraciques et lombaires émergent en dessous des vertèbres correspondantes. Chaque nerf spinal se divise ensuite en deux rameaux : un rameau dorsal qui innerve les téguments et les muscles du dos et un rameau ventral, plus gros (sauf pour C1 et C2 dont les rameaux dorsaux ont un calibre plus important), qui innerve la peau et les muscles de la face ventrale du corps et des membres.

L'ensemble des fibres composant ces nerfs spinaux va ensuite converger vers la moelle épinière via leurs racines dorsales respectives, faire synapse avec les 2^e neurones qui seront chargés de relayer l'information nociceptive aux centres supraspinaux.

c) Nociception trigéminal

Les informations douloureuses et thermiques en provenance de la zone céphalique (tête, visage, bouche ...) sont transmises au cerveau par un système similaire mais distinct de celui présent au niveau de la moelle épinière. Les douleurs associées à la sphère orofaciale sont nombreuses et ont en commun de survenir dans un territoire dont l'innervation somesthésique dépend d'une seule des 12 paires de nerfs crâniens, le nerf trijumeau. Cette sensibilité cutanéomuqueuse de la face et de la bouche est donc assurée par les 3 branches composant le nerf trijumeau (V) : le nerf ophtalmique (V1), le nerf maxillaire (V2) et le nerf mandibulaire (V3). Ces fibres nociceptives ou premiers neurones de ce complexe trigéminal sont composées de fibres A δ et C, les fibres trigéminales étant composées de 40% de fibres C (**Figure 5**).

Les corps cellulaires de ces fibres sont situés dans le ganglion trijumeau (ou de Gasser) et dans d'autres ganglions associés aux nerfs crâniens VII, IX et X. Toutes ces fibres se projettent ensuite sur le complexe sensitif du trijumeau divisé en 2 noyaux : le noyau principal situé dans la protubérance et le noyau spinal qui s'étend sur toute la hauteur du bulbe rachidien jusqu'au 3 premiers segments cervicaux de la moelle. Ce noyau spinal est lui même divisé en 3 sous-noyaux dont le sous-noyau caudal ayant un rôle dans le relais des informations nociceptives et périphériques (Darian-Smith and Mayday, 1960).

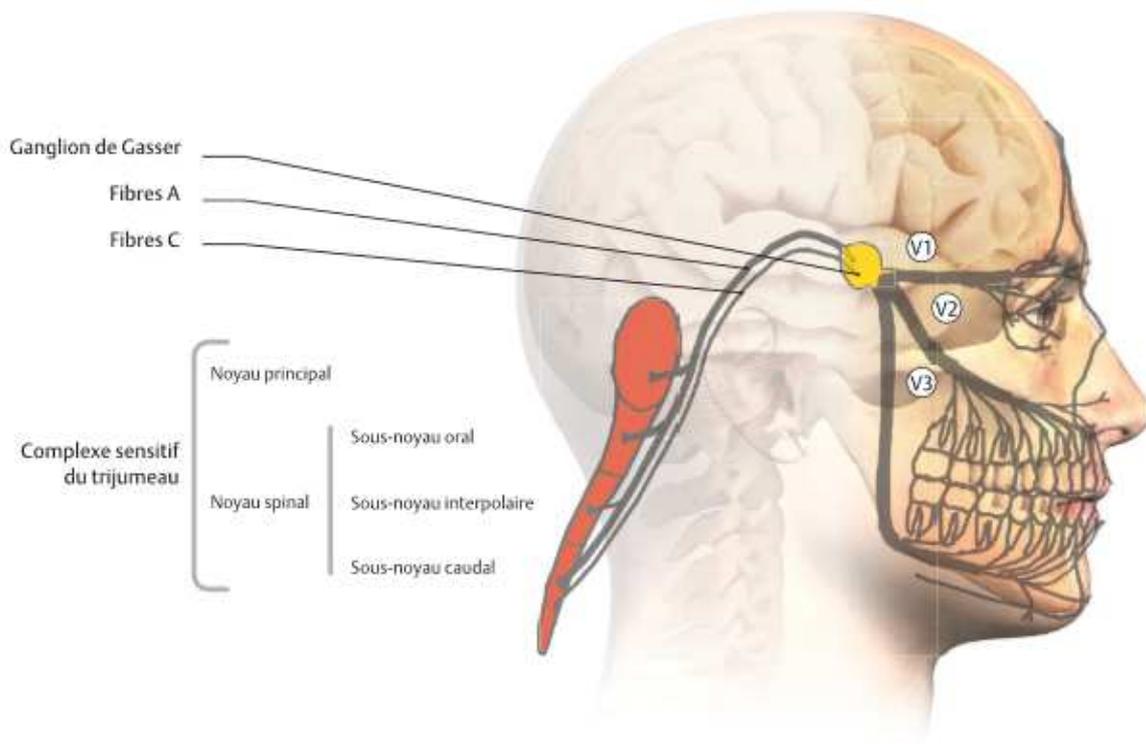


Figure 5 : Organisation du complexe trigéminal (Dallel et Lanteri-Minet, 2009)

L'innervation somesthésique de la face comprend le ganglion de Gasser (ou ganglion trigéminal) et les trois branches de la cinquième paire de nerfs crâniens à qui il donne naissance (V1: nerf ophtalmique, V2: nerf maxillaire, V3: nerf mandibulaire). Les FAP de ce ganglion font synapse avec un neurone de second ordre au niveau du noyau du nerf trijumeau.

Au niveau de ce complexe sensitif du trijumeau, les axones du nerf V font alors synapse avec le 2^e neurone du circuit. Il s'agit d'un ensemble de cellules nerveuses de second ordre principalement localisées dans les couches I, II et V du sous-noyau caudal et dans le sous-noyau oral qui sont capables de répondre aux stimuli nociceptifs. Comme dans la moelle épinière, les axones de ce 2^e neurone vont traverser la ligne médiane et le message nociceptif sera alors véhiculé du côté contralatéral via le thalamus par le faisceau trigéminothalamique jusqu'aux structures supérieures (cortex cérébral, amygdale & hypothalamus) qui participent à l'intégration de différents aspects: sensori-discriminatif et affectivo-émotionnel, pour donner lieu à une expérience douloureuse (Dallel et al., 2003). Dans toutes les structures supérieures, le message nociceptif est modulé, amplifié ou inhibé en fonction de la situation physiologique, émotionnelle, cognitive du sujet et des autres messages sensoriels qu'il reçoit. Des systèmes modulateurs descendants peuvent alors être mis en jeu dans l'activation et la modulation de ce message.

d) Mécanismes physiopathologiques des douleurs neuropathiques

La douleur neuropathique résulte d'une lésion et/ou d'une irritation de l'un des éléments constitutifs, périphérique et/ou central, des voies nociceptives ou d'une maladie affectant le système somatosensoriel (Treede et al., 2008). Ce terme inclut des dysfonctionnements des voies nociceptives qui génèrent des sensations anormales qui sont ressenties comme douloureuses, en l'absence de dégât tissulaire apparent. Les douleurs neuropathiques, qui sont indépendantes des phénomènes inflammatoires, peuvent néanmoins conduire à une hyperexcitabilité périphérique sous l'effet direct des lésions des fibres périphériques. Ces douleurs peuvent être aiguës mais sont le plus souvent chroniques.

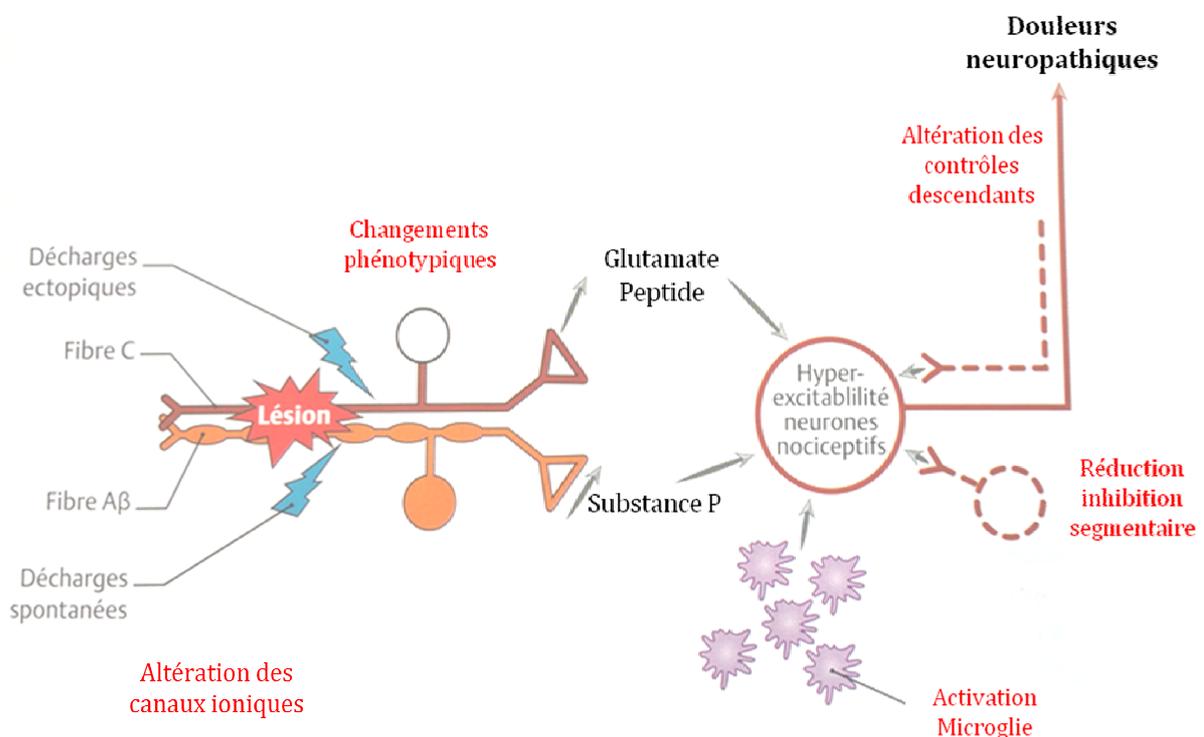


Figure 6 : Mécanismes physiopathologiques périphériques et centraux à l'origine des douleurs neuropathiques

Une lésion nerveuse entraîne des modifications périphériques notamment des décharges spontanées et ectopiques avec la mise en jeu de certains canaux ioniques et des modifications centrales correspondant à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs de la corne postérieure de la moelle entraînant ainsi la libération de nombreux médiateurs (Adapté de D. Bouhassira, 2009).

Une des conséquences d'une lésion nerveuse périphérique est l'apparition d'activités électriques anormales au sein des fibres lésées, car apparaissant en l'absence de stimulation périphérique. De telles activités, dites ectopiques car elles ne sont pas générées au niveau des terminaisons nerveuses, peuvent, dans les conditions pathologiques, naître directement au

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

niveau des corps cellulaires localisés dans les ganglions rachidiens (Baron et al., 2010). De telles décharges aberrantes sont vraisemblablement liées pour une large part à des remaniements des

canaux ioniques, localisés dans ces ganglions, qui règlent l'excitabilité membranaire. Il existe notamment, comme pour les douleurs inflammatoires, une surexpression et une accumulation de certains sous-types de canaux sodiques (les canaux Nav 1.3, 1.8, 1.9) au niveau de la lésion, qui pourraient entraîner un abaissement du seuil d'activation des fibres. La genèse des décharges ectopiques pourrait avoir aussi d'autres origines qui concerneraient notamment certains canaux potassiques ou encore les récepteurs de la famille TRP (*transient receptor potential*). D'autres modifications métaboliques localisées dans les ganglions spinaux, notamment la surexpression ou sous-expression de certains gènes impliqués dans la synthèse de neuropeptides utiles à la transmission ou la régulation du message nociceptif, pourraient également expliquer l'appartition de ce type de lésion.

D'autres transformations à caractère phénotypique ont également été décrites, de telle sorte que des fibres de gros calibres (fibres A β), qui véhiculent normalement les messages non nociceptifs, se « comportent » comme des nocicepteurs (les fibres fines de type C ou A δ) et synthétisent des neuropeptides pronociceptifs tels que la substance P ou le BDNF. Ainsi, dans les conditions pathologiques, les fibres de gros calibre pourraient aussi participer à la sensibilisation périphérique, participant ainsi à la modulation de l'intensité de la douleur.

Concernant les mécanismes centraux pouvant être responsables de douleurs neuropathiques, l'hypothèse principale est le développement d'une sensibilisation centrale, correspondant à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs centraux liée à des modifications directes de leurs propriétés électrophysiologiques. D'autres hypothèses suggèrent l'intervention de phénomènes de déshinhibition segmentaire avec les systèmes de modulation issus de nombreuses structures cérébrales pouvant faciliter ou inhiber la transmission médullaire des messages nociceptifs. L'hyperexcitabilité des neurones nociceptifs pourrait également dépendre de mécanismes neuro-immunitaires entraînant l'activation des cellules gliales et astrocytaires (**Figure 6**).

e) Douleur neuropathique et cancer

Nombreuses sont les causes des douleurs neuropathiques. Parmi elles, la maladie cancéreuse peut engendrer plusieurs types de douleurs neuropathiques d'origine tumorale ou

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

iatrogène. La prévalence de ce type de douleur reste difficile à évaluer du fait de la multiplicité des origines possibles ; il est cependant estimé qu'au cours de la maladie cancéreuse, 35 à 50% des patients montrent une atteinte du système nerveux (Manfredi et al., 2003). De plus, il est

relativement difficile de reconnaître la composante neuropathique parmi l'ensemble des autres symptômes auxquels sont exposés les patients atteints d'un cancer.

Concernant l'origine tumorale de ces douleurs neuropathiques, il est connu que la tumeur peut léser le système nerveux, soit localement ou à distance, lié à la présence de métastases (Kanner, 2001). La symptomatologie douloureuse peut donc être liée à un envahissement tumoral local expliqué par un infiltrat de cellules néoplasiques ou une compression du système nerveux par la masse tumorale donnant lieu à une atteinte neurologique progressive accompagnée de dysesthésies puis l'apparition d'une douleur neuropathique plus intense et plus constante. De même que pour la tumeur primitive, l'envahissement local secondaire par les métastases est à l'origine d'atteintes du système nerveux via des mécanismes similaires tels que des phénomènes de compression et apparition de plexopathies (lorsque l'atteinte touche les plexus nerveux). Egalement lié à la présence d'un cancer mais sans lien avec un envahissement tumoral ou une complication connue, des douleurs neuropathiques dites paranéoplasiques peuvent apparaître. Dans cette catégorie, plusieurs sous groupes sont à dénombrer avec les polyneuropathies paranéoplasiques dont celle de Denny-Brown qui est souvent à l'origine de la découverte de la pathologie cancéreuse chez le patient, les douleurs neuropathiques liées à la cachexie¹, l'immobilisation parfois prolongée du patient et le zona, pathologie à risque plus élevé chez le patient cancéreux (**Figure 7**) (Antoine, 2001; Mallecourt and Delattre, 2000).

L'ensemble des traitements du cancer, que ce soit la chirurgie, la radiothérapie ou encore la chimiothérapie, peut être à l'origine de douleurs neuropathiques iatrogènes du cancer. La chirurgie, visant à l'ablation tumorale, peut être à l'origine de plusieurs types de neuropathies post-chirurgicales allant de la douleur fantôme (lié à l'ablation d'un sein par exemple) aux douleurs causées par des lésions nerveuses ne pouvant être évitées durant la chirurgie. Concernant la radiothérapie, le but premier est de causer l'irradiation de la tumeur mais malheureusement certaines autres structures différentes de la tumeur sont touchées avec par exemple une atteinte des fibres nerveuses. Ces manifestations sont dose-dépendantes et d'apparition retardée par rapport au traitement. Enfin, l'utilisation de chimiothérapies neurotoxiques est la cause de polyneuropathies toxiques, sensibles ou sensitivo-motrices (Avan

¹ Affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, atrophie musculaire)

et al., 2015; Kudlowitz and Muggia, 2014; Miltenburg and Boogerd, 2014). Les polyneuropathies liées à l'utilisation des vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine & vindésine) touchent principalement les petites fibres sensibles, avec une apparition rapide environ 1 mois

après le début du traitement. Les taxanes (paclitaxel, docetaxel) causent eux aussi une neurotoxicité aiguë, dose-dépendante (275 mg/m²) avec une atteinte des grosses fibres tout comme les sels de platines. Ces derniers, notamment le cisplatine et le carboplatine, sont responsables d'une atteinte dose limitante (300 à 400 mg/m²) retardée. L'oxaliplatine, que nous décrirons plus en détails dans le chapitre suivant, présente un profil particulier avec 2 évolutions différentes consistant en une toxicité immédiate et réversible ainsi qu'une toxicité plus tardive à l'origine du développement d'une neuropathie chronique. Cette atteinte chronique dépend de la dose cumulée (environ 6 cycles) et peut parfois s'avérer irréversible. L'existence d'une allodynie thermique froide est également caractéristique. Une adaptation du traitement (posologie, dose) peut permettre de limiter l'apparition de certaines de ces neuropathies iatrogènes mais seule une bonne compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués devrait permettre de trouver des cibles moléculaires pour le traitement ou la prévention de ces effets indésirables.

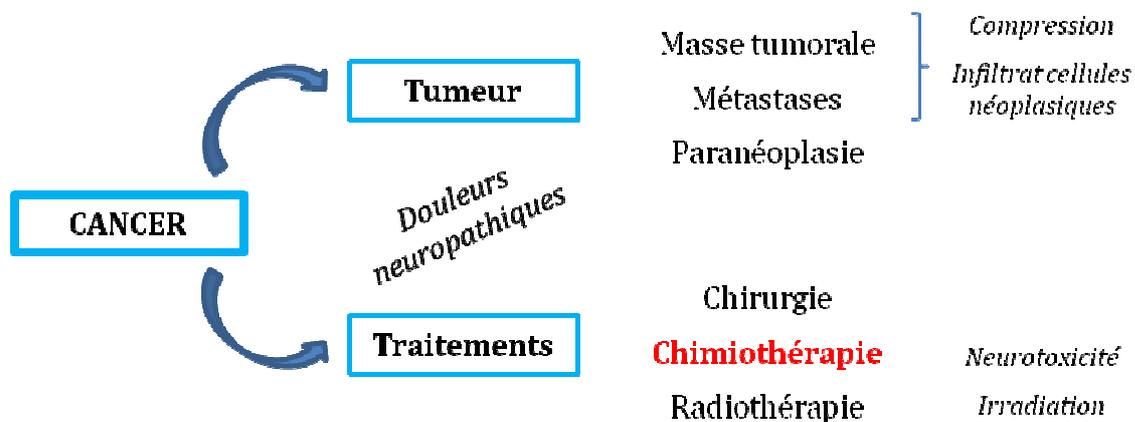


Figure 7 : Etiopathogénie des douleurs neuropathiques cancéreuses

La maladie cancéreuse elle-même peut être à l'origine de la symptomatologie douloureuse liée à l'envahissement tumoral lui-même, la compression mécanique d'un organe ou d'un nerf ou les atteintes d'organes secondaires par des métastases. Egalement, les traitements quels qu'ils soient peuvent être à l'origine d'une lésion nerveuse à l'origine de ces douleurs.

f) Pharmacologie des douleurs neuropathiques

En France, la prévalence des douleurs neuropathiques notamment chroniques (≥ 3 mois) est estimée à 7% de la population générale. Le taux passe à 5% si on tient compte uniquement des douleurs d'intensité modérée à sévère. Au stade de douleur neuropathique, la lésion du

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

système nerveux est avérée et les traitements proposés serviront à réduire l'intensité douloureuse mais aussi les incapacités qui en découlent. La prise en charge de la douleur neuropathique est complexe et reste encore aujourd'hui peu efficace avec des traitements essentiellement empiriques.

Les traitements de première intention ont déjà démontré leur efficacité dans plusieurs études randomisées contrôlées. Parmi eux, les antidépresseurs tricycliques comptent parmi les plus utilisés pour le traitement des douleurs neuropathiques périphériques et centrales (Attal and Bouhassira, 2015; Finnerup et al., 2015). En pratique, l'amitriptyline (Laroxyl®), la clomipramine (Anafranil®) et l'imipramine (Tofranil®) sont souvent le 1^{er} choix, vu leur efficacité démontrée et leur coût assez faible par rapport aux autres traitements. Ces traitements agissent essentiellement sur les systèmes de modulation de la douleur notamment sur les contrôles inhibiteurs descendants monoaminergiques. Ces molécules présentent des effets indésirables (sécheresse buccale, constipation, sueurs ...) dépendants de la dose administrée. Les antidépresseurs de la classe des inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline sont également largement prescrits avec une indication majoritaire pour la neuropathie diabétique. Leur mécanisme d'action réside sur le renforcement des inhibiteurs descendants monoaminergiques de la douleur. Parmi ces molécules, la duloxétine possède une AMM pour cette indication et a montré son efficacité dans plusieurs études (Lunn et al., 2014; Pergolizzi et al., 2013). Elle présente également des effets indésirables mineurs tels que des nausées, une constipation ou une diarrhée, une inappétence et parfois une sécheresse buccale et une somnolence. La venlafaxine, inhibiteur mixte de la recapture des monoamines, est également prescrite dans cette indication mais présente des effets indésirables plus importants comme des troubles digestifs intestinaux et une augmentation de la tension artérielle. Malgré leur efficacité souvent partielle, l'utilisation des antidépresseurs pour le traitement des douleurs neuropathiques reste à l'heure actuelle la meilleure alternative.

Toujours en traitement de première intention, la classe des antiépileptiques, notamment la gabapentine et la prégabaline, est utilisée dans le traitement de la douleur neuropathique périphérique et centrale notamment pour les neuropathies diabétique et post-zostérienne. Leur mécanisme d'action réside sur la réduction des phénomènes de sensibilisation centrale ou sur les contrôles modulateurs de la douleur. Des effets indésirables sont également observables incluant une fatigue/somnolence, une impression vertigineuse, des œdèmes périphériques, une sécheresse buccale et des céphalées.

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

Les analgésiques morphiniques (oxycodone, méthadone, morphine) et le tramadol figurent également dans les traitements des douleurs des polyneuropathies (Attal et al., 2010). L'utilisation de ces molécules est souvent limitée par leurs effets indésirables. D'autres médicaments sont parfois proposés mais ne sont pas des traitements de premier choix à cause

d'un manque de preuve de leur efficacité, de leurs effets indésirables ou encore de leurs coûts élevés.

Concernant le traitement des neuropathies cancéreuses iatrogènes, celles-ci ne semblent pas répondre aux traitements classiques utilisés pour les autres neuropathies. La complexité et les nombreux mécanismes expliquant l'apparition de ces neuropathies cancéreuses iatrogènes peuvent en partie expliquer que les traitements actuels soient inefficaces (**Annexe 1**). En effet, les possibilités de cibles thérapeutiques sont nombreuses afin de limiter les lésions de l'ADN, les altérations des systèmes de réparation cellulaire, les changements mitochondriaux, l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), la modulation de la signalisation glutamatergique, les altérations de canaux ioniques, l'activation ectopique de nocicepteurs et de cascade de MAP-kinases qui représentent l'ensemble des événements connus pouvant être déclenchés suite au traitement par une chimiothérapie cytotoxique. De récentes méta-analyses ont d'ailleurs démontré qu'aucun traitement standard n'existait à ce jour pour la prévention et le traitement de ces neuropathies chimio-induites à l'exception de la duloxétine s'avérant parfois efficace (Hershman et al., 2014).

2) Méthodes d'exploration de la douleur chez l'animal

La complexité des douleurs, qu'elles soient aiguë ou chronique, d'origine inflammatoire, neuropathique, viscérale, postopératoire ou encore cancéreuse reste difficile à étudier. Ceci explique la grande diversité des modèles animaux utilisés lors des études précliniques afin de mimer le plus fidèlement possible les symptômes des différentes pathologies observées en clinique. Ces modèles sont principalement utilisés pour l'étude des mécanismes intégrés de la douleur et l'évaluation préclinique de nouveaux antalgiques. Ces modèles de douleur sont très pertinents, mais cependant, la prédictibilité clinique de ces modèles, notamment en terme d'efficacité des antalgiques, se révèle parfois décevante. La disparité des protocoles utilisés ainsi que la difficulté dans l'évaluation de la douleur dans la littérature peuvent expliquer ce constat.

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

La compréhension de la douleur est un enjeu majeur justifiant la grande diversité des modèles animaux. Avec le développement de la génétique, de l'étude de nombreux mécanismes moléculaires ou encore les approches d'électrophysiologie, il est facile d'imaginer que de nombreux nouveaux modèles vont voir le jour notamment chez la souris, afin de se rapprocher toujours plus des pathologies à étudier. Une amélioration de ces modèles ne suffit pas, le

raffinement des méthodes comportementales et de l'analyse des résultats est également à envisager.

Les descriptions suivantes concerneront les modèles animaux utilisés pour la réalisation de mes travaux de thèse à savoir l'utilisation d'animaux sain WT (wild type) ou KO (knock out) et de modèles cancéreux visant à étudier la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine, réaliser des approches pharmacologiques pour l'étude de molécules susceptibles d'améliorer les symptômes associés à cette neuropathie et vérifier que ces dernières n'interagissent pas négativement sur l'action de la chimiothérapie.

a) Animal sain

Des souris WT ont été utilisées dans notre cas, pour la mise au point d'un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine. L'ensemble des symptômes décrits en clinique que ce soit l'hypersensibilité douloureuse, le développement de troubles de la sensibilité ainsi que les manifestations morbides telles que l'anxiété et la dépression ont été étudiés dans ce modèle.

Les souris génétiquement modifiées (transgéniques et aux gènes inactivés) représentent également des outils précieux dans la plupart des domaines de la recherche médicale. La souris est un bon modèle pour mimer les symptômes de pathologie observés en clinique, car l'organisation de son ADN et l'expression de ses gènes sont très similaires à ceux de l'homme. Son système nerveux est d'ailleurs identique à celui de l'Homme et les souris souffrent d'un grand nombre de maladies identiques, notamment le cancer, le diabète et l'anxiété. Manipuler leurs gènes peut les amener à développer d'autres maladies qui ne les affectent pas de façon naturelle. Par conséquent, les recherches sur les souris ont permis de comprendre à la fois la physiologie humaine et les causes de la maladie. Dans notre cas et dans un but complémentaire à la réalisation de nos études pharmacologiques, l'utilisation de souris génétiquement modifiées en particulier pour le gène TREK-1 (et les autres membres de la famille des canaux K2P) ou

encore mGluR4 ont été des outils utiles à la compréhension du mécanisme d'action de certaines molécules.

b) Animal cancéreux - modèle de cancer colique : Modèle APC^{Min}

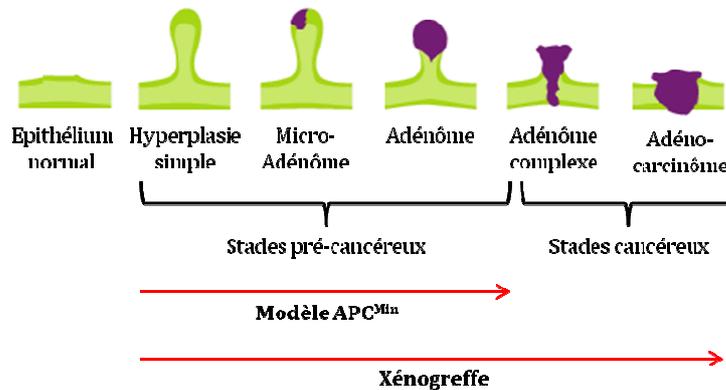


Figure 8 : Carncérogénèse colique - évolution du polype vers le cancer colorectal

Le cancer colorectal se développe sur la muqueuse du côlon ou du rectum. Le cancer est généralement précédé de lésions pré-cancéreuses : les polypes adénomateux, excroissances indolores qui prolifèrent sur la muqueuse intestinale selon un processus long qui s'étale sur plusieurs années.

Les souris APC^{Min} sont des oncosouris, c'est-à-dire qu'elles présentent une mutation spécifique qui les prédispose à développer un cancer. Ces souris sont essentielles pour la compréhension de nombreux cancers, pour le développement de techniques destinées à les traiter et dans notre étude, pour vérifier si l'utilisation de molécule visant à réduire les symptômes de la neuropathie induite par une chimiothérapie n'impacte pas l'effet de celle-ci sur le cancer en question.

Les souris APC^{Min} (adenomatous polyposis coli – multiple intestinal neoplasia) sont donc des animaux porteurs d'une mutation au niveau du gène APC, suppresseur de tumeur, les prédisposant au développement spontané de multiples adénomes intestinaux (**Figure 8**). Ces souris ne sont pas viables à l'état homozygote. Le séquençage de ce gène a permis d'identifier la transversion entre une thymine et une adénine au niveau du nucléotide 2549 engendrant une mutation non-sens avec le changement d'une leucine par un codon stop.

Il a été initialement rapporté que l'ensemble des souris hétérozygotes C57BL /6J-APC^{Min} suivant un régime riche en graisses développent plus de 30 adénomes à travers le tractus intestinal et la plupart meurent à l'âge de 120 jours. Les hétérozygotes développent également une anémie (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Certaines femelles APC^{Min} développent également des tumeurs mammaires mais les adénomes observés chez la souris APC^{Min}

Chapitre I : Douleur & Chimiothérapie

Chapitre I-1 : Neurophysiologie de la douleur

concernent principalement le côlon et l'intestin grêle (Cheung et al., 2010). La plupart des souris invalidées présentent quelques adénomes de petite ou moyenne taille à l'âge de 5 semaines, avec un nombre en constante augmentation jusqu'à l'âge de 8 semaines (Kettunen et al., 2003). Le diamètre des adénomes augmente de façon significative jusqu'à la 15^e semaine, âge auquel il est également observé que les mutants présentent un poids inférieur à une souris sauvage.

D'un point de vue clinique, le gène suppresseur de tumeur APC a été identifié dans les cancers colorectaux et la polypose adénomateuse familiale (PAF) chez l'Homme. La polypose adénomateuse familiale (PAF) est caractérisée par le développement d'adénomes du rectum ou du côlon par centaines ou milliers dans la deuxième décennie. Elle se manifeste dans les deux sexes, et représente moins de 1% des cancers colorectaux (CCR) avec un risque de 100% de CCR chez les porteurs de la mutation (Bisgaard et al., 1994).

Chapitre I :

Douleur & chimiothérapie

Chapitre I-2 : L'oxaliplatine (Eloxatine®)

Chapitre I-2 : L'oxaliplatine (Eloxatine®)

1) Généralités

a) Origine et structure

La découverte des platines a été faite par sérendipité. En effet, une expérience menée par un biophysicien du nom de Barnett Rosenberg a été à l'origine de cette découverte en 1965 (Monneret, 2011). En essayant de faire passer un courant électrique, grâce à des électrodes de platine, dans une culture d'*Escherichia coli*, il s'est alors rendu compte que les bactéries ne se multipliaient plus. Il a été démontré par la suite que la présence de sel de platine dans le milieu de culture était à l'origine de ce phénomène. La première génération de platine, incluant le cisplatine, a vu son utilisation clinique approuvée par la FDA en 1978. Des composés analogues ont ensuite vu le jour avec la 2^e génération comprenant le carboplatine mis sur le marché américain en 1989 et commercialisé par la firme Bristol-Myers Squibb. La dernière génération dont fait parti l'oxaliplatine a été découvert en 1976 par l'équipe du professeur Yoshinori Kidani à l'Université de Nagoya au Japon et sa mise sur le marché a été obtenue en France (1996), au Royaume-Uni (1999), aux États-Unis (2004) et au Japon (2005).

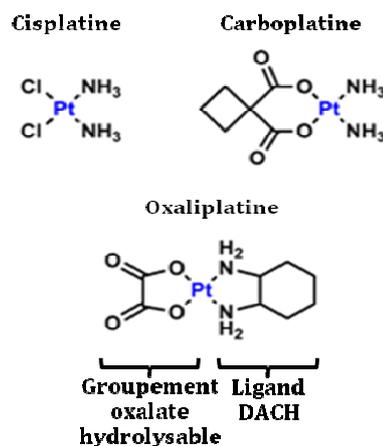


Figure 9 : Structure chimique comparée de l'oxaliplatine, du cisplatine et du carboplatine.

Les agents antinéoplasiques contiennent des complexes de platine actifs (Pt²⁺) ayant une structure commune. Le platine, généralement à l'état de Pt²⁺, est lié par des liaisons covalentes à deux substituants et datives aux deux autres, dont deux substituants azotés peu labiles et deux substituants labiles, chlorure ou carboxylate.

L'oxaliplatine (trans-[(1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-N,N']oxalato(2-)O,O'platinum ou Eloxatine®) est donc un anticancéreux de la classe des DACH platines de 3^e génération de part sa structure chimique originale qui lui confère des propriétés particulières et qui le distingue des générations précédentes. Il est constitué d'un groupement oxalate hydrolysable et d'un groupement 1,2-diaminocyclohexane (DACH) complexés autour d'un atome de platine (**Figure 9**). Sa formule chimique est $C_8H_{12}N_2O_4Pt$.

L'oxaliplatine se démarque des autres platines par son spectre d'activité anti-tumorale beaucoup plus large et est couramment utilisé dans le traitement du cancer colorectal et autres cancers digestifs. En effet, les autres dérivés de platine se sont révélés inactifs dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

b) Biotransformation

In vitro, la biotransformation de l'oxaliplatine résulte d'une série de dégradations non enzymatiques. De la même manière chez les patients, l'oxaliplatine subit une biotransformation complète. Plusieurs métabolites réactifs sont ainsi formés suite à l'hydrolyse du groupement oxalate, générant plusieurs composés bioactifs comme le monochloro-, dichloro-, diaquo-DACH platine (DACH-Pt) (Graham et al., 2000) et certains conjugués inactifs issus de la fixation irréversible de l'oxaliplatine avec des composés comme l'albumine, la cystéine, la méthionine et le glutathion réduit (Kweekel et al., 2005).

c) Mécanisme d'action

i) Pharmacocinétique

Au terme d'une perfusion de 2 heures, 15 % du platine administré est retrouvé dans la circulation systémique, les 85 % restants étant rapidement distribués dans les tissus ou éliminés dans les urines (Stein and Arnold, 2012). L'oxaliplatine a pour propriété de se fixer aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine et aux érythrocytes de façon irréversible (Mani et al., 2000) expliquant un temps de demi-vie érythrocytaire de l'oxaliplatine proche du temps de renouvellement naturel des hématies et de l'albumine sérique (29 à 50 jours). Ceci montre également que l'oxaliplatine ne diffuse pas dans le plasma une fois piégé dans les

hématies (Lévi et al., 2000) et perd son activité anti-tumorale. Le platine non fixé est dit ultrafiltrable, il représente le « platine libre » et représente la fraction active de la dose administrée (**Figure 10**).

Aucune accumulation du platine n'a été observée dans le plasma ultrafiltré après la perfusion de 85 mg/m² toutes les 2 semaines ou de 130 mg/m² toutes les 3 semaines et un état d'équilibre plasmatique est atteint au 1^{er} cycle de chimiothérapie avec une variabilité inter et intra-individuelle en général faible (Graham et al., 2000). La demi-vie plasmatique de l'oxaliplatine est brève (~ 14,1 minutes), ce qui s'explique par une hydrolyse excessive causée par la présence d'ions chlorure et une clairance rénale rapide (Alcindor and Beauger, 2011). L'élimination des dérivés de platines est triphasique, avec 2 phases rapides $t_{1/2\alpha}$ et $t_{1/2\beta}$ (respectivement 0.28-0.43h et 16.3-16.8h) dépendant de la dose administrée (85 ou 130mg/m²) correspondant à la clairance rapide de l'oxaliplatine et ses dérivés (diffusion dans les tissus et filtration glomérulaire). La dernière phase est plus longue avec 273-391h correspondant à la libération lente et progressive de platine (Morrison et al., 2000).

Concernant son élimination, le platine est principalement excrété dans l'urine, et la clairance survient principalement dans les 48 heures suivant l'administration et est corrélée directement au débit de filtration glomérulaire. A l'inverse du carboplatine, l'augmentation des doses d'oxaliplatine administrées n'a pas été corrélée à une augmentation de la toxicité rénale, indiquant qu'aucune modification de la posologie n'est nécessaire même chez les patients présentant une dysfonction rénale (Takimoto et al., 2003). Au 5^{ème} jour après l'administration, environ 53.8±9.1% de la dose totale a été récupérée dans l'urine et moins de 2.1±1.9% de la dose dans les fécès.

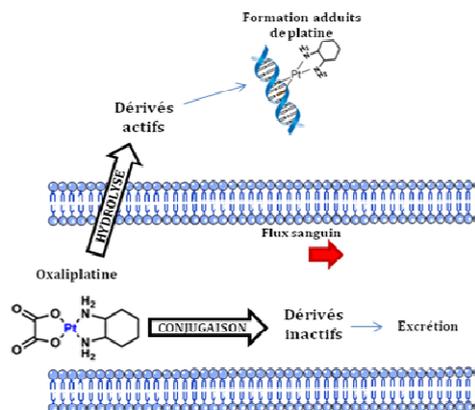


Figure 10 : Biotransformation et pharmacocinétique de l'oxaliplatine

Les réactions de biotransformations de l'oxaliplatine conduisent à la formation de métabolites actifs cytotoxiques après une réaction d'hydrolyse ainsi qu'à la libération d'oxalate, de conjugués inactifs, et de DACH libre après une réaction de conjugaison.

ii) Pharmacodynamie

Les dérivés actifs issus de la biotransformation de l'oxaliplatine sont capables d'interagir avec l'ADN, l'ARN ou encore les protéines (Graham et al., 2000). Ces interactions avec l'ADN sont à l'origine de la formation de liaisons covalentes croisées 1,2 ou 1,3-intra brins à la position N7 de 2 guanines adjacentes (GG) ou plus rarement d'une adénine et d'une guanine adjacente (AG) (**Figure 11**). Des adduits inter-brins sont également formés, mais en quantité bien plus faible. L'ensemble de ces liaisons forment des adduits de platines qui sont à l'origine de la perturbation de la synthèse de l'ADN (inhibition de la transcription, arrêt de la réplication et du cycle cellulaire et stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN et des voies de signalisation responsables de l'induction de l'apoptose). Le déclenchement de l'ensemble de ces mécanismes permet alors d'expliquer les effets cytotoxiques et antitumoraux de la chimiothérapie.

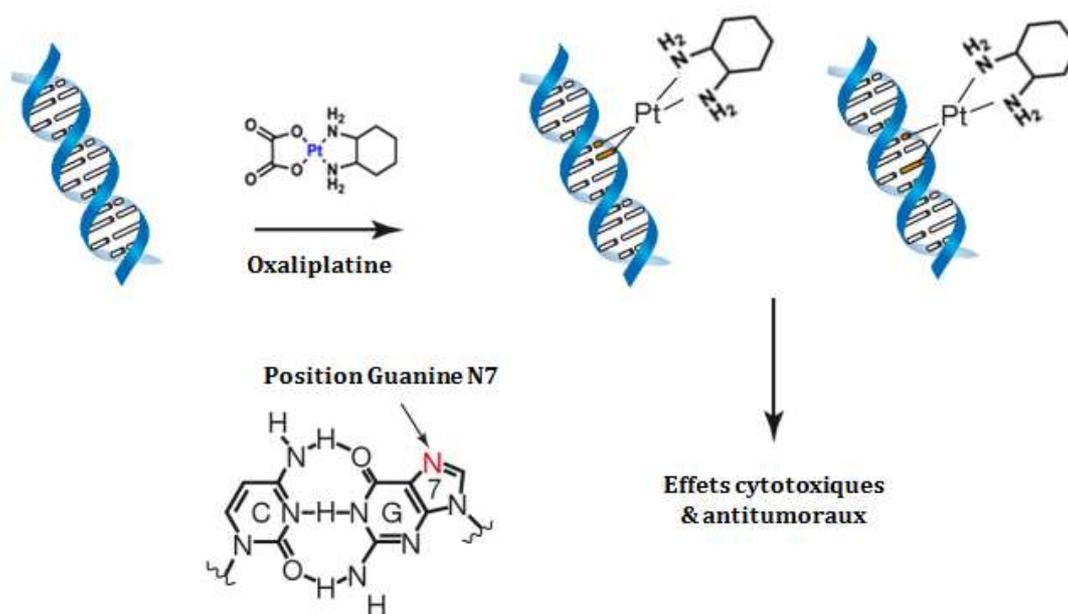


Figure 11 : Formation des adduits oxaliplatine-ADN

Les sels de platine forment des ponts intra- ou inter-brins (pontages) entre les deux chaînes de l'ADN. Les complexes ainsi formés sont appelés adduits et sont responsables de la cytotoxicité. Les adduits inhibent la réplication de l'ADN aboutissant à l'apoptose de la cellule.

L'oxaliplatine présente cependant une cytotoxicité supérieure à celle des adduits formés par les autres sels de platines. Des études ont montré qu'à doses équivalentes, l'oxaliplatine formait 2 à 10 fois moins d'adduits que les autres sels de platines (Faivre et al., 2003), suggérant l'existence de mécanismes et de lésions cellulaires différents avec une modification de la structure d'ADN plus importante que pour le cisplatine et des adduits Pt-ADN qui semblent plus

efficaces que les adduits cis-diamine-Pt-ADN causés par le cisplatine. En effet, l'oxaliplatine est capable de créer une distorsion de la double hélice provoquée par la fixation des dérivés de platine (Rixe et al., 1996; Todd and Lippard, 2009), bloquant ainsi plus efficacement la réplication et la transcription (Scheeff et al., 1999). Cette distorsion va être reconnue par les systèmes de réparation de l'ADN, notamment le MMR (Mismatch Repair) et le NER (Nucleotide Excision Repair). Ces systèmes se sont révélés moins efficaces dans la réparation des lésions liées à l'oxaliplatine par rapport aux dommages causés par les autres platines, pouvant expliquer l'efficacité de l'oxaliplatine sur des cancers résistants au cisplatine (Raymond et al., 2002).

Ces mécanismes de réparation sont à l'origine de la surexpression de p53, protéine capable d'initier deux voies apoptotiques différentes. La première, dite voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) fait intervenir la protéine p53 à l'origine de l'activation du cytochrome-c (la protéine Bax) présent dans les mitochondries. Lorsque la protéine Bax est en quantité suffisamment importante, il y a activation de l'apoptosome qui sera à son tour à l'origine de la mise en jeu d'une cascade responsable de l'activation des caspases effectrices, les caspases 3 (Arango et al., 2004). La seconde voie, dite voie extrinsèque (ou voie des récepteurs à domaines de mort) fait également intervenir p53, permettant la liaison du ligand Fadd à son récepteur Fas, composant le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) à l'origine de l'activation de la caspase 8 (Marchetti et al., 2004). Ces deux voies permettent d'aboutir à l'apoptose cellulaire (Figure 12).

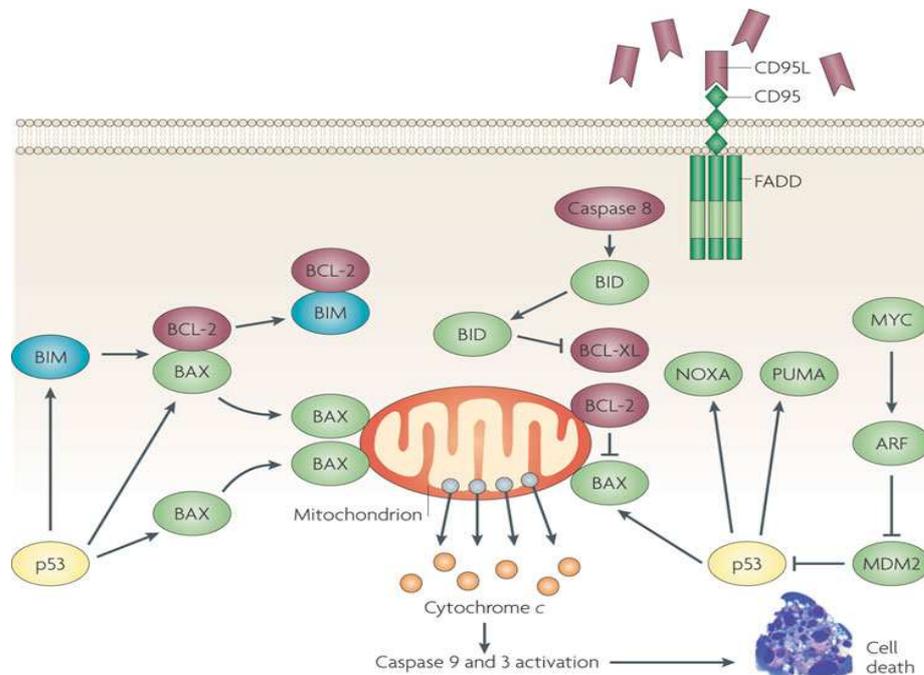


Figure 12 : Les voies de signalisations de l'apoptose (Cotter, 2009)

Deux voies intrinsèque et extrinsèque sont responsables de l'apoptose cellulaire et font intervenir la protéine p53 permettant ainsi l'activation du cytochrome-c et l'activation de caspases.

d) Pharmacologie clinique

i) Utilisation et posologie

L'oxaliplatine est majoritairement utilisé comme traitement adjuvant du cancer du colon au stade III (stade C de Dukes²) après résection complète de la tumeur initiale mais aussi comme traitement des cancers colorectaux métastatiques (Goldberg, 2004). La dose recommandée de l'oxaliplatine est de 85 mg/m² par voie intraveineuse répétée toutes les deux semaines pendant 12 cycles (6mois) en traitement adjuvant et jusqu'à régression de la maladie ou apparition d'une toxicité inacceptable dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. La dose sera ajustée en fonction de la tolérance. Des doses de 130mg/m² ou de 175 mg/m² libérées sur 5 jours répétées toutes les 3 semaines sont parfois utilisées. Communément, l'oxaliplatine est administré en perfusion I.V. de 2 à 6 heures dans 250 à 500 ml d'une solution de glucose 5% (50 mg/ml) afin d'obtenir une concentration comprise entre 0,2 mg/ml et 0,7 mg/ml; 0,7 mg/ml correspondant à la dose la plus communément utilisée de 85 mg/m².

L'oxaliplatine est parfois administré en monothérapie mais le plus souvent en association avec du 5 fluorouracile (5-FU) en perfusion continue. A cela s'ajoute l'acide folinique qui est utilisé pour stabiliser le complexe entre le 5-FU et la thymidine synthétase et permettre donc d'augmenter l'efficacité du 5-FU. L'association de ces 3 composés a pour acronyme FOLFOX avec différentes variantes développées afin de minimiser la toxicité de chacun des anticancéreux.

Au vue de l'efficacité de l'oxaliplatine sur les cancers colorectaux, de nouveaux essais cliniques ont été menés pour connaître son efficacité concernant d'autres cancers. Celle-ci a été démontrée pour les cancers oesophagiens (Yoon et al., 2015), des voies biliaires (Hwang et al., 2015), pancréatiques (Katopodis et al., 2014), hépatocellulaires (Sun et al., 2011) mais aussi ovariens (Herzog et al., 2014) et mammaires (Sun et al., 2012).

² Cancer étendu aux tissus péricoliques avec envahissement ganglionnaire

ii) Effets indésirables

Les toxicités les plus fréquemment rencontrées lors d'utilisation d'oxaliplatine en clinique sont les suivantes :

- À *une toxicité digestive* : les risques de vomissements sont moins importants qu'avec le cisplatine, mais justifient la prescription systématique d'antiémétiques puissants. Une toxicité particulière est la survenue fréquente de diarrhées qui peuvent être importantes et dont les effets sur l'hydratation du malade doivent être prévenus (Zafar et al., 2010).
- À *une toxicité hématologique* avec apparition d'une neutropénie de grade 3 à 4 (Cen et al., 2012) et une thrombopénie généralement peu sévère.
- À *une toxicité neurologique* avec l'apparition d'une neuropathie périphérique aigue caractéristique qui survient au cours ou dans les jours suivants la perfusion et une neuropathie chronique s'installant après plusieurs cures. Les symptômes caractérisant cette toxicité neurologique seront décrits plus précisément par la suite.

Pour comparer avec les autres sels de platine, l'oxaliplatine ne présente pas ou peu de toxicité auditive comme le cisplatine, il est moins néphro-toxique que le cisplatine et moins toxique pour la moelle osseuse que le carboplatine (Extra et al., 1998). Par contre, sa neurotoxicité est plus importante et représente une de ses particularités.

2) Neurotoxicité induite par l'oxaliplatine

a) Sémiologie

i) Neuropathie aigue

(1) Tableau clinique

Cette neuropathie touche près de 90% des patients et est responsable d'un ensemble de symptômes sensoriels comprenant des paresthésies³ et dysesthésies⁴ exacerbées par l'exposition au froid, touchant principalement les extrémités (mains et pieds) ainsi que la région péri-orale (Cersosimo, 2005). Des engourdissements, une fatigue musculaire ainsi que

³ Trouble de la sensibilité tactile, regroupant plusieurs symptômes, dont la particularité est d'être désagréable mais non douloureux : fourmillements, picotements, engourdissements

⁴ Diminution ou exagération de la sensibilité avec sensations de douleurs, d'engourdissements, picotements ou de brûlures

l'apparition de douleur neuropathique font également partis de ces symptômes. Ces manifestations sont précoces avec une survenue dans les 2 jours suivant la première cure dans 80 à 85% des cas. Exceptionnellement, dans 1 à 2% des cas, un syndrome aigu de dysesthésie pharyngo-laryngée (grade 3 ou 4) peut être observé, avec des sensations subjectives de dysphagie ou de dyspnée (sans signe objectif de détresse respiratoire), une contracture de la mâchoire, une dysesthésie linguale, une dysarthrie⁵ et une oppression thoracique. Une dysesthésie pharyngolaryngée (tous grades confondus) a été signalée dans une proportion allant jusqu'à 38% des patients (Argyriou et al., 2013).

Cette symptomatologie est rapidement réversible de façon systématique, même en l'absence de tout traitement. L'allongement de la durée de la perfusion dans les cycles suivants diminue l'incidence de ce syndrome. Malgré le caractère transitoire de ces symptômes neurologiques, la qualité de vie des patients traités par oxaliplatine est affectée et la mise en garde des patients sur l'éventuelle survenue de ce symptôme reste indispensable (Toftagen, 2010). Des recommandations simples comme le fait d'éviter le contact direct avec le froid permet de limiter la survenue des symptômes. De tous les symptômes décrits dans la neuropathie aiguë, le plus invalidant reste en effet l'hypersensibilité au froid.

(2) ~~A~~toxicodynamie

Les mécanismes pouvant expliquer la neuropathie aiguë restent encore à éclaircir mais l'hypothèse d'une canalopathie semble la plus décrite. A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes sont tout de même proposés pour expliquer cette neurotoxicité à savoir des mécanismes transitoires liés à une atteinte fonctionnelle des canaux sodium voltage-dépendant provoquant une diminution de l'amplitude des courants entrants (Adelsberger et al., 2000; Kagiava et al., 2008; Webster et al., 2005), un blocage des canaux potassium ou encore la chélation des cations bivalents. Il est donc suggéré que ces mécanismes peuvent interagir entre eux afin d'expliquer l'apparition des symptômes caractérisant la neuropathie aiguë (**Figure 13**).

Des études suggèrent donc une implication des canaux sodiques, en particulier le sous-type Nav1.6, son blocage engendrant une inhibition de l'allodynie au froid causée par l'oxaliplatine (Deuis et al., 2013). L'oxalate, métabolite de l'oxaliplatine, pourrait être à l'origine de ce mécanisme de par sa capacité à chélater les cations bivalents comme le calcium et le magnésium. Les réductions de concentrations de calcium contribuent en effet à l'hyperexcitabilité neuronale, expliquant les symptômes de paresthésie, crampes et tétanie

⁵ Trouble de l'articulation de la parole, d'origine centrale

musculaire. Une fois les concentrations de cations disponibles modifiées, ceci engendre une altération des courants sodiques mais également potassiques responsables de l'hyperexcitabilité neuronale périphérique induite par l'oxaliplatine (Sittl et al., 2012).

Il a par ailleurs été montré que l'utilisation de bloqueurs de canaux sodiques en combinaison avec des molécules contribuant à l'ouverture des canaux potassiques étaient capables d'inhiber l'hyperexcitabilité neuronale provoquée par l'oxaliplatine, montrant ainsi l'implication des canaux potassiques dans ce phénomène (Dimitrov and Dimitrova, 2012). Cette hypothèse est renforcée par le fait que plusieurs de ces canaux potassiques tels que les canaux hyperpolarisants TREK-1, TRAAK et Kv1.1 sont sous-exprimés dans les DRGs de souris traitées avec une injection d'oxaliplatine. De plus, l'implication de ces canaux ioniques a été confirmée par l'évaluation comportementale des souris invalidées pour les gènes codant pour TREK-1 et TRAAK (Descœur et al., 2011). Cependant, l'explication de cette neuropathie aigüe semble également imputable à d'autres canaux ioniques. Des études récentes ont montré que l'hypermotilité au froid peut être associée à l'hyperexcitabilité du canal TRPA1 (Zhao et al., 2012). Ce canal est présent au niveau des fibres C et possède un rôle dans la détection du froid, pouvant faire le lien avec l'hypermotilité au froid, symptôme largement décrit chez les patients traités à l'oxaliplatine. Le blocage de TRPM8, canal également impliqué dans la détection du froid, a permis d'atténuer l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine par l'injection d'un de ces antagonistes, la capsazépine. TRPM8 a été montré surexprimé dans les ganglions de la racine dorsale après une injection d'oxaliplatine (Gauchan et al., 2009; Kawashiri et al., 2012). Cette surexpression n'a cependant pas toujours été confirmée contrairement à la surexpression de TRPA1 (Descœur et al., 2011). Cette même étude a également montré la surexpression d'autres canaux pro-excitateurs tel que les canaux Nav1.8 confirmant bien l'implication des canaux sodiques mais également le canal HCN1. Ce dernier a prouvé son implication dans l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine, symptômes réversibles lors de l'utilisation d'un antagoniste des canaux HCN, l'ivabradine.

Plusieurs éléments suggèrent que le stress oxydatif pourrait être impliqué dans la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine (Nassini et al., 2011). En effet, de nombreux traitements anti-oxydants ont permis de réduire les symptômes neuropathiques, notamment l'acétyl-L-carnitine (Zheng et al., 2011), l'acide α -lipoïque ou encore la vitamine C capable d'inhiber l'hyperalgésie induite chez le rat traité à l'oxaliplatine (Joseph et al., 2008). Les nocicepteurs IB4 positifs seraient plus particulièrement la cible de ce stress oxydatif induit par l'oxaliplatine. En effet, l'injection d'une neurotoxine spécifique des nocicepteurs IB4 positifs (fibres C non peptidergiques) prévient l'hyperalgésie induite par l'oxaliplatine (Joseph et al., 2008).

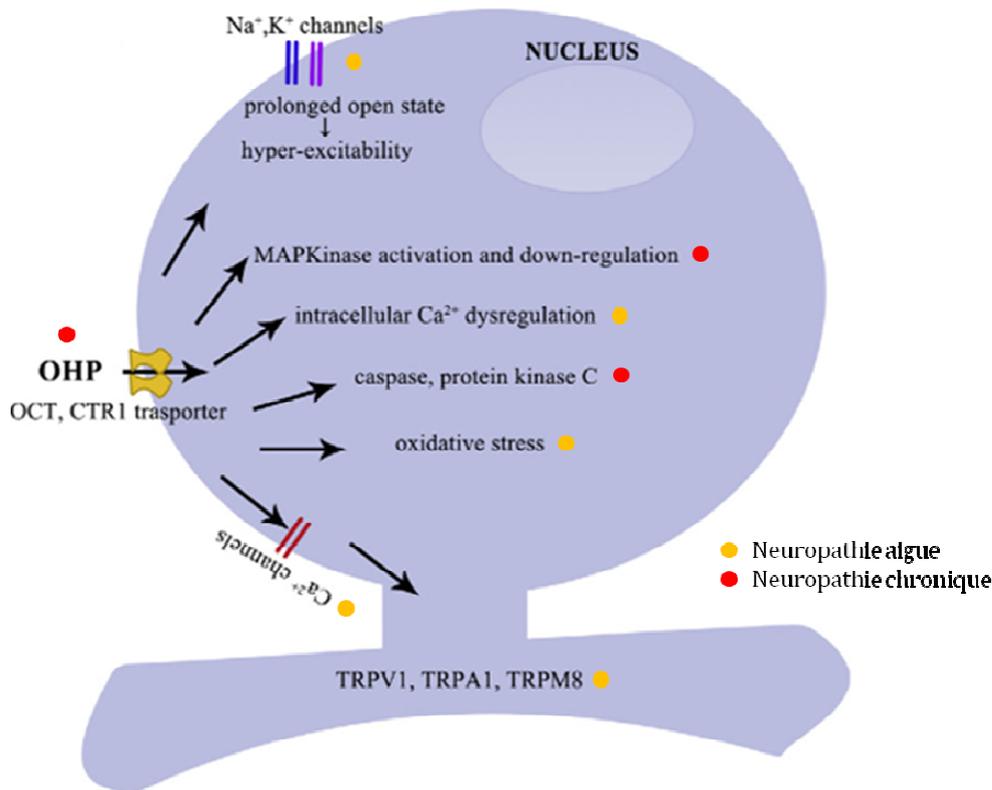


Figure 13 : Toxicodynamie de la neuropathie aigue et chronique.

Récapitulatif de l'ensemble des hypothèses existantes pour expliquer la neurotoxicité causée par l'oxaliplatine avec l'existence de canalopathies, de dysfonctionnements au niveau des transporteurs, de chelation de cations ou encore de stress oxydatif (adapté de Carozzi et al., 2015).

ii) Neuropathie chronique

(1) Tableau clinique

La symptomatologie de la neuropathie chronique à l'oxaliplatine est similaire à celle retrouvée avec le cisplatine et le carboplatine. La répétition des cures de chimiothérapie est à l'origine de l'apparition de cette neuropathie chronique et survient chez 50 à 70% des patients caractérisée par des symptômes persistants et fortement invalidants. Elle apparait en moyenne à 6 mois de cure (équivalent environ à la 10^e cure) et de grade 3 (Grothey, 2003). Elle se développe progressivement et se caractérise par une persistance des symptômes entre les cures de chimiothérapie, un engourdissement des membres et des douleurs spontanées. Elle est également accompagnée d'une gêne fonctionnelle et des troubles de la sensibilité. La sévérité des symptômes est dose dépendante et dans les cas les plus sévères, une ataxie sensorielle ainsi

qu'une perte de la sensibilité superficielle et profonde peuvent être retrouvées chez les patients (Gamelin et al., 2006; Zedan et al., 2014). Contrairement à la neuropathie aiguë, elle est lentement réversible et voire dans certains cas irréversible. En effet, jusqu'à 80% des patients atteints présentent encore des symptômes 29 mois après le dernier cycle de chimiothérapie (Park et al., 2011). Certains cas de progression voire d'installation de la neuropathie après l'arrêt de la chimiothérapie ont également été rapportés (Toftagen, 2010).

La neuropathie chronique dépend de nombreux facteurs comme la dose reçue, la dose cumulée mais également le temps de perfusion, le calendrier de traitement, la réalisation d'un acte chirurgical précédant la chimiothérapie ou encore la préexistence d'une neuropathie (Alejandro et al., 2013; Gornet et al., 2002; Grothey, 2005). D'autres facteurs de risques tels que l'âge, l'anémie ou encore l'hypoalbuminémie/hypomagnésémie et la consommation d'alcool peuvent favoriser son apparition (Vincenzi et al., 2013).

Grade	Echelle Lévi	Echelle NCIC-CTC
1	P/D régressives entre cycles 1a : < 8 jours 1b : ≥ 8 jours et < 14 jours	P/D légères Sans perte sensibilité Sans GF
2	P/D persistantes entre 2 cycles Sans GF ≥ 14 jours	P/D Avec perte sensibilité Sans gêne dans les AVQ
3	P/D persistantes entre 2 cycles Avec GF ≥ 14 jours	P/D avec douleurs Avec perte sensibilité Avec gêne dans les AVQ
4	-	P/D persistantes & incapacitantes, pouvant être mortelles
Non Applicable	-	TOXICITE AIGUE D laryngopharyngée durant ou dans les 2h suivants la perfusion

P – Paresthésie; D– Dysesthésie; GF – gêne fonctionnelle; AVQ – activités de la vie quotidienne

Tableau 1 : Grade de la neuropathie selon l'échelle de Lévi ou du NCIC-CTC

Elle est en général évaluée grâce à une échelle spécifique, l'échelle de Lévi modifiée (Lévi et al., 1997), permettant de classer les paresthésies en quatre grades selon l'intensité et la durée des troubles tout en prenant en compte les troubles fonctionnels s'avérant invalidants pour les patients. L'échelle du NCIC-CTC (National Cancer Institute of Canada Common Toxicity Criteria)

peut également être utilisée pour décrire ces troubles, notamment en dehors de toute période de traitement (**Tableau 1**).

(2) ~~A~~toxicodynamie

Le mécanisme le plus communément évoqué pour expliquer le développement de la neuropathie chronique est l'accumulation d'oxaliplatine sous forme d'adduits de platines au niveau des ganglions de la racine dorsale engendrant une diminution du métabolisme cellulaire et du transport axonal (Grothey and Goldberg, 2004) et une activation microgliale, mécanisme ayant un rôle pivot dans le développement des douleurs neuropathiques. Egalement, un autre mécanisme est observé lorsque que le nombre d'adduits surpasse les capacités de réparation cellulaire avec l'entrée des neurones en phase de mort programmée par apoptose (Argyriou et al., 2008a; Cavaletti et al., 2001; Gamelin et al., 2002).

De nombreuses études ont montré l'importance des mécanismes d'apoptose mis en jeu par l'oxaliplatine pouvant expliquer sa neurotoxicité. Dans les neurones des ganglions de la racine dorsale, l'activation précoce de la protéine p38 semble à l'origine de la mise en place de phénomènes d'apoptose induits par l'oxaliplatine. La protéine p38, située en amont de p53 dont le mécanisme a été énuméré précédemment, possède un rôle dans l'inhibition d'une protéine MAPkinase, JNK/Sapk, ayant un rôle dans la prolifération cellulaire (Scuteri et al., 2009). La diminution d'expression de cette MAPkinase est corrélée à l'augmentation des effets neurotoxiques de l'oxaliplatine. D'autres études ont montré une altération de la voie apoptotique mitochondriale tout d'abord avec l'implication des caspases dans des DRGs de rat (Ta et al., 2006). Il a par ailleurs été montré que l'utilisation d'inhibiteur de caspases inhibe la fragmentation de l'ADN induite par l'oxaliplatine (Faivre et al., 2003).

Une attention croissante est également portée au rôle des cellules gliales, en particulier des astrocytes et de la microglie. Ces cellules jouent un rôle régulateur essentiel dans l'homéostasie neuronale grâce à la position stratégique de leurs prolongements qui entourent les synapses et les vaisseaux sanguins. Plusieurs études suggèrent que les cellules gliales à la fois du système nerveux périphérique et central peuvent également être activées par l'oxaliplatine et possèdent un rôle non négligeable dans l'apparition de la neuropathie (Di Cesare Mannelli et al., 2014). De plus, il est connu que le développement des douleurs neuropathiques implique non seulement les voies neuronales mais également les cellules de Schwann et les cellules gliales dans les ganglions de la racine dorsale (Scholz and Woolf, 2007). En effet, il a été montré que l'activation des cellules gliales contribuait à la réduction des seuils de douleur liée au traitement

par oxaliplatine non seulement dans la moelle épinière (Yoon et al., 2013) mais aussi dans les ganglions spinaux (Warwick and Hanani, 2013) et d'autres indicateurs du système glial ont été impliqués dans ce phénomène (Bonaccini L, 2010).

Certains transporteurs CTRs et OCTs sont aussi apparus comme des protéines d'intérêts pour comprendre le mécanisme de la neuropathie chronique. Leur niveau d'expression peut en effet influencer le taux d'entrée et de sortie d'oxaliplatine dans les cellules neuronales. La protéine ATP7A, appartenant à la famille des CTRs, possède un rôle dans le transport des platines en dehors de la cellule vers les compartiments subcellulaires spécifiques (Safaei et al., 2012). ATP7A réduit donc la disponibilité de l'oxaliplatine dans les cellules cibles et permet de limiter la formation d'adduits de platines. Il a par ailleurs été démontré que les DRGs exprimant un fort taux d'ATP7A était moins sensibles à la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine (Liu et al., 2009). Concernant les OCTs, une absence de symptômes comme le développement d'une hypersensibilité au froid a été observée chez des souris inactivées pour le gène OCT2 après administration d'oxaliplatine, montrant le rôle de régulateur de ces transporteurs dans la neurotoxicité à l'oxaliplatine (Sprowl et al., 2013).

Histologiquement, la neuropathie chronique a également montré une perte de terminaisons nerveuses accompagné d'une dégénérescence axonale, d'une atrophie des corps cellulaires au niveau des DRGs et la présence de vacuoles dans les mitochondries (Lehky et al., 2004). D'un point de vue électrophysiologique, une anomalie de conduction dans les nerfs sensitifs est également observée pouvant expliquer l'apparition de certains symptômes (Renn et al., 2011).

b) Traitements de la neuropathie

A ce jour, les neuropathies induites par l'oxaliplatine sont très difficiles à traiter. De plus, les traitements consistent actuellement à soulager majoritairement les symptômes douloureux. Les autres manifestations, troubles sensori-moteurs et comorbidités, sont peu prises en compte par manque de traitements efficaces (**Annexe 1**). Or, la thérapeutique de la douleur n'a connu aucune innovation thérapeutique récente et la plupart des douleurs neuropathiques chimio-induites restent réfractaires aux traitements usuels. A l'heure actuelle, le traitement de cette neuropathie repose essentiellement sur l'information du patient concernant l'exposition au froid, mais également sur la modification du protocole d'administration ainsi que sur l'utilisation d'agents pharmacologiques plus ou moins efficaces. Aucun consensus sur les traitements à

utiliser pour prévenir ou limiter l'apparition des symptômes rencontrés dans les neuropathies chimio-induites n'a été établi à ce jour (Weickhardt et al., 2011).

i) Modifications du protocole d'administration

En premier lieu, les modifications du protocole d'administration de l'oxaliplatine consistent à réduire la dose administrée. Cette décision est prise suite à l'observation de la persistance des symptômes douloureux entre les cures et l'apparition d'une atteinte fonctionnelle ou d'anomalies sensitives chez le patient. Les doses peuvent alors être réduites de 85mg/m² à 75mg/m² en situation adjuvante et à 65mg/m² en situation métastatique (Saif and Reardon, 2005). Le temps de perfusion peut également être allongé et permet de limiter l'apparition des symptômes de la neuropathie et en cas de succès, l'adaptation de la posologie n'est alors pas nécessaire.

Une autre approche aussi appelée la stratégie du « Stop-and-Go » puisqu'elle consiste à alterner les phases de traitements et de pauses thérapeutiques pour limiter l'apparition des effets indésirables est utilisée. Cette stratégie consiste donc à suspendre l'administration d'oxaliplatine lorsque la dose de 780 mg/m² est atteinte. Ainsi, en laissant une période sans oxaliplatine, la neuropathie qui pouvait être présente peut s'atténuer, voire disparaître. Après une période de six mois, l'oxaliplatine peut être réintroduite, ce qui permet de donner une dose totale plus élevée de l'agent tout en réduisant les risques de neuropathie de grade 3 ou supérieur (Grothey, 2010). D'autres études ont pu montrer que l'incidence de la neuropathie était diminuée avec parfois une diminution du taux de neurotoxicité grade 3. Une meilleure survie sans récurrence a parfois été observée (Tournigand et al., 2006; Wolf et al., 2008)

ii) Approches pharmacologiques

De nombreuses études ont montré l'implication de l'oxalate, métabolite de l'oxaliplatine, à chélater les cations bivalents comme le calcium et le magnésium engendrant une hyperexcitabilité des neurones. C'est pourquoi plusieurs études cliniques ont utilisé des perfusions de Calcium/Magnésium afin de prévenir cette neuropathie mais les résultats s'avèrent controversés d'une étude à une autre. En effet, une méta-analyse a montré que les perfusions Ca/Mg ont tendance à réduire l'incidence de la neurotoxicité aiguë induite et cumulative induite par l'oxaliplatine et permettent d'améliorer la tolérance des patients à l'oxaliplatine, sans modifier sensiblement l'efficacité de la chimiothérapie (Wen et al., 2013). A

contrario, d'autres études n'ont montré aucune différence dans le taux de réponse entre le groupe traité par perfusion Ca/Mg et le groupe placebo (Loprinzi et al., 2014; Xu et al., 2013).

La perfusion de Calcium/Magnésium et la prophylaxie médicamenteuse à l'aide de différents agents pharmacologiques ont donc été tentées sans résultats probants, alors que la stratégie du « Stop and Go », expliquée dans le paragraphe précédent, a démontré une diminution des neuropathies de grade 3 (Nakayama et al., 2011; Tournigand et al., 2006).

A l'heure actuelle, les traitements médicamenteux utilisés restent empiriques. Une étude a révélé des effets positifs de la venlafaxine sur la neuropathie aiguë (Durand et al., 2012) mais jusqu'à présent, aucune étude clinique randomisée sur le traitement de la forme chronique n'a été réalisée. D'autres études cliniques de petite taille ont aussi été réalisées afin d'évaluer l'efficacité d'agents pharmacologiques (venlafaxine, amitriptyline et pregabaline) pour le traitement de la neuropathie sensorielle induite par l'oxaliplatine (Durand et al., 2012; Kautio et al., 2008; Saif et al., 2010). La petite taille des études réalisées réduit leur puissance, ce qui ne nous permet pas d'affirmer que ces agents sont efficaces pour le traitement de la neuropathie à l'oxaliplatine.

Au final, aucune recommandation spécifique pour le traitement des neuropathies post-chimiothérapie n'existe et l'utilisation d'une molécule plutôt qu'une autre ne repose en général que sur l'appréciation du médecin. Ces traitements incluent les antidépresseurs tricycliques (amitriptyline) et les anti-épileptiques dont la gabapentine et la prégabaline (Attal et al., 2010; Finnerup et al., 2015). Étant donné l'absence de preuve de l'efficacité de médicaments tant en prévention qu'en traitement de la neuropathie, il est donc primordial d'ajuster les doses d'oxaliplatine selon le grade de la neuropathie afin de limiter l'atteinte de la qualité de vie des patients.

Objectifs généraux

L'oxaliplatine est un sel de platine qui a prouvé son efficacité dans de nombreux cancers notamment digestifs. Son profil de toxicité est marqué par une neurotoxicité périphérique caractéristique, souvent limitante qui peut nécessiter l'arrêt précoce de la chimiothérapie. La neuropathie induite par l'oxaliplatine est secondaire à une atteinte nerveuse périphérique dont les mécanismes sont encore aujourd'hui mal connus. Au regard des études récentes, les traitements proposés à l'heure actuelle restent empiriques et peu d'entre eux ont montré une réelle efficacité pour traiter ou prévenir l'ensemble des symptômes liés à cette neurotoxicité que ce soit la douleur mais également les troubles sensori-moteurs ou encore les comorbidités telle que la dépression. Afin de mener à bien ces recherches, il est nécessaire d'utiliser des modèles pré-cliniques pertinents capables de mimer l'ensemble des symptômes observés en clinique. Ces outils devraient permettre une meilleure connaissance de la physiopathologie de la neuropathie induite par l'oxaliplatine et ainsi mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouveaux antalgiques.

Mon projet de thèse, qui s'inscrit dans cette stratégie de recherche translationnelle, a eu pour but de rechercher et valider pharmacologiquement certains canaux ioniques comme cibles moléculaires pour le traitement et/ou la prévention de la neuropathie induite à l'oxaliplatine.

Pour se faire, nous avons décidé de mieux caractériser un modèle murin de neuropathie douloureuse aigüe et de mettre au point et caractériser un modèle de neuropathie chronique induite respectivement par des injections uniques ou répétées d'oxaliplatine. Un travail comportemental a été entrepris chez ces modèles afin d'évaluer la survenue et le suivi longitudinal des symptômes retrouvés en clinique : symptômes douloureux céphaliques et extracéphaliques, déficits moteurs, dépression et anxiété. Chez ces mêmes animaux, des analyses moléculaires nous ont permis de sélectionner des gènes codant pour des canaux ioniques impliqués dans la physiologie et la pharmacologie de la douleur (canaux potassiques TREK et TRAAK, canaux HCN1 & HCN2).

Nous avons parallèlement entrepris de valider pharmacologiquement ces cibles chez l'animal. Les résultats de nos travaux seront présentés séquentiellement et concerneront :

- À L'étude de l'implication des canaux HCN dans l'hypersensibilité douloureuse céphalique et extracéphalique dans la neuropathie aigue induite par l'oxaliplatine ;
- À L'étude de l'implication des canaux TREK et TRAAK dans la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine et la validation pharmacologique de ces cibles chez un modèle murin de cancer colorectal.



Chapitre II :

Canaux ioniques & neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

*Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN dans
l'hypersensibilité céphalique et extracéphalique
induite par l'oxaliplatine*

Chapitre II :

Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

De par leur rôle dans l'activité neuronale, leur localisation dans les neurones sensoriels et les centres nerveux, les modifications de leur fonctionnalité ou de leur expression sous l'effet d'agents pharmacologiques ou dans un contexte d'état pathologique, les canaux ioniques possèdent un rôle évident dans la compréhension de la physiopathologie de la douleur et le développement de nouveaux antalgiques (Julius and Basbaum, 2001).

Dans un modèle de neuropathie aigue chimio-induite à l'oxaliplatine mis au point au laboratoire, il a été récemment montré que l'oxaliplatine entraîne une modification d'expression des gènes de plusieurs canaux ioniques. En particulier, les canaux hyperpolarisants TREK-1, TREK-2 et TRAAK ont une expression diminuée alors que l'expression des canaux pro-excitateurs HCN1 est augmentée suite à l'injection d'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011; Pereira et al., 2014). Ainsi, l'oxaliplatine posséderait un double effet en réduisant l'activité de canaux hyperpolarisants responsables de l'inhibition de l'excitabilité neuronale et en augmentant l'activité des canaux dépolarisants favorisant ainsi l'excitabilité neuronale. Ces canaux ont donc été la cible de ce travail de thèse et dans un premier temps, nous avons voulu connaître leur implication dans la neuropathie aigue chimio-induite à l'oxaliplatine notamment au niveau de la sphère orofaciale, où les symptômes douloureux sont largement décrits en clinique tout comme ceux observés au niveau extracéphalique (Ewertz et al., 2015) mais très peu étudiés en préclinique.

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN dans l'hypersensibilité céphalique et extracéphalique induite par l'oxaliplatine

3) Canaux HCN

a) Classification et structure

Les canaux HCN (hyperpolarisation-activated cyclic nucleotides-gated cation channel) sont des canaux cationiques non sélectifs qui génèrent un courant rectifiant entrant cationique activé par l'hyperpolarisation, appelé courant I_h ou I_f (pour *funny*) et qui possèdent un site de liaison à l'AMP cyclique (et au GMP cyclique) avec une sensibilité plus ou moins importante à l'AMPc selon la sous-unité HCN concernée. Ces canaux sont perméables à la fois aux ions sodium et potassium et jouent donc un rôle majeur pour stabiliser le potentiel membranaire de repos. Leurs potentiels d'inversion se situent autour de -30mV permettant la dépolarisation de la cellule dans la gamme de potentiel où les autres canaux dépendant du voltage peuvent être activés. La structure de ces canaux est tétramérique avec 6 hélices transmembranaires par monomère. Ils possèdent un domaine cytoplasmique CNBD (cyclic nucleotide binding domain) dans la région C-terminale qui confère à ces canaux une sensibilité aux nucléotides cycliques tels que l'AMPc. Cette fixation au niveau du site CNBD permettra alors d'accélérer les cinétiques d'activation et de déplacer la dépendance au potentiel de cette activation vers des potentiels moins négatifs (**Figure 14**).

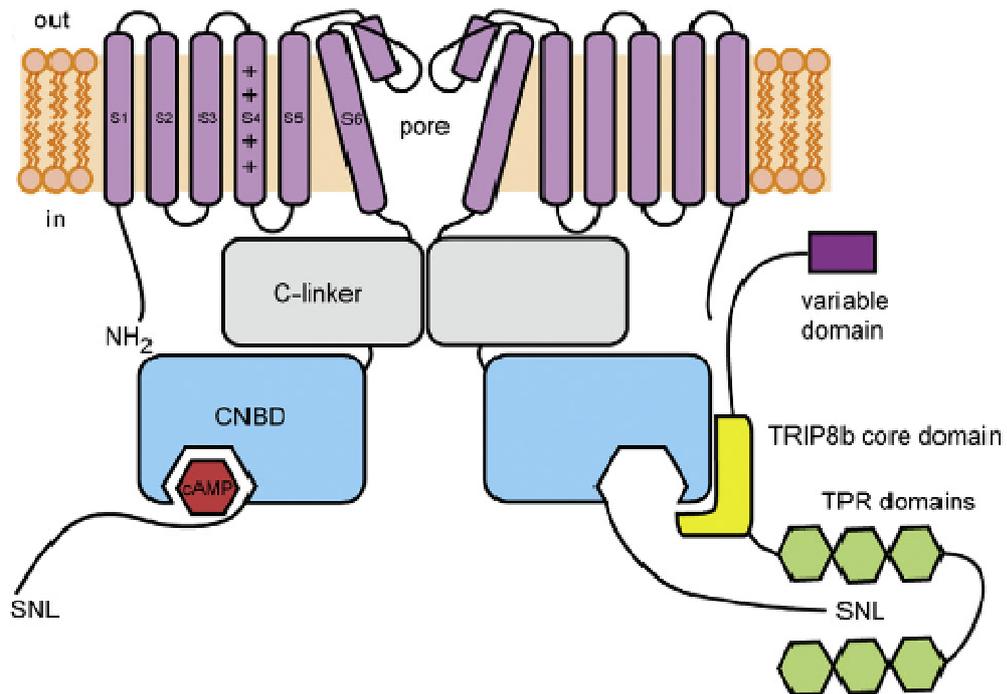


Figure 14 : Structure des canaux HCN (DeBerg et al., 2015)

Les canaux HCN sont des protéines comportant six domaines transmembranaires (S1-S6), une boucle comprise entre les segments S5 et S6 (pore du canal), ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire comportant un domaine de liaison aux nucléotides cycliques.

Ces canaux sont issus de 4 gènes donnant les monomères HCN-1 à HCN-4 présents notamment dans les systèmes cardiaque et nerveux (central et périphérique). Les quatre sous-unités HCN présentent environ 60% d'homologie lorsque les séquences complètes d'acides aminés sont comparées. Plus spécifiquement, les segments transmembranaires et le domaine NMPc sont semblables à plus de 80% d'une isoforme à l'autre (Kaupp and Seifert, 2001; Moosmang et al., 2001). Leurs différences résident dans leur cinétique d'activation et de désactivation ainsi que leur sensibilité à l'AMPc (cf paragraphe suivant). HCN1 possède la cinétique d'activation la plus rapide, comprise entre 30 et 300 ms, alors que HCN4 possède la plus lente pouvant aller de 300ms à plusieurs secondes. Le profil de HCN2 et HCN3 est intermédiaire. Les canaux HCN sont localisés au niveau du cœur et du système nerveux central et périphérique mais dans des proportions différentes (Calejo et al., 2014). La sous-unité HCN4 est majoritaire au niveau du cœur et une dérégulation de ce canal engendre l'apparition de pathologies cardiaques alors que les dérégulations impliquant les sous-unités HCN1 et HCN2 seront, quant à elles, responsables de l'apparition de troubles neurologiques (**Tableau 2**).

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

Sous type	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
Cinétique d'inactivation	Rapide	Intermédiaire	Lente	Lente
Modulation AMPc	Faible ---	Forte +	Faible -	Forte +++
Expression SNC	Neocortex Hippocampe Tronc cérébral	Ubiquitaire	Bulbe olfactif Hypothalamus Cônes rétine	Bulbe olfactif Ganglions de la base Thalamus
Expression DRG	N. Grand diamètre N. Sensible au froid	N. Nociceptif exprimant Nav1.8	-	-
Expression cardiaque	Nœud SA & NA	Ubiquitaire	Muscle cardiaque	Nœud SA & NA Système Purkinje
Phénotype souris KO	Renforce apprentissage & mémoire dépendant de l'hippocampe Altération apprentissage moteur Altération vision couleur Réduction allodynie au froid	Ataxie Absence d'épilepsie Réduction douleur neuropathique & inflammatoire Arythmie sinusale	Augmentation de l'onde T	Phénotype embryonnaire létale (bradycardie, abs cellules pacemaker) Pause sinusale Arrêt cardiaque
Manifestations cliniques	Augmentation exp. dendritique vers TLE Allodynie froid lié à oxaliplatine	Augmentation I_h associé à GEFS	-	Bradycardie Altération conduction SA & AV Prolongation QT Syncope

N: neurone; AV : atrioventriculaire; GEFS : épilepsie avec convulsions; SA : sinoatrial; TLE : temporal lobe epilepsy

Tableau 2 : Expression et propriétés des canaux HCN (adapté de Benarroch *et al.*, 2013)

b) Mécanismes de régulation

Plusieurs mécanismes de régulations des canaux HCN ont déjà été décrits, le plus connus étant la modulation de ces canaux par l'AMPc. Cette régulation se fait par interaction directe, l'AMPc se liant au domaine de liaison CNBD à l'extrémité C-terminale des canaux HCN. Lorsque le domaine CNBD n'est pas lié à l'AMPc, il agit comme un inhibiteur du courant I_h , alors qu'une hausse du taux d'AMPc permettra de décaler la courbe d'activation du courant I_h , c'est-à-dire qu'une moindre hyperpolarisation pourra activer plus vite les canaux HCN en présence d'AMPc qu'en son absence (Ulens and Siegelbaum, 2003; Wainger et al., 2001). Les isoformes HCN2 et HCN4 sont les plus sensibles à l'AMPc, entraînant ainsi un déplacement de la courbe d'activation de 15 à 20mV dans la direction positive. Concernant les autres sous-unités, l'inhibition par le CNBD est beaucoup plus faible et la présence d'AMPc n'entraîne qu'un faible déplacement de la courbe d'activation.

D'autres études ont montré que les canaux HCN pouvaient être modulés de façon similaire par les phospholipides membranaires tels que le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) endogène. L'application d'un analogue, le dioctanoyl phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

(diC8-PIP2), décale la courbe d'activation de HCN2 vers des potentiels moins négatifs de manière dose dépendante, le courant I_h est ainsi augmenté dans des gammes de potentiels physiologiques (Herzog et al., 2014). Contrairement à l'AMPC, la modulation par PIP2 est tout aussi efficace pour les 4 isoformes (Ying et al., 2011). Il a été démontré que l'interaction avec le PIP2 est nécessaire aux canaux HCN pour leur rôle dans l'automatisme cellulaire. La déplétion du PIP2 ne modifie pas seulement la sensibilité au potentiel du canal, mais ralentit également la fréquence d'automatisme des cellules neuronales dopaminergiques (Zolles et al., 2006).

Un autre mécanisme de régulation des canaux HCN par la protéine kinase Src a également été démontré. Cette kinase se fixe via son domaine SH3 à l'extrémité C-terminale du canal HCN et phosphoryle la tyrosine en position 476. Le résidu tyrosine conférant l'action modulatrice de la kinase Src se situe au niveau de l'extrémité C-terminale, région de liaison du segment transmembranaire S6 au domaine CNBD. Ceci permet d'expliquer que tout comme la régulation à l'AMPC, contrairement à HCN2 et HCN4, la sous-unité HCN1 n'est pas modulée par la kinase Src (Yu et al., 2004). Cette phosphorylation permet d'accélérer les cinétiques d'activation des courants I_h (Zong et al., 2005).

Afin d'établir un lien entre ces régulations, il est à noter que de nombreux neurotransmetteurs affectent le courant I_h via les récepteurs couplés aux protéines G, connus pour contrôler l'activation de l'adénylate cyclase (ADC) et donc le niveau d'AMPC. De plus, il est connu que la kinase Src peut également être stimulée par la protéine G_i ou G_s (Ma and Huang, 2002). L'activité de ces RCPG a donc un rôle prédominant dans la régulation du courant I_h . De cette façon, au niveau du cœur, la stimulation du nerf vague provoque un ralentissement de la fréquence cardiaque, en libérant de l'acétylcholine, qui, via l'activation de récepteur muscarinique couplé à une protéine G_i , diminue la concentration en AMPC, ce qui ralentit la cinétique du courant I_h , et donc diminue la fréquence cardiaque. A contrario, le système nerveux sympathique va stimuler la production d'adrénaline et de noradrénaline provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC, via l'activation de récepteur bêta-adrénergique. La cinétique du courant I_h est alors augmentée, ce qui provoque l'augmentation de la fréquence cardiaque.

Des protéines partenaires de ces canaux HCN ont également été décrites. Il a été montré que l'adressage des canaux HCN à la membrane cellulaire pouvait être régulé par une protéine cytoplasmique, Trip8b (Santoro, 2004; Zolles et al., 2009). Par ailleurs, cette protéine colocalise avec le canal HCN1 au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe et le courant I_h s'avère drastiquement réduit dans ces neurones chez les souris invalidées pour cette protéine Trip8b (Lewis et al., 2011; Piskorowski et al., 2011). A l'inverse, la protéine Nedd4-2 semble avoir un

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

rôle dans la diminution de l'adressage membranaire du canal HCN1 avec une colocalisation Nedd4-2/HCN1 qui semble être corrélée à une diminution du courant I_h (Wilkars et al., 2014)

c) Rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux HCN

Comme nous l'avons vu précédemment, les quatre isoformes HCN sont exprimées de manière différentielle dans divers tissus excitables que ce soit au niveau cardiaque ou encore au niveau des systèmes nerveux périphérique et central. Des études ayant utilisé des animaux transgéniques ou des bloqueurs spécifiques des canaux HCN en conditions physiologiques ou physiopathologiques ont également permis de démontrer leur importance fonctionnelle en cardiologie et dans de nombreuses fonctions neuronales.

i) Rôle dans la physiologie et physiopathologie cardiaque

Toutes les sous-unités sont exprimées au niveau du cœur. Cependant, HCN4 représente plus de 80% de l'expression des canaux HCN dans toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant (lapin, souris, homme) (Moosmang et al., 2001; Shi et al., 1999). La sous-unité HCN4 est exprimée de façon restreinte aux régions cardiaques douées d'automatisme et est donc particulièrement exprimée dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et dans les fibres de Purkinje. De faibles niveaux d'expression de HCN1 et HCN2 ont également été signalés. L'isoforme HCN1 est très faiblement exprimée chez la souris au niveau du nœud sinusal, alors que HCN2 est plus exprimée à ce niveau et cette isoforme est également retrouvée dans les cardiomyocytes non automatiques au niveau des oreillettes et des ventricules. L'isoforme HCN3 a également démontré son implication au niveau cardiaque avec un rôle fonctionnel dans les myocytes ventriculaires chez la souris (Fenske et al., 2011). La distribution de ces canaux au niveau cardiaque est donc ubiquitaire et le niveau d'expression de ces gènes varie en fonction de la région cardiaque, de l'espèce, de l'âge et de l'état physiologique ou pathologique du cœur.

Ces canaux HCN participent au contrôle de la pente de dépolarisation diastolique des cellules du nœud sinusal (pacemaker), c'est pour cette raison qu'ils sont également surnommés les canaux *pacemaker*. Ces canaux possèdent en effet un rôle dans la génération autonome du rythme et la modulation de la rythmicité cardiaque.

L'utilisation de souris invalidées pour certaines de ces isoformes HCN a permis de montrer leur implication dans l'apparition de pathologies cardiaques notamment le développement d'arythmie cardiaque chez les souris HCN2^{-/-}. La mutation homozygote HCN4 -

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

/- est létale au stade embryonnaire car le courant I_h est réduit d'environ 80% entraînant une réduction de la fréquence cardiaque de plus de 40% par rapport aux embryons sauvages (Stieber et al., 2003). Des mutations ont également été rapportées chez l'Homme et concernent exclusivement l'isoforme HCN4 et sont responsables d'arythmie et de bradycardie plus ou moins sévères (Verkerk and Wilders, 2015).

ii) Rôle dans l'excitabilité du système nerveux

Les quatre sous-unités HCN sont exprimées au niveau des systèmes nerveux périphérique et central. En plus de leurs rôles pacemaker et modulateur de l'activité cardiaque, les canaux HCN peuvent contrôler la réponse des neurones au niveau de la fente synaptique. Des études ont montré qu'ils possédaient différents rôles notamment dans la perception gustative, la coordination motrice, l'apprentissage et la mémoire. Des études précliniques et cliniques suggèrent également l'implication des canaux HCN dans l'épilepsie et la douleur de nature inflammatoire ou neuropathique.

(1) Rôle physiologique et physiopathologique des canaux HCN

Dans les neurones, le courant I_h a été découvert lors d'une étude électrophysiologique de différents courants dans les DRGs chez l'embryon de souris. Il a été décrit une conductance voltage-dépendant activée par l'hyperpolarisation avec des caractéristiques étonnamment similaires au courant *pacemaker* précédemment décrit (Mayer and Westbrook, 1983). Il a été montré que le courant I_h était plus marqué dans les neurones de moyenne et grande taille, alors que seulement la moitié des neurones de petites tailles montraient un courant I_h fonctionnel (Scroggs et al., 1994).

L'utilisation de souris invalidées pour certaines des isoformes HCN a permis de montrer leur implication dans le développement de pathologies neurologiques. Notamment les souris dépourvues du gène HCN1, viables, ont montré un déficit dans l'apprentissage de tâches motrices rapides en raison d'un dysfonctionnement au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet lié à une hyperpolarisation excessive (Nolan et al., 2003). En revanche, la suppression de HCN1 entraîne une amélioration inattendue de l'apprentissage spatial et de la mémoire (Nolan et al., 2004). Des études ont aussi montré l'implication du gène HCN1 dans l'épilepsie chez le rat ainsi que l'existence de mutations ponctuelles de ce gène chez l'homme expliquant l'apparition précoce d'encéphalopathie épileptique (Poduri, 2014). Contrairement à HCN1, la

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

délétion globale de HCN2 donne lieu à un phénotype neuronal beaucoup plus prononcé caractérisé par des crises d'absence (forme généralisée d'épilepsie), de tremblements, d'ataxie⁶ et d'hypoactivité (Ludwig et al., 2003). Les souris HCN2^{-/-} présentent également des troubles neuronaux prononcés avec une perte de l'activité motrice et une absence de développement de crise d'épilepsie spontanée (Ludwig et al., 2003).

Dans les DRGs, l'expression des sous-unités HCN3 et HCN4 est faible ou indétectable (Kouranova et al., 2008). Les sous-unités HCN1 et HCN2 sont les isoformes les plus fortement exprimées dans les neurones somatosensoriels primaires (Chaplan et al., 2003; Cho et al., 2009; Tu et al., 2004). HCN1 est particulièrement présent dans les neurones sensoriels non nociceptifs (Jiang et al., 2008) mais n'est que très peu exprimé dans les nocicepteurs mis à part dans une petite sous-population de neurones sensibles au froid (Momin et al., 2008; Orio et al., 2009). Concernant le canal HCN2, il est plus particulièrement exprimé dans les neurones de petits diamètres (Gao et al., 2012; Momin et al., 2008; Scroggs et al., 1994).

De nombreuses études ont montré la surexpression de ces canaux HCN, principalement HCN1 et HCN2, en conditions pathologiques notamment lors de douleur inflammatoire (Acosta et al., 2012; Cho et al., 2015; Papp et al., 2010; Schnorr et al., 2014; Weng et al., 2012) ou neuropathique (Chaplan et al., 2003; Descoeur et al., 2011; Jiang et al., 2008; Yao et al., 2003) suggérant leur implication dans l'apparition de phénomènes douloureux (Hatch et al., 2013; Herrmann et al., 2015) qui sera décrite dans les deux parties suivantes.

(2) Rôle dans la douleur inflammatoire

Concernant les données existantes sur les douleurs inflammatoires, l'utilisation de bloqueurs ou de souris invalidées pour certaines sous-unités HCN ont également été utilisés. Toutefois, les résultats diffèrent en fonction de l'agent inflammatoire utilisé ou du type de stimulus réalisé. L'utilisation du ZD7288, bloqueur non spécifique des canaux HCN, a montré un effet analgésique important sur l'hyperalgie thermique dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat (Dunlop et al., 2009). La sous-unité HCN2 semble responsable de cette hyperalgésie thermique, puisque le comportement nociceptif a été considérablement réduit chez les souris HCN2 KO conditionnelles lors d'une inflammation provoquée par l'injection de carragénine ou de PGE2 (Emery et al., 2011). Le développement de douleur inflammatoire n'a également pas été observé chez la souris snsHCN2KO⁷ lors d'injection d'analogue de l'AMPC, le 8-

⁶ Manque de coordination fine des mouvements volontaires

⁷ Délétion sélective de HCN2 dans les neurones périphériques sensoriels

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

bromo-AMPC (Schnorr et al., 2014). Les composés inflammatoires entraînant une sensibilisation douloureuse sans élévation de l'AMPC n'impliquent donc probablement pas les canaux HCN. Cela a d'ailleurs été démontré dans un modèle inflammatoire induit par le Zymosan A chez lequel la suppression de HCN2 n'influence pas le comportement nociceptif (Schnorr et al., 2014). L'implication des canaux HCN dans un état inflammatoire médié par l'augmentation de l'AMPC ne semble donc s'appliquer que dans un contexte d'inflammation aiguë, les états inflammatoires chroniques mettant en jeu des processus de régulations beaucoup plus complexes (Acosta et al., 2012; Antal et al., 2004; Papp et al., 2010).

Dans des modèles d'induction inflammatoire par le CFA, un renforcement du courant *I_h* contribuant à la sensibilisation neuronale a été observé chez l'animal sauvage, ce qui n'est plus le cas chez les souris invalidées pour HCN2 ou lors de l'utilisation du bloqueur ZD7288 (Schnorr et al., 2014; Weng et al., 2012). La localisation de l'effet lié aux canaux HCN a été mise en évidence par l'utilisation de ces souris *snsHCN2KO* et l'injection locale de ZD7288. En parallèle, il a été montré une surexpression protéique de HCN2 au niveau des nocicepteurs périphériques chez les animaux WT, mécanisme qui pourrait expliquer l'augmentation des seuils nociceptifs et faciliter la transmission neuronale dans ce modèle d'inflammation (Schnorr et al., 2014). Cependant, l'implication des canaux HCN semble être spécifique de l'hypersensibilité tactile car aucun changement n'a été observé dans l'hyperalgie thermique dans les modèles d'inflammation chronique chez les souris *snsHCN2 KO* ou lors du blocage par le ZD7288 (Luo et al., 2007; Weng et al., 2012). Des voies neuronales différentes semblent donc impliquées pour expliquer la sensibilisation mécanique et thermique dans des conditions d'inflammation chronique (Abrahamsen et al., 2008; Cavanaugh et al., 2009; Lawson et al., 2008).

(3) Rôle dans la douleur neuropathique

Plusieurs études ont révélé une surexpression des canaux HCN et/ou de l'activité du courant *I_h* suite à une lésion neuronale (Chaplan et al., 2003; Jiang et al., 2008; Yao et al., 2003). De plus, l'implication du courant *I_h* dans l'allodynie tactile et l'hyperalgésie thermique a d'abord été mise en évidence par l'étude de l'effet analgésique d'un bloqueur sélectif des canaux HCN, le ZD7288, dans divers modèles de douleur neuropathique (Dalle and Eisenach, 2005; Luo et al., 2007; Takasu et al., 2010).

De nombreuses études ont confirmé le rôle pivot du canal HCN2 dans la douleur neuropathique par l'utilisation de souris invalidées pour ce canal (Emery et al., 2011; Momin et al., 2008; Schnorr et al., 2014). L'abolition de la douleur a été observée chez des mutants pour

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-1 : Implication des canaux HCN

HCN2 ou des mutants conditionnels *snsHCN2KO* dans des modèles de douleurs neuropathiques (Emery et al., 2011; Schnorr et al., 2014). En effet, aucun comportement d'hyperalgie n'a pu être observé en comparaison avec les souris sauvages. A l'inverse, l'utilisation de ZD7288 chez ces mêmes souris n'a montré aucun effet supplémentaire, indiquant que la participation du canal HCN2 serait restreinte aux canaux présents au niveau des neurones sensoriels.

Un rôle particulier peut également être alloué à HCN1. Dans un modèle de douleur neuropathique, les souris invalidées pour le canal HCN1 ont montré une sensibilité au froid moins importante que les souris sauvages, suggérant l'implication de HCN1 dans ces douleurs (**Figure 15**) (Momin et al., 2008). Cette observation s'avère relativement intéressante et pourrait avoir une importance notamment dans des modèles de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine dont le symptôme majoritaire s'avère être le développement d'une hypersensibilité au froid observé en clinique. Ceci pourrait s'expliquer par une surexpression des canaux HCN1 dans les petits neurones sensibles au froid. Une étude pré-clinique va dans ce sens puisqu'il a été observé une surexpression du canal HCN1 au niveau des DRGs dans un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine et l'utilisation de l'ivabradine a permis de traiter ce symptôme (Descoeur et al., 2011).

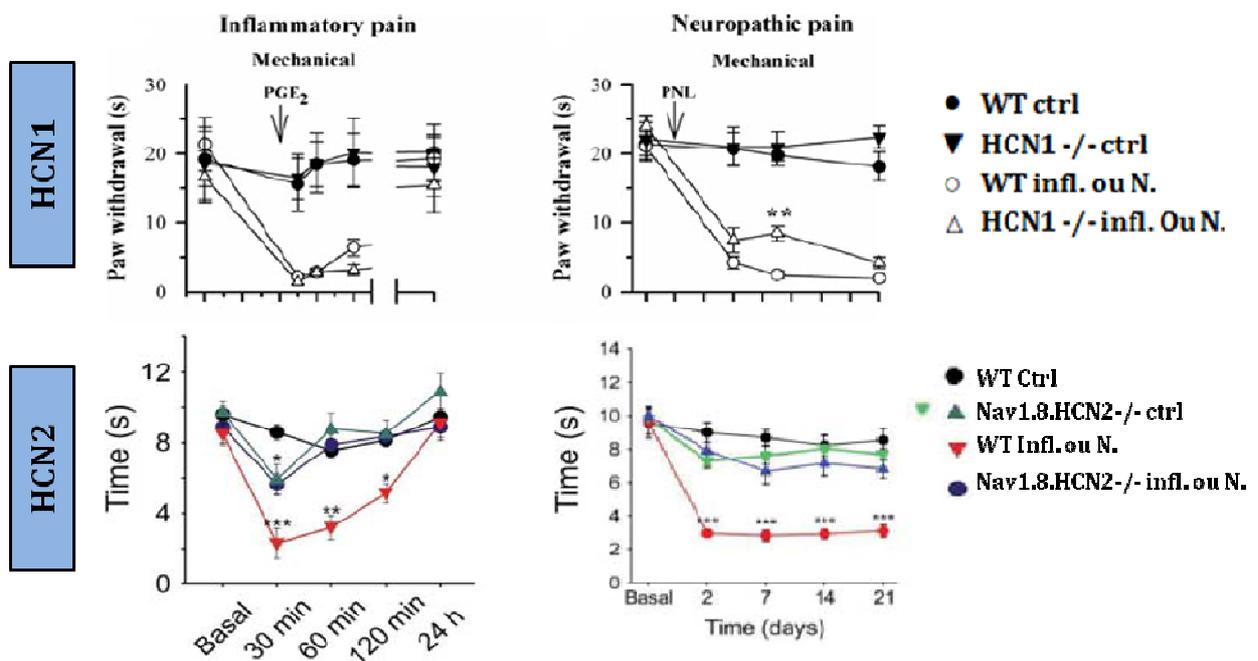


Figure 15 : Implication des canaux HCN1 et HCN2 dans la douleur inflammatoire et neuropathique.

L'utilisation de souris invalidées pour les canaux HCN1 et HCN2 a montré que ce soit dans un modèle de douleur inflammatoire ou neuropathique une diminution des seuils de douleur, traduisant leur implication dans ces phénomènes (Adapté de Momin, 2008 et Emery, 2011).

d) Pharmacologie : Ivabradine (Procoralan®)

L'ivabradine (Procoralan®) est le premier et, à l'heure actuelle, le seul bloqueur des canaux HCN utilisé en clinique. Ce médicament est indiqué dans le traitement symptomatique de l'angine de poitrine (Angor) et de l'insuffisance cardiaque. L'utilisation de cette molécule est également indiquée chez les patients présentant une intolérance ou une contre-indication aux bêta-bloquants ainsi qu'en association lorsque l'efficacité des bêta-bloquants n'est pas suffisante chez les patients présentant une fréquence cardiaque supérieure à 60 bpm.

L'ivabradine réduit la fréquence cardiaque en inhibant de manière spécifique et sélective le courant I_h intervenant dans l'automatisme de la dépolarisation au niveau du nœud sinusal, ce dernier étant le responsable du rythme cardiaque (DiFrancesco, 2010). Par ce biais, elle ralentit la fréquence cardiaque en augmentant le temps diastolique via le blocage du canal HCN4. Les effets cardiaques sont spécifiques du nœud sinusal, sans effet sur les temps de conduction intra-auriculaires, auriculoventriculaires ou intraventriculaires, sur la contractilité myocardique ou sur la repolarisation ventriculaire."

L'ivabradine peut également bloquer le courant rétinien I_h qui intervient dans la résolution temporelle du système visuel, par le raccourcissement de la réponse rétinienne à des stimuli lumineux intenses. Lors de circonstances déclenchantes (telles que des changements rapides de la luminosité), l'inhibition partielle du courant I_h par l'ivabradine est à l'origine des phénomènes lumineux que peuvent percevoir occasionnellement des patients. Les phénomènes lumineux (phosphènes) sont décrits comme une augmentation transitoire de la luminosité dans une zone limitée du champ visuel. Ces phosphènes font parti des effets indésirables les plus fréquents, rapportés chez environ 14,5% des patients, et régressent au cours du traitement dans 77,5% des cas ou à l'arrêt du traitement.

Parmi les autres effets indésirables largement décrits, il a été rapporté le développement de troubles cardio-vasculaires, notamment des bradycardies chez 3,3% des patients et en particulier dans les 3 premiers mois de traitement, des blocs auriculo-ventriculaire ou encore des extrasystoles ventriculaires. Certains troubles généraux apparaissent également avec l'apparition de céphalées dans les premiers mois de traitements, de sensations vertigineuses probablement liées à la bradycardie.

Actuellement, l'ivabradine n'est donc utilisée que dans le traitement de pathologies cardio-vasculaires mais de récentes études montrent que son utilisation pourrait s'étendre au traitement de la douleur notamment inflammatoire et neuropathique (Noh et al., 2014; Young et al., 2014).

ARTICLE 1:

“ORAL AND PERIORAL HYPERSENSITIVITY INDUCED BY OXALIPLATIN IS MEDIATED BY HCN CHANNELS UPREGULATION IN TRIGEMINAL GANGLIA”

**Laura POUPON^{1,2}, Vanessa PEREIRA^{1,2}, Youssef AISSOUNI^{1,2}, Maryse CHALUS^{1,2}, Laëtitia PRIVAL^{1,2},
Amélie DESCHEEMAEKER², Radhouane DALLEL³, Alain ESCHALIER^{1,2,3}, Jérôme BUSSEROLLES^{1,2}.**

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, Clermont-Ferrand, FRANCE ² Inserm, U1107, Neuro-Dol, Clermont-Ferrand, FRANCE ³CHU Clermont-Ferrand, Service de pharmacologie, F-63003 Clermont-Ferrand, FRANCE.

Présentation de l'article

L'expression des gènes, notamment ceux codant pour les canaux ioniques, joue un rôle prépondérant dans le développement et le maintien des douleurs qu'elles soient aiguës ou chroniques. En effet, des variations du niveau d'expression des protéines ou d'ARNm dans le SNP ou le SNC ont été mises en évidence dans différents modèles de douleurs inflammatoires ou neuropathiques. Ces variations peuvent contribuer à la genèse de décharges ectopiques, à l'abaissement des seuils de réponses des neurones ou à une plasticité synaptique renforçant la transmission du message de la périphérie au centre.

En clinique, la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine se manifeste par la survenue de paresthésies et/ou dysesthésies déclenchées ou exacerbées par le froid au niveau extracéphalique mais également au niveau céphalique dans la zone orale et péri-orale. Ces symptômes touchant la sphère orofaciale sont largement décrits en clinique mais très peu étudiés en préclinique. L'existence de différences embryologiques et moléculaires entre les TGs et les DRGs pourraient suggérer que les mécanismes expliquant l'apparition de l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine ne soient pas similaires entre ces deux territoires corporels. Ces mécanismes pourraient probablement expliquer les différences d'efficacité des traitements actuellement proposés en réponse aux symptômes retrouvés au niveau de ces deux territoires. (Michot et al., 2014). Compte tenu de ces éléments, nous émettons l'hypothèse que la découverte d'altérations moléculaires et/ou fonctionnelles qui seraient communément observées au niveau des deux territoires, céphalique et extracéphalique, pourraient représenter des cibles moléculaires plus pertinentes sur le plan physiopathologique pour le traitement de la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine. Au laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Dr Emmanuel Bourinet (IGF, Montpellier), nous avons observé que l'injection d'oxaliplatine s'accompagne rapidement, dès le quatrième jour après l'injection, et en corrélation avec l'acmé des symptômes douloureux, d'une modulation de l'expression de certains canaux ioniques (Descoeur et al., 2011) et notamment une augmentation du canal pro-excitateur HCN1 (**Figure 16**). Des données non publiées, montraient, chez les mêmes animaux, qu'au niveau trijéminal, seule l'expression des canaux HCN, HCN1 mais aussi HCN2, était surexprimée, ce qui pouvait en faire des cibles à privilégier.

Ainsi l'objectif de ce travail a donc été de mieux comprendre la physiopathologie de l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine au niveau de la sphère orofaciale. Pour cela, nous avons mis en place des tests comportementaux permettant d'évaluer l'hypersensibilité douloureuse chimio-induite au niveau céphalique. Chez les mêmes animaux, nous avons réalisé des analyses moléculaires de l'expression des canaux HCN1, HCN2 et de leur protéine partenaire trip8b au niveau du TG. Nous avons également recherché à valider pharmacologiquement les canaux HCN comme cibles pour le traitement de la neuropathie aigue induite par l'oxaliplatine en testant l'effet antalgique de l'ivabradine chez ce modèle animal de neuropathie aigue.

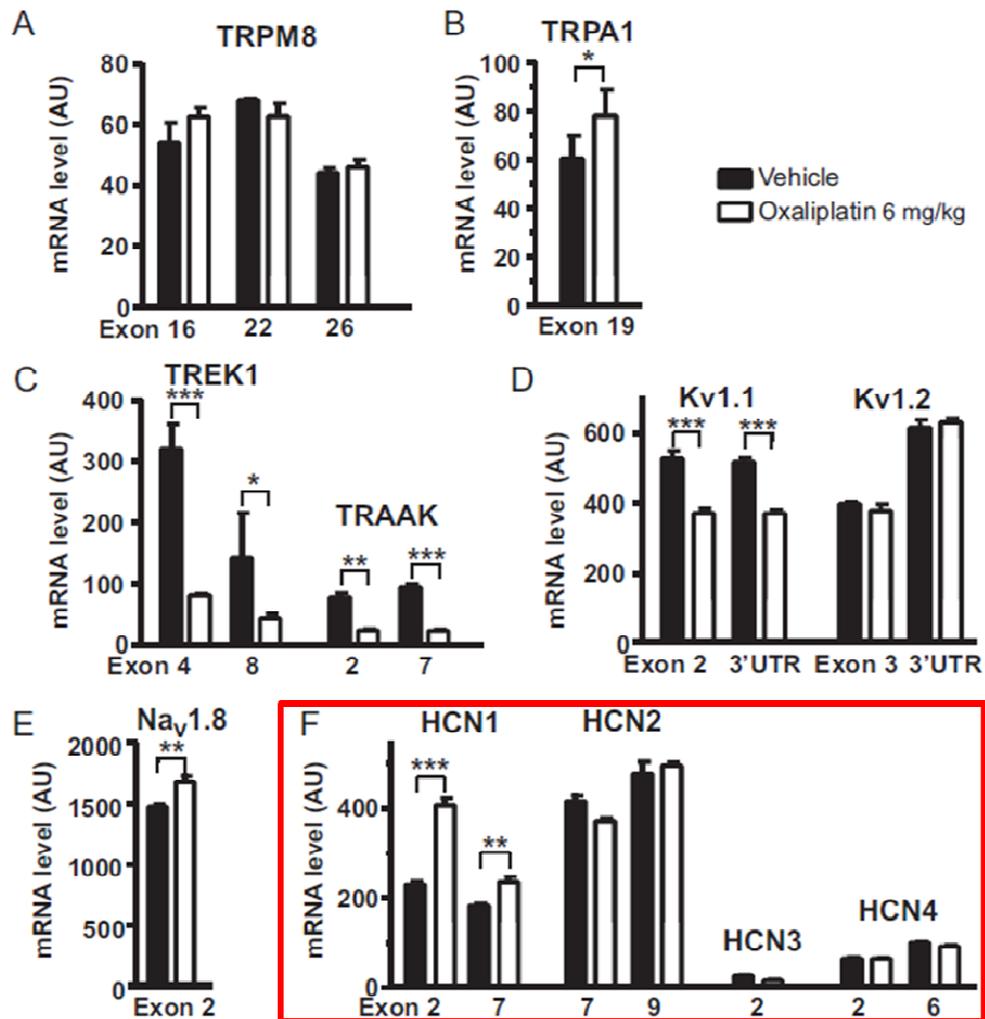


Figure 16 : Profil d'expression d'un ensemble de canaux ioniques suite à l'injection d'oxaliplatine au niveau du DRG.

Les barres noires représentent l'expression des canaux chez les souris contrôles et les barres blanches l'expression des canaux chez les souris traitées par oxaliplatine (6mg/kg). Parmi ces canaux, nous pouvons trouver les principaux senseurs du froid (A-B), des canaux potassiques (C-D), un canal sodique (E) ainsi que les canaux activés par l'hyperpolarisation (F) (Descoeur et al., 2011).

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Article I : présentation de l'article

En se basant sur le modèle de neuropathie aigue à l'oxaliplatine (administration unique à 6mg/kg) utilisé au laboratoire, nous avons cherché à évaluer, par des tests comportementaux adaptés, la sensibilité des animaux à des stimuli thermiques ou mécaniques appliqués au niveau de la sphère orofaciale. Ainsi, la sensibilité au froid dans la zone orale et pharyngée a été évaluée par un test d'aversion à l'eau froide ($4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) consistant à mesurer la consommation d'eau froide des souris ayant ou non été traitées à l'oxaliplatine. Ce test a permis de montrer que les souris traitées à l'oxaliplatine consommaient significativement moins d'eau froide que les souris contrôles dès le 3^e jour après l'injection d'oxaliplatine. Aucune différence n'a par ailleurs été observée lorsque le test a été réalisé avec de l'eau tempérée montrant bien qu'il ne s'agit pas d'une diminution de l'appétence à l'eau mais bien d'une aversion liée à la température de l'eau. L'allodynie au froid a quant à elle été mise en évidence par le test à l'acétone qui consiste à appliquer 20 μL d'acétone au niveau de la surface cutanée mandibulaire de l'animal et à comptabiliser le temps de grattage de l'animal induit par cette stimulation durant une minute. A partir du 3^e jour après l'injection, il a été observé une augmentation significative du temps de grattage chez les animaux traités à l'oxaliplatine traduisant bien l'apparition d'une hypersensibilité au froid. L'hypersensibilité mécanique a également été mise en évidence dans ce modèle par l'utilisation du test du pinceau qui consiste à stimuler avec des pinceaux calibrés les vibrisses de l'animal. Une augmentation du nombre de réponses sur les 5 stimulations a pu être observée chez les animaux traités à l'oxaliplatine à partir du 2^e jour après l'induction de la neuropathie.

Afin de comprendre le mécanisme moléculaire pouvant expliquer cette hypersensibilité douloureuse au niveau de la sphère orofaciale et en se basant sur les résultats obtenus précédemment concernant les symptômes extracéphaliques, nous avons recherché si des variations d'expression de certains canaux ioniques impliqués dans la nociception existaient au niveau des TGs et si ces variations étaient ou non identiques à celles observées précédemment au niveau des DRGs. Alors que l'expression de plusieurs canaux dépolarisants et hyperpolarisants était significativement modulée, augmentée et diminuée respectivement, dans les DRGs des animaux traités à l'oxaliplatine, au niveau des TGs nous avons observé que l'expression des transcrits de TRPM8 et TRPA1, principaux senseurs du froid, n'était pas altérée et que seule l'expression des transcrits codant pour les canaux dépolarisants HCN1 et HCN2 était augmentée quatre jours après le traitement à l'oxaliplatine. Nous avons également observé, à la fois par immunohistochimie et western blot, une augmentation de l'expression protéique des canaux HCN1 et HCN2 dans le ganglion trijumeau chez les animaux traités à l'oxaliplatine. De plus, l'expression protéique de TRIP8b, protéine connu pour son rôle dans l'adressage membranaire des canaux HCN, est également augmentée dans les TGs ce qui pourrait participer

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Article I : présentation de l'article

à l'explication du rôle important des canaux HCN dans l'excitabilité nerveuse périphérique lors d'un traitement à l'oxaliplatine.

Afin de confirmer la contribution de ces canaux HCN dans les symptômes douloureux liés à l'administration d'oxaliplatine, une approche pharmacologique a été entreprise. Le choix de l'antagoniste des canaux HCN s'est porté sur l'ivabradine (Procoralan®). A l'acmé des troubles sensitifs induits par l'oxaliplatine (J4), l'ivabradine a permis de réverser l'hypersensibilité au froid validant les canaux HCN comme cibles intéressantes dans le traitement de ce symptôme. Les symptômes mécaniques ont pu être réversés exclusivement lors d'un traitement préventif à l'ivabradine, indiquant qu'une dose plus importante de la molécule serait nécessaire à la suppression de ce type de symptômes.

En collaboration avec l'équipe de du Dr Emmanuel Bourinet à l'IGF de Montpellier, nous souhaitons évaluer l'impact de l'oxaliplatine en présence ou non d'ivabradine sur le pourcentage de neurones de TGs en culture sensibles au froid ainsi que sur leurs seuils de réponse à cette stimulation. Nous pourrions ainsi comparer l'effet de cet anticancéreux sur ces deux paramètres des neurones trijéminaux avec les données obtenues au niveau des DRGs et observer si les résultats comportementaux obtenus avec l'ivabradine peuvent s'expliquer par un remodelage des neurones sensibles au froid au niveau du TG.

L'ensemble de ces données nous a permis de valider l'existence du développement d'une hypersensibilité orofaciale dans le modèle de neuropathie aigue chimio-induite à l'oxaliplatine déjà mis en place au sein du laboratoire. En se basant sur le panel de canaux ioniques dont l'expression est modulée au niveau des DRGs et corrélée aux symptômes douloureux observés sur le territoire extracéphalique (Descoeur et al., 2011), nous avons découvert qu'au niveau trigéminal seule une surexpression des canaux HCN1 et HCN2 est induite par l'oxaliplatine. Nous avons confirmé le potentiel antalgique d'un bloqueur connu de ces canaux HCN dans ce modèle. En effet l'ivabradine réverse les symptômes d'hypersensibilité au froid et d'hypersensibilité mécanique induits par l'oxaliplatine non seulement au niveau du territoire extracéphalique mais également au niveau de la sphère orofaciale.

Abstract

Previous data showed that neuropathic pain symptoms induced by oxaliplatin-chemotherapy such as cold hypersensitivity could be due to variation of different ion channel expression in dorsal root ganglia (DRG) but no study exists to underlying mechanisms in trigeminal ganglia (TG).

C57BL/6J received a unique injection of oxaliplatin (6mg/kg) and behavioral tests were realized every day until day 4, which correspond to extra-cephalic cold-hypersensitivity peak previously reported in this model. Thermal hypersensitivity (acetone test and water aversion test) was assessed at the extra-cephalic level. Immunohistochemistry were realized in TG and caudalis.

Oxaliplatin induced cold hypersensitivity at cephalic level. Among all the studied expression channels, only HCN1 and HCN2 showed a surexpression in TG. The use of ivabradin (Procoralan®), an HCN blocker, resulted in a reversion of cold hypersensitivity. Despite the absence of TRPM8 and TRPA1 mRNA expression remodeling in TGs exposed to oxaliplatin, we investigate the contribution of these two cold-sensitive channels to cold-hypersensitivity, using either mice genetically invalidated for TRPM8 gene or the pharmacological inhibition of TRPA1.

These data showed that variation of ion channel expression are different between DRG and TG, suggesting different mechanisms to explain neuropathic pain development induced by oxaliplatin at cephalic and extra-cephalic level. However, the surexpression of HCN channels observed both at the cephalic and extracephalic levels make these channels of particular relevance for the treatment of oxaliplatin-induced neuropathy which was pharmacologically validated using ivabradin in mice.

***Keywords:* Oxaliplatin - HCN - orofacial hypersensitivity - neuropathic pain - TG**

1. Introduction

Neuropathic pain is a major public health problem because available treatments produce incomplete relief, and have dose limiting side effects (Baron et al., 2010). Furthermore, antineuropathic pain drugs can have different efficacy to alleviate symptoms at cephalic versus extra-cephalic levels (Attal et al., 2010; Robinson et al., 2004) in line with clear-cut data showing chronic injury-induced orofacial pain has specific characteristics compared with extracephalic nerve injury-induced pain mediated through the spinal nociceptive system (Fried et al., 2001; Hargreaves, 2011). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) may develop as a consequence of treatment with multiple chemotherapy agents, including platinum compounds. For example oxaliplatin, a third-generation platinum analog that is active against both early-stage and advanced colorectal cancer, produces significant neurotoxicity, a potential dose-limiting adverse side effect of treatment (André et al., 2004, 2009) characterized by symptoms such as paresthesia, dysesthesia and numbness induced or exacerbated by cold at both extracephalic (hands and feet) and cephalic (mouth and throat) territory immediately following the first infusion in 90% of patients (Argyriou et al., 2008; Attal et al., 2009; Wilson et al., 2002). Some patients also experience difficulty swallowing or shortness of breath exacerbated by the ingestion of cold liquid (Gramont et al., 2000; Schmoll, 2002). So far, despite cold hypersensitivity in oral and peri-oral territories described in patients under oxaliplatin treatment, preclinical studies were mainly focus on extra-cephalic area hypersensitivity induced by oxaliplatin and molecular variations (Descœur et al., 2011; Gauchan et al., 2009; Ling et al., 2007; Nassini et al., 2011; Ta et al., 2009) occurring in dorsal root ganglia that can explain, at least partly, the development of pain hypersensitivity at the extracephalic level. However, embryological and molecular differences that distinguish DRGs sensory neurons innervating limbs and viscera from trigeminal ganglia (TG) sensory neurons innervating face and oral territories strongly suggests that regulation of ion channel expression could differ in cephalic and extra-cephalic ganglia. Recently, M. Hamon group published a comparative study about oxaliplatin-induced cold and mechanical hypersensitivity pharmacological management at cephalic versus extra-cephalic level in both mice and rats (Michot et al., 2014). They found regional differences in drugs analgesic efficacy in OIPN, supporting the idea that molecular mechanisms underlying neuropathic pain are different between DRGs and TGs. Nonetheless, oxaliplatin impact on orofacial sensitivity in rodent and molecular mechanisms underlying the trigeminal neuropathy remains poorly understood.

Transient Receptor Potential channels TRPM8 and TRPA1 are major cold-sensitive channels. As they are respectively activated by moderate (25°C~34°C) and extreme cooling ($\leq 17^\circ\text{C}$) and involved in both innocuous and noxious cold perception (Vay et al., 2012). TRPM8 and TRPA1 expression in DRG under oxaliplatin treatment has been widely investigated. In most OIPN models, TRPA1 channel is upregulated in DRG during oxaliplatin induced neuropathy (Descoeur et al., 2011; Kato et al., 2014; Kawashiri et al., 2012; Nassini et al., 2011; Ta et al., 2010). Moreover, TRPA1 antagonists abolish acute cold hypersensitivity (Descoeur et al., 2011; Nassini et al., 2011; Trevisan et al., 2013; Zhao et al., 2012) and TRPA1 knockout mice are insensitive to OIPN (Nassini et al., 2011). TRPM8 channel upregulation is also frequently associated with oxaliplatin neuropathy (Gauchan et al., 2009; Kato et al., 2014; Kawashiri et al., 2012). The voltage-gated sodium channel Nav1.8, expressed in small-diameter sensory neurons important for cold pain perception (Zimmermann et al., 2007), is also upregulated in DRG exposed to oxaliplatin as well as Hyperpolarization-Activated Cation Nonselective (HCN) channels (Descoeur et al., 2011). HCN1 and HCN2 channels triggers an inward current in neurons termed I_h which is activated by membrane hyperpolarization (Wainger et al., 2001). HCN1, the dominant HCN transcript in mouse DRG, is expressed in both large neurons and a restricted sub-population of cold-sensitive small neurons whereas HCN2 is only expressed in small neurons (Momin et al., 2008; Moosmang et al., 2001; Orio et al., 2009). HCN1 lacking mice and mice carrying an HCN2 deletion in nociceptive neurons have both reduced cold allodynia in nerve injury models of neuropathic pain (Emery et al., 2011; Orio et al., 2009).

On the other hand, inward rectifying potassium channels TREK1 and TRAAK, as well as Kv1.1 voltage-gated channel are downregulated in OIPN (Descoeur et al., 2011). TREK1 and TRAAK are important modulators of both thermoception and nociception (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). TREK1/TRAAK double knockout mice are unable to develop oxaliplatin-induced cold hypersensitivity suggesting that TREK/TRAAK potassium channels downregulation contributes to cold-sensing neurons hyperexcitability in OIPN (Descoeur et al., 2011).

In order to understand the pathophysiology of cephalic oxaliplatin-induced cold hypersensitivity, we developed behavioral tests adapted to mice to assess their orofacial sensitivity. Based on data presented in our previous article (Descoeur et al., 2011), these tests were performed after a single administration of oxaliplatin at 6 mg/kg, a dose that have previously shown to induce neurotoxicity in mice. We found that a single injection of oxaliplatin was followed by the rapid development of hypersensitivity to innocuous and noxious cold stimuli at cephalic territory like that was previously shown at extra-cephalic territory. Study of expression levels of several ions channels show important differences between DRG and TG

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Article I : Introduction

profile expression. Hence, among all the channels evaluated only HCN channels are overexpressed both in DRG and TG which make these channels good targets for the treatment of oxaliplatin-induced neuropathy. This hypothesis has been pharmacologically validated by the use of ivabradin, a non specific HCN inhibitor which have been shown to alleviate cephalic hypersensitivity in mice treated by oxaliplatin.

2. Results

Oxaliplatin induced oral and perioral hypersensitivity in mice

In order to understand molecular mechanisms governing orofacial hypersensitivity induced by oxaliplatin, and compare them to our previous extra-cephalic data, we needed to know how cephalic sensitivity is affected by a single oxaliplatin administration in mice. Thus, we adapted for mice behavioral test allowing orofacial sensitivity evaluation.

The aim of the first test was to evaluate oxaliplatin-induced oral cavity cold-hyperalgesia. Briefly, animals were trained during for 4 days to have access to room temperature equilibrated water during 3 hours per day. After this training period, i.e. at D0, mice were either treated with oxaliplatin (6 mg/kg, i.p.) or its vehicle (glucose 5%, i.p.) and were watered with $5 \pm 1^\circ\text{C}$ cold water during 4 more days. Water consumption during the 3 hour drinking sessions has been monitored each day. Since the 3rd day after injection (D3) cold-water consumption was significantly lower in oxaliplatin-treated mice in comparison to vehicle group (**Fig 1A**). That difference was maintained at day 4, which correspond to extra-cephalic cold-hypersensitivity peak previously reported in this model (Descoeur et al., 2011). Water aversion test was also performed with tempered water in both oxaliplatin and vehicle-treated mice. No difference between vehicle and oxaliplatin groups was observed (**data not shown**).

Cool allodynia induced by oxaliplatin was evaluated in peri-oral territory by a time-course measurement of grooming behavior induced by a 20 μL drop of acetone applied in vibrissae surface. Grooming behavior provoked by acetone-mediated skin cooling was significantly increased in oxaliplatin-treated mice in comparison to vehicles animals (**Fig 1B**).

Finally, we used brush stimulation of vibrissae surface to assess mice cephalic mechanical sensitivity. Briefly, mice vibrissae surface were stimulated by 5 consecutive soft brush applications. Mice unpleasant related-behavior reaction in response to brush per application round was recorded. The number of allodynic responses to brush stimulation was significantly increased in neuropathic mice as compared to vehicle-treated mice from day 2 after oxaliplatin administration until the end of behavioral assessment at day 4 (**Fig 1C**).

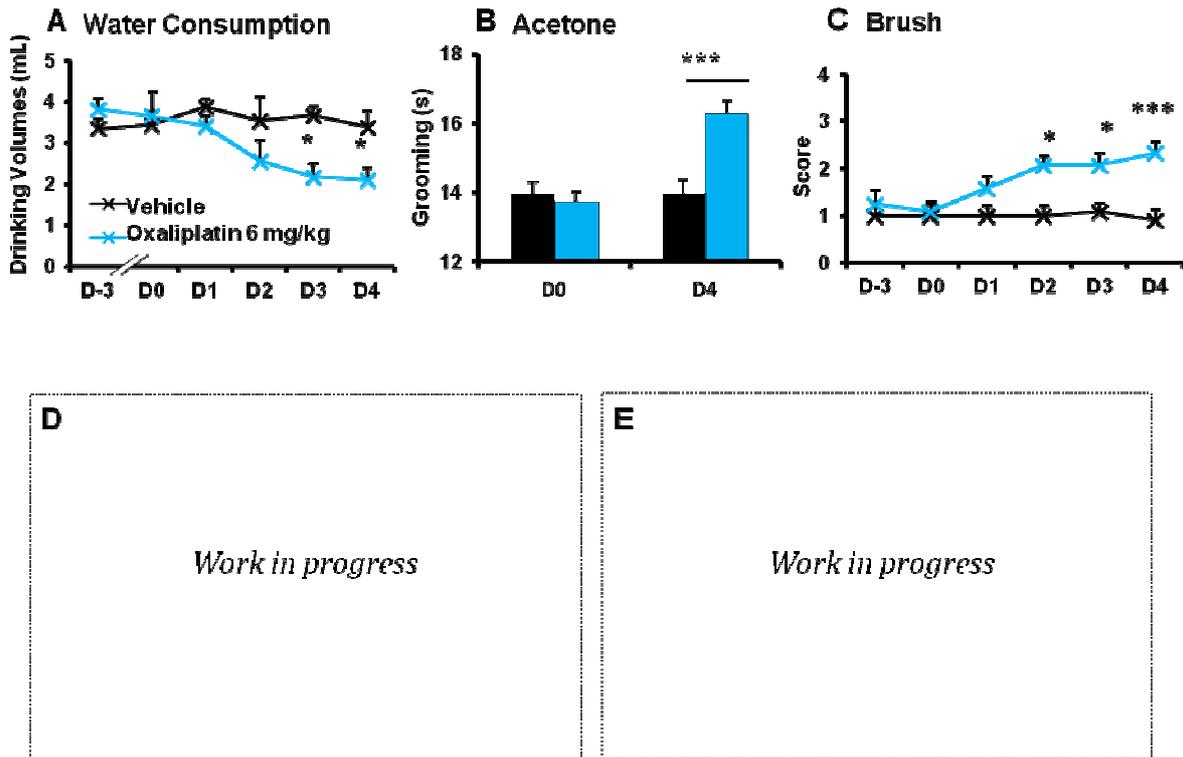


Figure 1: Oxaliplatin effects on wild-type mice cold and cool perception.

(A) Vehicle or oxaliplatin (6 mg/kg, i.p. injection) treated mice consumption of cold water ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) during 3 hour sessions. (B) Grooming behavior after acetone application in the upper lip area skin surface. (C) Response to dynamic mechanical stimulation with five consecutive strokes of brush. (D) Effect of oxaliplatin treatment on cold-sensing TG neurons *in vitro*. Frequency distribution of temperature threshold for cold sensitive neurons from vehicle or oxaliplatin mice and (E) Percentage of cold sensitive TG neurons. Values are mean \pm SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *, * for $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Oxaliplatin transcriptionally regulates HCN channels in TG

Since we previously observed transcriptional changes of a specific array of genes encoding for ionic channels involved in cold sensing in the DRGs of oxaliplatin-treated mice, we performed quantitative PCR analysis of TG neurons to detect potential changes in the expression of the same candidate genes coding for ion channels known to be involved in cold-sensing nociceptors excitability. These comprised the cold thermosensors TRPM8 and TRPA1; the mechanical and thermal-sensitive potassium channels TREK1, TREK-2 and TRAAK, the KV1.1 and KV1.2 potassium channels; the NaV1.8 sodium channel; and the hyperpolarization-activated channels (HCN1-2). Total RNA was obtained from TG at day 4 post vehicle or oxaliplatin injection (8 mice per condition). Expression levels were normalized to the expression of two invariant housekeeping genes (HKGs) in the RNA samples analysed. For most of the analysed transcripts, several sets of primers were selected in individual exons. While at the DRG level oxaliplatin promotes excitability by drastically lowering the expression of distinct potassium channels (TREK1, TREK-2, TRAAK, Kv1.1), and by increasing the expression of pro-excitatory

channels such as TRPA1, Nav1.8 and the hyperpolarisation-activated channel (HCN-1). At the TG level neither mRNA expression of TRPM8 and TRPA1 channels (**Fig 2A-B**), nor the two-pore potassium channels TREK1 and TRAAK (**Fig 2C**), or the slowly inactivating voltage-gated potassium channel Kv1.1 and Kv1.2 (**Fig 2D**) and the sodium channel Nav1.8 transcripts (**Fig 2F**) were altered by oxaliplatin. Concerning transcripts coding for hyperpolarization activated currents (I_h), oxaliplatin treatment resulted in highly significant increase of HCN1 and HCN2 (**Fig 2E**). Collectively, this transcriptome analysis reveals that oxaliplatin induces a more restricted remodelling of the candidate ion channel expression in the TGs as compared to what have been observed in the DRGs.

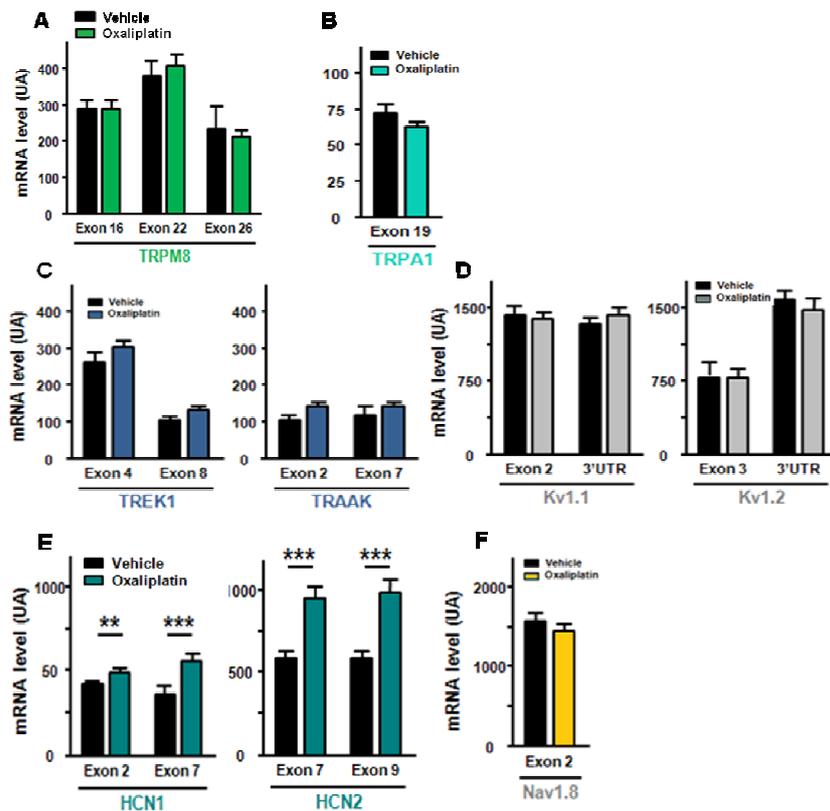


Figure 2: Oxaliplatin (6mg/kg) effects on the expression profile of a set of ion channels in TG.

The filled and color bars represent the vehicle- and the oxaliplatin-treated samples, respectively. The number in the X-axis correspond to the exon number targeted in the given channel transcript analysed. (A)(B) Expression of the cold-activated thermoreceptors, TRPM8 and TRPA1. (C) Expression profile of potassium channels TREK-1 and TRAAK and (D) Kv1.1 and Kv1.2 (E) Expression profile of the HCN1 and HCN2 hyperpolarization activated cationic channels. (F) Expression of the sodium channel Nav1.8. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *; * for p < 0,05; *** p < 0,001. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

TRPA1 and TRPM8 are required for oxaliplatin-induced cold-hypersensitivity

Cold hypersensitivity is the main symptom induced by oxaliplatin and major cold sensors channels are TRPM8 and TRPA1. Despite the absence of TRPM8 and TRPA1 mRNA expression remodeling in TGs exposed to oxaliplatin, we investigate the contribution of these two cold-

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Article I : Results

sensitive channels to cold-hypersensitivity, using either mice genetically invalidated for TRPM8 gene (**Fig 3A-C-E**) or the pharmacological blockade of TRPA1 (**Figure 3B-C-D**). In TRPM8 KO mice, no differences has been shown in water aversion and acetone test between day 0 and day 4 and mechanical allodynia was conserved at day 4, suggesting that oxaliplatin mediates a cold hypersensitivity (both hyperalgesia to noxious cold, and allodynia to innocuous cool) via TRPM8 afferent fibers, but the mechanism must be determined. Similarly, the use of HC00303 (TRPA1 antagonist) is capable to reverse cold hypersensitivity observed at day 4 in water aversion and acetone test but not mechanical hypersensitivity. Oxaliplatin mediated cold hyperalgesic animals were treated i.p. with HC003031 at 100mg/kg (an in vivo active concentration in rodents (Eid et al, 2008)) or its vehicle. Thirty minutes after treatment, mice were subjected to the cold tolerance paradigm. The treatment had a significant effect on the oxaliplatin cold hypersensitivity corroborating the notion that TRPA1 channels plays an important role in the mechanisms responsible for mechanical hypersensitivity in neuropathic condition (Eid et al, 2008). However, acute mechanical pain perception in control animals was not affected by the antagonist suggesting that the transduction of mechanical stimuli is governed by multiple molecular substrates.

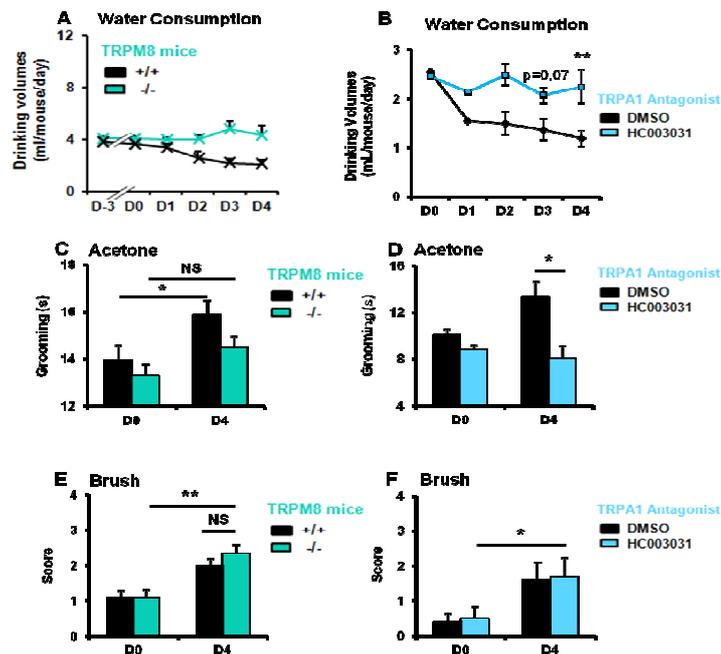


Figure 3: TRPM8 and TRPA1 channels involvement in oxaliplatin induced orofacial hypersensitivity.

WT (black histograms) and TRPM8 KO or HC003031 treatment (colored histograms) mice were treated by oxaliplatin (6mg/kg). Mice consumption of cold water ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) during 3 hour sessions every day from day 0 to day 4 in TRPM8 KO mice (**A**) and in TRPA1 antagonist treated mice (**B**). Grooming behavior after acetone application in the upper lip area skin surface in TRPM8 KO mice realized at day 4 after oxaliplatin treatment (**C**) or in TRPA1 antagonist (HC003031) treated mice (**D**). Response to dynamic mechanical stimulation with five consecutive strokes of brush every day from day 0 to day 4 in TRPM8 KO mice (**E**) and in TRPA1 antagonist treated mice (**F**). Black histograms correspond to the control group and the colored histogram corresponds to the group treated by oxaliplatin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Involvement of HCN channels in acute neuropathy induced by oxaliplatin

HCN transcripts surexpression after oxaliplatin treatment is thus the unique common transcritptionnal regulation that appear both at the DRG and at the TG levels (**Fig2E**). Moreover, we found an up-regulation of HCN1 and HCN2 channels protein levels either using immunostaining (**Fig 4A, C**) or western-blot analysis of TG after oxaliplatin treatment (**Fig 4B, D**), suggesting these channels could participate in the effects of oxaliplatin. It is also worthy to note that TRIP8b (TPR-containing Rab8b interacting protein), an accessory protein that regulates the cell surface expression and reduces the cyclic nucleotide dependence of these channels (DeBeg HA et al., 2015), was also found to be upregulated in TG after oxaliplatin injection (**Fig 4E**).

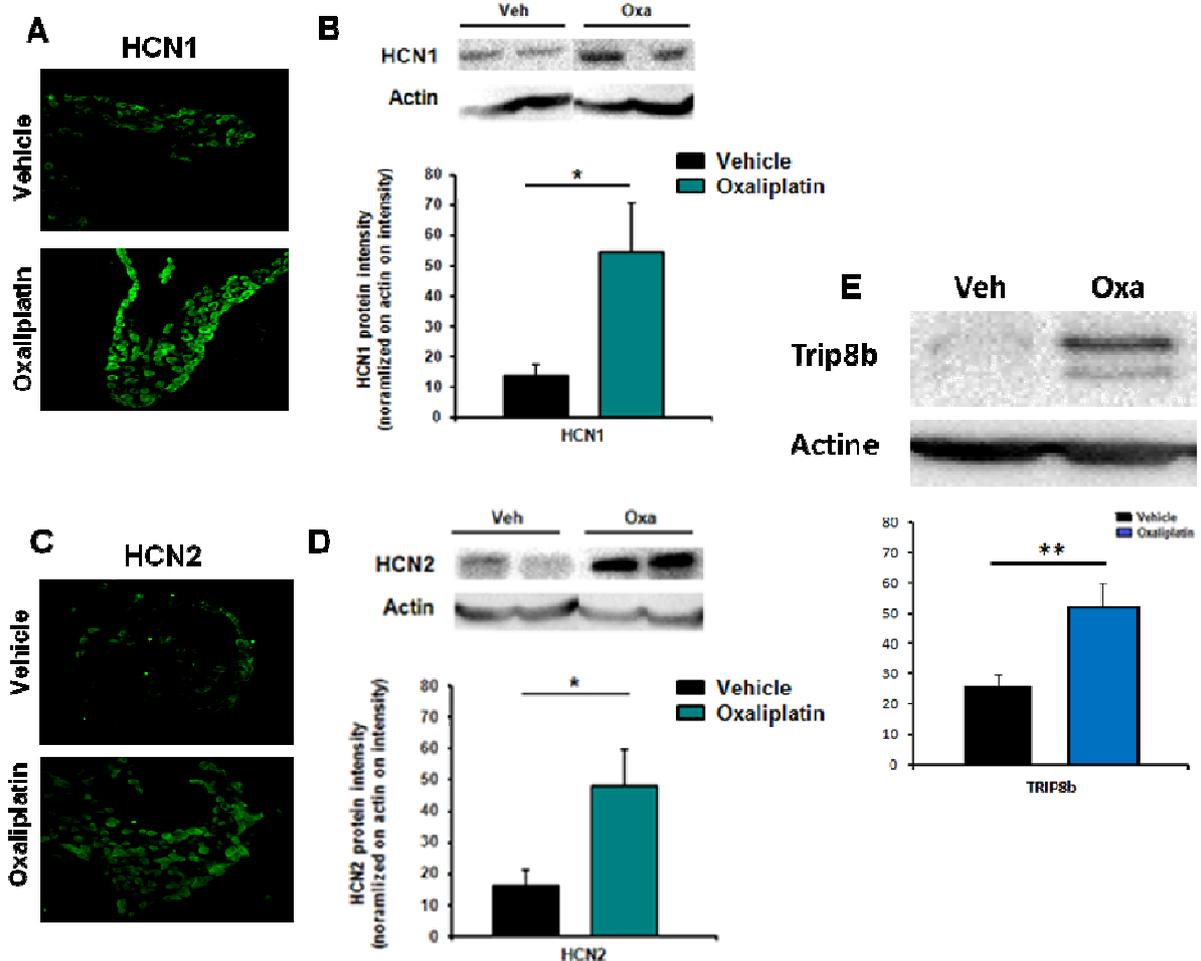


Figure 4: HCN channels and trip8b proteins expression is increased in the TG of oxaliplatin treated mice.

WT mice were treated by oxaliplatin (6mg/kg ip). (**A**) (**C**) Respectively HCN1 and HCN2 channels immunodetection in trigeminal ganglia sections (TG) (**B**) (**D**) Oxaliplatin effect on the protein expression profile of HCN1 and HCN2 channels in trigeminal ganglia. (**E**) Oxaliplatin effect on the protein expression profile of Trip8b in trigeminal ganglia. Black histograms correspond to the control group and the colored histogram correspond to the group traited by oxaliplatin (6mg/kg). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

As HCN channels triggers Ih current in sub-populations of cold-sensitive neurons, modulating these channels activity could prevent hypersensitivity to cold induced by oxaliplatin. To confirm this hypothesis, we assessed the impact of HCN channel antagonist ivabradine (Procoralan®) on orofacial sensitivity. Using both acetone and brush test in vibrissae surface, we shown that HCN channel blocker did not affect cold and mechanical perception in naïve animals. After neuropathy induction, ivabradine specifically reversed cold hypersensitivity (acetone and water aversion test) without affecting mechanical allodynia. (Fig 5).

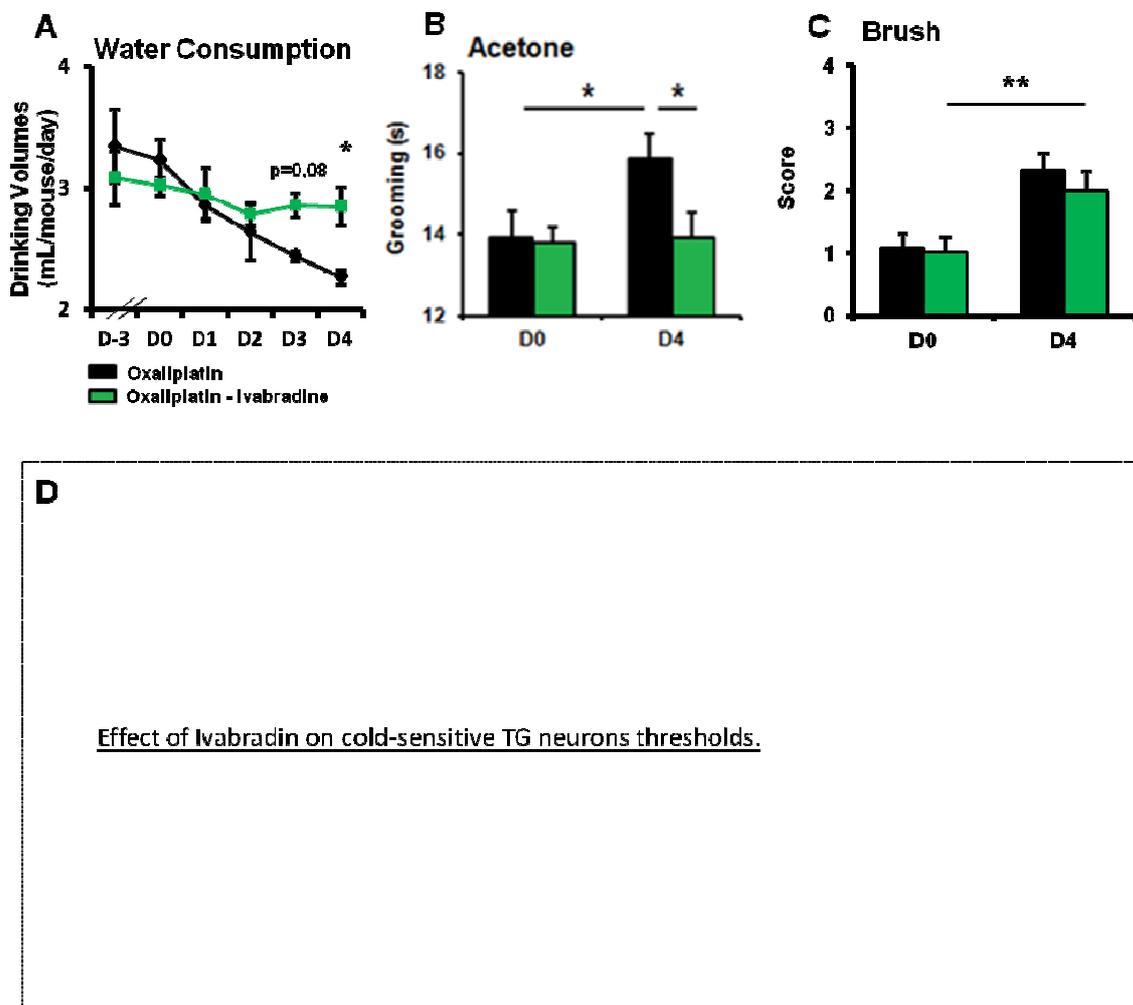


Figure 5: Ivabradin prevents oxaliplatin-induced orofacial cold hypersensitivity.

WT mice were treated by oxaliplatin (6mg/kg ip) until day 4 (D4), corresponding to acme pain symptoms. (A) Response to Mice consumption of cold water ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) during 3 hour sessions every day until day 4. (B) Grooming behavior after acetone application in the upper lip area skin surface. (C) Response to dynamic mechanical stimulation with five consecutive strokes of brush at day 0 and day 4. (D) calcium imaging. Black histograms correspond to the control group treated by oxaliplatin and the colored histogram correspond to the group traited by combination oxaliplatin-ivabradine (3mg/kg). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

3. Discussion

In this study, we showed that one administration of oxaliplatin induced allodynia and hyperalgesia in cephalic territory (vibrissae and oral areas) in mice. Oxaliplatin has specific features with regard to other anticancer drugs, notably because it induces two types of neuropathy: acute and chronic neuropathic pain signs associated specifically to exacerbated cold perception in almost all patients (Attal et al., 2009). In this study, we have targeted only acute neurotoxicity, which appears just after first treatment and lasts for a few days. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy is a common, often severe and dose limiting toxic side effect of cancer treatment (Wolf et al., 2008). Despite its clinical relevance, several important issues are still to be addressed for a less empirical therapeutic management of these pain symptoms. These include a better understanding of the underlying mechanisms of these neuropathies. Symptoms are reversible cold-induced paresthesia, dysesthesia or pain mainly localized in hands, feet and face (Argyriou et al., 2008). Oxaliplatin neurotoxicity is thought to be caused by voltage-gated sodium channel impairment due to calcium chelation by oxalate, an oxaliplatin metabolite (Grolleau et al., 2001; Kawashiri et al., 2012). Various studies have also reported oxaliplatin ability to modulate expression of ion channel encoding genes linked to cold and mechanical perception in rodent dorsal root ganglia (DRG) (Gauchan et al., 2009; Kawashiri et al., 2012; Nassini et al., 2011) but no study exists about variation in expression in trigeminal ganglia (TG). In fact, the mechanisms involved, and possible treatment targets, in orofacial pain due to chemotherapy are poorly understood. Understanding the mechanisms involved in chemotherapy-related orofacial pain will enhance patient management.

Chemotherapy-induced acute peripheral neuropathy frequently shows an oral and perioral cold hypersensitivity in patients. Despite existing embryological differences between sensory neurons of the TGs and DRGs, no preclinical study trying to compare the impact of oxaliplatin in orofacial area and underlying molecular mechanisms have been realized to our knowledge. To understand oxaliplatin-induced cephalic physiopathology, we have developed a behavioral test in mouse to estimate pain in orofacial area. These tests were realized after a unique administration of oxaliplatin at 6mg/kg, basing on previous behavioral results obtained at the extracephalic level (Descoeur et al., 2011).

Cold hyperalgesia in oral zone was estimated by water aversion test. We showed that oxaliplatin-mice consumed significantly less cold water than vehicle animals from the 3rd day after the injection, showing an aversion to cold water due to acute neuropathy development induced by oxaliplatin. This test was also realized with normal water (ambient temperature) and

no differences were observed between oxaliplatin or vehicles animals. Cold allodynia in peri-oral zone was estimated by acetone test. Grooming time are increased significantly in oxaliplatin animals 2 days after injection and continue to increase until day 4, which corresponding to peak of the symptoms. Mechanical hyperalgesia in orofacial sphere was assessed by brush test, consisting to apply stimulations in vibrissae territories with brush. Score are increased significantly in oxaliplatin animals 2 days after injection.

To identify various molecular actors involved in orofacial sensitivity induced by oxaliplatin-chemotherapy, and to compare the data obtained with previous study showing expression variations for each ionic channels in DRG after oxaliplatin treatment (Descoeur et al., 2011), we analyzed expression of the same channels. No variation in TG was observed for TRPM8, TRPA1, TREK1, TREK2, TRAAK, Kv1.1, Kv2.2, or Nav1.8 while DRG analysis had revealed a surexpression of TRPA1, Kv1.1 and Nav1.8 and a subexpression of TREK and TRAAK channel (Descoeur et al., 2011; Pereira et al., 2014). We found an up-regulation of both HCN1 and HCN2 channels transcripts and of proteins levels in TG after oxaliplatin treatment, suggesting these channels could participate in the effects of oxaliplatin. HCN1 surexpression had also reported in DRG (Descoeur et al., 2011). *Ih* channels encoded by the HCN subunits have been linked to cold perception (Momin et al., 2008; Orio et al., 2009). *Ih* current generated by HCN channels participate in control of neuronal excitability by modulating PA frequency further to a nociceptive stimulus.

Furthermore, animals genetically or pharmacologically invalidated for HCN1 have a perception alteration of cold and warm for extreme temperatures (Orio et al., 2009). Modulation of channels HCN1 and HCN2 activity could limit cold hypersensitivity and mechanical allodynia induced by oxaliplatin. Evaluation of the expression of all the members of this channel family revealed that HCN1 and 2 are predominant in trigeminal ganglia, and that oxaliplatin up regulates these 2 channels. These increases in HCN1 and HCN2 are consistent with data on neuropathic pain (Wells et al., 2007) This previous data showed a significant increase of TG neurons immunopositive for HCN1 and HCN2 after pulp injury. Given that *Ih* can facilitate neuronal excitability, results of current study suggest that antagonists to HCN1 and 2 subunits could work as analgesics in the alleviation of orofacial pain. Furthermore, *in vivo* microneurography recordings of single cold-sensing C-fibers in rats suggested the importance of HCN channels in their firing (George et al., 2007). In addition, cold-sensing fibres have been described to prominently elicit rhythmic firing (Orio et al., 2009), including in humans with persisting ongoing activity following cold exposure (Serra et al., 2009), wich is compatible with HCN channel activity, also known as the "pacemaker channels". Indeed, HCN channels also shape the excitability of heart pacemaker cells and a pan HCN inhibitor, ivabradine, has been marketed

to treat angina pectoris and myocardial ischemia (Berdeaux et al., 2009). To confirm these hypotheses, we estimated the impact of a HCN channels antagonist, ivabradine (Procoralan®) on orofacial sensitivity. Before induction of the neuropathy (D0), thresholds for cold and mechanical allodynia are similar between group control and oxaliplatin group, suggesting HCN would not be involved in painful modalities perception in physiological context. At day 4, which corresponding to peak of the symptoms, only cold hypersensitivity reversion is induced by ivabradine. Additionally, this behavioural effect corroborated by the demonstration that HCN blockade on cold-sensing neurons *in vitro* is able to increase the threshold of cold detection, thereby directly lowering the excitability of this subclass of nociceptors (Momin et al., 2008; Orío et al., 2009). So, we demonstrated that HCN channels surexpression participate in cold hypersensitivity caused by oxaliplatin injection and these channels represented an interesting target to handle this symptom.

No variations of TRPM8 and TRPA1 channels were observed in TG after oxaliplatin injection but this fact don't demonstrate these two channels would not be involved in acute neuropathy induced by oxaliplatin-chemotherapy. Indeed, oxaliplatin could favor TRPM8 and TRPA1 channels translation without affecting their transcript or directly modulate their opening. To study the contribution of these two channels in cold hypersensitivity induced by oxaliplatin, we realized several orofacial tests on mice genetically (TRPM8 KO mice) or pharmacologically (using the TRPA1 blocker HC003031). TRPM8 invalidated mice and mice pharmacologically invalidated for TRPA1 (involved in harmful cold) have altered extracephalic sensibility thresholds compared with controls animals (Descoeur et al., 2011). Contrary to these observations, thresholds for cephalic sensitivity obtained before oxaliplatin injection were not different between invalidated animals and controls animals. These results suggest deletion of TRPM8 channel or blocking of TRPA1 would be compensated in TG but not in DRG, probably with others cold sensors channels. We also showed that these invalidated animals did not develop cold hypersensitivity but a mechanical allodynia after oxaliplatin injection as compared to controls animals. In agreement with previous article, these data show that TRPM8 channel is involved in cold perception exacerbation after neuropathy induction but this channel does not participate in mechanical allodynia. Concerning TRPA1 results, HC003031 allowed a cold hypersensitivity reversion and this observation is coherent with previous data obtained on extracephalic territory. Contrary to the last results in extracephalic territory, blocking of TRPA1 did not affect mechanical allodynia in cephalic territory (Descoeur et al., 2011; Nassini et al., 2011). This difference could be due to intensity of the stimuli which evoke an allodynia with brush test and a hyperalgesia with Von Frey filament (1.4g) test. A specific implication of TRPA1 for mechanical stimuli of strong intensity had already been reported on TRPA1 genetically invalidated mice (Kwan et al., 2006). Furthermore, regional differences in the efficacy of drugs to

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induite à l'oxaliplatine

Article I : Discussion

alleviate oxaliplatin-induced allodynia/hyperalgesia further support the idea that mechanisms underlying neuropathic pain have peculiarities at cephalic versus-extracerebral level (Michot et al., 2014). In particular, TRPA1 is a sensor for cold, chemical as well as mechanical stimulations (Basbaum et al., 2009) and others studies show a significant increase in TRPA1 mRNA and a similar tendency in trigeminal ganglia in oxaliplatin-treated mice (Descoeur et al., 2011; Ta et al., 2010).

Concerning TREK and TRAAK channels, these three channels are under expressed in DRG after oxaliplatin administration (Descoeur et al., 2011) and this under expression would partially explain mechanical and cold hypersensitivity (allodynia and hyperalgesia). In TG, we showed no under expression of these channels induced by oxaliplatin. Indeed, a resistance of these lineages of transgenic mice on orofacial hypersensitivity induced by oxaliplatin demonstrates that the implication of these three channels in genesis of painful neuropathy is not only due to a repression of their expression. To understand this mechanism and implication on cephalic territory, it would be interesting to analyze profile proteins expression, generated currents of these three channels after anticancer agent administration.

For the first time, cold and mechanical hypersensitivity at cephalic level have been shown in animals treated with a unique oxaliplatin injection. This preclinical model of oxaliplatin-induced cold hypersensitivity in mice is clinically relevant because this model reproduce the symptoms described in clinic both at extra-cephalic level (members' extremities) and at the cephalic level (oral and peri-oral zones). Altogether, our data further support the idea that neuropathic pain has specific, at least partly different, characteristics in cephalic and extra-cephalic territories. Behavioral experiments show the same hyperalgesia and allodynia development for these 2 territories. Also, previous investigations revealed oxaliplatin induce a variation of ion channel expression in dorsal root ganglia (Descoeur et al., 2011), this is not true at the cephalic level for which only HCN channel expression is upregulated after oxaliplatin administration.. This makes these channels particularly good targets for the treatment of oxaliplatin-induced pain hypersensitivity. Moreover, the pharmacological validation of HCN channels using ivabradin is really encouraging in the context of a neuropathic pain model for which no current analgesic have shown to be efficient.

4. Methods

4.1 Animals

C57Bl/6J mice provided by Charles River (France) were kept on a 12h light/dark cycle and provided with food and water *ad libitum*. Triple KO mice were mice of the N10F2 backcross generation to C57Bl/6J inbred congenic strain as described previously (Guyon et al, 2009; Heurteaux et al, 2004). Triple KO mice were generated by crossing TREK1^{-/-}TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice, resulting in TREK1^{+/-}-TREK2^{+/-}-TRAAK^{+/-} offspring. Triple KO mice were obtained by intercrossing this progeny. The behavioral experiments were performed on 20–24 g male mice, blind to the treatment, in a quiet room, by the same experimenter for a given test taking great care to minimize or avoid discomfort of the animals. All animal procedures were approved by the local Animal Ethics Committee and experiments were performed according to the guidelines provided by the European Community guiding in the care and use of animals (86/609/CEE) (Zimmermann, 1983).

4.2 Drugs and treatments

Single i.p. injections of oxaliplatin (Sanofi Aventis, Montpellier France) were performed at 6 mg/kg dissolved in glucose 5% in male C57BL6J mice (20–25 g) directly after the first behavior assessment. 90h after drug administration, corresponding to time to reach the hyperalgesia peak (Descœur et al., 2011), a second cold and mechanical sensitivity evaluation was performed. Specific HCN inhibitor, Ivabradine (3 mg/kg) (Servier, Courbevoie France) and TRPA1 antagonist, HC030031 (100 mg/kg) (Enzo life sciences) was injected intraperitoneally (i.p). Vehicle solutions were injected in the control groups. All solutions were prepared just before experiments.

4.3 Behaviour

Pain scores were determined with strict adherence to ethical guidelines (Zimmermann, 1983). The typical symptoms of inflammatory and neuropathic pain, allodynia and hyperalgesia, were examined using following tests:

Acetone Test. Threshold reflex responses to innocuous cool temperatures were assessed using acetone test. This test was used to measure sensitivity to cold between 15 and 20°C. In this assay, a drop (20µL) of acetone is gently applied to the upper lip area skin surface and the total time spent in acetone-evoked behaviors (grooming, scratching and flinching) over a 1-minute. Acetone test was repeated 2 times from day 0 to day 4 and average was calculated for each day.

Water aversion. Threshold reflex responses to noxious cold temperatures were assessed using water aversion test. Three days after the test beginning, animals were used to drink for 3 hours a day. During 3 hours sessions, mice consumption of cold water ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) was measured from day 0 to day 4.

Brush Test. Threshold reflex responses to mechanical sensitivity were assessed using brush test consist to realize strokes of brush on the upper lip area skin surface in mice. For each brush, five stimuli were applied with an interval of 3-5 seconds. The number of response to dynamic mechanical stimulation was measured.

4.4 Ca^{2+} imaging

TGs were prepared from vehicle or oxaliplatine (6 mg/kg) treated mice 90 h post injection as previously described. Neurons were seeded on laminin coated glass bottom chambers (fluorodish WPI) and cultivated for 12–18 h at 37°C in B27 supplemented Neurobasal A medium (Invitrogen, France) with 100 ng/ml NGF 7S (Sigma–Aldrich, France). Prior to recording, cells were incubated with 5 mM fura-2AM in Tyrode's solution for 1 h at 37°C . Fluorescence measurements were made with an inverted microscope (Olympus IX70) equipped with a coolsnap HQ camera (Roper Scientific, France). Fura-2 was excited at 340 and 380nm and ratios of emitted fluorescence at 510nm were acquired simultaneously with bath temperature using Metafluor software (Universal Imaging). Temperature was controlled with a gravity driven perfusion (1–2 ml/min) cooled with a peltier device mounted in series with a resistive heater (CellMicroControls). Perfusion was first cooled at 12°C then heated at 37°C before application onto the chamber. Temperature was monitored with a thermistor probe located near the perfusion outlet always at the same place. Rapid cooling from 37°C to less than 15°C , achieved by switching off the heating, took typically less than 40sec. Threshold temperature of the cold evoked response on intracellular calcium was determined on individual cells.

4.5 Molecular Biology

Immunofluorescence. Mice were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg.i.p.) and tissues were fixed through a transcardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in PBS and postfixed overnight. After a 24-h incubation in 30% sucrose/PBS the tissue was cryostat sectioned at 20 μm with the use of the cryotome Leica CM3050S (Leica, Wetzlar, Germany) and stored at -80°C until use. The following antibodies were purchased from commercial sources: mouse anti-pERK (Santa Cruz E-4; 1/1000), donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Life Sciences; 1/1000). Transverse sections of mouse trigeminal ganglia were preincubated for 1 h in PBS containing 0.4% Triton X-100 and 3% donkey serum and then immunostained overnight at 4°C in the 0.4%

Triton X-100 and 1% donkey serum buffer containing primary antibodies. After three washes, sections were incubated in a conjugated secondary donkey antibody for 2h at room temperature in the same buffer. Immunostained sections were mounted with PermaFluor (ThermoScientific), and images were viewed and analyzed with AxioVision software.

Western Blot. Protein of Nuclear Caudalis was extracted in lysis buffer (0.5% PMSF and Iniprol/Aprotinine, 0.4% leupeptine, 1% Triton 10%) and separated on 10% SDS polyacrylamide gels, electrophoretically transferred onto polyvinylidene fluoride membranes, incubated with the blocking buffer (5% wt/vol nonfat milk in PBST) for 60 minutes and then incubated with HCN1 or HCN2 primary antibodies (1:200; Alomone Labs, Israël) at 4 °C overnight. The membranes were washed three times for 10 min in PBST before being incubated with anti-mouse secondary antibody (1:10,000) at reaction time (RT) for 60 min and visualized using the ECL Plus Kit (Pierce, Rockford, IL). The immunoreactive density was analyzed by Quantity One software (BioRad).

qPCR. RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously reported (Moore-Morris et al., 2009) The expression levels of 11 genes encoding ion channels known to regulate cold perception in sensory neurons were selected. Data were analysed using the threshold cycle (Ct) relative quantification method. Results are expressed as the percentage relative to the geometric average of the expression levels of the two selected housekeeping genes.

4.6 Statistical analysis

All relevant were analyzed with GraphPad Prism 6. Treatments were randomized within each cage. Behavioural data were analysed using two-way ANOVA followed by a post hoc Bonferonni's t-test. Western Blot data were analysed with one-way analysis of variance (ANOVA). Data were expressed as mean \pm S.E.M., and the levels of significance were set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

References

- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* 25, 2368–2376.
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.
- André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., et al. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3109–3116.
- Argyriou, A.A., Polychronopoulos, P., Iconomou, G., Chroni, E., and Kalofonos, H.P. (2008). A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat. Rev.* 34, 368–377.
- Attal, N., Bouhassira, D., Gautron, M., Vaillant, J.N., Mitry, E., Lepère, C., Rougier, P., and Guirimand, F. (2009). Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: A prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144, 245–252.
- Bankston, J.R., Camp, S.S., DiMaio, F., Lewis, A.S., Chetkovich, D.M., and Zagotta, W.N. (2012). Structure and stoichiometry of an accessory subunit TRIP8b interaction with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7899–7904.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.
- Berdeaux, A., Tissier, R., Couvreur, N., Salouage, I., and Ghaleh, B. (2009). [Heart rate reduction: beneficial effects in heart failure and post-infarcted myocardium]. *Thérapie* 64, 87–91.
- Descœur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 3, 266–278.
- Emery, E.C., Young, G.T., Berrococo, E.M., Chen, L., and McNaughton, P.A. (2011). HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333, 1462–1466.
- Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A., and Kuraishi, Y. (2009). Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci. Lett.* 458, 93–95.
- George, A., Serra, J., Navarro, X., and Bostock, H. (2007). Velocity recovery cycles of single C fibres innervating rat skin. *J. Physiol.* 578, 213–232.
- Gramont, A. de, Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 18, 2938–2947.
- Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Lapied, B., Pelhate, M., and Gamelin, E. (2001). A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J. Neurophysiol.* 85, 2293–2297.
- Kato, Y., Tateai, Y., Ohkubo, M., Saito, Y., Amagai, S., Kimura, Y.-S., Iimura, N., Okada,

- M., Matsumoto, A., Mano, Y., et al. (2014). Gosha-jinki-gan reduced oxaliplatin-induced hypersensitivity to cold sensation and its effect would be related to suppression of the expression of TRPM8 and TRPA1 in rats. *Anticancer. Drugs* 25, 39–43.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Yano, T., and Oishi, R. (2012). L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* 8, 7.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* 50, 277–289.
- Ling, B., Coudoré-Civiale, M.-A., Balayssac, D., Eschalier, A., Coudoré, F., and Authier, N. (2007). Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 234, 176–184.
- Liu, J.J., Jamieson, S.M.F., Subramaniam, J., Ip, V., Jong, N.N., Mercer, J.F.B., and McKeage, M.J. (2009). Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: association with platinum neurotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 847–856.
- Michot, B., Kayser, V., Bastian, G., Bourgoin, S., and Hamon, M. (2014). Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 79, 432–443.
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., and McNaughton, P.A. (2008a). Role of the hyperpolarization-activated current I_h in somatosensory neurons. *J. Physiol.* 586, 5911–5929.
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., and McNaughton, P.A. (2008b). Role of the hyperpolarization-activated current I_h in somatosensory neurons. *J. Physiol.* 586, 5911–5929.
- Moore-Morris, T., Varrault, A., Mangoni, M.E., Le Digarcher, A., Negre, V., Dantec, C., Journot, L., Nargeot, J., and Couette, B. (2009). Identification of Potential Pharmacological Targets by Analysis of the Comprehensive G Protein-Coupled Receptor Repertoire in the Four Cardiac Chambers. *Mol. Pharmacol.* 75, 1108–1116.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 1646–1652.
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., et al. (2011). Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN* 152, 1621–1631.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., et al. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28, 1308–1318.
- Orio, P., Madrid, R., Peña, E. de la, Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D.A., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *J. Physiol.* 587, 1961–1976.
- Santoro (2004). Regulation of HCN Channel Surface Expression by a Novel C-Terminal Protein-Protein Interaction.
- Schmoll, H.J. (2002). The role of oxaliplatin in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer: prospects and future directions. *Semin. Oncol.* 29, 34–39.
- Serra, J., Solà, R., Quiles, C., Casanova-Molla, J., Pascual, V., Bostock, H., and Valls-Solé, J. (2009). C-nociceptors sensitized to cold in a patient with small-fiber neuropathy and cold allodynia. *Pain* 147, 46–53.

- Sprowl, J.A., Ciarimboli, G., Lancaster, C.S., Giovinazzo, H., Gibson, A.A., Du, G., Janke, L.J., Cavaletti, G., Shields, A.F., and Sparreboom, A. (2013). Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11199–11204.
- Ta, L.E., Low, P.A., and Windebank, A.J. (2009). Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol. Pain* *5*, 9.
- Ta, L.E., Bieber, A.J., Carlton, S.M., Loprinzi, C.L., Low, P.A., and Windebank, A.J. (2010). Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol. Pain* *6*, 15.
- Trevisan, G., Materazzi, S., Fusi, C., Altomare, A., Aldini, G., Lodovici, M., Patacchini, R., Geppetti, P., and Nassini, R. (2013). Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res.*
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 787–801.
- Wainger, B.J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (2001). Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* *411*, 805–810.
- Wells, J.E., Rowland, K.C., and Proctor, E.K. (2007). Hyperpolarization-activated channels in trigeminal ganglia innervating healthy and pulp-exposed teeth. *Int. Endod. J.* *40*, 715–721.
- Wilson, R.H., Lehky, T., Thomas, R.R., Quinn, M.G., Floeter, M.K., and Grem, J.L. (2002). Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *20*, 1767–1774.
- Wolf, S., Barton, D., Kottschade, L., Grothey, A., and Loprinzi, C. (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *44*, 1507–1515.
- Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuroscience - Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* *288*, 1765–1768.
- Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2012). Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain* *8*, 55.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., and Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* *447*, 855–858.
- Zolles, G., Wenzel, D., Bildl, W., Schulte, U., Hofmann, A., Müller, C.S., Thumfart, J.-O., Vlachos, A., Deller, T., and Pfeifer, A. (2009). Association with the Auxiliary Subunit PEX5R/Trip8b Controls Responsiveness of HCN Channels to cAMP and Adrenergic Stimulation. *Neuron* *62*, 814–825.

'''

Discussion & Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude supportent l'hypothèse que les mécanismes moléculaires expliquant l'apparition des symptômes liés à la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine sont différents en fonction des territoires (céphaliques et extracéphaliques) concernés (Michot et al., 2014). Ces symptômes douloureux céphaliques sont par ailleurs largement décrits en clinique mais peu étudiés en pré-clinique. En effet, en comparaison avec les résultats obtenus au niveau périphérique (Descoeur et al., 2011), il a été constaté que les variations d'expression de certains canaux ioniques étaient différentes ne remettant cependant pas en cause leur implication dans la neuropathie. L'absence de variations d'expression des ARNm des canaux TRPM8 et TRPA1 dans les TGs après l'administration d'oxaliplatine n'est donc pas suffisante pour démontrer que ces deux canaux ne sont pas impliqués dans les symptômes douloureux induits par l'oxaliplatine ou qu'ils ne représentent pas des cibles d'intérêt pour le traitement de cette neuropathie. En effet, ce sel de platine pourrait favoriser la traduction des canaux TRPM8 et TRPA1 sans affecter leur taux de transcrite ou directement moduler leur ouverture. Afin d'étudier la contribution de ces deux canaux, nous avons utilisé des souris génétiquement invalidées pour le gène TRPM8, canal impliqué dans la détection du froid non nocif, et nous observons qu'elles ne développent pas d'hypersensibilité au froid après l'administration d'oxaliplatine mais présentent une hypersensibilité mécanique. De la même façon, l'utilisation d'un bloqueur du canal TRPA1, le HC030031 (100mg/kg), a permis de réverser uniquement l'hypersensibilité au froid que ce soit pour le test d'aversion à l'eau froide ou pour le test à l'acétone. Des doses plus élevées de cet antagoniste auraient pu être utilisées afin d'observer les effets sur l'hypersensibilité mécanique mais il serait nécessaire d'étudier les effets secondaires liés à l'utilisation d'une dose supérieure. A ce jour, la dose de 100 mg/kg est couramment utilisée et n'a pas montré d'action sur l'activité locomotrice des souris (de Moura et al., 2014).

En comparaison aux variations d'expression observées dans les DRGs, seule la surexpression de HCN1 a été conservée dans les TGs à laquelle s'ajoute celle de HCN2 au niveau du TG qui n'était initialement pas observé au niveau du DRG. Les courants I_h générés par les canaux HCN participent au contrôle de l'excitabilité neuronale en modulant la fréquence des PA émis en réponse à un stimulus nociceptif. Dans le cas présent, la stratégie à adopter serait de bloquer par un antagoniste les canaux HCN situés dans les neurones des TGs sensibles au froid et qui génèrent le courant I_h (Orío et al., 2009).

Afin de cibler ces deux canaux HCN1 et HCN2, nous avons choisi de les bloquer pharmacologiquement avec l'ivabradine (Procoralan®), un bloqueur non spécifique des canaux HCN couramment utilisé dans le traitement de l'angine de poitrine. Cette molécule doit être utilisée avec précautions du fait de ses effets cardiaques. Afin d'établir un parallèle avec l'étude précédente (Descoeur et al., 2011), la dose de 3mg/kg d'ivabradine a été utilisée. Avant l'induction de la neuropathie, le blocage des canaux HCN n'a pas affecté les seuils de sensibilité douloureuse au froid ou mécanique par rapport au groupe contrôle, suggérant que les HCN ne seraient pas impliqués dans la perception de ces modalités douloureuses en contexte physiologique. A l'acmé des troubles sensitifs induits par l'oxaliplatine, un traitement aigu d'ivabradine a permis spécifiquement la réversion des symptômes thermiques mais n'a pas eu d'effet sur les seuils de douleur mécanique, suggérant que l'implication de ces canaux est stimulus-dépendante. Or, plusieurs études, validées pharmacologiquement par l'utilisation d'ivabradine, ont montré l'implication des canaux HCN à la fois dans la composante thermique et dans la composante mécanique. Des données récentes suggèrent cependant une implication spécifique de l'isoforme HCN2 dans la sensibilité mécanique. En effet, dans le cas d'inflammation chronique, la surexpression du canal HCN2 a pu être observée et l'utilisation de souris invalidées pour cette isoforme a montré une sensibilité douloureuse diminuée lors de stimulations mécaniques contrairement aux stimulations thermiques (Schnorr et al., 2014). En revanche, concernant l'isoforme HCN1, l'utilisation de 2,6-DTBP, un antagoniste spécifique de ce canal, a permis de réverser les manifestations douloureuses suite à des stimulations thermiques mais aussi mécaniques dans un modèle de douleur neuropathique chez la souris (Tibbs et al., 2013). L'ivabradine étant un inhibiteur non spécifique des canaux HCN avec un IC50 similaire pour les deux isoformes HCN1 et HCN2, il est donc attendu que cette molécule ait un effet sur les douleurs provoquées par des stimulations thermiques mais aussi mécaniques. Un tel effet a été observé dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat (Noh et al., 2014) et chez la souris (Young et al., 2014). En comparant ces études, nous pouvons observer que l'ivabradine est capable d'inhiber l'hypersensibilité thermique dans différents modèles de douleurs neuropathiques (Descoeur et al., 2011; Noh et al., 2014). En revanche, cela s'avère différent pour l'inhibition de l'hypersensibilité mécanique par l'ivabradine qui n'a pas été observée dans l'ensemble des modèles; l'hypothèse mise en avant étant les différences étiologiques concernant l'apparition de cette hypersensibilité mécanique. Une explication possible serait par exemple que l'hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine serait associée à des changements au niveau des canaux TRPA1 (Nassini et al., 2011). La différence observée par rapport à nos résultats pourrait également provenir de la dose utilisée. En effet, les rats ont reçu un traitement préventif à raison de deux gavages par jour à une dose de 6mg/kg alors que nous utilisons un traitement curatif, à raison d'une unique dose à 3mg/kg au 4^e jour, acmé des symptômes de la

neuropathie. Afin d'observer si nous pouvions obtenir une réduction des douleurs suite à une stimulation mécanique dans notre modèle de neuropathie aiguë chimio-induite à l'oxaliplatine, nous avons donc réalisé un traitement préventif, débutant la veille de l'induction de la neuropathie, avec une administration 2 fois par jour à la dose de 3mg/kg. Il a ainsi pu être observé une réduction des seuils de douleurs suite à une stimulation thermique (test à l'acétone) à partir du 2e jour ainsi qu'une réduction des seuils douloureux suite à une stimulation mécanique (test du pinceau) au 4e jour (**Figure 17**).

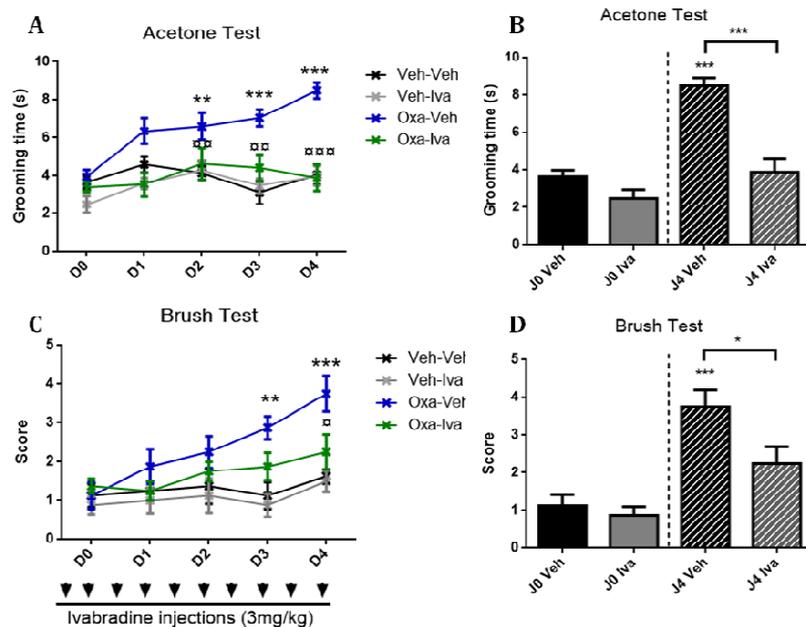


Figure 17 : Effet préventif de l'ivabradine sur les symptômes douloureux au niveau de la sphère orofaciale.

Le traitement à l'ivabradine (3mg/kg) a débuté la veille de l'induction de la neuropathie et a été poursuivi à raison de 2 injections par jour jusqu'au 4e jour (acmé des symptômes de la neuropathie aiguë). Les tests de douleur ont été réalisés au niveau de la sphère orofaciale pour évaluer l'impact de ce traitement : test à l'acétone (A-B) et test du pinceau (C-D).

Une autre étude dans laquelle l'ivabradine a été utilisée à de plus fortes doses (5mg/kg) a démontré un effet significatif de la drogue vis-à-vis des symptômes douloureux mécaniques périphériques dans un modèle de neuropathie chimio-induit à l'oxaliplatine (Young et al., 2014). Aucun effet indésirable, sédatif ou cardiaque n'a d'ailleurs été montré pour l'utilisation de dose allant jusqu'à 10 mg/kg dans cette même étude.

L'utilisation de molécule plus spécifique, tel que le 2,6DTBP, pourrait également permettre de discriminer l'impact de chacune des deux isoformes HCN concernant leur implication au niveau des différents territoires céphaliques et extracéphaliques mais également au niveau des composantes thermiques et mécaniques. Afin de répondre à cette question, une approche génétique avec l'utilisation d'animaux invalidés pour chacun des 2 canaux pourrait

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Article I : Discussion & Perspectives

être envisagée. Au vue des résultats existants, l'isoforme HCN1 semble en effet à privilégier car il s'agit de la seule isoforme dont l'expression s'avère modulée au niveau des DRGs et des TGs. De plus, concernant les éventuels effets indésirables, HCN1 semble beaucoup moins impliqué dans les troubles cardiaques que l'isoforme HCN2, ce qui nous donne une raison supplémentaire de privilégier cette cible.

Il nous paraît important de mieux comprendre l'implication des canaux HCN dans la physiopathologie de la douleur induite par l'oxaliplatine. Nos résultats, obtenus sur un modèle de neuropathie aigue, suggèrent que HCN1 pourrait donc représenter une cible d'intérêt à prioriser. Des protéines partenaires, notamment Trip8b pourraient également être des cibles intéressantes. D'un point de vue mécanistique, les canaux HCN sont connus pour être régulés par l'hyperpolarisation membranaire et l'AMPc mais également par des protéines partenaires comme Trip8b(1a-4), impliquée dans l'adressage membranaire des canaux HCN (Lewis et al., 2009; Santoro et al., 2009; Zolles et al., 2009). Parmi les données que nous avons obtenu, nous avons montré une surexpression de cette protéine suite à l'injection d'oxaliplatine, pouvant suggérer un rôle de TRIP8b dans la neuropathie aigue chimio-induite à l'oxaliplatine. De plus, des données de la littérature montrent que HCN1 colocalise avec Trip8b dans les dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Lewis et al., 2011; Piskorowski et al., 2011), il serait alors intéressant de vérifier si cette colocalisation est également retrouvée au niveau des DRGs et TGs. Trip8b semble également capable de se lier à HCN2 (DeBerg et al., 2015). A l'inverse, la protéine Nedd4-2 semble impliquée dans la diminution des courants *I_h* du canal HCN1 via un processus d'ubiquitination de ce canal (Wilkars et al., 2014) et pourrait représenter une cible dans la régulation de ces canaux HCN.

En perspective de ce travail, nous souhaiterions comprendre les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer l'implication de ces canaux HCN dans le développement de l'hypersensibilité douloureuse à l'oxaliplatine. Des données de la littérature et des données préliminaires pourraient nous orienter vers une régulation des canaux HCN1 notamment par une protéine partenaire, Trip8b (Santoro, 2004). En effet, cette protéine responsable de l'adressage membranaire de ces canaux est surexprimée lors d'une administration d'oxaliplatine mais il faudrait établir si cette surexpression est en lien avec l'implication des canaux HCN dans la neuropathie aigue. Afin de vérifier cette piste, il serait intéressant de vérifier si les isoformes HCN1 et HCN2 colocalisent avec cette protéine Trip8b et de bloquer (par l'utilisation de knock-down par exemple, les outils pharmacologiques n'existant pas pour bloquer cette protéine), de façon localisée, cette protéine pour observer son impact au niveau du développement de l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine. Nous pouvons aussi nous questionner sur les causes de la surexpression de ces canaux induite par le traitement à l'oxaliplatine. De

Chapitre II : Canaux ioniques & neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Article I : Discussion & Perspectives

nombreux phénomènes sont sous-tendus pour expliquer des modifications dans l'expression et la régulation de canaux ioniques notamment comme des régulations épigénétiques.

Un dernier point pourrait être abordé, à savoir l'implication de ces canaux HCN dans un contexte de neuropathie chronique et dans un modèle de cancer colorectal. En effet, l'ivabradine peut permettre de réverser une partie des symptômes douloureux liés à la neuropathie mais il est important de savoir si cette molécule maintient ses effets lorsque les injections d'oxaliplatine sont répétées mais également si cette molécule n'altère pas l'action de la chimiothérapie.

Chapitre II :

Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1 dans la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1 dans la neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine

La physiopathologie évoquée pour expliquer les neuropathies se résume généralement à des mécanismes morphologiques avec la perte axonale et la démyélinisation fondés sur des observations histologiques mais également par l'existence d'anomalies fonctionnelles de la conduction nerveuse impliquant notamment des canalopathies. Une dysfonction canalaire pourra donc être à l'origine d'activités électriques axonales ectopiques ou aberrantes engendrant soit une augmentation de l'excitabilité nerveuse à l'origine de symptômes « positifs » sensitifs (paresthésie, dysesthésie) ou moteurs, soit une diminution de l'excitabilité nerveuse avec l'apparition de symptômes « négatifs », déficitaires sensitifs (hypoesthésie) ou moteurs (paralysie).

En effet, de nombreux canaux ont déjà montré leur implication dans la neuropathie aigue et certains, au vue de leurs propriétés connues qui seront décrites ci-dessous, laissent à penser qu'ils pourraient être de bons candidats pour le développement de nouveaux antalgiques pour le traitement de cette neuropathie.

4) Canal TREK-1

a) Classification et structure

Parmi l'ensemble des canaux ioniques, les canaux sélectifs de l'ion potassium (K^+) constituent la famille la plus vaste et la plus diversifiée. Une caractéristique essentielle des canaux potassiques est qu'ils sont mille fois plus sélectifs pour l'ion K^+ que pour l'ion Na^+ alors que ce dernier a une taille inférieure. Cette sélectivité est indispensable pour l'ensemble des différents processus physiologiques que sont l'excitabilité électrique neuronale, musculaire ou cardiaque, les sécrétions d'hormones ou de neurotransmetteurs ainsi que la prolifération, la différenciation ou la régulation du volume cellulaire. Aujourd'hui, il est universellement admis

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

que la boucle P, une séquence de 20 acides aminés présente dans la séquence de tous les canaux potassiques, est responsable de cette sélectivité. Les canaux potassiques sont des tétramères de sous-unités à deux (canaux à rectification entrante, K_{IR}) ou six/sept segments transmembranaires (canaux dépendants du potentiel, K_V , ou du calcium, K_{Ca}) possédant un seul domaine P, ou des dimères de sous-unités contenant quatre segments transmembranaires et deux domaines P différents en tandem (canaux de fond, K_2P).

La sous-famille des canaux potassiques à deux domaines P (K_2P) est la plus récemment découverte. Le premier cloné a été appelé "Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K^+ channel" [TWIK1] (Lesage et al., 1996) et comprend 15 membres subdivisés en six classes fonctionnelles et structurelles parmi laquelle la classe composée des canaux TREK-1 et TREK-2 (TWIK1-related K^+ channels), et du canal TRAAK (TWIK1-related arachidonic acid sensitive K^+ channel) (**Figure 18**) (Enyedi and Czirjak, 2010; Feliciangeli et al., 2014). La famille des canaux à deux boucles P, ou K_2P semble avoir une importance capitale puisqu'il a été montré par la suite qu'elle est conservée dans de nombreuses espèces très éloignées telles que le nématode (Kunkel et al., 2000), la levure (Lesage et al., 1996), la drosophile (Goldstein et al., 1996), ainsi que chez la plante *Arabidopsis Thaliana* (Czempinski et al., 1997).

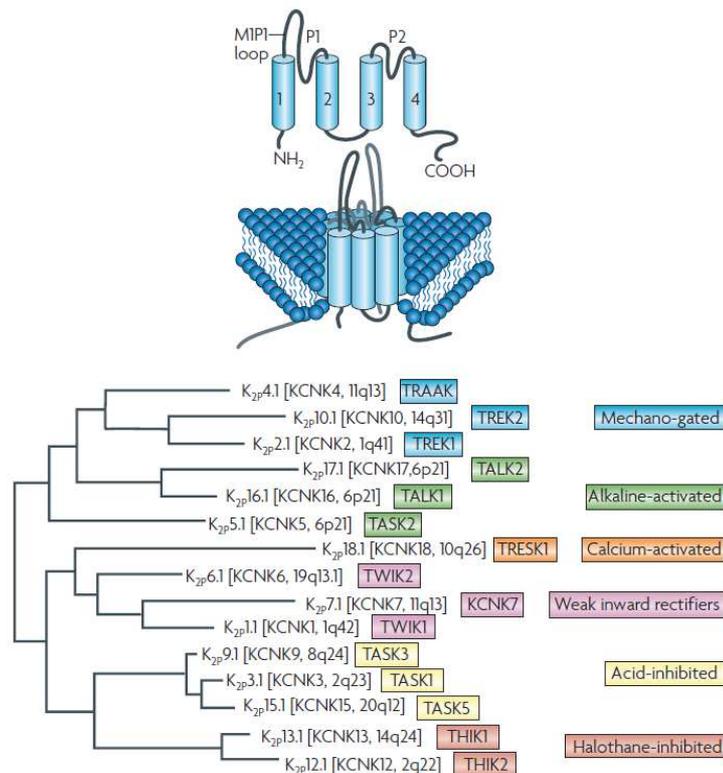


Figure 18 : Structure et classification des canaux K_2P (adapté de Honoré, 2007).

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

Les canaux de la sous-famille TREK/TRAAK sont responsables des courants de fuite et jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire grâce à leur rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos. Lors d'une dépolarisation, la rectification entrante permet de limiter l'efflux de potassium qui pourrait gêner le déclenchement des PA. Le courant généré est dit à rectification sortante et reste en place même lorsque la concentration en potassium est équimolaire entre la cellule et le milieu.

TREK1 (KCNK2/K_{2P}2.1) est le premier membre de la sous-famille TREK/TRAAK (TWIK Related Arachidonic Acid activated K⁺ channel) à avoir été identifié (Fink et al., 1996). Le canal TREK1 a une taille de 426 acides aminés pour la protéine humaine et 411 pour la protéine de souris (Fink et al., 1996). Il est codé par le gène KCNK2 localisé sur le chromosome 1 au niveau de l'extrémité terminale du bras long (locus 1q41). Cette sous-unité présente deux sites potentiels de N-glycosylation au niveau de la boucle M1P1. Elle possède également 4 sites potentiels de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC), deux pour la protéine kinase A (PKA) et deux pour la caséine kinase II. La plupart de ces sites sont situés sur l'extrémité C-terminale. TREK1 est régulé négativement par la PKA et la PKC. L'inhibition du canal par ces deux kinases fait intervenir la phosphorylation de deux sérines en position 333 et 300 (Cain et al., 2008).

L'expression de ce canal est ubiquitaire avec une forte expression dans le système nerveux central (Fink et al., 1996). Cependant sa distribution n'est pas homogène et certaines régions sont plus riches en TREK1 que d'autres. C'est le cas par exemple des interneurons GABA du noyau caudé et du putamen (Hervieu et al., 2001). L'ARNm TREK1 est également retrouvé en grande quantité dans le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'hypothalamus, le bulbe olfactif, les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (DRG) où il colocalise avec le canal TRPV1 ou encore les neurones sérotoninergiques du raphé (Medhurst et al., 2001). TREK1 a aussi été détecté dans le tractus intestinal, en particulier dans l'estomac et l'intestin grêle (Talley et al., 2001).

b) Mécanismes de régulation

Les mécanismes de régulation du canal TREK-1 sont relativement bien connus. En dehors des substances pharmacologiques dont nous parlerons dans la partie suivante, le canal TREK-1 est régulé par de nombreux stimuli thermiques, mécaniques, chimiques, liés au pH, par les lipides membranaires, par des neurotransmetteurs via les récepteurs couplés aux protéines

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

G ou encore régulé par d'autres protéines associées capables de modifier l'adressage membranaire et l'activité du canal (**Figure 19**) (Noel et al., 2011).

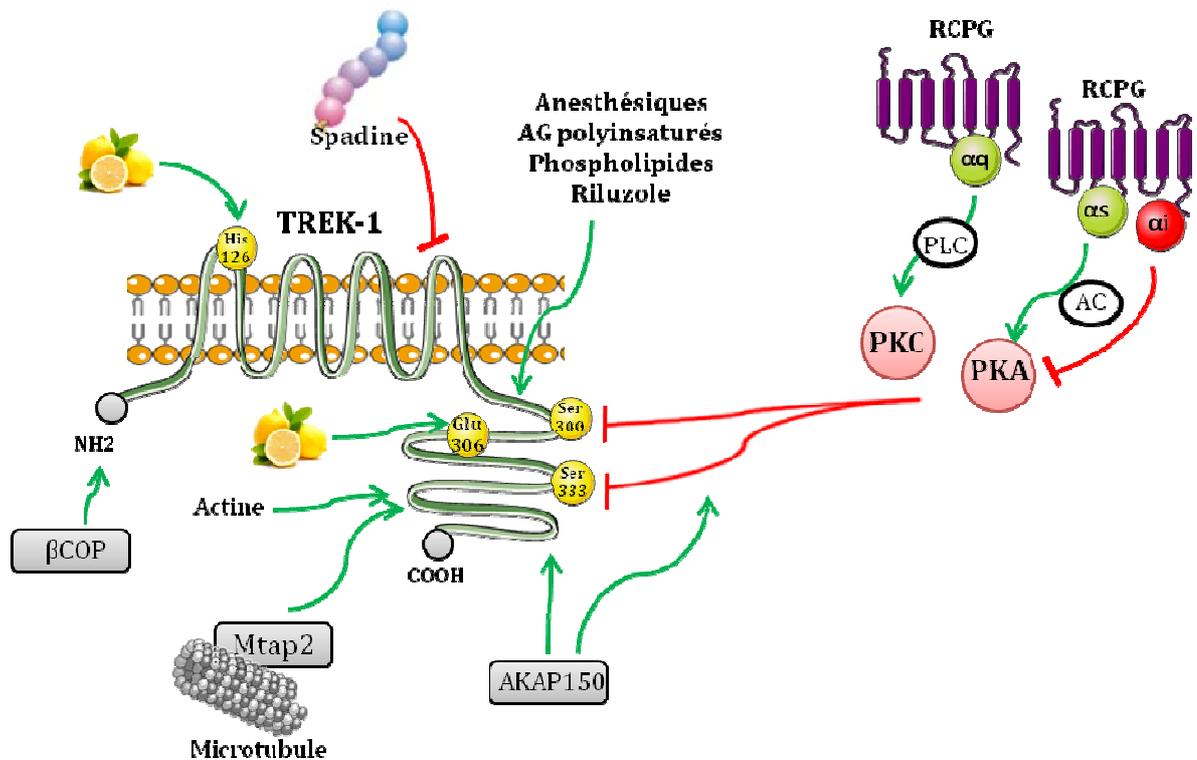


Figure 19 : Mécanismes de régulation du canal TREK-1

Le canal TREK-1, dont l'activité basale est faible, est modulé par des stimuli physiques et chimiques, par les lipides cellulaires et notamment les acides gras polyinsaturés, par divers agents pharmacologiques, par des neurotransmetteurs via des récepteurs couplés aux protéines G et par des protéines associées.

Concernant les régulations physiques et chimiques, le canal TREK-1 s'avère sensible à la température, aux contraintes mécaniques et aux variations de pH (Chemin et al., 2005; Maingret, 1999; Maingret et al., 2000a, 2000; Patel et al., 1998). Des études électrophysiologiques ont démontré que l'activation de TREK-1 avait lieu lors d'une augmentation progressive de la température, mécanisme impliquant la partie C-terminale de la protéine puisque cet effet est perdu lorsque le canal est délété pour cette partie. Cette sensibilité à la température n'est cependant pas retrouvée lorsque cette partie est transférée sur le canal TASK-1, insensible à la température, indiquant que cette région est nécessaire mais insuffisante pour expliquer cette régulation (Patel et al., 1998). L'activation de TREK-1 est aussi retrouvée lors d'étirements de la membrane, suggérant sa mécanosensibilité. Ce phénomène a été démontré par l'intégration d'acides gras polyinsaturés (acide arachidonique, lysophospholipides) dans la couche de phospholipides externe qui provoquent la déformation de la membrane, mimant l'étirement

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

membranaire. L'acidose intracellulaire (ou alcalose extracellulaire) favorise également l'ouverture du canal TREK-1.

Les neurotransmetteurs peuvent également réguler l'activité du canal TREK-1 notamment la sérotonine, et le glutamate, dont les récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG). Les récepteurs couplés aux protéines Gs et Gq régulent négativement le canal alors que l'ouverture de TREK-1 est positivement régulée par les récepteurs couplés aux protéines Gi. Les protéines Gs et Gi activent et inhibent respectivement l'adénylate cyclase, capable de produire de l'AMPc à partir d'ATP, qui sera à son tour à l'origine de l'activation de la PKA. La protéine Gq sera quand à elle, capable d'activer la phospholipase C (PLC), permettant ainsi la production de diacylglycérol (DAG) et PIP3, effecteurs capable d'activer la PKC (**Figure 20**). Le canal TREK-1 est inactif à l'état phosphorylé. Les protéines kinases PKA ou PKC sont impliquées dans l'inactivation du canal TREK-1 et le site principal de phosphorylation est la Serine 333 située en partie Cter du canal (Cain et al., 2008).

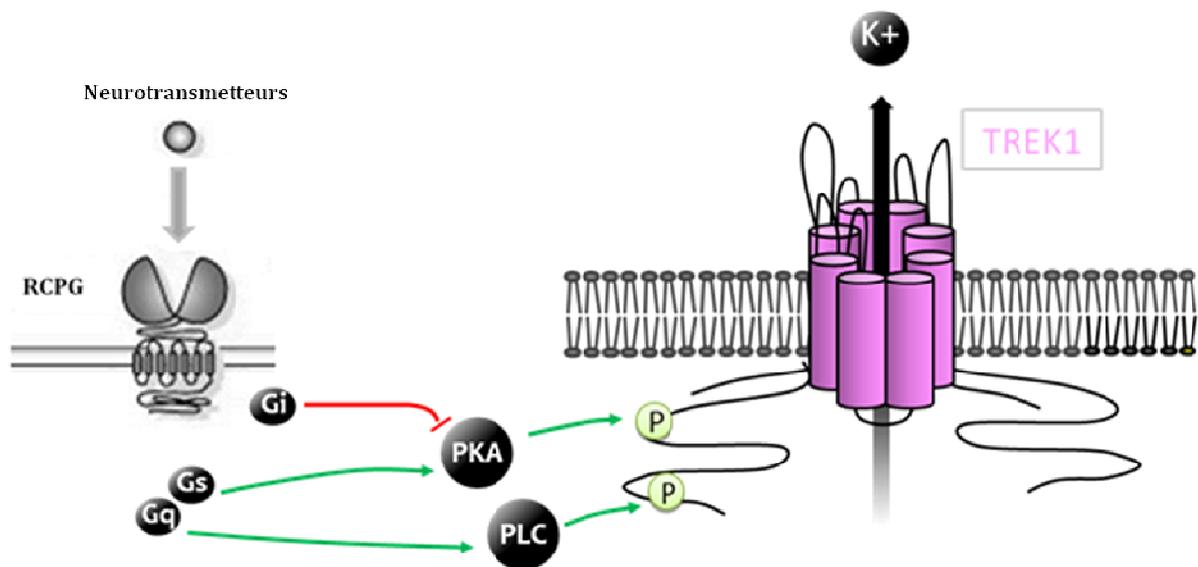


Figure 20 : Régulation du canal TREK-1 par les RCPG couplés aux protéines G.

Les RCPG peuvent être couplés à différents types de protéines G, qui possèdent chacune leur propre rôle notamment dans l'activation ou l'inhibition des protéines kinases A et phospholipase C, qui sont à leur tour responsables de la phosphorylation des canaux ioniques au niveau de sites spécifiques, rendant le canal TREK-1 inactif.

Des approches protéomiques ont permis d'identifier des protéines associées régulatrices des canaux TREK, appelée AKAP-150 et MTAP2. L'AKAP-150 est une protéine capable de former des complexes protéiques impliqués dans la transduction du signal (PKA/PKC). Son interaction permet au canal de passer d'un état de faible activité à un état de forte activité de base, appelé courant de fuite (Sandoz et al., 2006). Il n'est alors plus sensible aux autres régulations telles que

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

l'activation par les acides gras polyinsaturés ou par l'acidification intracellulaire, la sensibilité à l'étirement membranaire, ou encore les régulations par les neurotransmetteurs via le RCPG couplés à Gq qui reste seulement régulable par les RCPG de type Gs. De plus, l'association de TREK-1 avec l'AKAP lui permet d'être inclus dans les domaines protéiques post-synaptiques où les RCPG et TREK sont colocalisés simultanément permettant aux RCPG de type Gs une phosphorylation du canal plus rapide par la PKA. MTAP2 est une protéine somato-dendritique qui est impliquée notamment dans la mise en place des microtubules, capable d'interagir avec TREK-1 (Sandoz et al., 2008). MTAP2, à l'inverse de l'AKAP, n'active pas directement le canal TREK-1 mais va augmenter son adressage à la membrane. Cette protéine ne semble pas affecter ses régulations par les stimuli physiques et les neurotransmetteurs via les récepteurs couplés aux protéines Gs et Gq. Les interactions existantes du canal TREK-1 avec ces protéines peuvent donc être à l'origine de conséquences fonctionnelles importantes en modifiant l'activité de ces canaux TREK.

c) Rôles physiologiques de TREK-1

Les canaux TREK-1 sont à l'origine de courants dits de fond dont le rôle principal est la mise en place et le maintien du potentiel de repos des cellules. Ils participent ainsi au contrôle de l'excitabilité cellulaire neuronale et aux mécanismes impliqués dans l'épilepsie, l'anesthésie, la neuroprotection ou encore la dépression. De nombreuses études lui confèrent également un rôle important dans la douleur. Ces différents rôles ont pour la plupart été mis en évidence par l'utilisation des souris invalidées pour le gène du canal TREK-1 (KO TREK-1 ou TREK-1 $-/-$) (**Figure 21**) ou d'outils pharmacologiques tel que le bloqueur spécifique du canal TREK-1, la spadine.

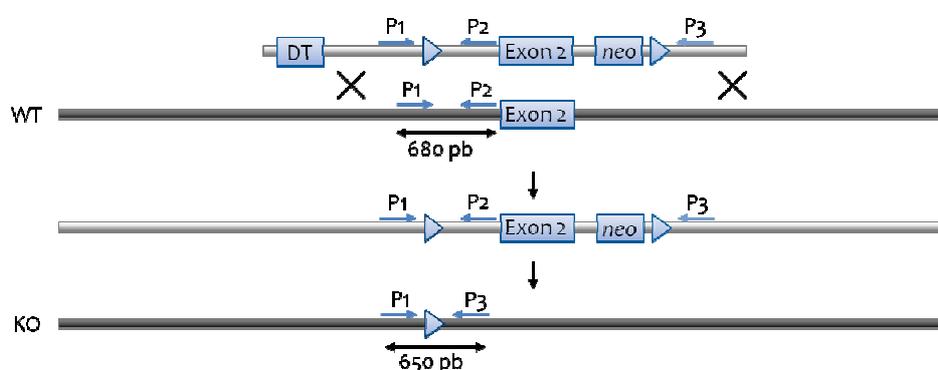


Figure 21 : Structure du gène TREK-1 chez la souris et construction du KO correspondant.

Le vecteur comprend une cassette néomycine (neo) juxtaposée à l'exon 3 du gène codant TREK1 et encadrée par des sites LoxP permettant l'excision du fragment par la recombinaise Cre. Les flèches notées P1 à P3 représentent la position des amorces utilisées pour déterminer le génotype des animaux (Heurteaux et al., 2004).

i) Neuroprotection

L'action neuroprotectrice du canal TREK-1 a été démontrée pour la première fois dans le cadre d'étude sur l'ischémie cérébrale et sur l'épilepsie (Blondeau et al., 2002a, 2002b; Heurteaux et al., 2004; Lauritzen et al., 2000). La propriété neuroprotective attribuée au canal TREK-1 permettrait donc de prévenir les mécanismes neurotoxiques caractéristiques de ces pathologies neurologiques dont font partie l'épilepsie et l'ischémie cérébrale. Ceci a été confirmé par l'utilisation de souris invalidées pour le canal TREK-1 dont le risque de développer ces pathologies est fortement augmenté par rapport aux souris sauvages (Mirkovic et al., 2012). Notamment, il a été observé que le déclenchement de crises d'épilepsie par le kainate, activateur des récepteurs au glutamate, engendrent un taux de mortalité très élevé chez les souris KO TREK-1 comparé aux souris sauvages, ce qui suggère une activité neuroprotectrice du canal dans cette pathologie (Heurteaux et al., 2004). De plus, l'injection intracerebroventriculaire et intraveineuse d'acide gras polyinsaturés possède une action neuroprotectrice vis-à-vis de ces crises d'épilepsie (Lauritzen et al., 2000) D'un point de vue mécanistique, le relargage d'acide arachidonique observé durant une ischémie associée à une acidification du pH et une augmentation du volume des neurones contribueraient à l'ouverture du canal TREK-1, engendrant alors une hyperpolarisation des neurones pré- et post-synaptiques capable de protéger les neurones de l'excitotoxicité au glutamate (Franks and Honoré, 2004).

Concernant l'ischémie, la littérature montre que le canal TREK-1 joue également un rôle très important dans cette pathologie. Parmi les études les plus récentes, il a été montré que l'activation du canal TREK-1 par le sevoflurane ou encore l'isoflurane réduit le risque d'ischémie chez le rat (Tong et al., 2014; Yin et al., 2012). Lors d'induction d'ischémies cérébrales bilatérales ou d'ischémies de la moelle épinière, les souris TREK-1 $-/-$ présentent un taux de mortalité largement supérieur. Là encore, les acides gras polyinsaturés diminuent l'ischémie (Blondeau et al., 2002a, 2002b; Lauritzen et al., 2000). Ce mécanisme pourrait être expliqué par le rôle fondamental joué par des astrocytes dans la pathogénèse de la mort neuronale ischémique. En effet, le bon fonctionnement de ces astrocytes est dépendant de la présence des canaux K^+ dans les membranes cellulaires, dont le canal TREK-1 fait parti, et du potentiel de membrane hyperpolarisé. Après ischémie, le canal TREK-1 est surexprimé et son inhibition provoque une augmentation des sécrétions inflammatoires astrocytaires conduisant à une apoptose neuronale plus importante, suggérant l'implication du canal TREK-1 dans la fonction des astrocytes et la survie neuronale (Wu et al., 2013).

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

De plus, il a été répertorié que ce canal pouvait être activé par plusieurs molécules connues pour leur propriété neuroprotectrice comme le riluzole ou le xénon (Duprat et al., 2000; Gruss et al., 2004).

ii) Anesthésie

Il est connu que le canal TREK-1 est activé par les anesthésiques volatiles à des doses similaires à celles utilisées en clinique (Patel et al., 1999). L'utilisation de souris invalidées pour le gène du canal TREK-1 (KO TREK-1 ou TREK-1^{-/-}) a permis d'observer une diminution de la sensibilité aux anesthésiques par rapport aux souris sauvages, notamment au chloroforme, halothane, sevoflurane, desflurane mais aussi l'isoflurane. Cette sensibilité aux anesthésiques, notamment les dérivés halogénés, peut également varier en fonction de l'âge des animaux utilisés, les adultes ayant une concentration alvéolaire minimale beaucoup plus faible que les juvéniles. Cette modification de la sensibilité peut également dépendre de l'expression du canal au niveau du SNC (Steinberg et al., 2015). Les doses d'anesthésiques administrées à ces souris doivent donc être adaptées. D'un point de vue mécanistique, il est connu que l'acide aminé Glu306 possède un rôle dans la modulation de TREK-1 par l'acide arachidonique, l'étirement de la membrane et le pH interne. Il semblerait que cet acide aminé soit également essentiel pour les effets d'activation du canal par les gaz anesthésiants (Gruss et al., 2004). En effet, une mutation ponctuelle au niveau de cet acide aminé dans la séquence de la partie C-terminale du canal TREK-1 permet d'observer une importante diminution du pourcentage d'activation de celui-ci.

iii) Dépression

Le canal TREK-1 est connu pour être impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de la dépression. TREK-1 est fortement exprimé dans plusieurs structures impliquées dans les aspects émotionnels et cognitifs de la dépression, notamment le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'amygdale et le gyrus cingulaire (Fink et al., 1996; Hervieu et al., 2001; Medhurst et al., 2001; Talley et al., 2001). Il a été démontré que les souris TREK-1 ^{-/-} présentaient une résistance à la dépression s'expliquant par une augmentation de la transmission sérotoninergique (Heurteaux et al., 2006). D'un point de vue moléculaire, la sérotonine est considérée comme le neurotransmetteur clé impliqué dans les phénomènes de dépression. L'utilisation d'antidépresseurs inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (SSRI) comme la fluoxétine ou la paroxétine, largement utilisés en clinique, n'a montré aucun effet anti-dépresseur chez les souris TREK-1 ^{-/-}. C'est pour cette raison que les

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

souris invalidées pour ce canal sont dites "anti-déprimées", expliquant ainsi le fait que les antidépresseurs n'ont pas d'effet chez ces animaux. De plus, l'escitalopram (Lexapro®), médicament appartenant à la classe des SSRI, diminue les symptômes dépressifs dans un modèle de dépression post-AVC chez le rat. Cet effet est lié à la capacité de cette molécule à réduire le courant TREK-1, confirmant le rôle important de ce canal dans l'effet thérapeutique des SSRI (Lin et al., 2015). L'utilisation de spadine, bloqueur spécifique du canal, a permis de confirmer le phénotype anti-dépresseur précédemment observé chez les animaux chez lesquels le canal TREK-1 est absent. Par ailleurs, la spadine n'entraîne pas d'effets indésirables qui pourraient être attendus compte tenu des données existantes sur l'implication et ou la localisation de TREK-1 au niveau cardiaque ou au niveau du système nerveux périphérique sensoriel (Moha Ou Maati et al., 2012).

L'implication du canal TREK-1 dans la dépression a également été mise en évidence dans plusieurs études cliniques dont une étude multicentrique, STAR*D, qui a montré une corrélation entre la résistance à différents antidépresseurs et quatre SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) localisés au niveau du locus TREK-1 (Rush et al., 2004). Il a également pu être observé dans une seconde étude que certains polymorphismes du gène *KCNK2* (codant pour le canal TREK-1) pouvaient altérer l'efficacité de traitements anti-dépresseurs (Liou et al., 2009).

iv) Douleur

Le canal TREK-1 est présent dans le système nerveux périphérique, au niveau des DRGs. Il est notamment exprimé au niveau des neurones de faible et moyen diamètre connus pour véhiculer le message nociceptif. Sa colocalisation avec le canal TRPV1, connu pour son rôle dans la sensibilité thermique au chaud et localisé exclusivement dans les fibres C, confirme la présence de TREK-1 dans les fibres nociceptives. TREK1, bien que moins sensible que TRPV1 aux variations thermiques, module l'excitabilité des nocicepteurs probablement en s'opposant à la dépolarisation des TRP et pourrait ainsi participer à la perception de petites variations thermiques (Maingret et al., 2000; Talley et al., 2001). De façon plus précise, le canal TREK-1 est présent à la fois dans les fibres peptidergiques synthétisant des peptides impliqués dans la transmission spinale des messages nociceptifs (comme la substance P et le CGRP) et qui sont sensibles au récepteur au NGF et dans les fibres non peptidergiques, exprimant l'isolectine B4 (Alloui et al., 2006).

Des expériences sur des fibres C polymodales isolées mettent en évidence que les neurones de ganglion spinal des souris TREK1^{-/-} ont une sensibilité augmentée pour des

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

stimulations thermiques entre 30° et 45°C. *In vivo*, les souris TREK1^{-/-} présentent, en cohérence avec les données électrophysiologiques, des modifications de la perception de la douleur. L'utilisation de ces souris a permis de montrer son rôle dans la détection du chaud nocif avec une gamme de température allant de 46 à 50°C, mais également la détection de stimuli mécaniques avec le test de Von Frey (**Figure 22**) (Alloui et al. 2006). En effet, une même stimulation mécanique n'est pas ressentie comme douloureuse chez une souris sauvage à la différence de la souris KO. Aucune différence entre les souris sauvages et les souris TREK1^{-/-} n'a été cependant observée pour la sensibilité au froid. TREK1 semble également inhibé par une acidification du milieu extérieur et l'acide lysophosphatidique, tous deux connus pour être augmentés lors d'une blessure, d'une inflammation ou d'un cancer (Cohen et al., 2009).

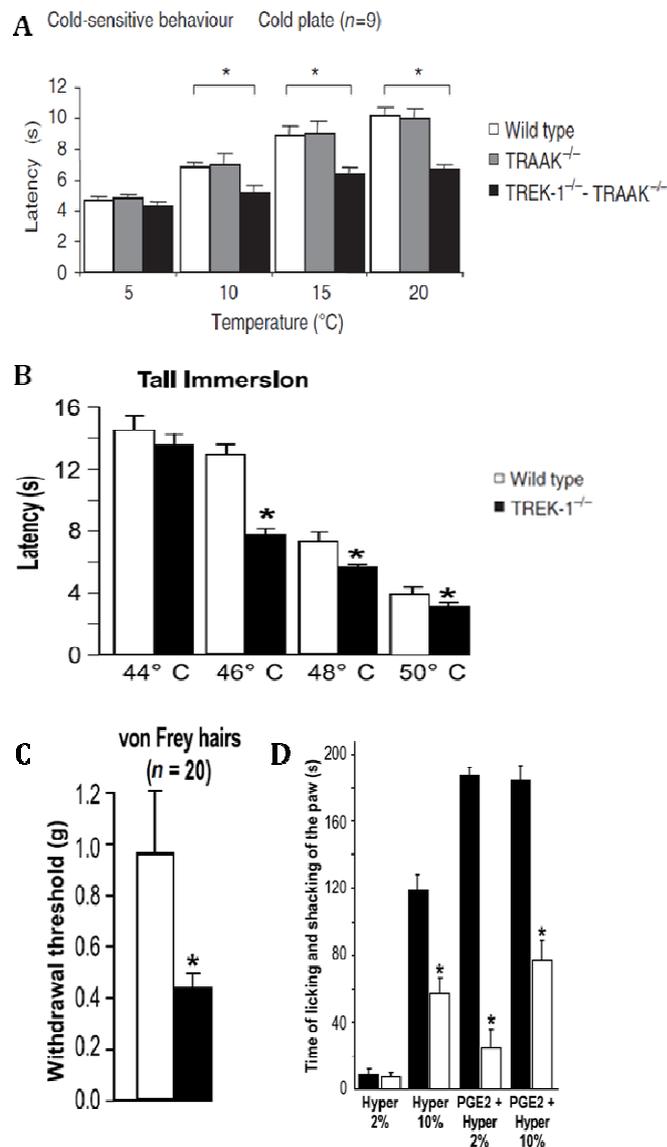


Figure 22 : Implication du canal TREK-1 dans la perception polymodale de la douleur.

Test de sensibilité thermique au froid (A), au chaud (B). Sensibilité mécanique avec le test de Von Frey (C) Sensibilisation des nocicepteurs à l'hyperosmolarité induite par la PGE2 (D). Résultats adaptés de Alloui *et al.*, 2006 et Noël *et al.*, 2009.

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

Le canal TREK-1 pourrait avoir un rôle en contexte physiopathologique. En effet, TREK-1 participe à l'hypersensibilité inflammatoire puisque les souris TREK-1 $-/-$ présentent un phénomène de résistance à la sensibilisation par la PGE2 des nocicepteurs à l'hyperosmolarité. (Alloui et al., 2006; Noel et al., 2009).

En contexte neuropathique, TREK-1 serait également impliqué dans l'hypersensibilité douloureuse induite par la ligature du nerf sciatique (Alloui et al., 2006) mais également dans un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine pour laquelle une diminution du taux d'expression du canal TREK1, et des canaux TREK2 et TRAAK, a été observée au niveau des DRGs (Descoeur et al., 2011; Pereira et al., 2014). *In vivo*, les animaux invalidés pour TREK1 et TRAAK, qui ont des seuils de tolérance au froid de base plus élevés que les animaux sauvages, ne démontrent pas de sensibilité douloureuse, thermique et mécanique, exacerbée sous l'effet de l'oxaliplatine comme le montrent les souris sauvages (**Figure 23**). Cette perte d'action totale de la chimiothérapie dans l'apparition des symptômes douloureux chez ces animaux permet donc de conclure que la sous expression des gènes codant pour TREK1 et TRAAK est un élément important pouvant expliquer la survenue de la neuropathie douloureuse induite par l'oxaliplatine, tout au moins à court terme (4 jours après l'injection de la molécule).

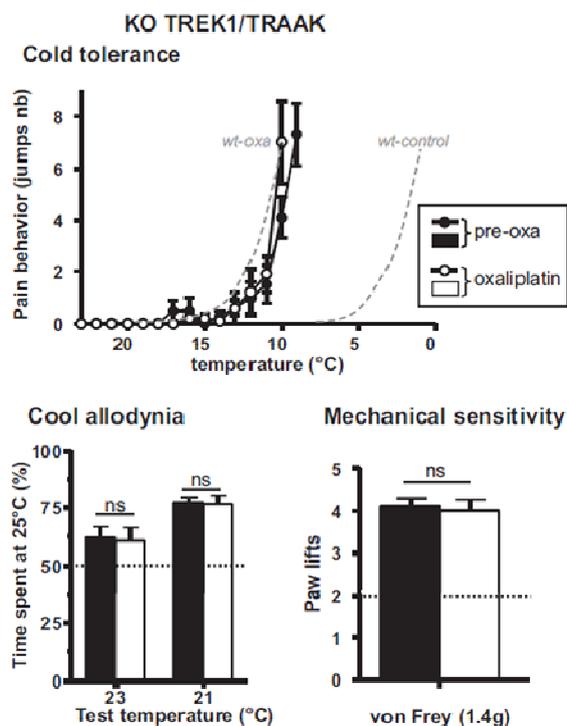


Figure 23 : Effet de l'oxaliplatine chez les animaux KO TREK-1/TRAAK (Descoeur et al., 2011)

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

L'ensemble de ces observations suggère donc que le canal TREK-1 est capable de moduler l'excitabilité des nocicepteurs. Cette implication semble vérifiée dans différents contextes physiopathologiques, ce qui conforte le canal TREK-1 comme étant une cible thérapeutique pour le traitement de la douleur.

d) Pharmacologie

La pharmacologie du canal TREK-1 est relativement bien documentée mais la plupart des molécules activatrices (voire inhibitrices) connues ne sont pas spécifiques de ce canal (Mathie and Veale, 2015). Certaines molécules montrent en effet une action sur d'autres canaux ioniques ou d'autres protéines, pouvant expliquer l'apparition d'effets indésirables. Comme nous l'avons vu précédemment, TREK-1 est inhibé par le baryum, la fluoxétine (antidépresseur inhibiteur spécifique de la recapture de sérotonine) (Sandoz et al., 2011) et la lidocaïne (anesthésique) (Nayak et al., 2009).

A l'inverse, TREK1 est activé par une classe importante d'agents pharmacologiques, les anesthésiques volatils généraux : chloroforme, éther, halothane et isoflurane (Heurteaux et al., 2004; Patel et al., 1999). Les anesthésiques gazeux, comme l'oxyde d'azote, le xénon ou le cyclopropane activent également TREK1 à des doses utilisées en clinique. Egalement, la classe des fénamates (tels que l'acide flufénamique, et le diclofénac) qui sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) déjà utilisés en clinique dans le traitement de la douleur, se sont également révélés capable d'augmenter l'activité du canal TREK1 (Takahira et al., 2005; Veale et al., 2014). Au laboratoire, et en collaboration avec Jacques Noel (IPMC, Nice), il a été démontré un couplage fonctionnel entre le récepteur opioïdérique μ et le canal TREK-1. De plus le canal TREK-1 s'est révélé être un contributeur essentiel de l'analgésie induite par la morphine chez des souris, alors qu'il ne participe pas aux trois principaux effets indésirables induits par cette molécule que sont la constipation, la dépression respiratoire et la dépendance (Devilliers et al., 2013). Plus récemment plusieurs groupes, dont le nôtre, ont lancé des programmes de recherche de modulateurs des canaux TREK et TRAAK. Ces travaux ont donné lieu à la découverte par l'équipe de Dan Minor d'un analogue de dihydroacridine, le ML67-33, et de ses dérivés qui activent et possèdent une bonne sélectivité pour la sous-famille des canaux TREK (Bagriantsev et al., 2013). Ces composés n'ont toutefois pas fait l'objet de test d'activité antalgique à notre connaissance. Au laboratoire, en collaboration avec Florian Lesage (IPMC, Nice Sophia-Antioliis) et Sylvie Ducki (ENSCCF, Clermont-Ferrand), nous avons entrepris un programme de recherche de modulateurs positifs du canal TREK-1. Nous avons rapporté la synthèse d'une série d'esters de l'acide caféique à partir du composé lead CDC. Ces analogues ont été testés *in vitro* pour leur

capacité à moduler l'activité du canal et *in vivo* pour leur potentiel antinociceptif (Rodrigues et al., 2014).

Durant ces travaux de thèse, nous avons recherché à moduler l'activité du canal TREK-1 *in vivo* afin de valider ce canal comme cible pour le traitement de la douleur. Nous avons utilisé la spadine, un peptide inhibiteur du canal, ainsi qu'une molécule connue pour activer le canal, le riluzole, qui seront présentés plus en détails ci-dessous.

i) Spadine

La spadine a été identifiée comme le premier composé inhibiteur spécifique des courants TREK1 (Mazella et al., 2010). La spadine est issue du clivage du pro-récepteur à la neurotensine 3 (NTSR3), appelée aussi sortiline. Ce peptide synthétique est constitué de 17 acides aminés dont la séquence est contenue dans le propeptide de 44 acides aminés issu de la maturation de la sortiline. La spadine possède 7 acides-aminés responsables du site de fixation du peptide (Mazella et al., 2010) et peut se fixer à la sortiline mais également au canal TREK-1.

La spadine favorise la neurogénèse hippocampique et augmente la phosphorylation de la protéine CREB, considérées comme des marqueurs clés de l'action antidépressive après traitement chronique avec des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Il est à noter que l'augmentation de cette neurogénèse est également observée avec l'utilisation d'autres antidépresseurs comme la fluoxétine (Ohira et al., 2013). Concernant son implication dans la transmission sérotoninergique, le traitement par la spadine permet d'augmenter le taux de décharges des neurones 5-HT au niveau central dans le noyau Raphé dorsal (**Figure 24**). Ce mécanisme permet également d'expliquer le rôle de la spadine dans la dépression, l'hypothèse d'un défaut de la transmission sérotoninergique étant retrouvée pour caractériser de nombreux antidépresseurs. Egalement, la délétion du gène TREK-1 dans ce noyau du Raphé semble également diminuer la transmission sérotoninergique (Mazella et al., 2010) et cette délétion chez la souris semble être le résultat d'un phénotype résistant à la dépression (Heurteaux et al., 2006). L'inhibition de ce canal semble donc un élément clef pour expliquer le rôle de la spadine dans la dépression.

Le mécanisme d'action de cet effet antidépresseur de la spadine réside donc dans la diminution du courant TREK-1 mais aussi par un phénomène d'internalisation du canal. D'un point de vue mécanistique, ceci a pour conséquence d'augmenter significativement la transmission sérotoninergique au niveau des neurones post-synaptiques engendrant un effet antidépresseur (Moha Ou Maati et al., 2014). Cet effet anti-dépresseur est lié à un effet direct sur

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

le canal TREK1, et s'avère cependant dépourvu des effets indésirables qui pourraient être attendus suite à l'inhibition de TREK1 aussi bien dans le système nerveux (douleur, épilepsie et ischémie) que dans le système cardiovasculaire (Moha Ou Maati et al., 2012).

Deux modes de fonctionnements de la spadine ont été décrits, en condition physiologique et en contexte thérapeutique, lors d'un traitement par spadine, lorsque le peptide est en excès. En condition physiologique, TREK-1 et le précurseur du récepteur NTSR3 s'associent dans les vésicules de transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, ce qui favorise l'adressage du canal à la surface de la cellule. Quand les vésicules fusionnent avec la membrane, la spadine, produite lors de la maturation du pro-récepteur par clivage, va être excrétée. Elle pourra ensuite se fixer sur le récepteur NTSR3 et/ou sur le canal TREK-1, entraînant alors l'inhibition du courant et l'internalisation du complexe qui sera dégradé. Lorsque la spadine est présente en grande quantité, dans le cas d'un traitement par exemple, le rythme d'internalisation est augmenté, menant à une disparition complète des canaux TREK-1 à la surface de la membrane plasmique.

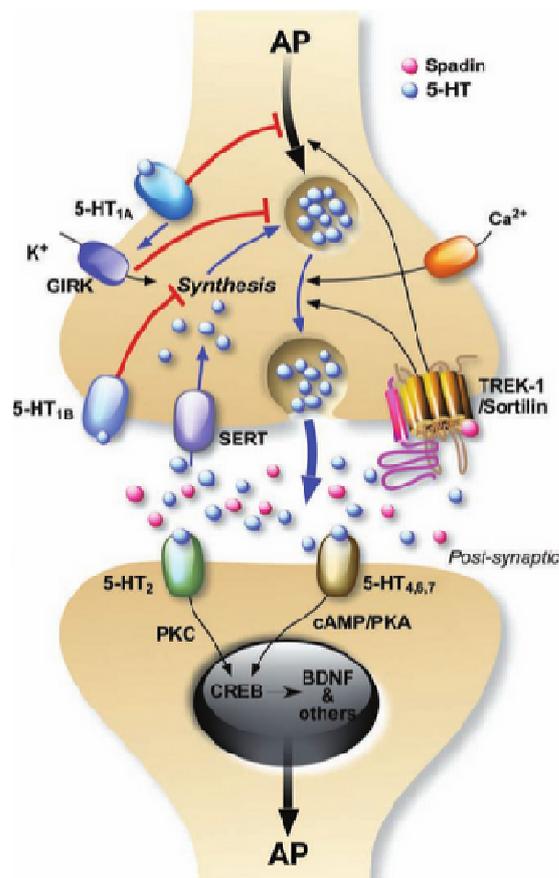


Figure 24 : Implication du canal TREK-1 dans la transmission sérotoninergique (Borsotto et al., 2015).

Les flèches rouges représentent la voie de sécrétion et de recapture de la sérotonine. Les flèches noires épaisses représentent le système mis en jeu pour ralentir ce mécanisme et les flèches noires fines les voies favorisant la libération de la sérotonine. Le complexe TREK1/sortiline est bénéfique lorsque la spadine est liée au canal. AP = potentiel d'action ; SERT = transporteur de la sérotonine.

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Chapitre II-2 : Implication du canal TREK-1

La spadine s'avère donc être un outil pharmacologique intéressant pour le blocage localisé du canal TREK-1 et vient en complément de l'utilisation des animaux KO pour ce canal, qui peuvent, quant à eux, présenter des phénomènes compensatoires.

ii) Riluzole (Rilutek®)

Le canal TREK1 peut être activé par le riluzole (Duprat et al., 2000), un agent neuroprotecteur utilisé en clinique chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Bensimon et al., 1994). *In vitro*, l'activation du courant TREK-1 par cette molécule est transitoire et est suivie par une inhibition PKA-dépendante du canal due à l'augmentation intracellulaire d'AMPc (Du et al., 2014; Duprat et al., 2000). Dans ces cellules, cette seconde phase d'inhibition est perdue lorsque le canal est délété pour le résidu sérine333 qui est le site principal de phosphorylation par la PKA.

Le riluzole (Rilutek®) présente de nombreuses propriétés thérapeutiques. Il possède un rôle neuroprotecteur dont l'efficacité a été démontrée dans la maladie de Parkinson (Koller and Cersosimo, 2004). Il possède également des propriétés anti-convulsives, anti-ischémiques, anti-dépresseurs (Zarate et al., 2004). Plus récemment il a été décrit un potentiel effet anticancéreux du riluzole comme suggéré par des études précliniques dans lesquelles il diminue la migration, la prolifération et l'invasion de cellules issues de mélanome (Le et al., 2010) ou de tumeur gliale (Zhang et al., 2015). Ces données ont été confortées dans une étude clinique de phase 0 dans laquelle le riluzole a été administré à des patients pour lesquels une résection de mélanome de stade III et IV était réalisée (Yip et al., 2009). D'autres études cliniques sont actuellement en cours pour étudier l'effet du riluzole dans des cas de mélanomes stade III et IV (NCT00866840, NCT00667901) mais aussi pour le traitement de métastases cérébrales après radiothérapie (NCT01018836). De plus, son effet antalgique est largement décrit dans plusieurs modèles de douleur neuropathique (Moon et al., 2014) ou inflammatoire (Xie et al., 2012). Deux études relativement anciennes entreprises sur un faible nombre de patients neuropathiques ou de volontaires sains respectivement n'ont pas montré d'effet sur la douleur (Galer et al., 2000; Hammer et al., 1999). Plus récemment, une étude clinique a montré son efficacité antalgique chez des patients présentant une lésion traumatique au niveau de la moelle épinière (Grossman et al., 2014).

Concernant les effets indésirables répertoriés, le riluzole est une molécule relativement bien tolérée. Parmi les plus fréquents, mais sans gravité, il a été rapporté la présence d'asthénie, de nausées et la modification de certains paramètres biologiques hépatiques.

ARTICLE 2:

“TREATMENT OF OXALIPLATIN-INDUCED NEUROPATHY BY ORAL RILUZOLE”

Laura POUPON^{1,2}, Vanessa PEREIRA^{1,2}, David BARRIERE^{1,2}, Sylvain LAMOINE^{1,2}, Youssef AISSOUNI^{1,2}, Alison ACCARIE^{1,2}, Laëtitia PRIVAL^{1,2}, Nicolas KERCKHOVE³, David Balayssac³, Alain ESCHALIER^{1,2,3}, Jérôme BUSSEROLLES^{1,2}.

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, Clermont-Ferrand, FRANCE ² Inserm, U1107, Neuro-Dol, Clermont-Ferrand, FRANCE ³CHU Clermont-Ferrand, Service de pharmacologie, F-63003 Clermont-Ferrand, FRANCE.

Présentation de l'article

En clinique, la neurotoxicité chronique à l'oxaliplatine se manifeste par la survenue de symptômes similaires à ceux retrouvés dans la forme aiguë à la différence que ces manifestations perdurent dans le temps et peuvent s'avérer irréversibles pour certains patients. Cette forme chronique s'accompagne également d'autres manifestations énoncées ci-dessous. A l'heure actuelle, les traitements utilisés restent empiriques et très peu efficaces ce qui justifie l'étude de la physiopathologie de la neuropathie induite par cet anticancéreux. Plusieurs études pré-cliniques se sont attachées à modéliser cette neuropathie chez le rat ou la souris (**Tableau 3**). En fonction des études, plusieurs doses et voies d'administration ont été utilisées, mais la majorité des études n'ont porté que sur l'étude des symptômes sensoriels.

Espèce	Dose	Dose cumulée	Voie	Durée	Symptômes	Références
Souris	3mg/kgx10	30mg	ip	21	Hypersensibilité au froid Allodynie mécanique	Ta et al, 2009
Souris	3,5mg/kgx8	28mg	ip	28		Renn et al, 2011
Souris	10mg/kgx8	80mg	ip	56		Coriat et al, 2014
Souris	15mg/kgx3	45mg	ip	21		Toyama et al, 2014
Rat	1,85mg/kg x16	29,6mg	ip	56	-	Jamieson et al, 2005
Rat	2mg/kgx9	18mg	iv	28	Allodynie froid/chaud Allodynie mécanique	Ling et al, 2007
Rat	2mg/kgx5	10mg	ip	5	Hypersensibilité au froid Allodynie mécanique	Xiao et al, 2012
Rat	2,4mg/kgx5	12mg	ip	21		Ghelardini et al, 2010

Tableau 3 : Principaux modèles de neuropathies chronique chimio-induites à l'oxaliplatine

Le but de cet article a donc été de caractériser un modèle murin de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine capable de mimer l'ensemble des symptômes décrits en clinique : développement d'une hypersensibilité douloureuse souvent exacerbée par l'exposition au froid au niveau périphérique (mains & pieds) et au niveau de la sphère orofaciale (face et cavité buccale), apparition de comorbidités telles que la dépression ou l'anxiété mais également de troubles sensorimoteurs caractéristiques de la forme chronique de la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine. Une fois le modèle

caractérisé, nous avons cherché à déterminer une cible moléculaire susceptible d'être impliquée dans cette neuropathie chronique, de vérifier à l'aide d'outils génétiques et pharmacologiques son implication et de valider pharmacologiquement cette cible pour le traitement de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine et de tester son action éventuelle vis-à-vis de l'effet anticancéreux de l'oxaliplatine.

Après mises au point, ce modèle murin de neuropathie chronique consiste en deux injections d'oxaliplatine (6mg/kg, i.p.) pendant quatre semaines. Un suivi longitudinal est réalisé sur l'ensemble des animaux afin d'évaluer le développement des symptômes douloureux, des troubles sensitifs et moteurs ainsi que les comorbidités telles que l'anxiété et la dépression. Les symptômes douloureux ont été évalués au niveau céphalique et extracéphalique à l'aide de tests thermiques et mécaniques. Les troubles sensori-moteurs ont été évalués à l'aide de 2 tests : le beam walk permettant d'évaluer les troubles moteurs fins et l'équilibre et le test de la gomette qui permet de mettre en évidence des troubles proprioceptifs et une altération de la dextérité.

En parallèle, une approche pharmacologique avec l'utilisation de Riluzole (Rilutek®) a été réalisée afin d'observer si ce traitement pouvait prévenir certains des symptômes de la neuropathie. En effet, cet agent neuroprotecteur, connu comme un activateur non spécifique des canaux TREK entre autres, a un effet antalgique, anti-dépresseur mais également anti-prolifératif *in vitro* selon la littérature. Nous avons également recherché à savoir quels mécanismes moléculaires étaient impliqués dans les effets du riluzole.

L'administration répétée d'oxaliplatine chez la souris sauvage nous a donc permis d'observer de nombreux symptômes de la neuropathie chronique décrite en clinique avec l'apparition rapide de symptômes douloureux dès les premières injections d'oxaliplatine, symptômes retrouvés au niveau céphalique et extracéphalique. La chronicisation de la neuropathie a également engendré l'apparition de troubles moteurs et de comorbidités. De plus, l'utilisation de riluzole par voie orale chez les souris a montré des effets encourageants puisqu'elle limite le développement des symptômes douloureux et moteurs ainsi que la dépression induits par la chimiothérapie.

Afin de valider l'implication de l'ensemble de ces canaux TREK dans la neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine, deux approches ont été envisagées : une approche génétique avec l'utilisation de souris invalidées pour le gène TREK-1, TREK-2 ou TRAAK associée à l'approche pharmacologique utilisant le riluzole. Cette molécule, utilisée dans le modèle de neuropathie aiguë chez ces différentes souris invalidées pour les canaux TREK a permis de mettre en évidence que

seul le canal TREK-1 semblait impliqué dans l'effet antalgique du riluzole puisque cet effet était supprimé chez les animaux invalidés pour ce canal TREK-1 uniquement, pas chez les animaux invalidés pour le canal TREK-2 ou TRAAK.

Tout en conservant les 2 approches génétiques et pharmacologiques, nous avons ensuite recherché si le riluzole avait un effet préventif vis-à-vis de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine et si le canal TREK-1 était ou non impliqué dans ces effets. D'un point de vue mécanistique, il a été confirmé que les effets du riluzole sont dépendants de l'activation de TREK-1 puisqu'ils sont fortement diminués chez les souris génétiquement invalidées pour ce canal. Il semblerait d'ailleurs que ses effets soient en partie liés à son action neuroprotectrice puisqu'un marquage ATF-3, marqueur de lésion neuronale, a montré que le traitement au riluzole était capable de prévenir ces lésions chez les souris sauvages uniquement. Afin d'appuyer ce résultat, il serait également intéressant d'observer si un phénomène connu de démyélinisation par l'oxaliplatine intervient dans ce modèle et si le riluzole est également capable de prévenir cet évènement.

Pour aller plus loin, nous avons voulu vérifier si le riluzole pouvait influencer ou non sur l'effet anticancéreux de l'oxaliplatine. Pour cela nous avons réalisé des approches *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation seule ou combinée de l'oxaliplatine et du riluzole a permis de montrer que ces molécules étaient capables de diminuer la viabilité cellulaire des cellules T84 (cellules humaines issues de carcinômes colorectaux) et CT26 (cellules murines issues de carcinômes colorectaux), leur conférant des propriétés anti-prolifératives *in vitro*, données obtenues à l'aide du test MTT. Les capacités anti-migratoires et anti-invasives du riluzole ont été observées à l'aide du test de la blessure sur les cellules CT26 (données non présentées) et doivent être prochainement évaluées sur les cellules T84. *In vivo*, nous avons donc administré conjointement de l'oxaliplatine (6mg/kg, 2 fois par semaine) et du riluzole (60µg/mL, traitement dans l'eau de boisson) durant 4 semaines chez les souris APC_{Min}, animaux porteur d'une mutation d'un gène suppresseur de tumeur les prédisposant au développement spontané de multiples adénomes intestinaux. Chez ces animaux, l'oxaliplatine a entraîné une diminution importante du nombre de tumeurs, qu'ils reçoivent ou non du riluzole. Le riluzole seul a diminué aussi significativement le nombre de tumeurs. Cette molécule apparaît donc comme un traitement intéressant pour la prévention de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine, tout en préservant l'action anti-tumorale de la chimiothérapie à l'oxaliplatine.

Abstract

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) represents a dose limiting adverse effect of specific neurotoxic anticancer drugs such as platinum salts for which no preventive or curative treatment are available yet. Oxaliplatin, a platinum compound used in the treatment of several solid tumors such as colorectal cancer, induces an acute sensory neuropathy which can lead to limit dosage, to changes in treatment to non-neurotoxic agents with the risk of limiting the effective clinical outcome. A chronic cumulative sensorimotor neuropathy is also frequently developing and greatly alters the quality of life of survivors. In the present study, we developed a mouse model of chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) which mimics both sensory and motor deficits in a clinical relevant time course. Repeated oxaliplatin administration in mice induces both cephalic and extracephalic mechanical and cold hypersensitivity as soon as after the first injection, as well as delayed sensorimotor deficits and a depression-like phenotype. Riluzole (Rilutek®), a non-selective TREK1 activator with known neuroprotective action, prevents both sensory and motor deficits induced by oxaliplatin. Interestingly, riluzole also reduces the depression-like phenotype induced by oxaliplatin. Noteworthy, riluzole did not affect the anticancer effect of oxaliplatin in a genetic model of colorectal cancer, the ApcMin mice. In conclusion, these results suggest that TREK1 could represent an innovative molecular target for the prevention of OIPN without affecting the antineoplastic proprieties of oxaliplatin.

Keywords: Oxaliplatin – TREK-1 – Chronic neuropathy – riluzole

Introduction

Oxaliplatin is a platinum compound widely used as a cytotoxic agent in the treatment of a spectrum of solid tumors, especially colorectal cancer (CRC) (Screnci et al., 2000). Unlike cisplatin and carboplatin, other platinum drugs used in chemotherapy, oxaliplatin has low ototoxicity and nephrotoxicity. However, oxaliplatin is highly hematotoxic and neurotoxic that remains the most common dose limiting adverse effect and limits its clinical use (André et al., 2009; Andre T, 2004; de Gramont et al., 2000). Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) occurs in two forms. The first one is an acute neuropathy immediately following the drug infusion which manifests as rapid onset of cold-induced dysesthesia or paresthesia, possibly associated with muscle cramps in the hands, feet and jaw (Gamelin et al., 2002). More than 90% of patients experience acute symptoms which are however resolved within a few days and 30-50% of patients suffer from chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) (Balayssac et al., 2015; Beijers et al., 2015). The second form is a cumulative and dose-dependent sensory neuropathy that develops gradually during long-term treatment (Grothey, 2003) and may limit the dosage and/or duration of oxaliplatin-based chemotherapy (Hartmann and Lipp, 2003). The incidence of neuropathy increases with cumulative dose, with severe neuropathy estimated to occur in 10% of patients after 9 treatment cycles and 50% after 14 treatment cycles (Park et al., 2013). Chronic OIPN is characterized by loss of sensory perception and is frequently associated with painful sensations. Symptoms are persistent and include distal paresthesia, sensory ataxia, functional impairment, jaw pain, eye pain, ptosis, leg cramps and visual and voice changes (Cersosimo, 2005). These symptoms may be accompanied by comorbidities such as distress, depression, anxiety, and poor sleep quality (Hong et al., 2014). In cancer patients and survivors, painful neuropathy is likely overshadowed by disabling deficit in fine sensory-motor coordination, such as writing or buttoning shirts, causing significant loss of functional abilities and quality of life. Currently, none of the drugs used for prevention or treatment of OIPN have been shown to be sufficiently effective to be incorporated routinely into clinical practice (Hershman et al., 2014b) and strategies to control neuropathy relies essentially in modifications of dosage and infusion scheme.

The pathophysiology of oxaliplatin-induced neuropathy is still unknown. It is well documented that the treatment of cancer with other platinum-based drugs leads to accumulation of high levels of platinum in the dorsal root ganglia (DRG), which harbor the cell bodies of peripheral primary sensory neurons (Cavaletti et al., 2001; Screnci et al., 2000; Thompson et al., 1984). Platinum levels in the DRG of treated patients correlate with the severity of their neuropathy (Dzagnidze et al., 2007; Gregg et al., 1992). However, ranking the platinum

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Article II: Introduction

salts by their peripheral nerve accumulation revealed oxaliplatin to be less accumulated as compared to cisplatin or carboplatin and did not correlate with neurotoxicity (Screnci et al., 2000). Oxaliplatin neurotoxicity is thought to be caused partly by voltage-gated sodium channel impairment due to calcium chelation by oxalate, an oxaliplatin metabolite (Grolleau et al., 2001b; Kawashiri et al., 2012c). Various studies have also reported oxaliplatin ability to modulate expression of ion channels encoding genes linked to cold and mechanical perception in animal models DRG (Descoeur et al., 2011c; Gauchan et al., 2009b; Kawashiri et al., 2012c; Nassini et al., 2011b; Pereira et al., 2014). These transcriptional changes have been observed in the DRGs of animals in the acute phase of oxaliplatin administration and mostly correlated with pain symptoms. Motor adverse side effects of oxaliplatin are far less studied than sensory symptoms although they are strongly debilitating for patients in the long term and difficult to be effectively managed (Terrazzino et al., 2015). It is known that oxaliplatin causes degeneration of myelinated fibers in the rat sciatic nerve in the late phase of repeated treatment (Kawashiri et al., 2011). Very recently, it has also been shown that oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve (Tsutsumi et al., 2014). Chronic treatment with oxaliplatin has also been reported to induce shrinkage of DRG neurons and axonopathy of myelinated fibers in mouse models (Cavaletti et al., 2001; Renn et al., 2011).

Looking for new molecular target whose modulation would confer both analgesic and neuroprotective effect against oxaliplatin neurotoxicity, we focused our attention on the TREK and TRAAK potassium channels family. Hence, these channels are hyperpolarizing background K⁺ channels regulating the resting membrane potential, action potential duration, and thus are believed to play an important role in neuron excitability. Electrophysiological measurements strongly established that TREK1, TREK2 and TRAAK share similar characteristics, especially mechano- and thermo-activated gating. In line with these biophysical properties, we demonstrated that TREK/TRAAK members are involved in polymodal pain perception, especially in noxious cold perception for TREK1 and TRAAK channels (Alloui et al., 2006c; Noel et al., 2009) and innocuous cold for TREK2 (Pereira et al., 2014). Moreover, TREK1 activation specifically triggers morphine-induced analgesia but not its major adverse side effects in mice (Devilliers et al., 2013), suggesting that TREK1 direct activation would lead to strong analgesic effect without opiates adverse side effects. Interestingly, TREK1 knock out animals are also more sensitive to ischemia and epilepsy suggesting that TREK1 activation promotes neuroprotection. Altogether these data suggest that TREK and TRAAK channels would be potential interesting pharmacological targets to prevent both acute and chronic neurotoxicity induced by oxaliplatin. Electrophysiological studies have shown that TREK and TRAAK channels are activated by riluzole (Rilutek®) (Duprat et al., 2000). Riluzole exhibits various pharmacological activities, the most prominent of which are inhibition of voltage-gated Na⁺ (Na_v) channels at concentrations of

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Article II: Introduction

1-50 μ M and activation of small-conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channels with EC_{50} of 10-20 μ M (Grunnet et al., 2001; Song et al., 1997). Riluzole has further been reported to inhibit delayed-rectifier K^{+} channels and to activate 2-pore K^{+} channels at 30-100 μ M (Duprat et al., 2000). Other study show $\text{K}^{2\text{P}}$ channels of the TREK subfamily (mainly TREK-2) generate a riluzole-activate current and contribute to the control of excitability and resting membrane potential (Cadaveira-Mosquera et al., 2011, 2012). Riluzole has also a non specific activator of TREK channels and has many known advantageous properties. Aside from being a TREK1 activator, this molecule also reduces glutamate release by inhibiting sodium channel currents (Stefani et al., 1997), exerting a neuroprotective function against glutamate-induced neurotoxicity. Sodium channels blockage is thought to contribute to the neuroprotective effects of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis, the unique currently US Food and Drug Administration approved indication for riluzole (Bensimon et al., 1994). Preclinical studies have shown a potential neuroprotective role of riluzole after spinal cord injury (SCI) (Tator et al., 2012) and phase I clinical trial for efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury has yielded promising results (Grossman et al., 2014). Moreover, antidepressant and anti-proliferative effects of riluzole have been described in animal models of depression and cancer cell lines respectively (Akamatsu et al., 2009; Gourley et al., 2012; Le et al., 2010b). Thus, in combination with oxaliplatin, we postulate that riluzole could prevent oxaliplatin-induced neuropathy and possibly enhance anticancer chemotherapy efficacy.

Here, we developed a mice model of chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. We made a longitudinal assessment of the time course development of both cephalic and extracephalic pain symptoms, of sensorimotor deficits, and evaluate depression-like symptom appearance in this model. When daily administered in the drinking water, riluzole prevents oxaliplatin-induced cold and mechanical hypersensitivity, sensorimotor deficits and reduces the depression-like phenotype induced by chronic oxaliplatin administration. Most of these effects are lost or at least largely decreased in TREK1 knock-out animals, suggesting that TREK1 represents a good molecular target for the prevention of oxaliplatin-induced neuropathy and comorbidities. It is also worthy to note that riluzole did not affect oxaliplatin anti-tumoral effect either *in vitro* or *in vivo* in APCmin mice, a murine model of colorectal cancer which spontaneously develop intestinal adenoma.

Results

Repeated oxaliplatin administration induces extracephalic and cephalic pain hypersensitivity in WT mice.

Prolonged oxaliplatin treatment is known to induce a persistent sensory peripheral neuropathy, affecting especially extremities such as hands and feet as well as orofacial territory. To assess these symptoms, we measured tail withdrawal response to a noxious cold stimulation at 10°C (**Fig. 1A**) and hind paw mechanical tactile/pain perception using Von Frey test (**Fig. 1B**). Each cephalic and extracephalic behavioral test was realized once a week. Concerning cephalic test, we used acetone and brush test. Acetone test consist to gently applied acetone to the upper lip area skin surface and measure the total time spent in acetone-evoked behaviors (grooming, scratching and flinching) over a 1-minute. Brush test consist to realize five strokes of brush on the upper lip area skin surface in mice and measure the number of response to dynamic mechanical stimulation. Moreover, mice were monitored for the duration of the chronic model and the results showed no significant weight loss or temperature changes and few losses were observed (**suppl. Data 1**). Cold hypersensitivity was observed in mice as evidenced by the significant decreased tail withdrawal and increased acetone-induced grooming (**Fig 1A-C**) behavior observed in animal treated by oxaliplatin as soon as after day 7 after the first injection. Mechanical hypersensitivity (**Fig 1B-D**) assessed by Von Frey and brush test was also observed after oxaliplatin treatment.

Treatment with riluzole (60µg/mL, p.o) significantly prevented cold and mechanical hypersensitivities induced by oxaliplatin both at extracephalic and cephalic levels. Although not completely understood, an important part of the mechanism of action of riluzole is probably linked to the fact that it inhibits synaptic glutamate release.

Oxaliplatin-chemotherapy induces depression-like symptoms reversed by Riluzole.

Depression was assessed at day 28 using three classical behavioral tests: the Tail Suspension Test (TST), the Porsolt Forced-Swim Test (FST) and the Novelty-induced hypophagia test (NHT). TST (Steru et al., 1985) is conducted by suspending mice by the tail for a test period of 6 minutes in our conditions, and measuring the immobility time during the entire test period. FST is based on a measurement of the rodents' immobility time after they are placed in a tank filled with water and from which they cannot escape. This immobility is also interpreted as a "behavioral despair" (Nishimura et al., 1988). In the NHT (Dulawa and Hen, 2005), food-deprived mice are set in a situation that provoques conflict between the drive to eat a food pellet placed in the center of a brightly lit open field and the fear of this brightly lit open space. Whatever the test used, a depression-like phenotype was observed at day 28 in oxaliplatin-treated mice as

evidenced by an increased immobilization time for TST, a significant increased immobilization time for FST and a significant increased time before to eat pellet for NHT. For the three tests used, riluzole treatment (60µg/mL, p.o) significantly prevented the depression-like phenotype observed. Given this results we wondered whether TREK-1 channel activation was involved in the antidepressant-like effect of riluzole (**fig 1 F-G**).

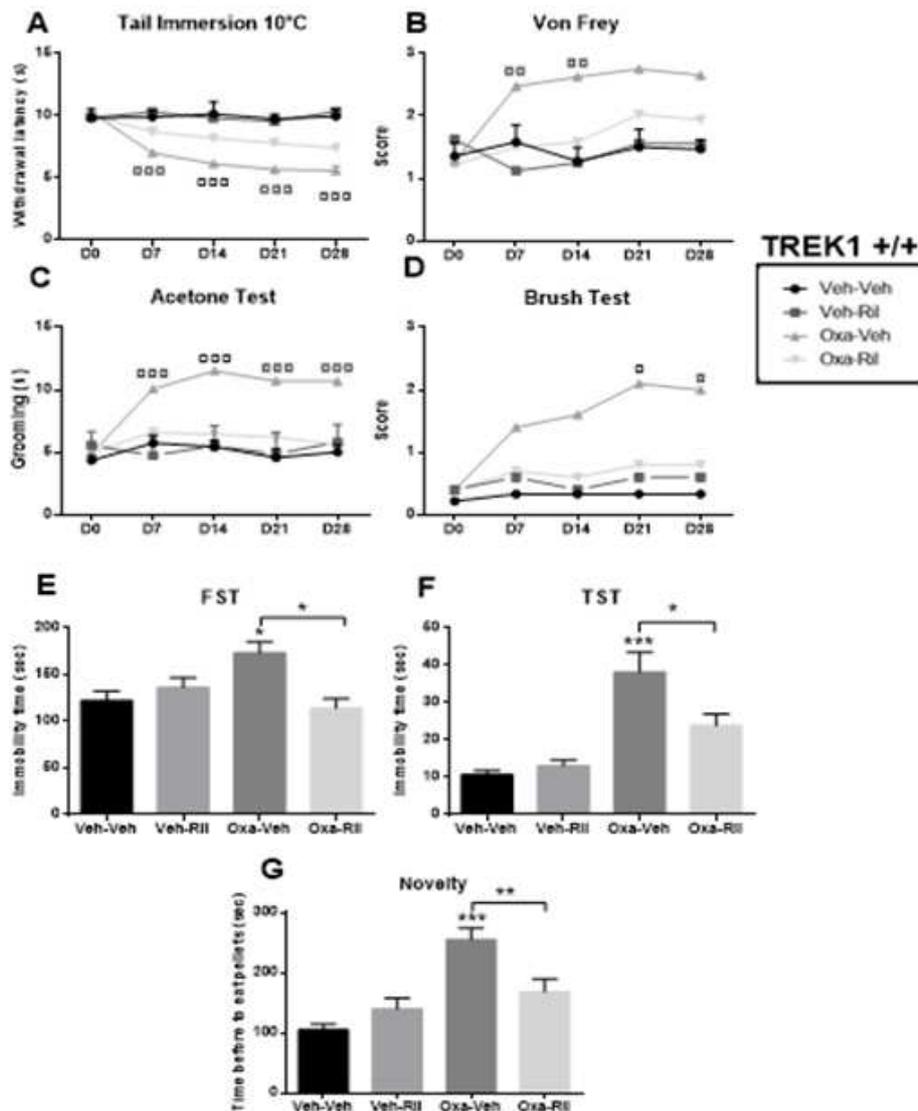


Figure 1: Riluzole effects on wild-type mice in chronic neuropathy : pain symptoms and depression.

In vivo study of oxaliplatin-induced neurotoxicity. Experimental mice received oxaliplatin (6 mg/kg) twice a week and riluzole (drinking water - 60µg/mL, po) for 4 weeks. Evaluation of hyperalgesia in 4 groups (n=8 per group): Control group, group with riluzole alone, oxaliplatin-group and group treated by combination oxaliplatin-riluzole. Riluzole effect was assessed in chronic neuropathy induced by oxaliplatin (6mg/kg): on peripheral level with tail immersion (10°C) (A) and Von Frey tests (B), on cephalic level with acetone (C) and brush tests (D). Each test was realized once a week until day 28 in WT mice (A-D). Three different tests were performed to evaluate depression in WT (E-G) (n=8 per group). Measured parameters are immobility time for FST (force swim test) and TST (tail suspension test) and time before to eat pellets for NIHT (novelty induced hypophagia test). Values are mean ± SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *; * for p<0,05; ** for 0.01; *** p<0,001. * to compare vehicle and oxaliplatin group, x to compare oxaliplatin and oxaliplatin-riluzole group. One or Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Oxaliplatin induces deficits of fine coordination movements that are prevented by Riluzole.

Although rarely assessed in preclinical studies related to anticancer drugs-induced neuropathy, changes in proprioception, than can affect fine motor coordination, such as writing, holding objects, picking up coins, buttoning shirts and walking, appears as a consequence of chronic cumulative oxaliplatin neurotoxicity (Cersosimo, 2005) as an element of the dose-limiting toxicity of the drug (Grothey, 2005). Rotarod test has previously been used in both acute (Sałat et al., 2014) and chronic oxaliplatin-induced neuropathy (Coriat et al., 2014). In these studies it has been used at a fixed speed and demonstrated no effect of oxaliplatin after a single dose administration (Sałat et al., 2014) but a decrease latency to fall as soon after the third week till 8 weeks of once a week a 10mg/kg oxaliplatin injection (Coriat et al., 2014). The accelerating rotarod test is more commonly used and has been shown to measure not only motor coordination but also balance (Lalonde et al., 2005). Here we show no effect of repeated oxaliplatin administration on the accelerating rotarod test along the time course of the 4 weeks of oxaliplatin treatment and no differences were observed on the grip test between oxaliplatin- and vehicle-treated groups (**fig 2A-B**). Performance on the balance beam is another useful measure of fine coordination and balance (Brooks and Dunnett, 2009) that, to our knowledge, has never been used in preclinical models of oxaliplatin-induced neuropathy. The goal of this test is for the mouse to stay upright and walk across an elevated narrow beam to a safe platform. This test takes place over 3 consecutive days: 2 days of training and 1 day of testing. Performance on the beam is quantified by measuring the time it takes for the mouse to traverse the beam and the number of paw slips that occur in the process. This task has been shown to be particularly useful for detecting subtle deficits in motor skills and balance that may not be detected by other motor tests, such as the Rotarod (Luong et al., 2011). Two parameters were measured: time to cross beam (fine coordination) and number of footslips (balance). None of the two parameters were altered by oxaliplatin 7 days after the beginning of the treatment (**fig 2C-E**). At day 28 (end point), fine coordination and balance, especially with the number of footslips, were altered in oxaliplatin-treated mice and riluzole treatment (60µg/mL, p.o) prevented these motor defects (**fig 2D-F**). We also used the adhesive removal test in order to evaluate the effect of oxaliplatin on tact sensibility (**Fig. 2G-I**). This behavioral test implies correct paw and mouth sensitivity (time-to-contact) and correct dexterity (time-to-remove). Contact time and removal time were significantly increased in oxaliplatin-treated mice at D28 (**fig 2H-J**), resulting from an alteration of sensitivity and dexterity due to repeated administration of chemotherapy (no alterations were observed at day 7 (**fig 2G-I**), corresponding to the beginning of chemotherapy administration). Riluzole treatment (60µg/mL, p.o) have effect on only one parameter and allowed restoring dexterity (removal time) in mice treated with combination of oxaliplatin and

riluzole but no significant changes were observed concerning alterations of sensitivity (contact time).

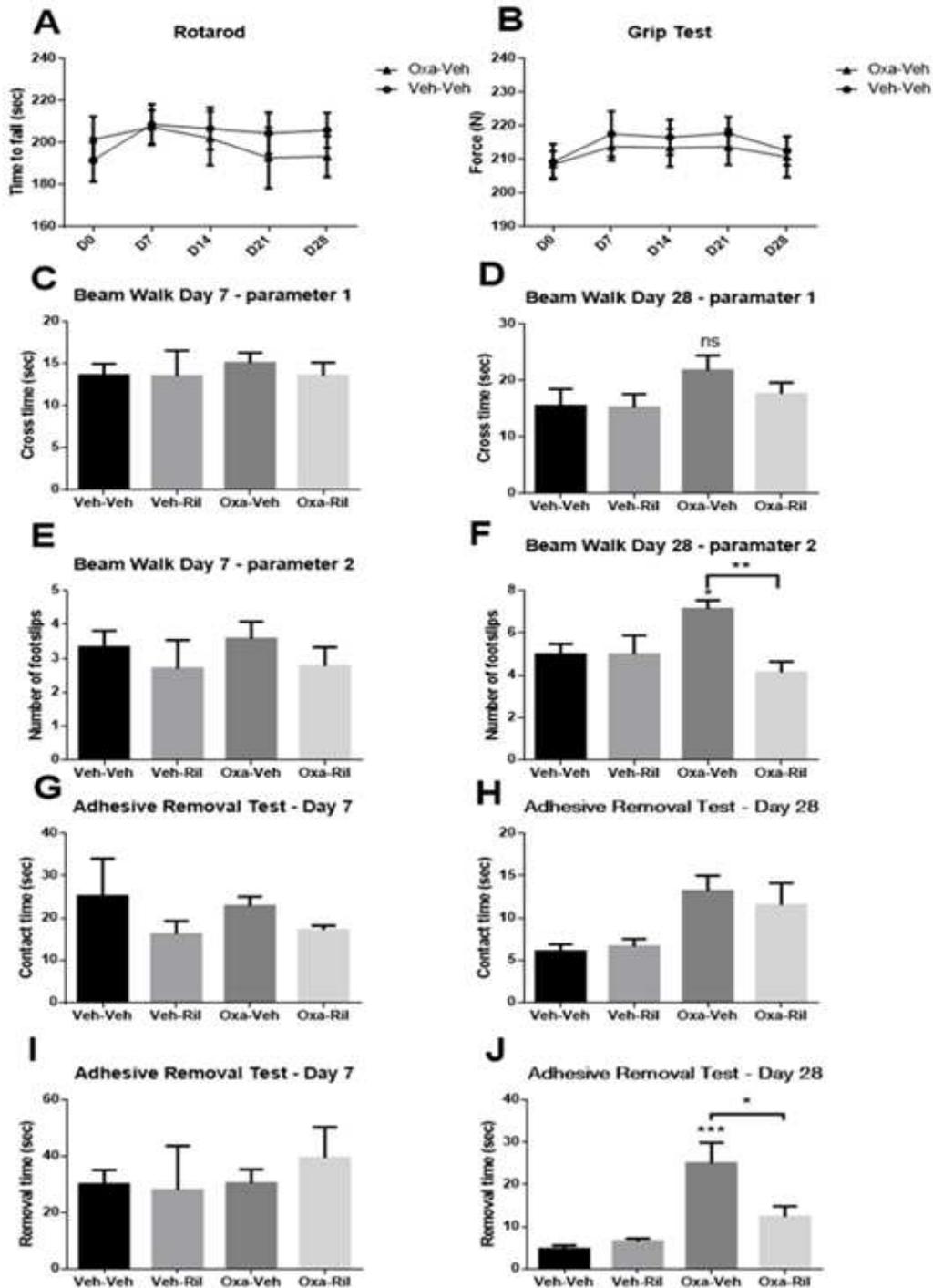


Figure 2: Riluzole effects on locomotor and sensory troubles induced by chemotherapy in WT mice (n=8 per group). These tests were realized at day 28 for Rotarod and GripTest, at day 7 and day 28 for Beam Walk and Adhesive removal tests. Basic locomotor disturbances were evaluated using rotarod (A) testing and griptest (B). Fine motor coordination and balance were assessed by the beam walking assay (C-F) with 2 parameters: crossing time (C-D) and number of footslips (E-F) in mice treated by repeated injections of oxaliplatin (6mg/kg) with or without riluzole treatment. Sensorimotor deficits were studied by the adhesive removal test (G-J) with two measured parameters: contact time (G-H) and removal time (I-J). Values are mean \pm SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *, * for $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Riluzole have an anti-hyperalgesic effect in acute oxaliplatin-induced neuropathic pain that is TREK-1 dependant.

At the molecular level, riluzole has been shown to affect the activity of several ionic channels. It is reported to block voltage-gated sodium channels (<1–10 μM) and to inhibit voltage-activated calcium channels (10–40 μM), thereby preventing repetitive neuronal firing and promoting neuronal survival (Song et al., 1997; Wang et al., 2008). Riluzole also potentiates calcium-dependent potassium currents and has been shown to activate K2P2.1 (TREK1), K2P10.1 (TREK2) and K2P4.1 (TRAAK) channels (10-100 μM), three members of the 2-pore K^+ channels family (Duprat et al., 2000; Lesage et al., 2000). Given these data, we evaluated here whether these channels are involved in the analgesic effect of riluzole. We first evaluated the involvement of these channels in a model of pain hypersensitivity induced by a single injection of oxaliplatin. To determine anti-hyperalgesic effect of Riluzole, we used oxaliplatin-induced acute neuropathic pain models in mice deleted for either one or all of the TREK-1, TREK-2 or TRAAK channels. Thermic sensitivity was assessed by paw immersion test at 10°C (**fig 3A-C**) and acetone test (**fig 3G-I**) and mechanical sensitivity was assessed by Von Frey (**fig 3D-F**) and brush test (**fig 3J-L**). KO mice and their wild-type littermates were treated either with vehicle or riluzole 7.5 mg/kg, i.p. administered at day 4 after injection of oxaliplatin (6mg/kg), at the time of maximum hypersensitivity (Descoeur et al., 2011c). The peak effect of riluzole occurred within 30 min post injection, followed by a progressive decrease until 60 min post injection (**fig 3**). This effect was totally lost in TREK1^{-/-} mice but not in TREK-2^{-/-} or TRAAK^{-/-} mice, suggesting a major and specific contribution of the TREK-1 channel in the analgesic effect of riluzole in this neuropathic pain model.

Repeated oxaliplatin administration induces extracephalic and cephalic pain hypersensitivity that is prevented by riluzole-induced TREK-1 activation

Our data obtained in the model of acute oxaliplatin-induced neuropathy (**Fig. 3**) suggest the involvement of TREK-1 channel in the analgesic effect of riluzole.

Given these data we then focused our work on the TREK-1 channel and first evaluated its involvement in the analgesic effect of riluzole in mice treated with repeated oxaliplatin injections. As seen in **Fig. 4(A-D)**, whatever the stimulus (mechanic or thermic) or the location tested (face or extremities), riluzole partially or totally loses its analgesic effect in TREK-1^{-/-} mice.

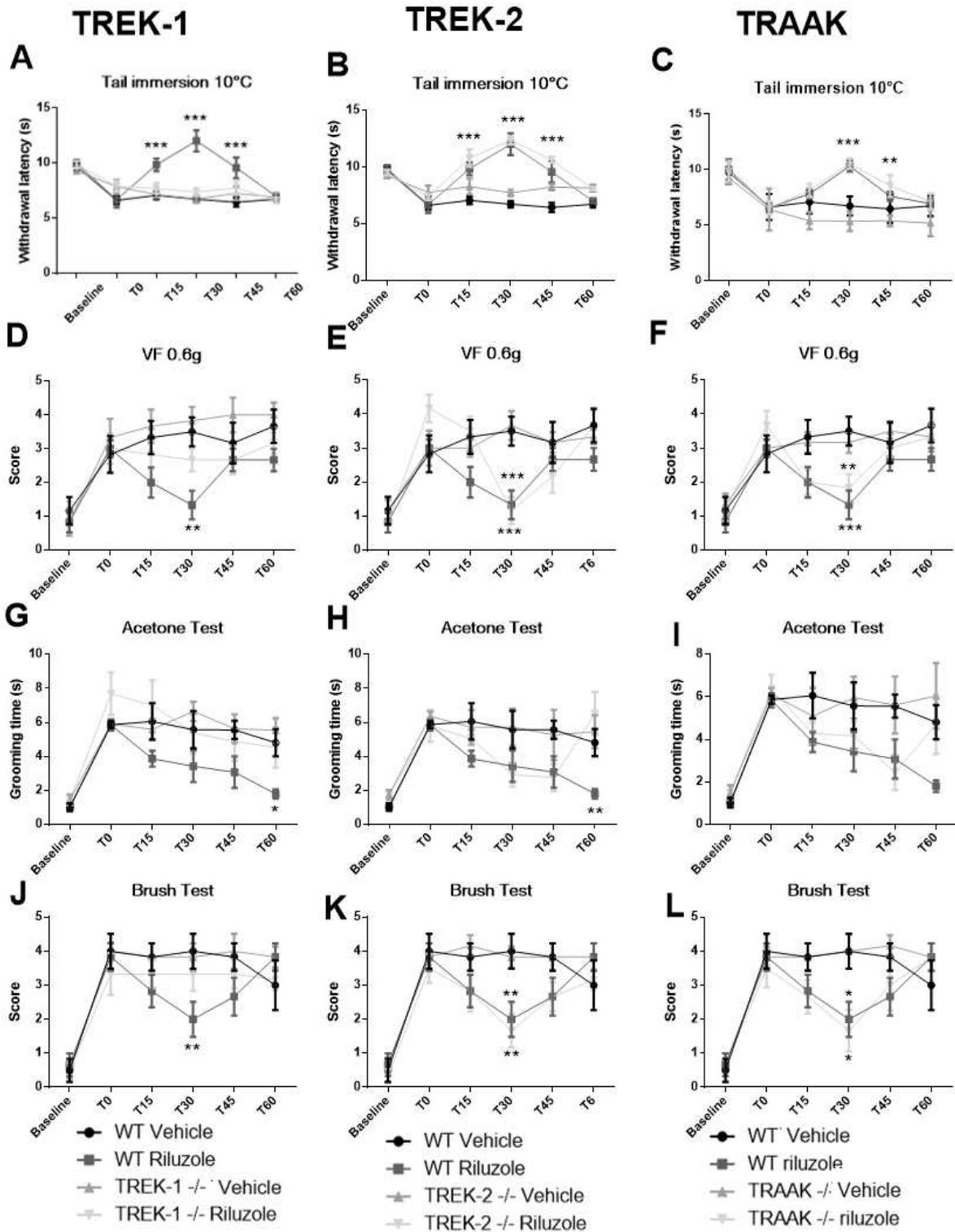


Figure 3: Involvement of K2P channels in analgesic riluzole effect.

Baseline latencies were recorded before chemotherapy injection and the antihyperalgesic effect of riluzole was assessed 4 days after injection. Kinetics of riluzole effect were realized at D4 (acme of acute neuropathy symptoms) after oxaliplatin treatment (6 mg/kg, ip injection) on peripheral level with tail immersion (10°C) and Von Frey tests, on cephalic level with acetone and brush tests. on wild-type, simple KO TREK-1 (**A-D-G-J**), KO TREK-2 (**B-E-H-K**) and KO TRAAK (**C-F-I-L**) mice (n=8 per group). Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *; * for p<0,05; ** for 0.01; p<0,05 *** p<0,001. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Oxaliplatin-chemotherapy induces depression-like symptoms and deficits of fine coordination movements that are prevented by Riluzole treatment in a TREK-1 dependant manner

We first compared the basal depression phenotype of TREK-1^{-/-} mice and their wild-type littermates. Confirming previous results obtained by Heurteaux and colleagues (2006) (Heurteaux et al., 2006), immobility time was half in the TST and decrease in the FST suggesting an antidepressive like behavior of the TREK-1 knock-out mice. However, no difference was observed between the two genotypes neither in the NST (Novelty-suppressed feeding test). Like what we observed in WT mice, oxaliplatin led to a depression like behavior in TREK-1^{-/-} mice that was however not prevented by riluzole treatment in this genotype (**fig 4E-G**), thus suggesting an involvement of the channel in this effect. At first sight, this result is intriguing since it has been well documented that the genetic invalidation or the pharmacological blocking of the TREK-1 channel lead to an antidepressive state. Here our results suggest that the activation of TREK-1 by riluzole : (i) did not induce a depressive behavior in mice and that (ii) it leads to the prevention of the depression-like behavior induced by repeated oxaliplatin administration.

Concerning locomotors effects, oxaliplatin induces deficits of fine coordination movements in TREK1^{-/-} mice as in WT mice (**fig 5**), as observed with the beam walk and adhesive removal tests. No effect of Riluzole was also observed in TREK1^{-/-} mice, demonstrating that this effect of riluzole also involves TREK1 activation.

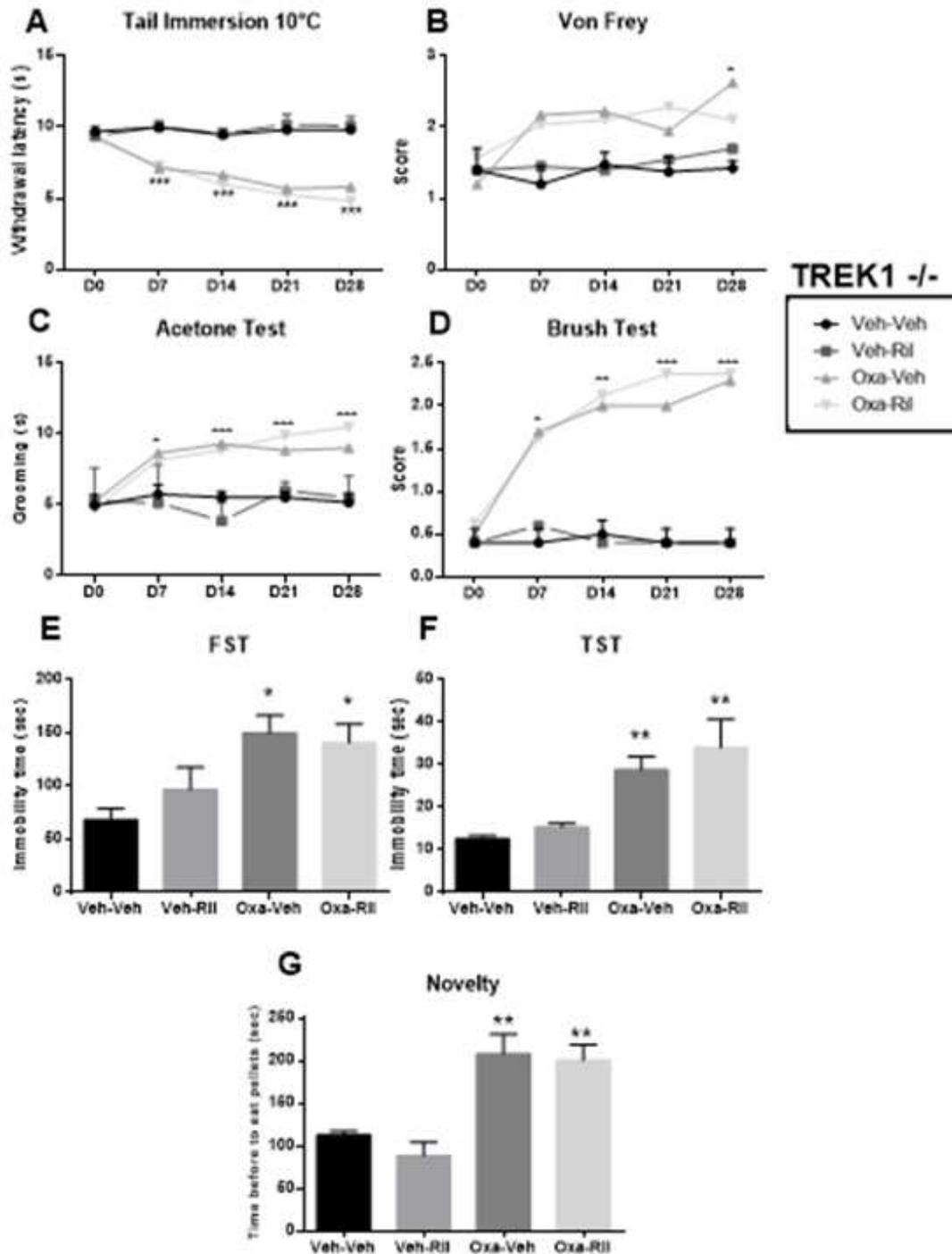


Figure 4: Riluzole effects on KO TREK-1 mice in chronic neuropathy : pain symptoms and depression.

In vivo study of oxaliplatin-induced neurotoxicity. Experimental mice received oxaliplatin (6 mg/kg) twice a week and riluzole (drinking water - 60µg/mL, po) for 4 weeks. Evaluation of hyperalgesia in 4 groups (n=8 per group): Control group, group with riluzole alone, oxaliplatin-group and group treated by combination oxaliplatin-riluzole. Riluzole effect was assessed in chronic neuropathy induced by oxaliplatin (6mg/kg): on peripheral level with tail immersion (10°C) (A) and Von Frey tests (B), on cephalic level with acetone (C) and brush tests (D). Each test was realized once a week until day 28 in TREK-1^{-/-} mice (A-D). Three different tests were performed to evaluate depression in TREK-1^{-/-} mice (E-G) (n=8 per group). Measured parameters are immobility time for FST (force swim test) and TST (tail suspension test) and time before to eat pellets for NIHT (novelty induced hypophagia test). Values are mean ± SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *; * for p<0,05; ** for 0.01; *** p<0,001. * to compare vehicle and oxaliplatin group, † to compare oxaliplatin and oxaliplatin-riluzole group. One or Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

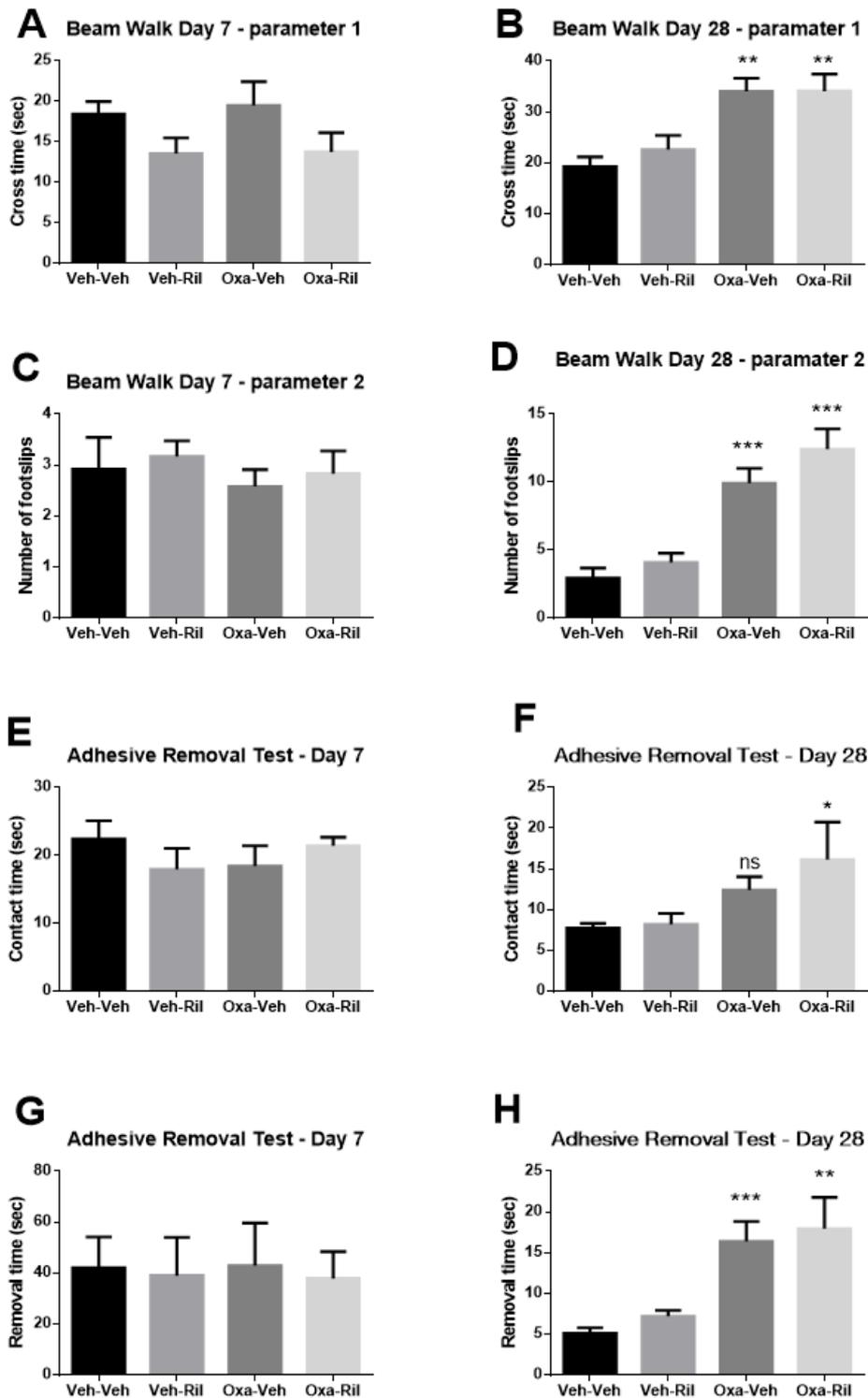


Figure 5: Riluzole effects on locomotor and sensory troubles induced by chemotherapy in KO TREK-1 mice (n=8 per group). These tests were realized at day 7 and day 28 for Beam Walk and Adhesive removal tests. Fine motor coordination and balance were assessed by the beam walking assay (A-D) with 2 parameters: crossing time (A-B) and number of footslips (C-D) in mice treated by repeated injections of oxaliplatin (6mg/kg) with or without riluzole treatment. Sensorimotor deficits were studied by the adhesive removal test (E-H) with two measured parameters: contact time (E-F) and removal time (G-H). Values are mean \pm SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *; * for $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Repeated oxaliplatin injection leads to delayed neuronal toxicity that is prevented by riluzole.

Oxaliplatin-induced chronic peripheral neuropathy has been characterized by damage of the cell bodies of primary afferent fibers (Cavaletti et al., 2001; Donzelli et al., 2004; McKeage et al., 2001; Scuteri et al., 2009; Ta et al., 2006). In the present study we used ATF-3, a widely recognised marker of injured neurons. We observed an increase in ATF-3 immunostaining both at the extracephalic (DRG) (**Fig 6A-D**) and at the cephalic (TG) (**Fig 6E-H**) levels at day 28 after repeated oxaliplatin administration and an important decrease is observed with riluzole treatment. No significant variations were observed in the oxaliplatin group at day 4. Consistent with its known neuroprotective effect, riluzole significantly prevented ATF-3 expression in TREK-1^{+/+} mice. In TREK-1^{-/-} mice, an increase of ATF-3 immunostaining was observed in oxaliplatin treated mice in TG and DRG but no differences can be observed between oxaliplatin and oxaliplatin-riluzole groups. In conclusion, this effect was lost in TREK-1^{-/-} mice, suggesting a major role of the channel in the neuroprotective effect of riluzole as previously documented.

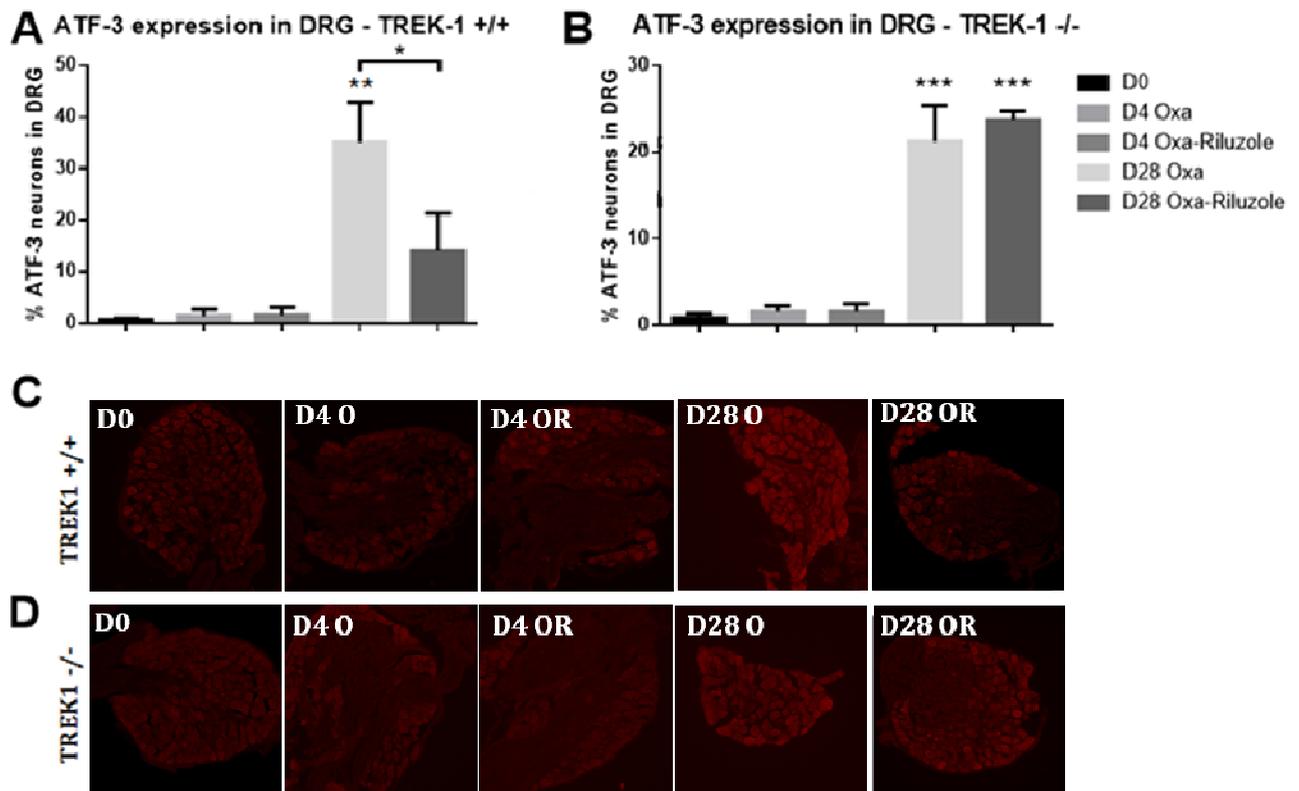


Figure 6-1: Neuroprotective property of Riluzole in chronic neuropathy induced by oxaliplatin. Immunostaining of ATF-3, a widely recognised marker of injured neurons, was used to evaluate neuroprotective action of Riluzole in DRG (**A-D**) at day 4 (acute form) and day 28 (endpoint of chronic neuropathy model) in WT and KO TREK-1 mice treated by vehicle, oxaliplatin alone and combination oxaliplatin-riluzole (n=4 per group).

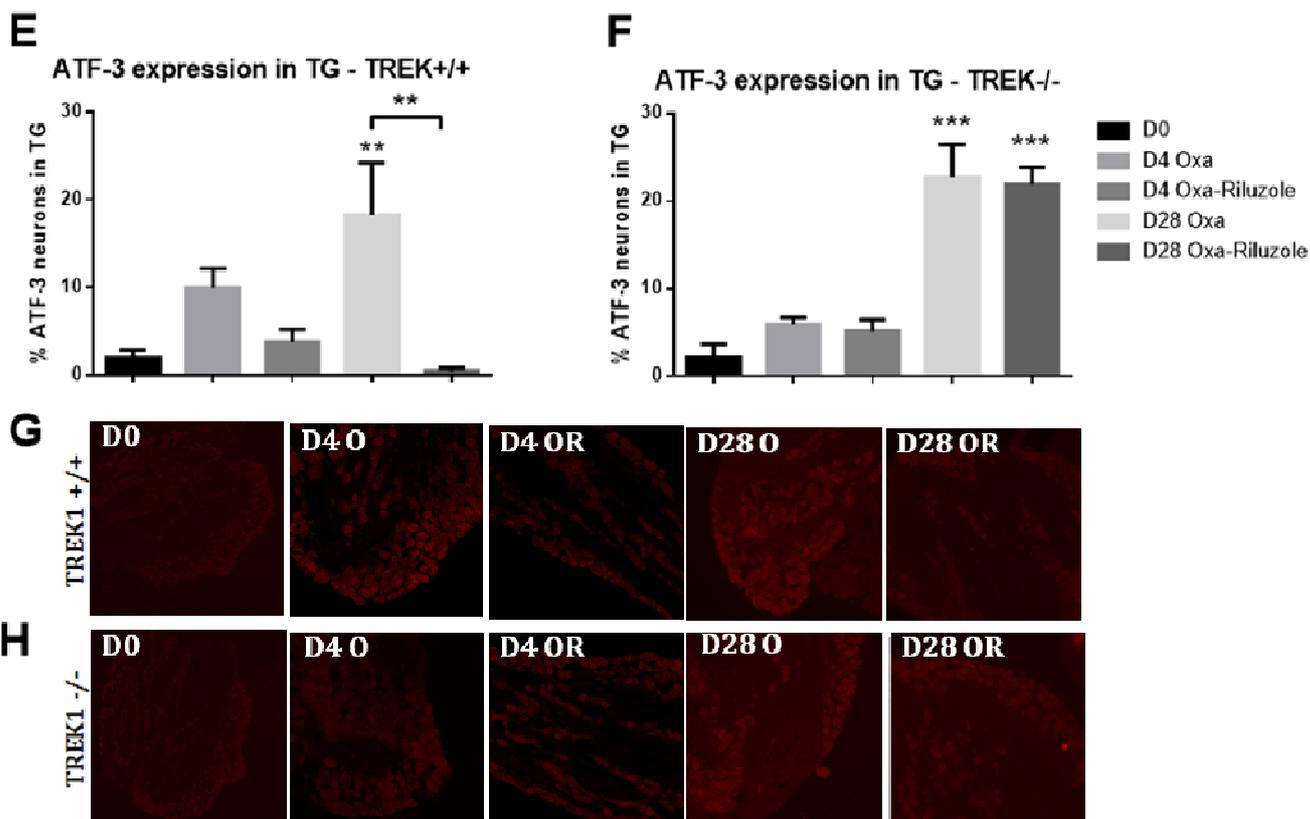


Figure 6-2: Neuroprotective property of Riluzole in chronic neuropathy induced by oxaliplatin.

Immunostaining of ATF-3, a widely recognised marker of injured neurons, was used to evaluate neuroprotective action of Riluzole in TG (E-H) at day 4 (acute form) and day 28 (endpoint of chronic neuropathy model) in WT and KO TREK-1 mice treated by vehicle, oxaliplatin alone and combination oxaliplatin-riluzole (n=4 per group). Values are mean \pm SEM. NS: not significant. Significant difference between vehicle and oxaliplatin treated mice are marked with *, * for $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Riluzole has anti-proliferative effects in vitro

T84 human colorectal adenocarcinoma cells were used to evaluate anti-proliferative effects of chemotherapy, riluzole or combination treatments. MTT assay confirmed anti-proliferative property of oxaliplatin (**fig 7A**), a dose dependant effect. This test showed the same effect for riluzole treatment but with high doses (**fig 7B**) and riluzole doesn't alter the anti-proliferative effects of oxaliplatin in case of combination treatment (**fig 7C**).

Spadine, an antagonist of this channel, have no effect on T84 cells (**fig 7D**). Spadine is a secreted peptide derived from the propeptide generated by the maturation of the neurotensin receptor 3 (NTSR3/Sortilin) and acting through TREK-1 inhibition. Anti-proliferative effect of riluzole doesn't involve TREK-1 channel because spadine doesn't block effect of riluzole on T84 cells.

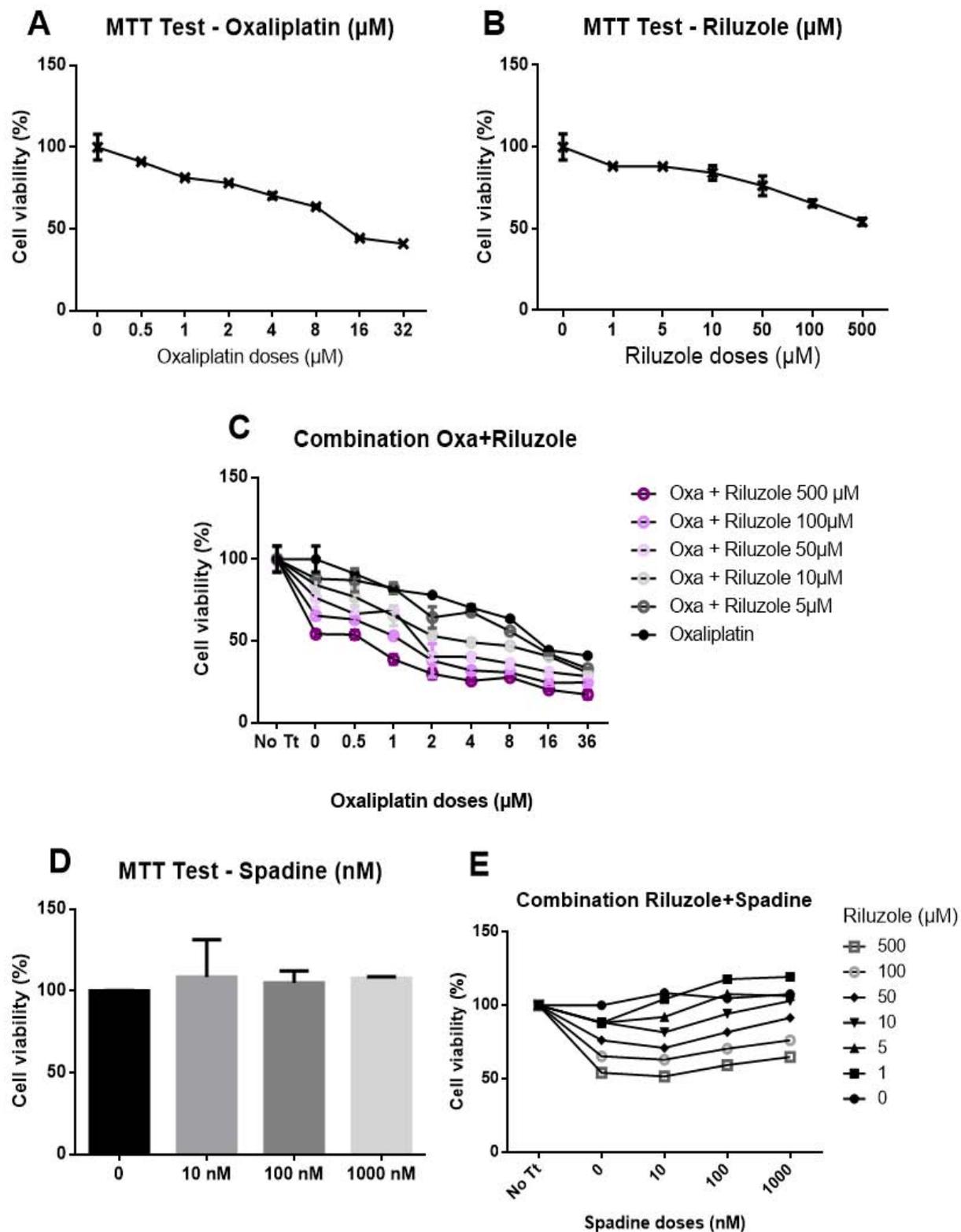


Figure 7: Anti tumoral effect with oxaliplatin and riluzole combination *in vitro*.

Cell viability test for different doses of oxaliplatin (A), riluzole (B), combination oxaliplatin-riluzole (C), three doses of spadine (D) and combination riluzole-spadine (E). Values are mean \pm SEM. NS: not significant. Significant difference between groups are marked with *, * for $p < 0.05$; ** for 0.01; *** $p < 0.001$. One-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Riluzole doesn't alter the anticancer effect of oxaliplatin in APC^{min/-} mice.

To evaluate the effect of riluzole on the anticancer effect of oxaliplatin *in vivo*, we used the *Apc*^{Min/+} model of intestinal neoplasia on the C57BL/6J background. This murine model harbors a germline mutation in *Apc* at codon 850 that leads to a truncation of the protein. Heterozygosity in one *Apc* allele occasionally generates the inactivation of the other allele by somatic recombination and when this occurs in intestinal epithelial cells adenomas form (Moser et al., 1995). The molecular consequences of losing *Apc*, a multi-functional protein that binds microtubules, proteins in the Wnt/Wg pathway, β -catenin and axin, cytoskeletal regulators, and the Rac guanine-nucleotide-exchange factor, leads to the activation of β -catenin and induction of WNT signaling (Aoki et al., 2007; Haigis et al., 2004; Levy et al., 1994). In *Apc*^{Min/+} mice adenomas begin to develop in infancy with death occurring at 16–20 weeks due to chronic intestinal hemorrhage (Moser et al., 1992; Shoemaker et al., 1995). Mice with this mutation on the C57BL/6 background develop an average of 30 small intestinal and 5 colonic adenomas per mouse. On occasion, adenomas progress to adenocarcinoma but metastases are not seen, most likely because mice do not live long enough for this late complication to occur. First of all, we evaluate the effect of oxaliplatin and riluzole on sensory sensibility in this strain of mice. We observed a similar development of sensory neuropathic symptoms in APC^{Min/-} mice as the ones observed in C57Bl6/J under oxaliplatin treatment (**Fig. 8 A-B**). Treatment with riluzole (60 μ g/mL, p.o) allows a partial reversion of peripheral cold and mechanical symptoms and total reversion of orofacial cold hypersensitivity in APC^{min/+}. At day 28 after treatments, mice were sacrificed and the number of tumors in the colon, in the duodenum and the jejunum was quantified. Oxaliplatin treatment led to a strong decrease (73.7 \pm 9.7%) of the number of tumor in the entire intestinal tract (**Fig 8D**). Riluzole did not significantly alter the anticancer effect of oxaliplatin. Moreover, riluzole alone led to a slight but significant anticancer effect as shown by the significant lower number of tumors observed in the small intestine. (**Fig. 8E**) Histology analysis of colon samples from the vehicle group obtained at day 28 after treatments revealed typical moderate to severe lesions usually observed in APC^{Min/-} mice and the presence of ulceration. These mice also exhibit inflammation and mild to moderate dysplasia with a high mitotic index, histopronostic markers of cancer. Mice treated with oxaliplatin or combination oxaliplatin/riluzole had no lesions or other tumoral manifestations observed in the vehicle group. Mice treated only with riluzole have an intermediate profile with or without the presence of smaller lesions and a low mitotic index, reflecting a possible anti-tumor effect of this molecule (**fig 8C**).

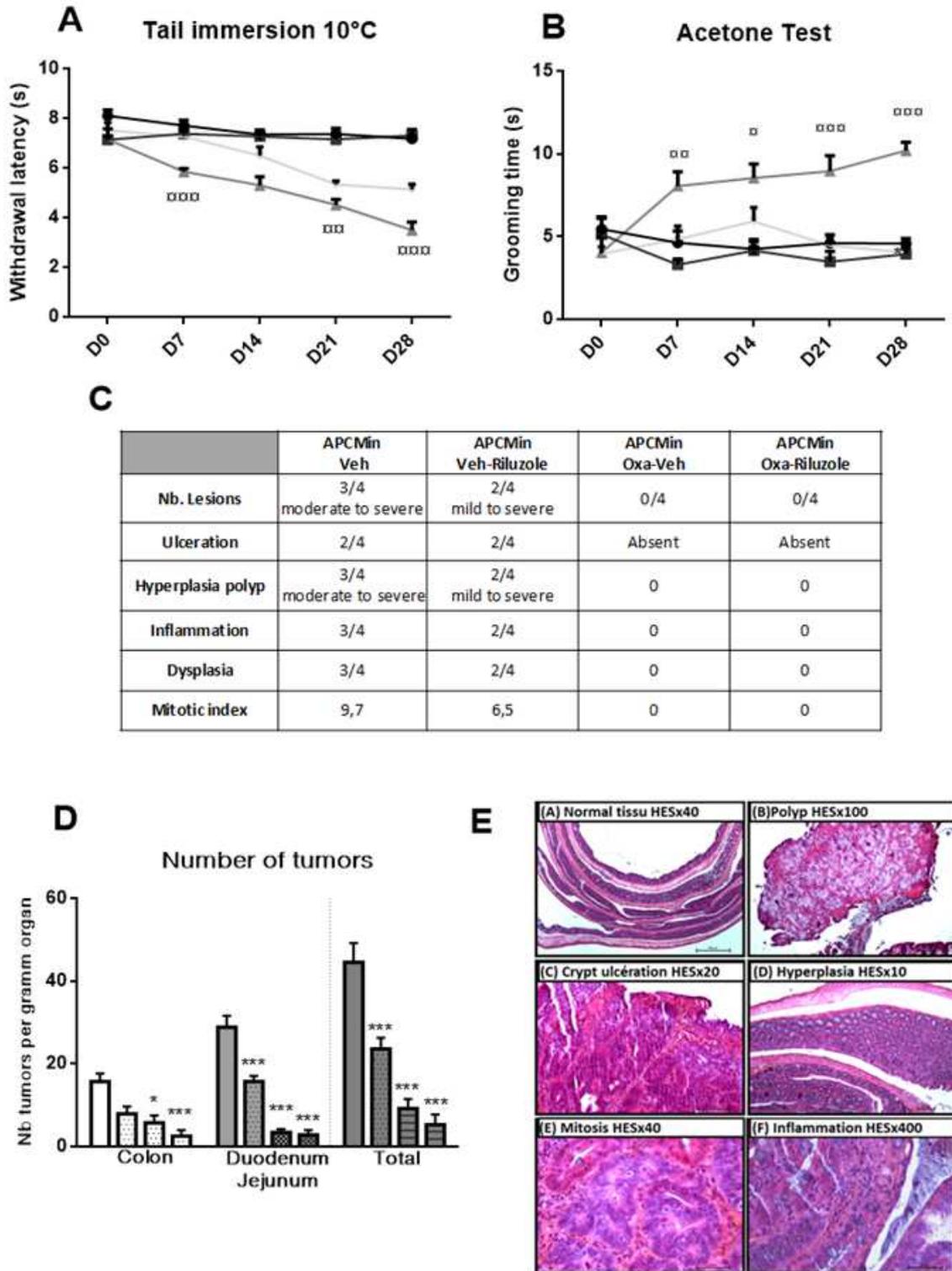
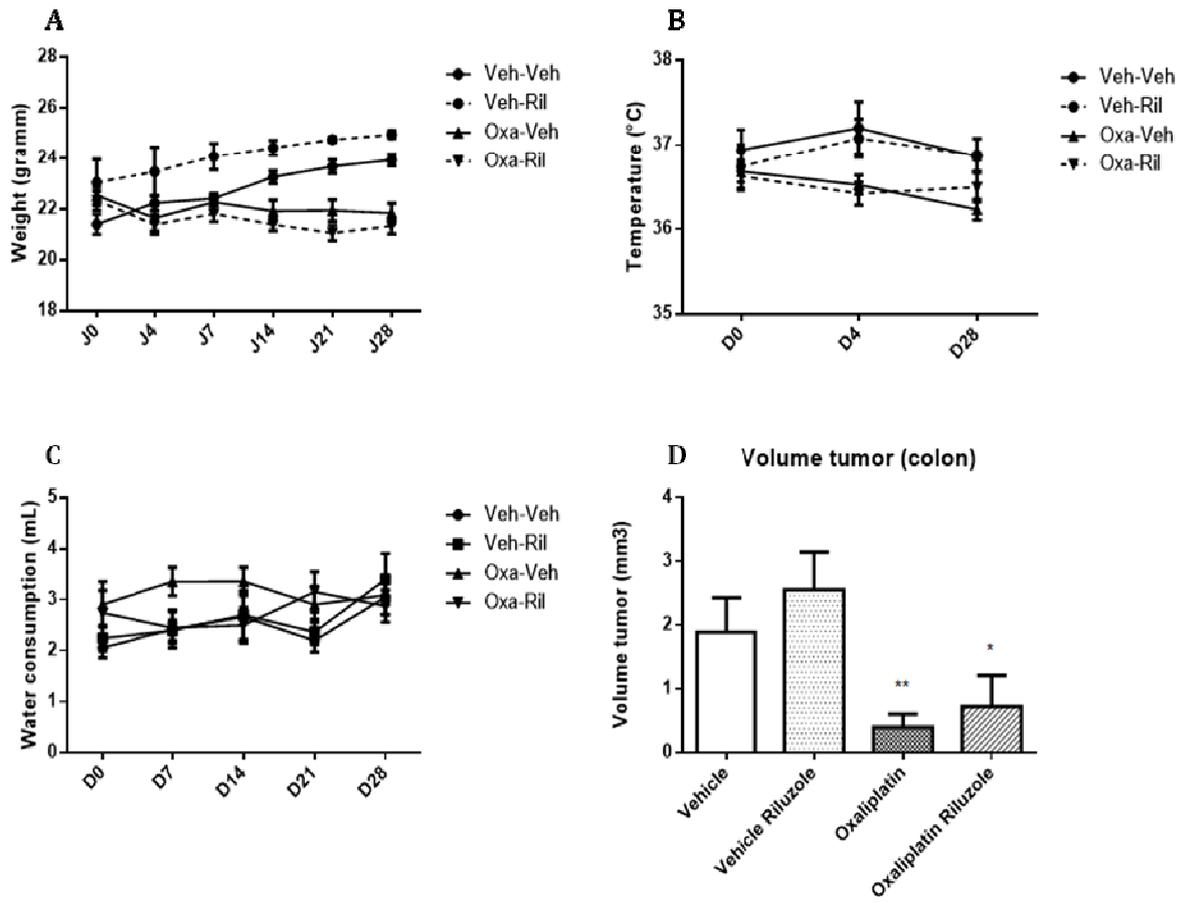


Figure 8: Anti tumoral effect with oxaliplatin and riluzole combinaison in APCmin+/- mice.

APCmin+/- mice received vehicle or oxaliplatin (6 mg/kg) twice a week and vehicle or riluzole (drinking water - 60µg/mL, po) for 4 weeks. Evaluation of hyperalgesia in 4 groups (n=8 per group): was realized with tail immersion 10°C and acetone tests (A-B). At end point (day 28), dissection allowed counting the number of tumors (D). Values are mean ± SEM. NS: not significant. Values are mean ± SEM. NS: not significant. Significant difference are marked with *, * for p<0,05; ** for 0.01; *** p<0,001. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test. Representative photos of hematoxylin- and eosin-staining in colon APCmin+/- mice (n=4 per group) (E). Macroscopic view of colons tumors: count of polyps and determination of grade lesions, presence or not of ulcerations, presence or not of inflammation, dysplasia and mitotic index in 4 mice groups (C).



[Supplementary data 1: Monitoring of animals during chronic neuropathy model induced by oxaliplatin.](#)

Mice weight (A) and temperature (B) were monitored until day 28. Water consumption until day 28 (C). Tumor volume of colon in APC mice at end point (day 28) (D). Two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Discussion

We described here a model of chronic oxaliplatin-induced neuropathy that mimicked patients' conditions. This study demonstrates the beneficial effect of riluzole against oxaliplatin-induced neurotoxicity in this model. Twice oxaliplatin injections during 4 weeks led to the development of cold and mechanical hypersensitivity that developed as soon after the first injection, with intensity increasing with the repetition of oxaliplatin administrations. Same observations were realized both at cephalic and extracephalic levels. Riluzole has been shown to have an effect on neuropathic pain (Hama and Sagen, 2011; Moon et al., 2014b) and in this study, it showed an effect on chronic neuropathy with partial reversion at peripheral level and a total reversion at oral and peri-oral level. This difference could be explain by existing embryological differences between sensory neurons of the TGs and DRGs (Fariñas et al., 2002; Hjerling-Leffler et al., 2005) generating different responses. These regional differences in the efficacy of riluzole to alleviate oxaliplatin-induced allodynia/hyperalgesia further support the idea that mechanisms underlying neuropathic pain have peculiarities at cephalic versus extra-cephalic level (Michot et al., 2014).

The evidence above suggests that up-regulation of K2P channel activity and particularly up regulation of TREK1 channel activity may be a useful strategy in the development of new therapies for the treatment of pain. Activation of postsynaptic TREK1, channels would hyperpolarize the membrane of sensory neurons and depresses neuronal activity in the pain pathway (Du and Gamper, 2013; Mathie, 2010; Tsantoulas and McMahon, 2014; Waxman and Zamponi, 2014). In addition to a role in pain transmission, evidence is accumulating for the potential importance of targeting the activity of TREK1 channels in a number of therapeutic situations in the nervous system, including depression and neuroprotection (Bayliss and Barrett, 2008; Honoré, 2007). Whereas activation of TREK-1 channel is supposed to have positive effects on pain symptoms and would lead to a neuroprotective effect, inhibition of the same channel has been shown to lead to an antidepressive effect (Heurteaux et al., 2006). In our conditions, riluzole, involving TREK-1 activation, thus did not result in a depression-like phenotype in oxaliplatin-treated mice as can be expected, but to an antidepressant effect. This dissociation of the painful and depressive symptoms by modulating the TREK-1 channel has already been observed by Heurteaux. At the molecular level, riluzole has been shown to increase the expression of GLT-1 transporter (Sanacora and Banasr, 2013) and reductions in the glial glutamate transporter (GLT-1, also known as excitatory amino-acid transporter 2 (EAAT2)) particularly in the prefrontal cortex have been implicated in depression (Sanacora and Banasr,

2013). Increasing the expression of GLT-1 would be predicted to reduce synaptic concentrations of glutamate and thus perhaps induce antidepressant-like effects. Indeed, riluzole has been shown to reverse depressive-like behaviour in animal models (Banasr et al., 2010; Millan, 2006) and there is also some evidence that it may improve depressive symptoms in a clinical setting (Sanacora et al., 2007; Zarate et al., 2004). Here, in a model of chronic neuropathy induced by oxaliplatin, riluzole treatment has shown a significant action on depression in all of our three depression tests. One can hypothesize an indirect effect of the preventive effect of riluzole against oxaliplatin-induced depression. We observed that a single administration of riluzole has an antinociceptive effect in mice. We also decided to assess the effectiveness of a single dose of riluzole at day 28 after repeated oxaliplatin injections on depression. No effect of riluzole has been seen in these conditions, suggesting that riluzole prevents the cause of depression development but cannot treat this comorbidity. However, this could explain that activation and inactivation of the same target, TREK-1 in this case, do not necessarily lead to opposite effects. Hence, Heurteaux et al. previously showed that while spadin, an antagonist peptide of TREK-1, has an antidepressive effect it did not modify pain thresholds in mice (Moha Ou Maati et al., 2012; Veysiere et al., 2015) then we showed that riluzole, a trek-1 activator, is able to reduce depression in mice.

Neuroprotective agents are used in an attempt to save neurons or prevent its alterations in CNS from irreversible injury caused by chemotherapy for example. Neuroprotective property of riluzole could be playing a key role to reduce neuropathy symptoms in this case. ATF3 (a member of the ATF3/cAMP-responsive element binding protein family) appears to be a useful and reliable neuronal marker of nerve lesions (Lindå et al., 2011) and we have shown an up regulation of this marker within the TG and L4-L5 DRG of oxaliplatin-treated mice. Riluzole treatment results in ATF3 thresholds that are similar to those of vehicle animal in TG and expression tends to decrease (non-significant) in DRG. These findings suggest that early administration of riluzole is sufficient to mitigate pain symptoms by preventing development of neuronal dysfunction in the DRG and TG.

Therefore, riluzole has numerous advantages for the treatment of neuropathy symptoms and could also be a possible anti-cancer effect. *In vitro*, riluzole have an anti-proliferative effect in different types of cancer cells and induces inhibition of DNA synthesis and apoptotic cell death via ER stress in both the LNCaP and C4-2 prostate cancer cell lines (Akamatsu et al., 2009). Also, riluzole can significantly suppress melanoma migration, invasion and colony formation as well as inhibit the proliferation of melanoma cells (Le et al., 2010b). In our study, riluzole doesn't alter oxaliplatin action and have an action on cancer alone decreasing the viability of ModeK and CT26 cells. *In vivo*, oxaliplatin entails an important decrease of the number of tumors to Apc^{Min}

mice and a potentiation of this effect with combination oxaliplatin-riluzole seems difficult to observe. But, administration of riluzole alone has a significant anti-cancer effect on total number of intestinal tumors. Concomitant with these results, anti-cancer effect of riluzole seems to be confirmed with histologic analysis of Apc^{Min} colon having an intermediate profile between animals non-treated (moderate to severe lesions with high mitotic index) and treated by oxaliplatin or combination (no lesion and mitotic index zero).

In conclusion, the results clearly showed that repeated oxaliplatin treatment in mice mimicked symptoms observed in patients. Oxaliplatin induced cold hypersensitivity as well as mechanical allodynia and hyperalgesia in peripheral and perioral area. We also observed sensorimotor deficits (dexterity, touch and tact disorders) and depression-like symptoms, thus validating the clinical relevance of this model. Riluzole partially restored basic thresholds of cold and mechanical hypersensitivities, sensorimotor deficits and depression-like symptoms in wild type animals but was totally ineffective in TREK-1 knock-out mice. In APC^{min} mice, oxaliplatin causes a significant decrease of tumors in these animals with or without riluzole treatment. Riluzole alone also showed significant anti-proliferative effect but lower than oxaliplatin. Thus, the potassium channel TREK-1 represents a potential target to neuropathy and other associated symptoms induced by oxaliplatin treatment. Riluzole could represent a promising and valuable therapy to prevent oxaliplatin-induced acute chronic neuropathy without altering the antiproliferative effect of the drug.

Methods

Animals. Animal care and experiments were carried out in accordance with the Committee for Research and Ethical Issues of the IASP (Zimmermann, 1983). Adult male C57 / BL6J mice were purchased from Charles River and homozygous TREK-1 (-/-) and wild-type (+/+) littermates were generated from crosses between heterozygous animals. APC^{min} mice are a gift from Dr. Mathilde Bonnet working at the laboratory UMR Inserm U1071 (Clermont Ferrand, FRANCE). These mice have a mutation in a tumor suppressor gene and develop spontaneously multiple intestinal adenomas. Animals were housed under controlled environmental conditions (22°C; 55% humidity) and kept under a 12/12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum* for a week prior to start the experiments in order to acclimatize.

Drugs administration. i.p. injections of oxaliplatin (Sanofi Aventis, Montpellier France) were performed at 6 mg/kg dissolved in glucose 5% in male C57BL6J mice (20–25 g) directly after the first behavior assessment. For acute model, behavior tests were performed at 90h (day4) after drug administration, corresponding to time to reach the hyperalgesia peak for acute neuropathy (Descoeur et al., 2011c). For chronic neuropathy model, twice injections per week were performed during 4 weeks. Non specific TREK-1 inhibitor, Riluzole (Rilutek®) (60 µg/mL, *per os ad libitum*) (Abcam, PK26124) was used in drinking water for chronic neuropathy model. For acute neuropathy model, Riluzole was injected at 7.5mg/kg. Vehicle solutions were injected in the control groups. All solutions were prepared just before experiments.

Behavior. Pain scores were determined with strict adherence to ethical guidelines (Zimmermann, 1983). The typical symptoms of neuropathic pain, allodynia and hyperalgesia, were examined using following tests. Observers were blind to the group treatment of the mice for all of these described tests.

Tail Immersion test. Nociceptive responsiveness was determined using the cold water (10°C) immersion tail test. The tail or the paw was immersed in a temperature-controlled water bath until withdrawal was observed (cutoff time, 30 seconds). Reaction scores were the result of 2 averaged separate withdrawal latency time determinations. The latency to the first rapid tail flick represented the behavioral endpoint (JANSSEN et al., 1963). Baseline measurements of tail-flick latencies were collected on all subjects before and after oxaliplatin injection and pain. Antinociception activity of molecule was determined by latency tail flick measure at different time points: D0 – D7 – D14 – D21 –D28 for all groups: control group, group treated with oxaliplatin only, riluzole only (60 µg/mL p.o) or combined oxaliplatin-riluzole group.

Von Frey test. Mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed using calibrated von Frey hair filaments of three different bending forces (0.07, 0.6 and 1.4 g). The filaments, tested in order of increasing stiffness, were applied five times, perpendicularly to the plantar surface of hindpaw and pressed until they bent applied with an interval of 3–5 s between each stimulation. The first filament which evoked at least one response was assigned as the threshold (Tal and Bennett, 1994). The paw pressure test was used as described by Randall and Selitto (1957), by applying increasing pressure to the right hind paw until a paw withdrawal threshold was obtained. Baseline measurements were collected and measures were repeated at different time points for all groups.

Acetone Test. Threshold reflex responses to innocuous cool temperatures were assessed using acetone test. This test was used to measure sensitivity to cold between 15 and 20°C. In this assay, a drop (20µL) of acetone is gently applied to the the upper lip area skin surface and the total time spent in acetone-evoked behaviors (grooming, scratching and flinching) over a 1-minute. Acetone test was repeated 2 times from day 0 to day 4 and average was calculated for each day.

Brush Test. Threshold reflex responses to mechanical sensitivity were assessed using brush test consist to realize strokes of brush on the upper lip area skin surface in mice. For each brush, five stimuli were applied with an interval of 3-5 seconds. The number of response to dynamic mechanical stimulation was measured.

Beam Walk. Gross vestibulomotor function was evaluated with the beam-balance task. The beam-balance task involved placing the mice on a suspended narrow wooden beam (12mm wide for training and 6 mm wide for test). Performance on the beam is quantified by measuring the time it takes for the mouse to cross the beam (80cm) and the number of paw slips that occur in the process. The animal was placed on the beam 3 times and the mean of 3 trials was used. Beam-balance performance was measured at day 7 and day 28.

Adhesive Removal test. The test analyzes both forepaw sensitivity including presence of adhesive tape as well as motor impairments of the forepaw. This test was performed as previously described (Bouet et al., 2009). Briefly, mice were placed in a transparent box (150 cm²) for 1 min to allow habituation. Thereafter, the mouse was taken out of the box and one adhesive tape (0.3-0.4 cm) was attached on each mouse paw. The order of attaching the tape (right or left) was changed between different trials and different animals alike. Thereafter, the mouse was put into the box and the time to either contact and to remove the tape was analyzed for a total of 120s.

Force swim test (FST). The forced swim test (FST) was similar to the traditional method that is described in a detailed reference (Porsolt et al., 1977), with some modifications. Briefly, mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 14 cm, height 20 cm), containing 10 cm of water (depth) at $(25 \pm 1^\circ\text{C})$. Each animal was forced to swim for six min, and the first immobilization and total duration of immobility were measured. The definition of immobility was the absence of all movements, with only motions required to maintain the animal's head above the water.

Tail suspension test (TST). The tail suspension test was performed based on a previous publication (Steru et al., 1985). Briefly, mice both acoustically and visually isolated were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The first immobilization and total test duration of mouse immobility were quantified during a test period of 6 min. Mice were considered immobile only when they were passively suspended and remained completely motionless.

Novelty suppressed feeding test (NSFT). The NSF test was performed according to the method described previously (Santarelli et al., 2003). Briefly, animals were food-deprived for 24 h prior to the test. Testing was performed in a clear plastic (40 × 40 × 20 cm) arena. A single weighed pellet of food (standard chow) was placed on a white circular filter paperplat-form positioned in the center of the box. Mice were tested individually after placing them in the corner of the box for 5 min. The latency to detect and to eat the food pellet was manually scored.

Cellular Biology. T84 human colorectal adenocarcinoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were grown and maintained in a 1:1 (vol/vol) mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 medium (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 37°C in 5%CO₂ humidified atmosphere. Cells were maintained in high confluency and were passaged using 0.25% trypsin solution in phosphate-buffered saline without calcium and magnesium every 4–5 days.

The viability of cells was measured by a colorimetric MTT assay. Briefly, cells were seeded at 5000 cells for each well in 96-well culture plate in an enriched medium. The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24h until complete adherence; the medium was replaced with basal medium (without FBS and growth factor) with drugs (Oxaliplatin, Riluzole, Spadine and Oxaliplatin/Riluzole combination or Riluzole/Spadine combination) according to the various experimental groups. It was again incubated at 37 °C in a 5% CO₂ for 24 h; at the end, cells were washed twice and MTT was added to each well at 0.5 mg/mL concentration and incubated for

another 4h at 37 °C and 5% CO₂. Thereafter, dye crystal was dissolved in 100µL of DMSO per well. Finally, the optic density (OD) of each well was measured spectrophotometrically at wavelength of 570 nmol/L. The OD of control group was taken as 100% cell viability.

Immunofluorescence. The mice were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg,i.p.) and tissues were fixed through a transcardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in PBS and postfixed overnight. After a 24-h incubation in 30% sucrose/PBS the tissue was cryostat sectioned at 20 µm with the use of the cryotome Leica CM3050S (Leica, Wetzlar, Germany) and stored at -80°C until use. The following antibodies were purchased from commercial sources: mouse anti-ATF-3 (Santa Cruz E-4; 1/1000), donkey anti-mouse Alexa Fluor 546 (Life Sciences; 1/1000). Transverse sections of mouse trigeminal ganglia and dorsal root ganglia were preincubated for 1 h in PBS containing 0.4% Triton X-100 and 3% donkey serum and then immunostained overnight at 4°C in the 0.4% Triton X-100 and 1% donkey serum buffer containing primary antibodies. After three washes, sections were incubated in a conjugated secondary donkey antibody for 2h at room temperature in the same buffer. Immunostained sections were mounted with PermaFluor (ThermoScientific), and images were viewed and analyzed with AxioVision software.

Histology analysis. After perfusion colons from APCmin mice were collected. We used a Swiss roll technique with each colon segment was rolled up longitudinally, with the mucosa outwards, using a wooden stick. Colons were placed in PBS 0.1M 4 % PFA and post fixed for 24hours and transferred in PBS 0.1M pH7.4 then embedded in paraffin. Each sample was cutting and Hematoxyline&Eosine (HE) plus Toluidine Blue staining was performed. Pathology analysis is performed by a separate analysis platform, ONIRIS.

Statistics. The data obtained were analyzed using the Graphpad Prism software program Version 6.0 and expressed as means ± SEM. There were 6-10 animals per group. Statistically significant differences between groups were calculated by the application of an analysis of variance (one or two-way ANOVA) followed by Bonferonni test post-hoc. P-Values less than 0.05 (p <0.05) were considered significant and the levels of significance were set at *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

Study approval. Experimental procedures and animal care and use were performed in accordance with the ethics committee regulations of the International Association for the Study of Pain.

Acknowledgments

This work was partly supported by Neurodol-Inserm U1107.
The authors disclose no conflict of interest in respect of this work.

References

1. Screnci D et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br. J. Cancer* 2000;82(4):966-972.
2. André T et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2009;27(19):3109-3116.
3. Andre T. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for... - PubMed - NCBI2004;
4. De Gramont A et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2000;18(16):2938-2947.
5. Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin. Oncol.* 2002;29(5 Suppl 15):21-33.
6. Beijers AJM et al. Peripheral neuropathy in colorectal cancer survivors: The influence of oxaliplatin administration. Results from the population-based PROFILES registry. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 2015;54(4):463-469.
7. Balayssac D et al. Prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by a polyamine-reduced diet-NEUROXAPOL: protocol of a prospective, randomised, controlled, single-blind and monocentric trial. *BMJ Open* 2015;5(4):e007479.
8. Grothey A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin. Oncol.* 2003;30(4 Suppl 15):5-13.
9. Hartmann JT, Lipp H-P. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin. Pharmacother.* 2003;4(6):889-901.
10. Park SB et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A critical analysis. *CA. Cancer J. Clin.* 2013;63(6):419-437.
11. Cersosimo RJ. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. *Ann. Pharmacother.* 2005;39(1):128-135.
12. Hong JS, Tian J, Wu LH. The influence of chemotherapy-induced neurotoxicity on psychological distress and sleep disturbance in cancer patients. *Curr. Oncol.* 2014;21(4):174-180.
13. Hershman DL et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2014;32(18):1941-1967.
14. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 1984;54(7):1269-1275.
15. Cavaletti G et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* 2001;37(18):2457-2463.
16. Gregg RW et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1992;10(5):795-803.
17. Dzagnidze A et al. Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the

- severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2007;27(35):9451–9457.
18. Grolleau F et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J. Neurophysiol.* 2001;85(5):2293–2297.
19. Kawashiri T et al. L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* 2012;8(1):7.
20. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci. Lett.* 2009;458(2):93–95.
21. Nassini R et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN* 2011;152(7):1621–1631.
22. Descoeur J et al. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 2011;3(5):266–278.
23. Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception [Internet]. *PAIN®* [published online ahead of print: September 2014]; doi:10.1016/j.pain.2014.09.013
24. Terrazzino S et al. Genetic determinants of chronic oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: a genome-wide study replication and meta-analysis. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* [published online ahead of print: April 10, 2015]; doi:10.1111/jns.12110
25. Kawashiri T et al. Prevention of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration by neurotrophin in the rat model. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 2011;15(4):344–350.
26. Tsutsumi K et al. Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. *Neurosci. Res.* 2014;80:86–90.
27. Renn CL et al. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol. Pain* 2011;7:29.
28. Alloui A et al. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *Embo J.* 2006;25(11):2368–2376.
29. Noel J et al. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *Embo J.* 2009;28(9):1308–1318.
30. Devilliers M et al. Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 2013;4:2941.
31. Duprat F et al. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 2000;57(5):906–912.
32. Song JH, Huang CS, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;282(2):707–714.
33. Grunnet M et al. Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology* 2001;40(7):879–887.
34. Cadaveira-Mosquera A, Ribeiro SJ, Reboreda A, Perez M, Antonio Lamas J. Activation of TREK Currents by the Neuroprotective Agent Riluzole in Mouse Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* 2011;31(4):1375–1385.

35. Cadaveira-Mosquera A et al. Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 2012;48(1):86–96.
36. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp. Neurol.* 1997;147(1):115–122.
37. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1994;330(9):585–591.
38. Tator CH et al. Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 2012;17(1 Suppl):157–229.
39. Grossman RG et al. A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 2014;31(3):239–255.
40. Gourley SL, Espitia JW, Sanacora G, Taylor JR. Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 2012;219(3):805–814.
41. Akamatsu K et al. Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress. *Anticancer Res.* 2009;29(6):2195–2204.
42. Le MN et al. The glutamate release inhibitor Riluzole decreases migration, invasion, and proliferation of melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130(9):2240–2249.
43. Wang Y-J, Lin M-W, Lin A-A, Wu S-N. Riluzole-induced block of voltage-gated Na⁺ current and activation of BKCa channels in cultured differentiated human skeletal muscle cells. *Life Sci.* 2008;82(1-2):11–20.
44. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 2000;275(37):28398–28405.
45. Mazella J et al. Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biol* 2010;8(4):e1000355.
46. Grothey A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. *Clin. Colorectal Cancer* 2005;5 Suppl 1:S38–46.
47. Sałat K et al. Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014;122:173–181.
48. Coriat R et al. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J. Clin. Invest.* 2014;124(1):262–272.
49. Lalonde R, Le Pêcheur M, Strazielle C, London J. Exploratory activity and motor coordination in wild-type SOD1/SOD1 transgenic mice. *Brain Res. Bull.* 2005;66(2):155–162.
50. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(7):519–529.
51. Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Assessment of motor balance

- and coordination in mice using the balance beam. *J. Vis. Exp. JoVE* [published online ahead of print: 2011];(49). doi:10.3791/2376
52. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 1985;85(3):367–370.
53. Nishimura H, Tsuda A, Oguchi M, Ida Y, Tanaka M. Is immobility of rats in the forced swim test “behavioral despair”? *Physiol. Behav.* 1988;42(1):93–95.
54. Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005;29(4-5):771–783.
55. Heurteaux C et al. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* 2006;9(9):1134–1141.
56. Donzelli E et al. Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurooncol.* 2004;67(1-2):65–73.
57. McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, Haddad G, Baguley BC. Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. *Br. J. Cancer* 2001;85(8):1219–1225.
58. Scuteri A et al. Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology* 2009;30(2):312–319.
59. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology* 2006;27(6):992–1002.
60. Moser AR et al. ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 1995;31A(7-8):1061–1064.
61. Aoki K et al. Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 2007;26(24):3511–3520.
62. Haigis KM et al. Tumor regionalism in the mouse intestine reflects the mechanism of loss of Apc function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(26):9769–9773.
63. Levy DB et al. Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res.* 1994;54(22):5953–5958.
64. Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI. The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J. Cell Biol.* 1992;116(6):1517–1526.
65. Shoemaker AR, Moser AR, Dove WF. N-ethyl-N-nitrosourea treatment of multiple intestinal neoplasia (Min) mice: age-related effects on the formation of intestinal adenomas, cystic crypts, and epidermoid cysts. *Cancer Res.* 1995;55(19):4479–4485.
66. Hama A, Sagen J. Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J. Neurotrauma* 2011;28(1):127–134.
67. Moon ES, Karadimas SK, Yu W-R, Austin JW, Fehlings MG. Riluzole attenuates neuropathic pain and enhances functional recovery in a rodent model of cervical spondylotic myelopathy. *Neurobiol. Dis.* 2014;62:394–406.
68. Fariñas I, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Soriano M. Regulation of neurogenesis by neurotrophins in developing spinal sensory

- ganglia. *Brain Res. Bull.* 2002;57(6):809–816.
69. Hjerling-Leffler J et al. The boundary cap: a source of neural crest stem cells that generate multiple sensory neuron subtypes. *Dev. Camb. Engl.* 2005;132(11):2623–2632.
70. Michot B, Kayser V, Bastian G, Bourgoin S, Hamon M. Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 2014;79:432–443.
71. Du X, Gamper N. Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. *Curr. Neuropharmacol.* 2013;11(6):621–640.
72. Mathie A. Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010;62(9):1089–1095.
73. Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 2014;37(3):146–158.
74. Waxman SG, Zamponi GW. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* 2014;17(2):153–163.
75. Bayliss DA, Barrett PQ. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008;29(11):566–575.
76. Honoré E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(4):251–261.
77. Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, Neuroprotection and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Med. Chem.* 2010;17(18):1942–1959.
78. Brix Finnerup N, Hein Sindrup S, Staehelin Jensen T. Management of painful neuropathies. *Handb. Clin. Neurol.* 2013;115:279–290.
79. Sanacora G, Banasr M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol. Psychiatry* 2013;73(12):1172–1179.
80. Banasr M et al. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol. Psychiatry* 2010;15(5):501–511.
81. Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol. Ther.* 2006;110(2):135–370.
82. Sanacora G et al. Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. *Biol. Psychiatry* 2007;61(6):822–825.
83. Zarate CA et al. An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. *Am. J. Psychiatry* 2004;161(1):171–174.
84. Veyssiere J et al. Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology (Berl.)* 2015;232(3):561–574.
85. Moha Ou Maati H et al. Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology* 2012;62(1):278–288.
86. Lindå H, Sköld MK, Ochsmann T. Activating Transcription Factor 3, a Useful Marker for Regenerative Response after

Nerve Root Injury [Internet]. *Front. Neurol.* 2011;2. doi:10.3389/fneur.2011.00030

87. Forcello NP, Khubchandani S, Patel SJ, Brahaj D. Oxaliplatin-induced immune-mediated cytopenias: A case report and literature review. *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.* [published online ahead of print: February 5, 2014]; doi:10.1177/1078155213520262

88. JANSSEN PA, NIEMEGERES CJ, DONY JG. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung.* 1963;13:502-507.

89. Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 1994;57(3):375-382.

"

90. Bouet V et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* 2009;4(10):1560-1564.

91. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 1977;229(2):327-336.

92. Santarelli L et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003;301(5634):805-809.

93. Corbett TH, Griswold DP, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res.* 1975;35(9):2434-2439.

Discussion & Perspectives

Recherchant des cibles moléculaires pour le traitement de la neuropathie induite par l'oxaliplatine, nous avons vu dans le chapitre précédent que les canaux HCN1 et HCN2 étaient surexprimés au niveau du système nerveux périphérique 4 jours après une injection d'oxaliplatine (6mg/kg, i.p.). Nous avons validé pharmacologiquement ces canaux comme étant des cibles potentielles pour le traitement de la neuropathie aigue induite par l'oxaliplatine. Il reste à évaluer l'intérêt de ces canaux HCN dans la prévention de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine, la tolérance et l'effet éventuel de bloqueurs de ces canaux vis à vis de l'effet anticancéreux de la chimiothérapie. D'autres canaux ioniques pourraient représenter des cibles moléculaires pour le traitement de la neuropathie induite par l'oxaliplatine. Le canal TREK-1 notamment est un canal impliqué dans la physiologie et la pharmacologie de la douleur, mais a également été impliqué dans l'effet neuroprotecteur du riluzole. Il est également un des canaux thermo- et/ou mécano-senseurs dont l'expression est modulée par l'effet de l'oxaliplatine. En effet, les canaux TREK et TRAAK sont sous exprimés au niveau des DRG d'animaux traités avec l'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011), et les données obtenues chez les animaux KO suggèrent leur implication dans la survenue de l'hypersensibilité douloureuse extracéphalique induite par l'oxaliplatine. En revanche, ils ne sont pas sous exprimés au niveau trijéminal chez ce même modèle de neuropathie aigue induite par l'oxaliplatine. Quel que soit leur niveau d'expression périphérique, nous avons tout de même cherché à savoir si leur activation pouvait avoir un effet antalgique chez des animaux traités par l'oxaliplatine. En effet, il n'est pas évident que la sous expression des messagers codant ces canaux au niveau des DRG puisse empêcher l'action d'un activateur de ces canaux. Il est également possible que l'activation de canaux TREK et TRAAK situés au niveau du SNC puisse avoir un effet antalgique. Ne disposant pas d'activateurs spécifiques du canal TREK-1, nous avons choisi de tester le riluzole dans notre étude.

1) Etude de l'effet antalgique du riluzole et de son mécanisme d'action

Des données non publiées du laboratoire démontrent un effet antalgique du riluzole dans un modèle de douleur inflammatoire induite par injection intraplantaire de carragénine et dans un modèle de neuropathie post-traumatique (**Figure 25**). Nous avons, dans un premier temps, recherché à savoir si le riluzole avait un effet antalgique en aigu quatre jours après une injection

d'oxaliplatine. Des tests visant à évaluer l'hypersensibilité douloureuse qu'elle soit mécanique ou thermique ont permis de mettre en évidence un effet antalgique du riluzole.

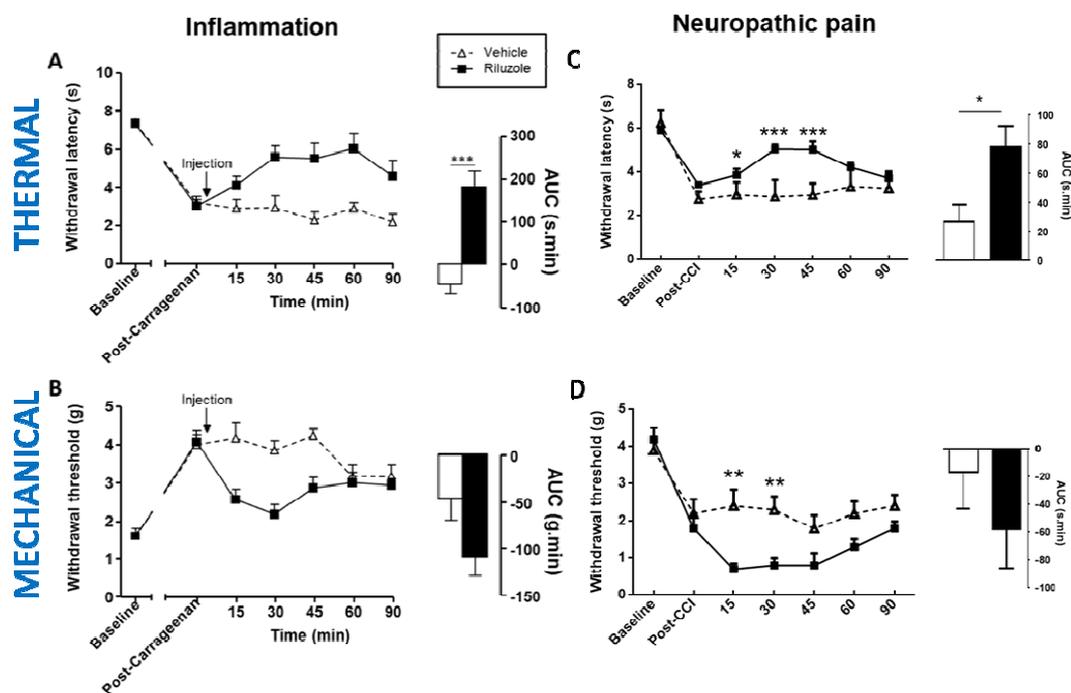


Figure 25 : Evaluation de l'effet du Riluzole dans différentes conditions pathophysiologiques chez des souris sauvages.

L'effet du riluzole a été estimé dans un modèle de douleur inflammatoire (carragénine, A-B) et un modèle de douleur neuropathique (CCI, C-D). Les résultats sont représentés par la cinétique d'effet du riluzole et l'aire sous la courbe (AUC, g.min). Les souris sont traitées soit par le véhicule ou le riluzole (7.5mg/kg). La sensibilité mécanique a été évaluée avec le test de Von Frey et la sensibilité thermique avec le test d'immersion de la queue à 46 ° C. Les valeurs sont la moyenne de l'ensemble de valeurs obtenues par groupe de souris (n=8 par groupe) ± SEM. NS: non significatif. Différence significative marquée par * pour $p < 0,05$; ** pour $p < 0,01$ et p *** $< 0,001$. Two-Way ANOVA avec post-test de Bonferroni.

Une fois l'action antalgique du riluzole avérée, nous avons voulu vérifier sa spécificité d'action. En effet, le riluzole a été montré comme un activateur des canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK (Duprat et al., 2000; Lesage et al., 2000) mais des données de la littérature montrent que cette molécule serait capable d'agir *in vitro* sur de nombreuses autres cibles moléculaires (Bellingham, 2011). C'est pourquoi nous avons décidé de comparer l'action antalgique du riluzole chez des souris invalidées pour les différents membres de cette sous-famille des canaux K2P : les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK. L'action anti-hyperalgique est totalement perdue chez les souris triple KO pour les 3 membres de la famille K2P, traduisant le rôle essentiel *in vivo* de cette sous-famille de canaux K2P dans l'effet du riluzole sur la douleur. L'utilisation de KO simple a permis de montrer que cette action était totalement perdue chez les souris simple KO

TREK-1 et conservée chez les souris simple KO TREK-2 et TRAAK. La spécificité du riluzole semble donc concerner uniquement le canal TREK-1.

Il est à noter que l'effet antalgique du riluzole est retrouvé au niveau extracéphalique mais également au niveau de la sphère orofaciale, ce qui s'avère intéressant au vue des données d'expression des transcrits de ces canaux TREK et TRAAK. En effet, ces canaux étaient sous-exprimés au niveau des DRGs chez les animaux traités par oxaliplatine alors que leurs expressions restaient inchangées dans les TGs. L'hypothèse d'un effet central du riluzole avait été faite et validée chez un modèle de douleur inflammatoire induite par injection intraplantaire de carragénine (**Figure 26**) et semble se confirmer chez des animaux traités à l'oxaliplatine (**Figure 27**). En effet, l'injection localisée de spadine, inhibiteur spécifique du canal TREK-1 a permis de supprimer l'effet antalgique du riluzole lorsque que les canaux TREK-1 étaient bloqués au niveau spinal ou supraspinal mais pas au niveau local (intraplantaire) dans le modèle inflammatoire à la carragénine. Il est connu que le riluzole active directement le canal TREK-1 (Duprat et al., 2000) mais cette activation a été montrée comme transitoire. Un autre mécanisme pourrait donc être mis en jeu pour expliquer l'effet antalgique de cette molécule. Des données existantes proposent une hypothèse d'activation indirecte du canal. Il a été montré que la morphine était capable d'activer le canal ionique TREK-1, canal situé en aval du récepteur opoïde μ (Devilliers et al., 2013). Ce récepteur μ est couplé à une protéine G_i , à l'origine d'une cascade de signalisation limitant la phosphorylation du canal TREK-1, canal inactivé sous sa forme phosphorylée (Patel et al., 1998). En effet, la protéine G_i est négativement couplée à l'adénylate cyclase qui est normalement responsable de l'activation de la PKA. L'activation des récepteurs couplés aux protéines G_i empêche alors ces phosphorylations et permettrait la levée d'inhibition, ou activation, des canaux TREK-1. Des données de la littérature ont révélé un mécanisme similaire par lequel un des récepteurs métabotropiques au glutamate du groupe III couplé à une protéine G_i , mGluR4, serait capable d'augmenter l'activité du canal TREK-1 (Cain et al., 2008). C'est pour cette raison que nous avons voulu savoir si ce récepteur était également impliqué dans l'action antalgique du riluzole.

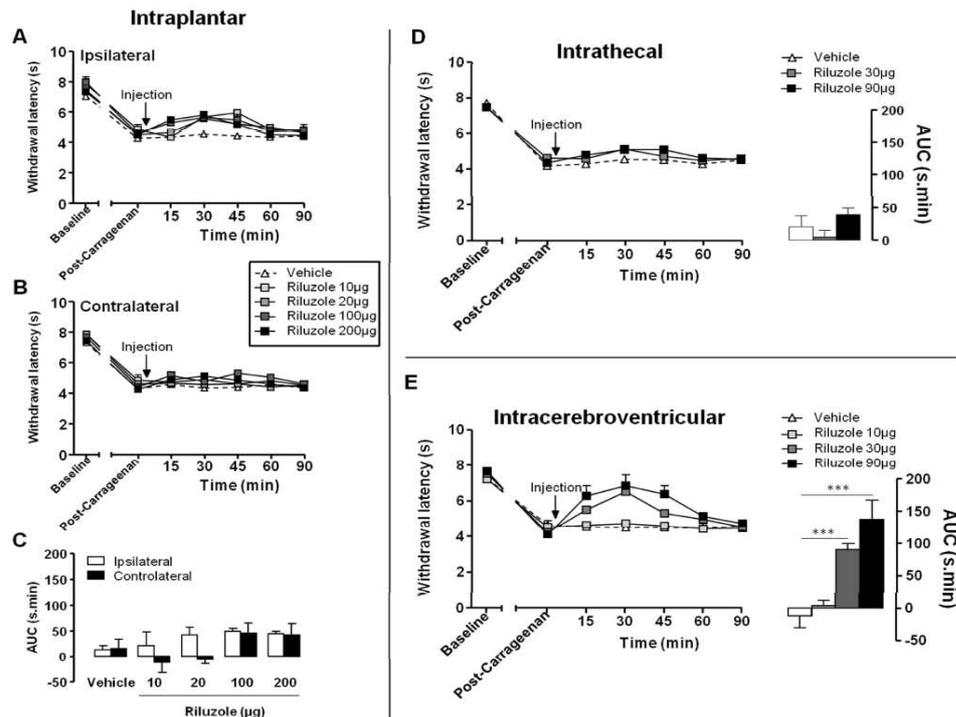


Figure 26 : Effet central du Riluzole dans un modèle de douleur inflammatoire induit par l'injection de carragénine.

La douleur a été évaluée par le test d'immersion de la patte à 46°C. Les souris WT ont été traitées par le riluzole (différentes doses indiquées en µg, en 3 points d'injections différents : intraplantaire (A-C), it (D) et icv (E)) administré 240min après l'injection de carragénine. Les différences significatives entre les groupes riluzole et véhicule sont marquées par des * avec *** $p < 0,001$, Two-way ANOVA avec Dunett post-test.

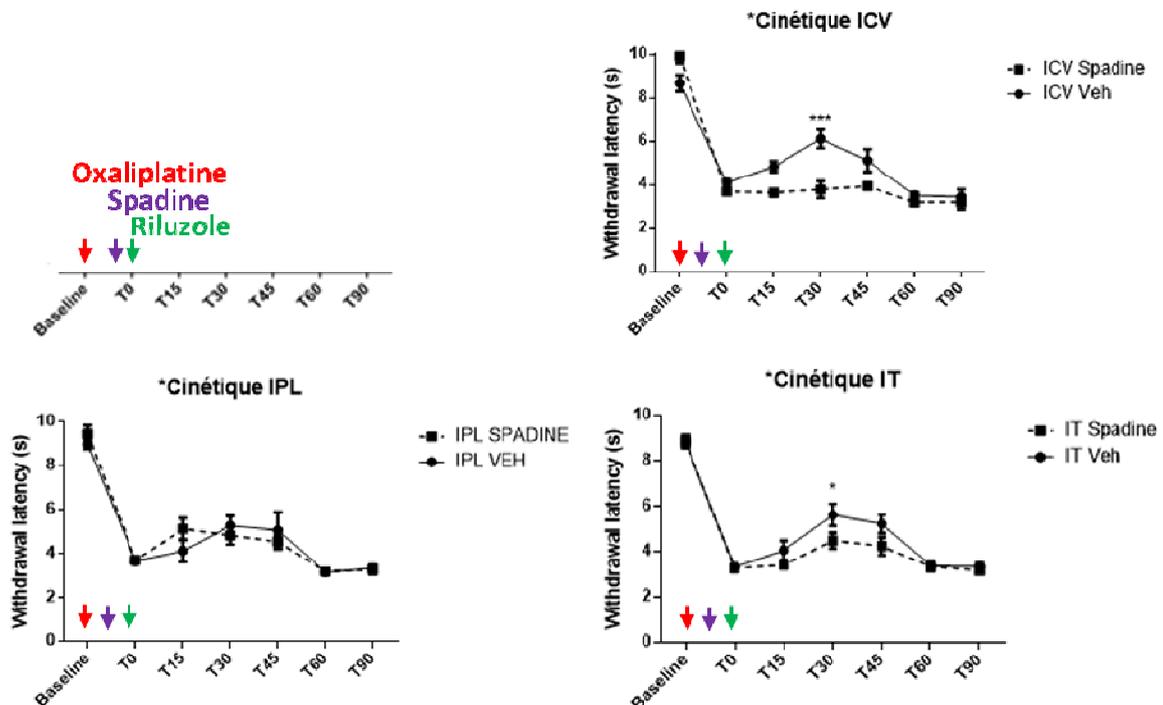


Figure 27 : Effet central du Riluzole dans un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine.

La douleur a été évaluée par le test d'immersion de la patte à 10°C au 4^e jour après l'injection d'oxaliplatine. La spadine (injectée localement à la dose de 10^{-4} M en intraplantaire et 10^{-7} M en intrathécale et intracérébroventriculaire) a été injectée 30min avant l'injection de riluzole (7.5mg/kg). Les différences significatives entre les groupes riluzole et véhicule sont marquées par des * avec * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Two-way ANOVA avec Bonferonni post-test.

L'utilisation de souris invalidées pour mGluR4 a ainsi montré que l'action du riluzole était totalement perdue chez ces souris KO (**Figure 28**). Il est en effet connu que le riluzole possède un rôle dans la diminution de l'effet excitotoxique du glutamate extracellulaire en inhibant sa libération et en activant les récepteurs au glutamate postsynaptiques (Bellingham, 2011). Ce mécanisme d'action permet donc de justifier son action sur les récepteurs au glutamate notamment les récepteurs métabotropique avec l'implication de mGluR4 et la perte d'action du riluzole chez ces souris KO.

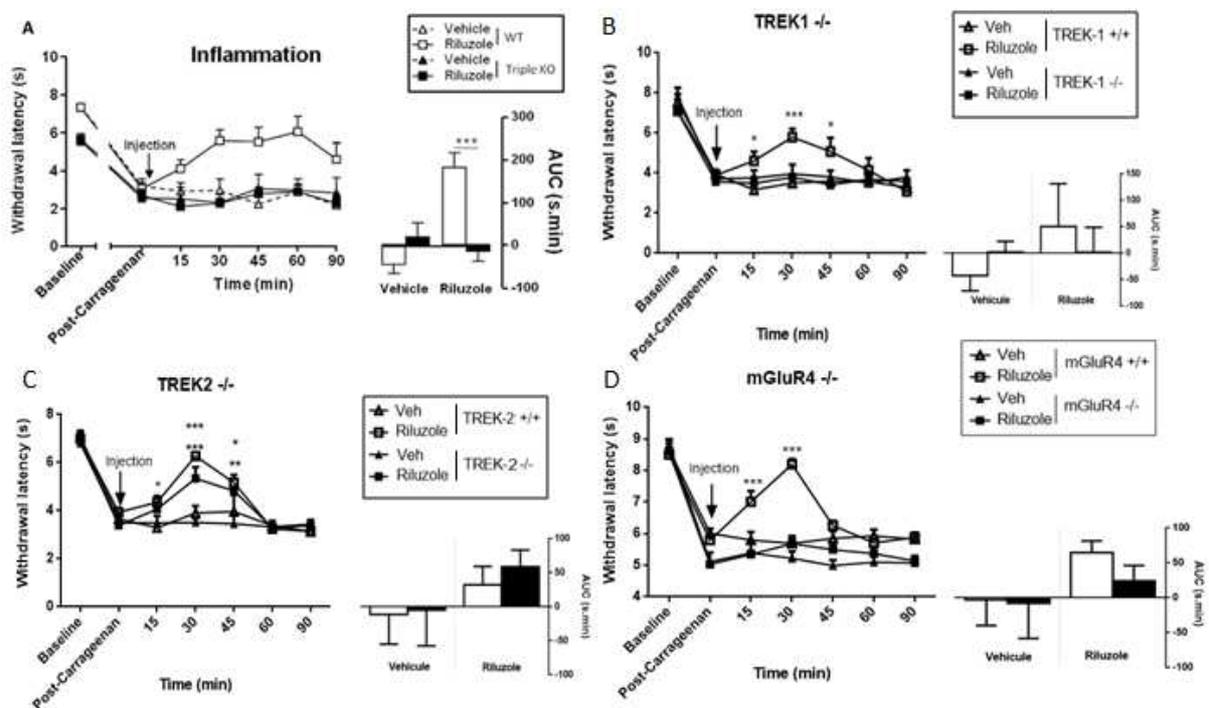


Figure 28 : Implication des canaux K2P et des récepteurs mGluR dans l'effet antalgique du riluzole.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'une cinétique et les aires sous la courbe (AUC, g.min). Cette cinétique est réalisée 4h après induction de l'inflammation (injection de carragénine) et la sensibilité thermique est évaluée par le test d'immersion de la patte à 46°C. Les souris WT, KO pour TREK-1, TREK-2, Triple KO et mGluR4 sont traitées soit avec le véhicule ou par le riluzole (7.5mg/kg, ip).

D'autres récepteurs glutamatergiques, autre que le récepteur mGluR4, pourraient être à l'origine de cette régulation du canal TREK-1. En effet, l'ensemble des récepteurs métabotropiques au glutamate ont été identifiés dans la plupart des structures impliquées dans la transmission de l'information douloureuse, de la périphérie au niveau central, et sont capables de moduler la perception de la douleur. D'un point de vue pharmacologique, il pourra être envisagé de bloquer cette douleur en bloquant les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques de classe I, responsables d'une augmentation de l'activité glutamatergique, ou

en activant les récepteurs métabotropiques de classe II et III qui régulent négativement la transmission glutamatergique (Chiechio and Nicoletti, 2012; Montana and Gereau, 2011; Palazzo et al., 2014). Les classes II et III (dont fait parti mGluR4) sont couplées à une protéine Gi et pourraient participer à l'hypothèse de régulation du canal TREK-1 qui a été observée.

C'est pourquoi, nous nous sommes proposés de vérifier si l'effet du riluzole pouvait être imputé à une ou plusieurs classes de récepteurs métabotropiques au glutamate. Pour cela, des antagonistes spécifiques des classes II (LY-143495) et III (CPPG) ont été utilisés en combinaison avec le riluzole afin d'observer une éventuelle spécificité d'action. Des doses de ces antagonistes ont été préalablement choisies en fonction des doses retrouvées dans la littérature. Un effet dose a été réalisé pour le CPPG (doses de 1, 2.5 et 5mg/kg) en combinaison avec un agoniste de la classe III (LSP4-2022) pour vérifier la perte d'action de la molécule, validant ainsi l'utilisation de la dose de 5mg/kg. Concernant la molécule LY143495, l'effet dose sera à réaliser mais n'a pour l'instant pas pu être réalisé n'ayant pas d'agoniste de classe II à disposition. En revanche, le LY143495 étant également considéré comme un antagoniste de la classe III à plus forte dose, l'utilisation d'un agoniste III a été utilisé pour vérifier que l'action de cette molécule est conservée à la dose de LY143295 utilisée, justifiant ainsi une action sur la classe II (**Figure 29**).

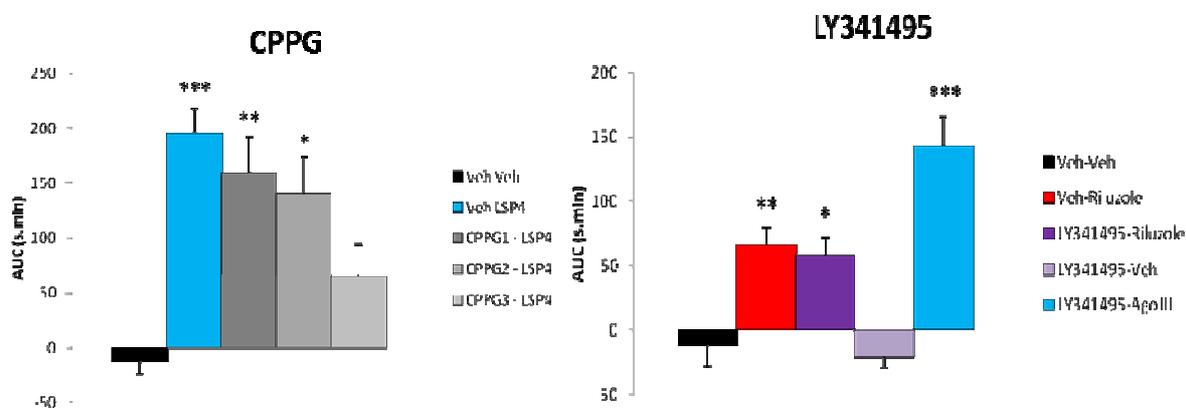


Figure 29 : Tests sur les doses d'antagonistes des récepteurs métabotropiques au glutamate II (LY341495) et III (CPPG). Un effet dose à été réalisé avec le CPPG (CPPG1 1mg/kg, CPPG2 2.5 mg/kg, CPPG3 5mg/kg) en combinaison avec un agoniste de la classe III (LSP4-2022, 10mg/kg) et la spécificité du LY341495 pour la classe II à la dose de 1mg/kg a été testée en combinaison avec ce même agoniste III.

Les résultats obtenus nous ont donc montré que l'utilisation du LY143495 (1mg/kg) n'a pas permis de bloquer l'action du riluzole alors qu'elle était totalement perdue avec le CPPG (5mg/kg), suggérant une spécificité d'action via la classe III (**Figure 30**). Cette classe comporte 4 membres dont mGluR4, 7 et 8 (ainsi que mGluR6 qui, de par sa localisation dans la rétine, montre peu d'intérêt ici) qui sont exprimés dans la plupart des structures impliquées dans la transmission de l'information douloureuse notamment au niveau de la corne dorsale de la

moelle épinière. Nous souhaitons, en perspective à court terme, évaluer si l'action du riluzole nécessite spécifiquement l'implication du récepteur mGlu4 (mGluR4), ou si les autres récepteurs de la classe III pourraient être impliqués. Pour ce faire, nous disposons d'outils pharmacologiques, agonistes, antagonistes ou modulateurs allostériques spécifiques des récepteurs mGlu7 et mGlu4, ainsi que d'animaux invalidés génétiquement pour le récepteur mGluR7. Il est cependant important de noter que des données préliminaires obtenues à l'IGF de Montpellier dans l'équipe du Dr. Cyril Goudet n'ont pas permis d'observer d'actions directes du riluzole sur les 8 membres de la famille des récepteurs métabotropiques au glutamate. D'autres hypothèses ont été émises concernant le mécanisme d'action glutamatergique du riluzole. En effet, il a été observé que le riluzole était capable d'augmenter significativement la recapture du glutamate en augmentant l'affinité de celui-ci pour différents transporteurs au glutamate (Fumagalli et al., 2008).

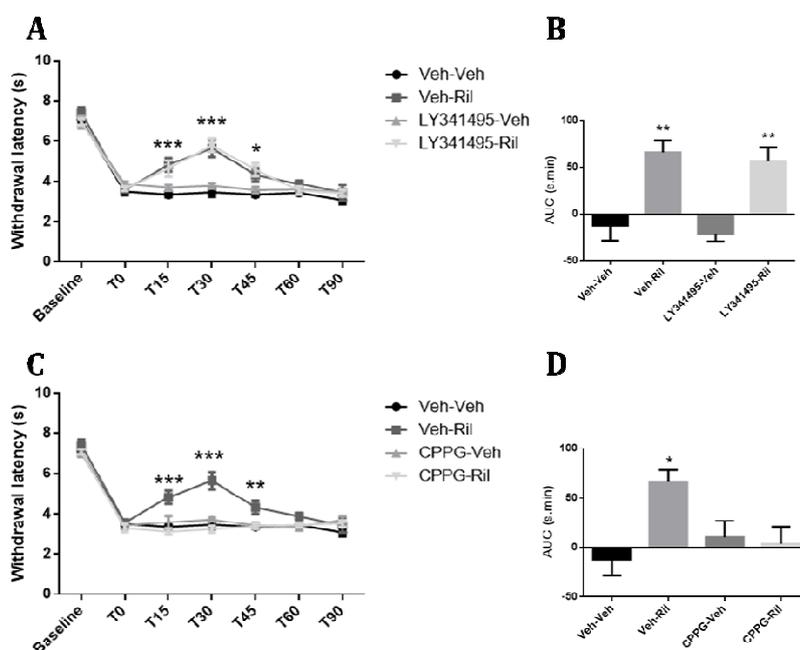


Figure 30 : Action antalgique de composés activateurs de la classe III des récepteurs métabotropiques au glutamate.

LY341495 (1mg/kg) = antagoniste de la classe II des récepteurs métabotropiques au glutamate, CPPG (5mg/kg) = antagoniste de la classe III des récepteurs métabotropiques au glutamate, Ril = riluzole utilisé à 7.5mg/kg. Modèle inflammatoire carragénine, évaluation de la douleur à l'aide du test d'immersion de la patte à 46°C lors d'une cinétique débutant 4h après l'induction de l'inflammation.

Pour étayer l'hypothèse d'un couplage fonctionnel entre le canal TREK-1 et les récepteurs mGluR de classe III, une molécule agoniste du récepteur mGluR4, le LSP4-2022, a été utilisée. Il a pu être observé que le LSP4-2022 perd son action antalgique chez les souris invalidées pour mGluR4 mais également pour le canal TREK-1 (**Figure 31**). Des données comparables ont

également été observées avec d'autres agonistes des récepteurs métabotropiques au glutamate de classe III, dont fait partie mGluR4 notamment avec la molécule PHCCC, modulateur allostérique positif de mGluR4, ainsi qu'avec une molécule agoniste récemment synthétisée par l'équipe du pr Francine Acher (Paris Descartes) et beaucoup plus spécifique de mGluR4, le LSP2-9166 (données non présentées). Ces données *in vivo* s'ajoutent aux données *in vitro* ayant démontré l'existence d'une régulation en amont du canal TREK-1 par le récepteur mGluR4, mécanisme faisant intervenir la protéine Gi du récepteur mGluR4 sur l'état de phosphorylation du canal TREK-1 (Cain et al., 2008).

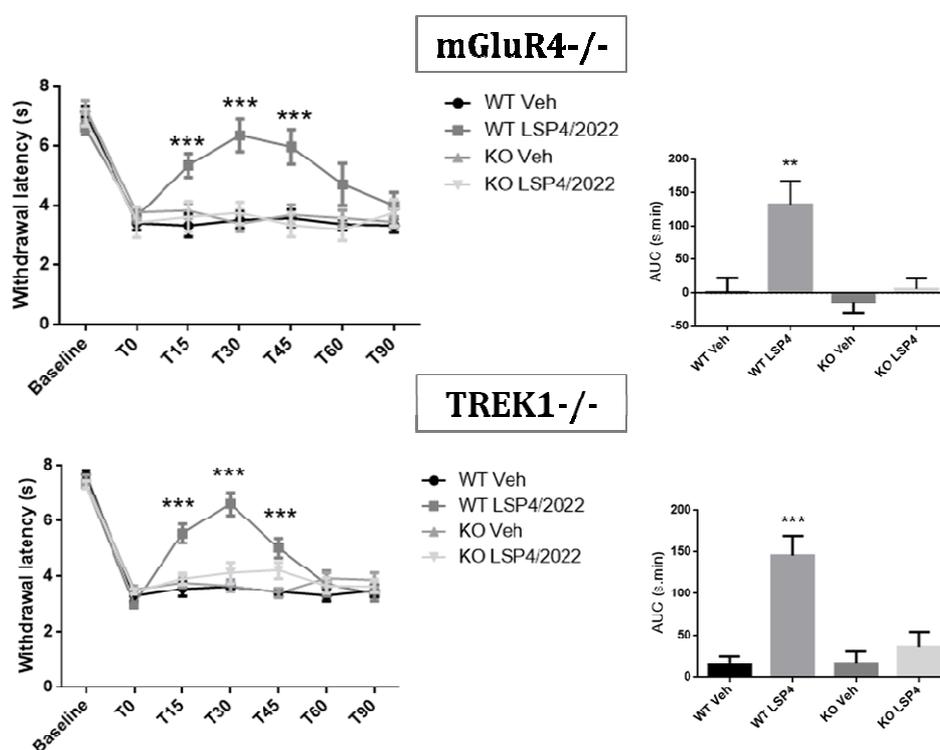


Figure 31 : Etude de la spécificité d'action du riluzole sur les récepteurs métabotropiques au glutamate.

LSP4-2022 = agoniste spécifique du récepteur métabotropique au glutamate 4 (mGluR4) Modèle inflammatoire à la carragénine, évaluation de la douleur à l'aide du test d'immersion de la patte à 46°C lors d'une cinétique débutant 4h après l'induction de l'inflammation chez des animaux WT et KO pour mGluR4 ou TREK-1.

Une fois le potentiel antalgique du riluzole établi, nous nous sommes intéressés aux possibles effets indésirables pouvant survenir suite à l'utilisation de cette molécule, en particulier les possibles effets moteurs ou sédatifs qui pourraient biaiser les résultats obtenus avec les tests de douleurs qui sont en grande majorité des tests réflexes. Il a ainsi pu être constaté que le riluzole ne présente que peu d'effets indésirables et, en cohérence avec la bibliographie, semble être une molécule bien tolérée (Grossman et al., 2014). En effet, jusqu'à la

dose utilisée de 7,5 mg/kg, aucune altération de la locomotion n'a été observée que ce soit avec le test du rotarod ou de l'actimètre. Aucun signe de sédation n'a par ailleurs été décelé lors de la réalisation de ces deux tests. De plus, en comparaison avec la morphine, la tolérance du riluzole semble également bonne puisque l'administration répétée de la molécule n'engendre pas de diminution de l'effet antalgique au cours du temps (**Figure 32**).

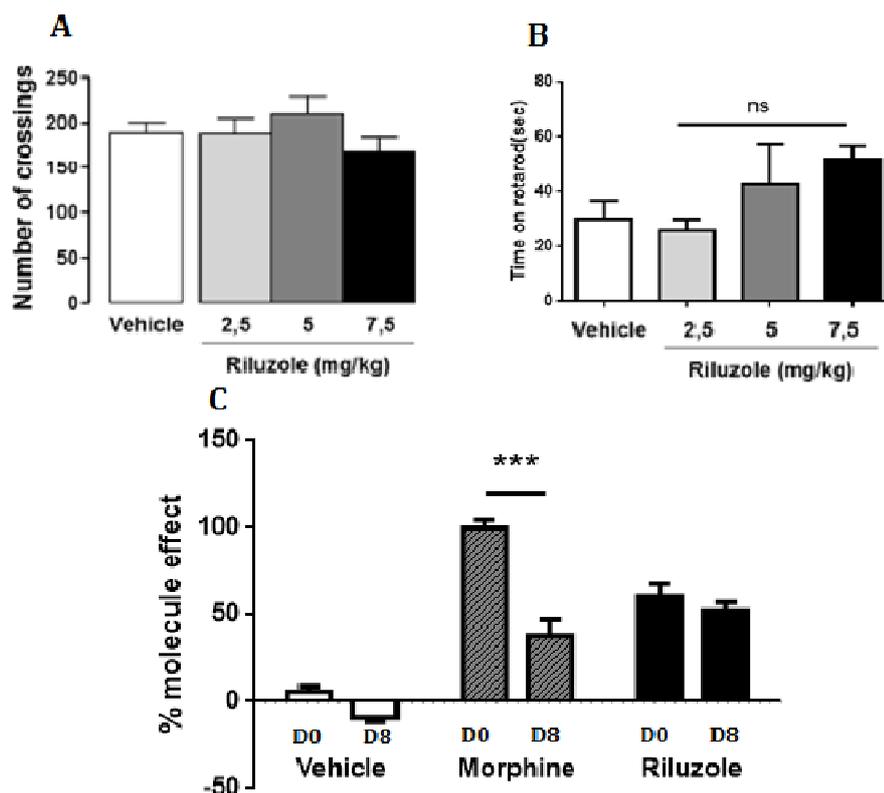


Figure 32 : Le riluzole présente peu d'effets indésirables et une bonne tolérance.

Le riluzole (7.5mg/kg) n'induit pas d'effets locomoteurs et sédatifs, observés avec le test d'actimétrie (A) et de rotarod (B). Cette molécule n'induit également pas de phénomène de tolérance comme observé avec la morphine (3mg/kg) suite à des injections bi-quotidiennes répétées pendant 8 jours de ces molécules.

L'ensemble de ces résultats ont permis de montrer l'action antalgique du riluzole dans des conditions de douleurs neuropathiques chimio-induites à l'oxaliplatine. Cette action nécessite la présence du canal TREK-1 et du récepteur métabotrope au glutamate de type 4 puisque l'utilisation de souris invalidées pour ces gènes a montré une perte d'action du riluzole. L'effet semble impliquer principalement les acteurs moléculaires centraux. De plus, l'utilisation du riluzole ne présente pas d'effets indésirables et possède une bonne tolérance.

2) Mise au point et caractérisation d'un modèle murin de neuropathie chronique à l'oxaliplatine et des troubles associés

La neuropathie chronique induite par l'administration répétée d'oxaliplatine se traduit par l'apparition de symptômes douloureux mais également de troubles moteurs et de comorbidités (anxiété et dépression) impactant directement la qualité de vie des patients (Jaggi and Singh, 2012; Park et al., 2008).

Une partie de ce travail de thèse consistait à mettre au point et étudier la physiopathologie d'un modèle murin de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine mimant l'ensemble des symptômes associés à cette neurotoxicité. Afin de mimer la répétition des cures de chimiothérapie chez les patients, une série d'injections d'oxaliplatine a été réalisée chez notre modèle de souris à raison de deux injections par semaine à la dose de 6mg/kg durant 28 jours. Les symptômes douloureux ont été évalués à l'aide de tests d'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique au niveau céphalique et extracéphalique. Ces tests ont été choisis afin de rechercher, chez la souris, les symptômes douloureux observés en clinique caractérisés, entre autres, par une hypersensibilité au froid apparaissant chez les patients au niveau des extrémités (main & pieds) mais également au niveau de la sphère orofaciale. Contrairement à la neuropathie aiguë, la forme chronique s'accompagne, à plus long terme, de troubles moteurs et de comorbidités telles que l'anxiété et la dépression apparaissant avec la répétition des cures de chimiothérapie. Toujours dans le but de rechercher les effets indésirables observés en clinique, ces symptômes ont été évalués chez la souris. Notre modèle a ainsi mis en évidence une hypersensibilité douloureuse notamment au froid au niveau des deux territoires périphérique et orofacial ainsi que le développement de troubles proprioceptifs, d'anxiété et de dépression.

Le canal TREK-1 est connu pour être impliqué dans la perception de la douleur polymodale, la dépression et la neuroprotection. Nous avons vu qu'un activateur connu de ce canal, le riluzole, est efficace vis-à-vis des symptômes douloureux aigus. Par ailleurs, le riluzole a également démontré un effet antidépresseur et neuroprotecteur. Le mécanisme d'action antidépresseur du riluzole n'est pas connu. De plus, compte tenu de l'effet antidépresseur de la spadine, bloqueur spécifique de TREK-1, il n'était pas attendu l'implication du canal dans l'effet antidépresseur du riluzole. Chez le modèle chronique, l'ensemble des symptômes douloureux, moteurs et les comorbidités, à l'exception de l'anxiété, ont pu être prévenus partiellement ou totalement par le traitement au riluzole (**Figure 33**). De plus, il semblerait que l'effet neuroprotecteur du riluzole serait impliqué dans l'effet antalgique de cette molécule car il a été observé une augmentation du marqueur de lésion neuronale chez les souris traitées à l'oxaliplatine, marquage réversé lorsque la chimiothérapie est combinée avec le riluzole.

Concernant ses effets sur les comorbidités comme la dépression, il semblerait qu'ils soient la conséquence d'une amélioration de l'état général notamment la réduction de l'hypersensibilité douloureuse puisque le riluzole n'améliore pas les symptômes dépressifs lorsqu'il est administré en point final en traitement curatif (7.5mg/kg, ip) mais seulement en administration préventive dans l'eau de boisson des animaux (60µg/mL). Ceci reste en accord avec les données existantes qui montrent à l'inverse que l'inhibition du canal TREK-1, via l'utilisation de spadine, a un effet anti-dépresseur mais aucun effet sur la douleur (Moha Ou Maati et al., 2012).

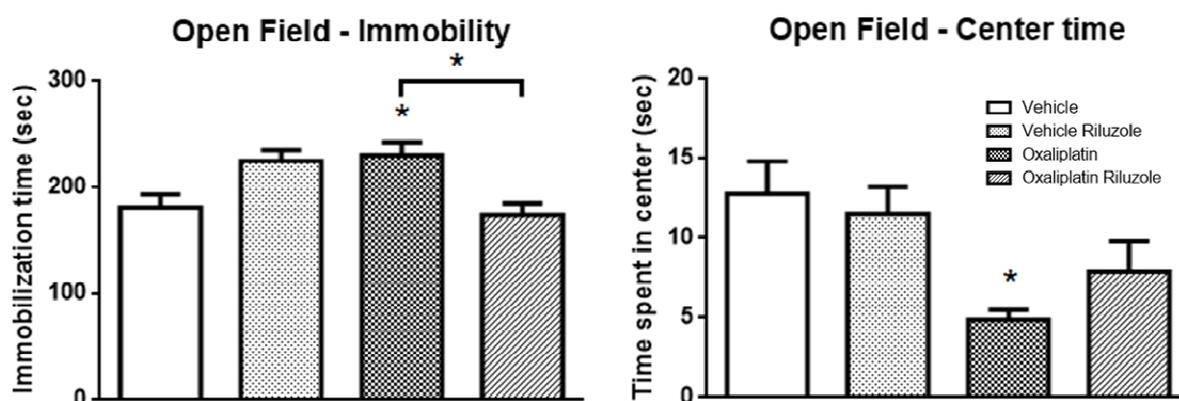


Figure 33 : Le traitement à l'oxaliplatine (6mg/kg) entraîne un état anxieux et dépressif.

Paramètres mesurés en point final (J28) avec le test de l'Open Field : temps d'immobilité pour la dépression et temps passé au centre pour l'anxiété. Ces 2 comorbidités sont présentes chez les souris WT traitées à l'oxaliplatine mais le riluzole a permis de réverser uniquement les symptômes dépressifs.

D'autres paramètres ont été étudiés dans notre modèle murin de neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine. Parmi les effets indésirables connus de l'oxaliplatine, nous avons observé une toxicité hématologique importante caractérisée par une diminution drastique des lignées rouge et blanche (cette diminution ne concerne que la sous-population des lymphocytes) et des plaquettes. Cette diminution s'est également accompagnée d'anomalies morphologiques des érythrocytes avec présence de dacryocytes et schizocytes. Ces atteintes ne semblent pas amplifiées par le traitement combiné avec le riluzole, qui n'a seul, aucun effet hématotoxique (Figure 34). En revanche, le taux de lymphocytes semble être amélioré par le traitement combiné oxaliplatine-riluzole. Cet effet bénéfique du riluzole reste à élucider. En clinique, les conséquences au niveau hématologique peuvent s'expliquer par la capacité de l'oxaliplatine à se lier de manière irréversible aux protéines sanguines notamment l'albumine et les érythrocytes (Graham et al., 2000). La thrombocytopénie touche également plus de 70% des patients et s'avère être la conséquence d'une atteinte médullaire (Jardim et al., 2012). De façon moins fréquente, des cas d'anémie et de leucopénie ont également été rapportés.

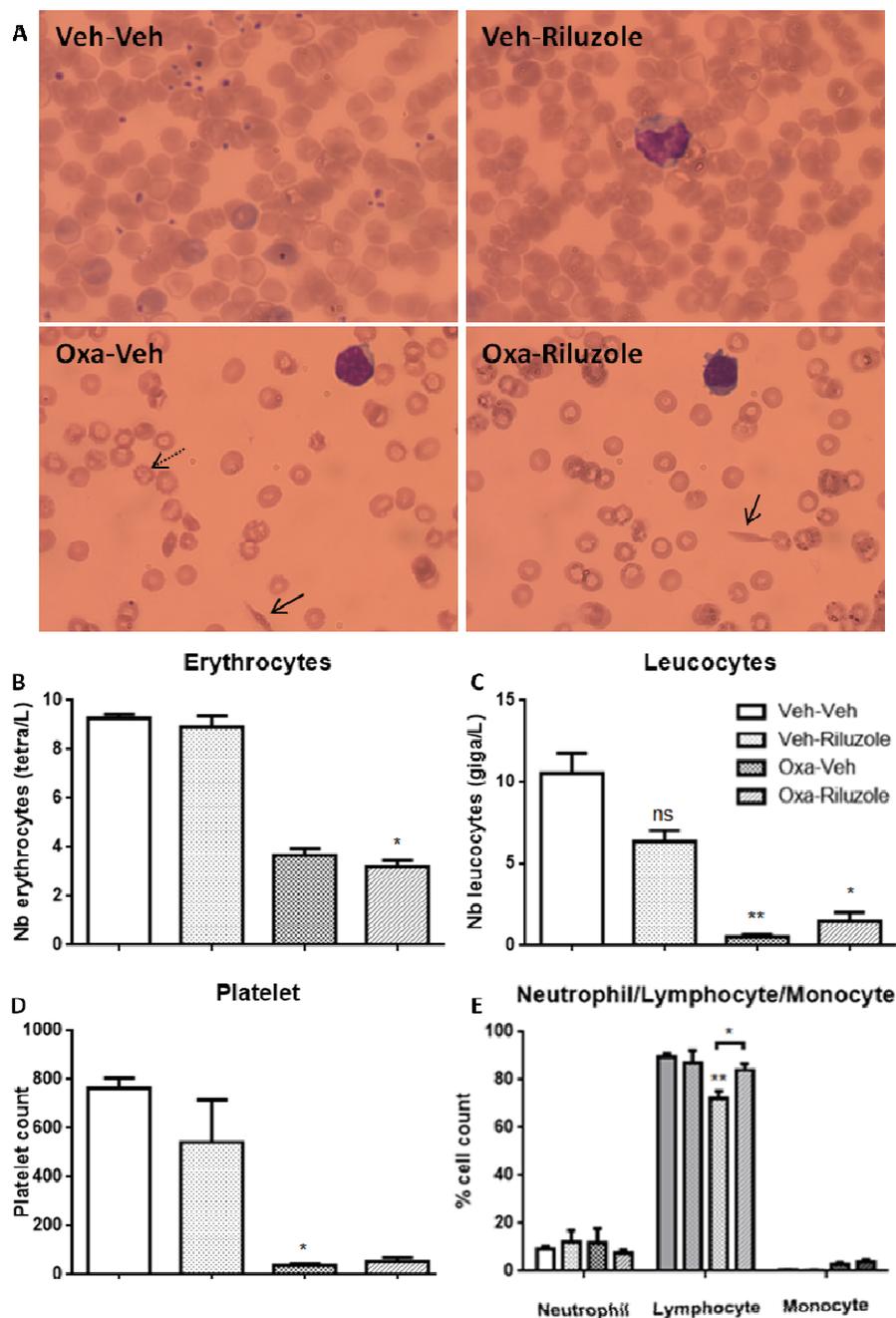


Figure 34 : Analyse sanguine dans le modèle de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine (6mg/kg, i.p. ; 2 fois/semaine pendant 4 semaines) à J28.

Observation d'une réduction drastique au niveau de la numération de différents types cellulaires sanguins et anomalies morphologiques concernant les érythrocytes (marqué par une flèche). Valeurs moyennes exprimées \pm SEM. Significatives différences entre les différents groupes marqués par des *; * pour $p < 0,05$; ** for 0.01; *** $p < 0,001$. ANOVA1 et Bonferroni post-hoc.

Ce modèle murin de neuropathie chronique semble donc proche des symptômes observés en clinique en mimant différentes toxicités liées à l'oxaliplatine. La pertinence de ce modèle pourrait davantage être renforcée par la vérification de l'existence d'autres toxicités liées au traitement par l'oxaliplatine, notamment au niveau digestif et hépatique. Concernant la

toxicité digestive, l'oxaliplatine est rarement la cause de troubles digestifs, sa dose limitante étant plus associée à la neurotoxicité (Lee et al., 2014). Peu de données existent sur la toxicité gastro-intestinale (Bullinger et al., 2011; Nassini et al., 2011) mais il a cependant été montré que l'apparition de mucites et de dommages au niveau de l'épithélium gastro-intestinal sont la résultante de l'activation d'une cascade inflammatoire (Nukatsuka et al., 2012). Des études complémentaires restent à effectuer afin de comprendre de façon précise les voies moléculaires mises en jeu.

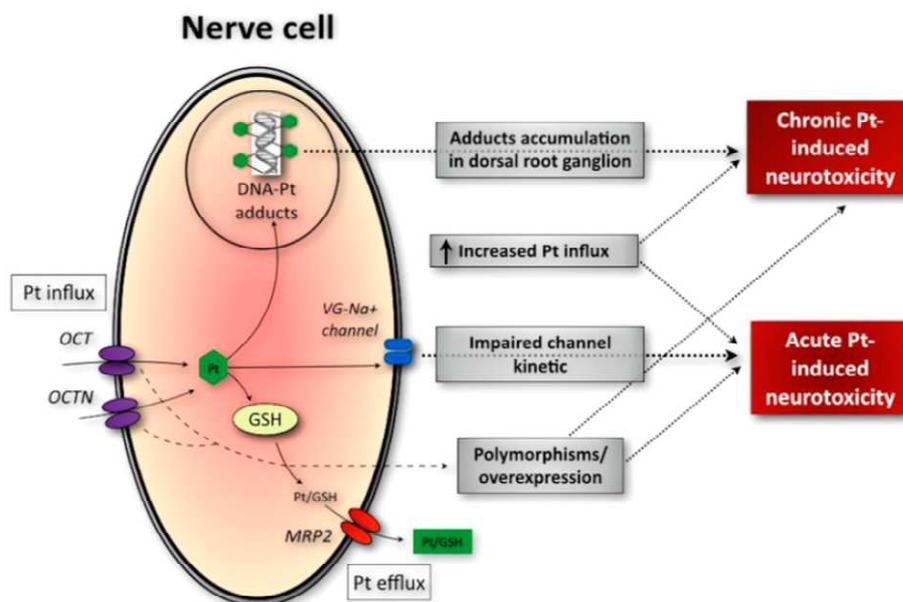


Figure 35 : Mécanismes d'action de la neurotoxicité aiguë et chronique induite par les composés de platine (Avan et al., 2015).

De nombreux mécanismes ont déjà été mis en évidence pour tenter d'expliquer les causes de l'apparition de ces neuropathies chimio-induites (**Figure 35**). Concernant nos travaux, cette caractérisation multimodale du modèle nous a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la neuropathie induite par l'oxaliplatine et de proposer le canal TREK-1 comme cible moléculaire pour la prévention de la neuropathie et des comorbidités induites par cette molécule. Nos résultats suggèrent que l'activation du canal TREK-1 par le riluzole reverse une grande partie des manifestations associées à la neurotoxicité de l'oxaliplatine et l'ensemble des résultats offre des perspectives cliniques intéressantes. De plus, il semblerait que d'autres propriétés de cette molécule pourraient être utiles et seront développées dans le point suivant. A ce stade, il nous est apparu crucial de rechercher si le riluzole pouvait ou non entraver l'effet anticancéreux de l'oxaliplatine.

3) Influence du riluzole sur les propriétés antiproliférative et cancéreuse de l'oxaliplatine

Plusieurs études *in vitro* ont permis de montrer que le riluzole avait la capacité de diminuer la migration, l'invasion, ainsi que la prolifération de cellules issues de mélanome (Le et al., 2010). Cet effet « anti-cancéreux » semble être lié à l'action du riluzole sur la signalisation glutamatergique via son action sur les récepteurs métabotropiques au glutamate mais également sur d'autres mécanismes notamment de l'apoptose, de l'angiogénèse ou de l'invasion cellulaire. Tout ceci montre donc un intérêt pour une éventuelle utilisation en combinaison avec d'autres chimiothérapies (Yu et al., 2015).

De la même façon, au sein de notre équipe, nous avons pu mettre en évidence l'action antiproliférative du riluzole sur des cellules *T84* et *CT26* (respectivement cellules issues de carcinômes colorectaux humains et murins) avec le test MTT⁸ (**article II, fig. 8B**) ainsi que sa capacité à réduire la migration de ces mêmes cellules avec l'utilisation du test de la blessure⁹ pour les cellules *CT26* (données non présentées), ce test sera prochainement réalisé sur les cellules *T84*. Il serait également intéressant de vérifier si cette action "anti-cancéreuse" implique le canal TREK-1 notamment par l'utilisation de spadine en combinaison des traitements utilisés sur différentes lignées cellulaires, les premières données obtenues pour les cellules *T84* semblant indiquer un phénomène indépendant du canal TREK-1. Au vue des résultats de la littérature obtenus essentiellement sur des cellules issues de mélanôme et nos données obtenues sur des cellules issues de carcinômes, l'étude des propriétés anti-prolifératives du riluzole pourrait être envisagée sur d'autres lignées de cellules afin de vérifier si son action peut s'appliquer à d'autres cancers mais également en combinaison avec différents types de chimiothérapies.

In vivo, nous avons démontré que l'utilisation du riluzole en combinaison avec l'oxaliplatine dans un modèle spontané de cancer colorectal chez la souris (modèle APC^{min+/-}) n'altérerait pas l'action de l'oxaliplatine (la diminution du nombre de tumeurs après traitement à l'oxaliplatine est identique en présence ou absence de riluzole). De plus, le riluzole a un effet anti-tumoral lorsqu'il est administré seul puisqu'une réduction significative du nombre de tumeurs sans réduction du volume a été observée chez ces mêmes souris APC^{min}.

Un des points à surveiller lors de l'étude de nouveaux traitements, associés aux chimiothérapies, est leur impact sur la survie sans rechute (temps après la chimiothérapie avant

⁸ Méthode rapide de numération des cellules vivantes

⁹ Méthode de comblement suite à la réalisation d'une blessure cellulaire et observation de la reconstitution d'une monocouche confluente par migration cellulaire

réapparition d'une tumeur), ce qui pourrait nous donner une indication concernant un éventuel effet du riluzole sur l'action de l'oxaliplatine. Ce paramètre pourra être étudié dans le cadre d'une étude clinique que nous souhaitons mettre en place et visant à évaluer l'effet du riluzole chez les patients sous chimiothérapie à l'oxaliplatine.

4) Etude clinique : Riluzox

Outre l'intérêt du riluzole dans le traitement et la prévention de la douleur neuropathique chimio-induite, les résultats pré-cliniques présentés ci-dessus offrent des perspectives cliniques intéressantes. En effet, les symptômes douloureux ne semblent pas les seuls à être prévenus par le riluzole qui possède de nombreuses autres propriétés thérapeutiques potentielles. Ainsi, cette molécule serait également capable de prévenir la survenue des troubles moteurs et des comorbidités telles que la dépression tout en préservant l'action anti-tumorale de la chimiothérapie associée.

Il est important de mentionner que malgré toutes les données précliniques actuelles démontrant l'effet bénéfique du riluzole sur les symptômes des NPCI (troubles sensori-moteurs, douleurs, comorbidités) associés à l'utilisation d'oxaliplatine, aucune étude clinique n'a été publiée à ce jour concernant l'efficacité du riluzole dans la prévention des NPCI chez des patients sous oxaliplatine. Les arguments précliniques de son efficacité et l'absence d'évaluation clinique constituent le rationnel pour conduire un premier essai thérapeutique visant à évaluer le bénéfice thérapeutique de l'utilisation du riluzole dans la prévention des NPCI. La démonstration d'une efficacité clinique permettrait d'enrichir la palette thérapeutique des cliniciens et d'apporter un nouvel espoir thérapeutique aux patients. C'est pourquoi nous proposons une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle dont l'objectif principal sera l'évaluation de l'efficacité préventive du riluzole sur la sévérité des symptômes des neuropathies périphériques induites par l'oxaliplatine. Les objectifs secondaires ont été définis comme suit :

- Á Impact du riluzole sur l'incidence des neuropathies, la douleur neuropathique et la qualité de vie ;
- Á Impact du riluzole sur la survie sans rechute à 6 mois après la chimiothérapie.
- Á Détermination de marqueurs génétiques susceptibles de prédisposer les patients au développement de neuropathies chimio-induites et à la réponse au traitement par le riluzole.

Chapitre II : Canaux ioniques & les neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine

Article II: Discussion & Perspectives

Le bénéfice potentiel sera une diminution des symptômes et de la gravité des neuropathies chimio-induites (NPCI) pour les patients recevant le riluzole. Le riluzole est prescrit depuis 1996 dans le traitement de la SLA afin de prolonger la durée de vie ou retarder le recours à la ventilation mécanique assistée chez les patients. La posologie retenue pour cet essai thérapeutique sera celle habituellement utilisée dans cette indication, à savoir 100 mg/jour, à raison de 2 prises de 50 mg à environ 12 heures d'intervalle (selon RCP). Les effets indésirables attendus seront principalement des nausées, asthénie et anomalies des paramètres biologiques hépatiques (élévation des ALAT). Dans des cas très rares, une maladie interstitielle pulmonaire peut survenir. L'intensité de ces effets reste cependant légère à modérée et ils disparaissent à l'arrêt du traitement. Afin d'éviter la survenue de ces effets indésirables, il est recommandé de ne pas dépasser la dose prescrite. En cas de surdosage, un traitement symptomatique devra être mis en œuvre. La dose de 200 mg/jour a cependant déjà été testée lors d'études cliniques antérieures mais aucun effet indésirable supplémentaire n'a été observé par rapport à l'utilisation de la dose habituelle de 100 mg/jour. De plus, compte tenu de la mise sur le marché déjà relativement ancienne de ce médicament, son profil de sécurité est parfaitement connu. Ceci limite la probabilité de survenue de problème de tolérance. Enfin, dans le cadre du parcours de soin habituel des patients bénéficiant d'une chimiothérapie anticancéreuse, un suivi de la fonction hépatique et une NFS seront réalisés à chaque début de cycle de chimiothérapie.

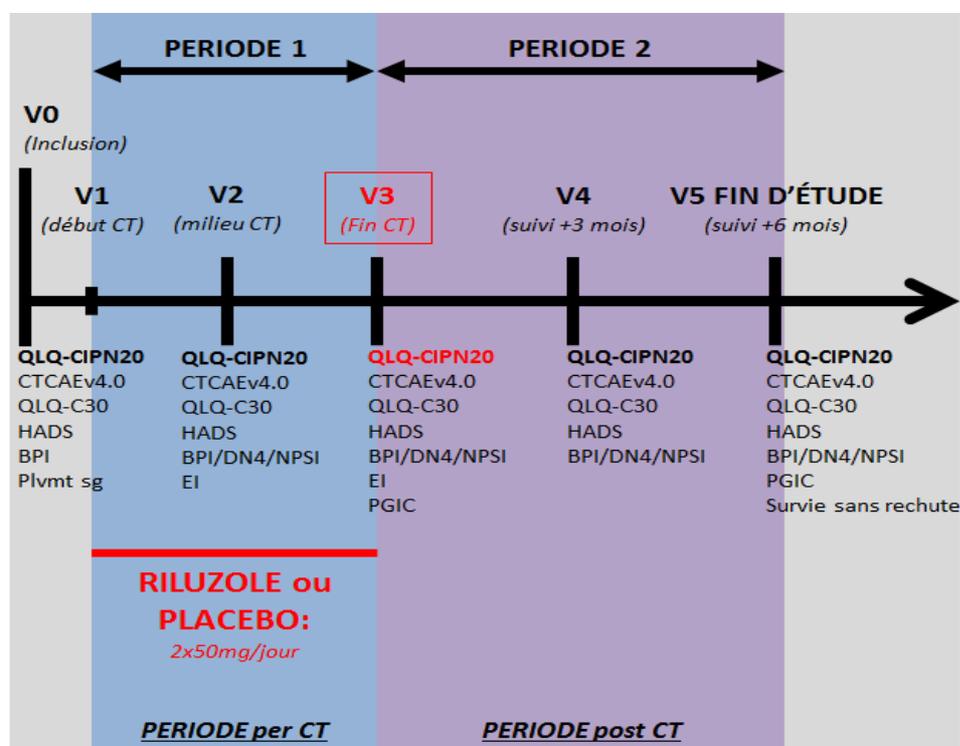


Figure 36 : Schéma de l'étude RILUZOX

Cette étude devrait permettre :

- Á d'apporter une confirmation (ou non) des données précliniques obtenues sur le potentiel thérapeutique du riluzole sur les NPCI associées à l'utilisation d'oxaliplatine,
- Á de potentiellement identifier des marqueurs génétiques susceptibles de prédisposer au développement des neuropathies périphériques et à la réponse au riluzole.

Si tel est le cas, les résultats de cet essai clinique permettraient :

- Á d'enrichir la palette thérapeutique du traitement symptomatique des NPCI, avec une molécule possédant déjà une AMM pour une autre indication thérapeutique,
- Á de poursuivre les recherches pour ouvrir l'utilisation de cette molécule vers d'autres types de NPCI et neuropathies réfractaires aux traitements habituels,
- Á de potentiellement permettre un dépistage génétique du risque de développement de neuropathies périphériques suite à une chimiothérapie anticancéreuse,
- Á potentiellement de sélectionner sur des critères génétiques les patients répondeurs au riluzole.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Les cancers sont devenus la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et devancent maintenant les maladies cardio-vasculaires. A l'heure actuelle, la prise en charge thérapeutique des cancers a clairement évolué avec une amélioration de la survie des patients grâce à une meilleure efficacité des traitements qui ont permis une diminution du risque de mortalité par cancer de 25% au cours des 30 dernières années. Cependant, le recours aux traitements anticancéreux est associé à de nombreux effets indésirables qui impactent significativement la qualité de vie des patients et, dans certains cas, peuvent être à l'origine d'un arrêt prématuré des traitements anticancéreux compromettant le succès du traitement (Mantyh, 2006; Visovsky, 2003). Parmi les effets indésirables des chimiothérapies, des complications neurologiques peuvent survenir. Cette toxicité neurologique est relativement fréquente et toutes les fibres du système nerveux sont susceptibles d'être atteintes qu'elles soient sensibles, motrices mais également végétatives ce qui se traduit par un large spectre de manifestations cliniques chez les patients. Avec les chimiothérapies actuelles, les cliniciens ont à gérer un équilibre délicat pour minimiser les effets indésirables sans compromettre l'efficacité anticancéreuse. Cet objectif est d'autant plus difficile à atteindre lorsque la chimiothérapie génère une neurotoxicité importante responsable de troubles sensitifs et moteurs très invalidants pour le patient. Enfin, une étude a révélé que les coûts de santé moyens pour la prise en charge des neuropathies périphériques chimio-induites (NPCI) étaient augmentés de 14948 euros en comparaison des neuropathies douloureuses non chimio-induites (Pike et al., 2012), traduisant la spécificité et la difficulté de prise en charge des NPCI.

Les NPCI, considérées comme un effet indésirable potentiellement grave, sont le plus souvent observées chez les patients traités avec des taxanes (docétaxel, paclitaxel), des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (vincristine), d'autres chimiothérapies (bortézomib, thalidomide) cytotoxiques actuellement disponibles ou encore des composés du platine (cisplatine, oxaliplatine), l'oxaliplatine étant la molécule sur laquelle s'est articulé ce travail de thèse. La NPCI est définie par des dommages du système nerveux périphérique engendrés par les agents anticancéreux. La plupart des symptômes de la NPCI correspondent à un tableau clinique de polyneuropathie sensitive dépendante des nerfs affectés. En effet, les dommages causés peuvent être retrouvés à 3 niveaux distincts : au niveau du système nerveux central se traduisant par des troubles de la coordination, des étourdissements ou encore des troubles de certaines fonctions cognitives; au niveau des nerfs périphériques se traduisant par une faiblesse musculaire causant des difficultés dans la réalisation de mouvements fins, l'altération des

réflexes et l'apparition de symptômes douloureux avec des sensations d'engourdissements et sensations de brûlures principalement au niveau des extrémités; enfin au niveau des nerfs craniens avec l'apparition de symptômes douloureux au niveau de la face et de la cavité buccale, mais également une faiblesse du visage, de la langue, du cou et des épaules (Hausheer et al., 2006; Smith et al., 2008). Les symptômes sensoriels se développent généralement avant les symptômes moteurs et un sous-ensemble de patients souffre également de douleur neuropathique (Miltenburg and Boogerd, 2014). Ces toxicités neurologiques peuvent survenir directement après administration de la chimiothérapie et sont pour la plupart réversibles sans contre-indication concernant la poursuite du traitement à une posologie inférieure mais certaines manifestations s'avèrent être irréversibles avec parfois de lourdes conséquences.

Les mécanismes à l'origine de ces manifestations neurologiques restent encore aujourd'hui à élucider ce qui permettrait de proposer des traitements efficaces visant à limiter l'apparition de ces effets indésirables liés à la chimiothérapie. En effet, à l'heure actuelle aucun traitement n'a montré d'efficacité substantielle justifiant son utilisation en pratique clinique. Le but de ces travaux de thèse s'est inscrit dans cette problématique avec l'identification d'acteurs moléculaires qui pourraient être impliqués dans l'apparition de ces neuropathies chimio-induites à l'oxaliplatine, permettant ainsi d'élargir l'arsenal thérapeutique actuel.

Des données antérieures du laboratoire avaient montré la contribution de certains canaux ioniques dans la neuropathie aigue à l'oxaliplatine. C'est dans cette optique que nous avons cherché à étudier tout d'abord les symptômes décrits chez les patients au niveau de la sphère orofaciale. Nous avons donc utilisé le modèle de neuropathie aigue pour explorer les conséquences d'un traitement à l'oxaliplatine sur l'expression d'un ensemble de canaux ioniques préalablement identifiés comme importants dans la perception au froid ou dans la douleur. La variation d'expression de ces canaux ioniques s'est avérée différente dans le TG par rapport aux précédents résultats obtenus au niveau du DRG. Parmi le panel de canaux ioniques étudiés, seuls HCN1 et HCN2 se sont révélés surexprimés au niveau du TG. L'utilisation de l'ivabradine, antagoniste des canaux HCN, a permis de valider les canaux HCN1 et HCN2 comme cibles moléculaires dans le traitement de la neuropathie aigue à l'oxaliplatine avec une implication particulière du canal HCN2 pour expliquer les symptômes retrouvés au niveau de la sphère orofaciale, sa surexpression n'étant retrouvée qu'au niveau du TG. De plus, l'ivabradine a permis de réverser les symptômes douloureux au niveau céphalique en particulier l'hypersensibilité au froid. Les perspectives de ce travail consisteront donc à mettre en évidence si l'une des 2 sous-unités est plus spécifiquement impliquée dans ce phénomène. L'étude de molécule plus spécifique pour le canal HCN1 serait en effet à prioriser car elle causerait moins d'effets indésirables, la sous-unité HCN2 étant beaucoup plus responsable de pathologies cardiaques.

L'étude des causes responsables de la surexpression des canaux HCN1 et HCN2 suite à l'injection d'oxaliplatine serait également à poursuivre avec les hypothèses de régulations par des protéines partenaires comme Trip8b ou Nedd4-2 ou d'éventuelles régulations épigénétiques.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la forme chronique de la neuropathie induite à l'oxaliplatine. Cette neuropathie est beaucoup plus invalidante que la forme aiguë car elle perdure dans le temps et peut s'avérer irréversible même après arrêt du traitement. En plus des symptômes douloureux déjà observés avec la forme aiguë, cette neurotoxicité chronique s'accompagne également de comorbidités telles que le développement d'anxiété et de dépression mais également des troubles sensitifs invalidants et impactant directement le quotidien des patients. Le but premier de ce travail a donc été de mettre au point un modèle murin de neuropathie chronique à l'oxaliplatine afin de mimer au mieux les symptômes retrouvés en clinique. Un modèle consistant en une série de 8 injections d'oxaliplatine à 6mg/kg sur une durée de 28 jours a permis d'observer les symptômes douloureux au niveau céphalique et extracéphalique, ainsi que les manifestations morbides et sensori-motrices. L'ensemble des propriétés du canal TREK-1 nous a ensuite fait penser que ce canal pouvait représenter une cible intéressante pour le traitement de la neuropathie chronique à l'oxaliplatine. En effet, ce canal est connu pour son rôle dans la perception de la douleur polymodale, mais également dans la dépression, la neuroprotection et la prolifération cellulaire. Toutefois, ces données suggèrent l'intérêt d'activateurs du canal pour le traitement de la douleur et la prévention de la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine, mais à l'opposé ce sont des bloqueurs du canal qui ont, ou pourraient avoir, un effet antidépresseur et antiprolifératif. C'est pourquoi il est tout à fait remarquable de noter que le riluzole, dans nos conditions expérimentales, a permis la prévention des symptômes douloureux, moteurs ainsi que de la dépression induits par l'oxaliplatine, et qu'il n'a pas entravé l'effet anticancéreux de cette molécule *in vivo*. Mis à part l'effet sur la prolifération de cellules cancéreuses qui reste à déterminer, ces effets sont par ailleurs dépendants de l'activation du canal TREK-1 puisqu'ils sont très fortement diminués chez les souris invalidées pour ce canal. Le canal TREK-1 représente donc une cible moléculaire d'intérêt pour le traitement de nombreuses manifestations de la neuropathie chronique à l'oxaliplatine tout en préservant l'action anti-tumorale de la chimiothérapie. Des activateurs spécifiques du canal ont très récemment été développés au laboratoire en collaboration avec l'équipe de Florian Lesage (IPMC, Nice) et Sylvie Ducki (ENSCCF, Clermont-ferrand) et pourraient être testés pour valider pharmacologiquement le canal TREK-1 comme cible moléculaire pour la prévention de la neuropathie induite par l'oxaliplatine. Nos travaux ont également une perspective translationnelle immédiate puisque le riluzole sera testé chez des patients cancéreux en combinaison avec l'oxaliplatine dans l'espoir d'améliorer la qualité de vie et la survie de ces patients.

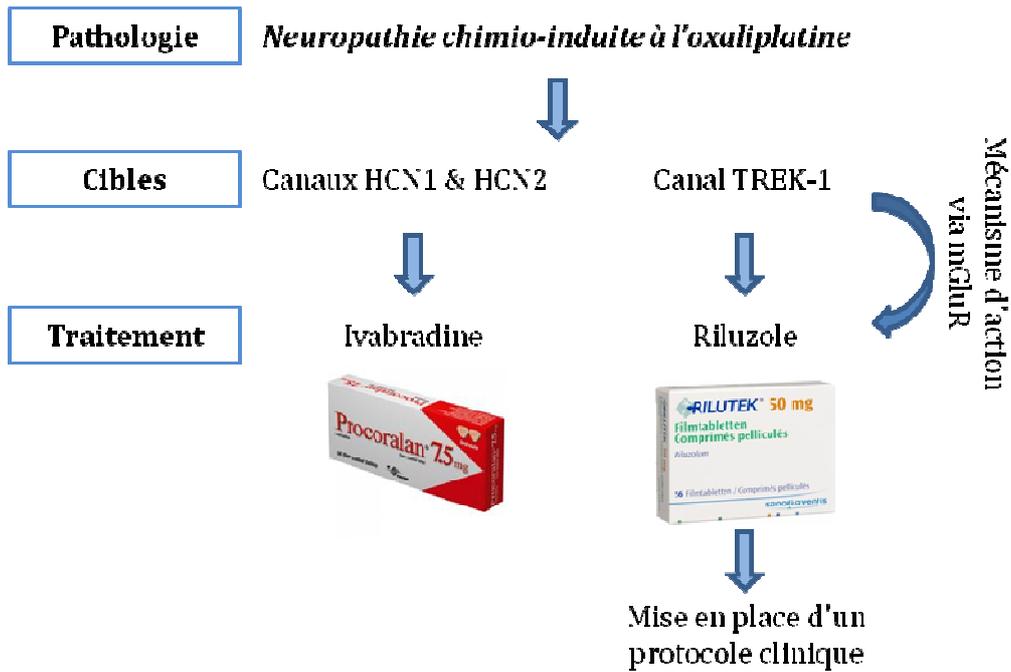


Figure 37 : Différentes étapes de l'étude de l'implication des canaux HCN et TREK-1.

L'ensemble de ces travaux a donc permis de mettre en évidence des cibles moléculaires pour le traitement de la neuropathie induite par l'oxaliplatine. Des molécules modulatrices de l'activité de ces canaux sont déjà disponibles en clinique, ce qui favorise un passage rapide aux études cliniques et peu risqué compte tenu de leur bonne tolérance, que ce soit pour l'ivabradine (Procoralan®), ou le riluzole (Rilutek®). L'élargissement de l'utilisation de ces molécules ou de modulateurs plus spécifiques des canaux HCN et TREK-1 à d'autres neuropathies chimio-induites est également une perspective de recherche à court et moyen terme de nos travaux de thèse.

REFERENCES

Références bibliographiques

Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C.O., Cendan, C.M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J.P., Nassar, M.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321, 702–705.

Acosta, C., McMullan, S., Djouhri, L., Gao, L., Watkins, R., Berry, C., Dempsey, K., and Lawson, S.N. (2012). HCN1 and HCN2 in Rat DRG neurons: levels in nociceptors and non-nociceptors, NT3-dependence and influence of CFA-induced skin inflammation on HCN2 and NT3 expression. *PloS One* 7, e50442.

Adelsberger, H., Quasthoff, S., Grosskreutz, J., Lepier, A., Eckel, F., and Lersch, C. (2000). The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 25–32.

Akamatsu, K., Shibata, M.-A., Ito, Y., Sohma, Y., Azuma, H., and Otsuki, Y. (2009). Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress. *Anticancer Res.* 29, 2195–2204.

Alcindor, T., and Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol. Tor. Ont* 18, 18–25.

Alejandro, L.M., Behrendt, C.E., Chen, K., Openshaw, H., and Shibata, S. (2013). Predicting acute and persistent neuropathy associated with oxaliplatin. *Am. J. Clin. Oncol.* 36, 331–337.

Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* 25, 2368–2376.

André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.

André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., et al. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3109–3116.

Andre T (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for... - PubMed - NCBI.

Antal, M., Papp, I., Bahaerguli, N., Veress, G., and Vereb, G. (2004). Expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in axon terminals of peptidergic nociceptive primary sensory neurons in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1336–1342.

Antoine, J.C. (2001). [Paraneoplastic peripheral neuropathies]. *Rev. Neurol. (Paris)* 157, 1557–1560.

Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M., Seno, H., Chiba, T., et al. (2007). Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 26, 3511–3520.

- Arango, D., Wilson, A.J., Shi, Q., Corner, G.A., Arañes, M.J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J.M., and Augenlicht, L.H. (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* *91*, 1931–1946.
- Argyriou, A.A., Polychronopoulos, P., Iconomou, G., Chroni, E., and Kalofonos, H.P. (2008). A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat. Rev.* *34*, 368–377.
- Argyriou, A.A., Cavaletti, G., Briani, C., Velasco, R., Bruna, J., Campagnolo, M., Alberti, P., Bergamo, F., Cortinovis, D., Cazzaniga, M., et al. (2013). Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer. *Cancer* *119*, 438–444.
- Attal, N., and Bouhassira, D. (2015). Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms? *Pain* *156 Suppl 1*, S104–S114.
- Attal, N., Bouhassira, D., Gautron, M., Vaillant, J.N., Mitry, E., Lepère, C., Rougier, P., and Guirimand, F. (2009). Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: A prospective quantified sensory assessment study. *Pain* *144*, 245–252.
- Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Nurmikko, T., and European Federation of Neurological Societies (2010). EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* *17*, 1113–e88.
- Avan, A., Postma, T.J., Ceresa, C., Avan, A., Cavaletti, G., Giovannetti, E., and Peters, G.J. (2015). Platinum-Induced Neurotoxicity and Preventive Strategies: Past, Present, and Future. *The Oncologist*.
- Bagriantsev, S.N., Ang, K.-H., Gallardo-Godoy, A., Clark, K.A., Arkin, M.R., Renslo, A.R., and Minor, D.L. (2013). A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K2P channels. *ACS Chem. Biol.* *8*, 1841–1851.
- Balayssac, D., Ferrier, J., Pereira, B., Gillet, B., Pétorin, C., Vein, J., Libert, F., Eschalier, A., and Pezet, D. (2015). Prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by a polyamine-reduced diet-NEUROXAPOL: protocol of a prospective, randomised, controlled, single-blind and monocentric trial. *BMJ Open* *5*, e007479.
- Banasr, M., Chowdhury, G.M.I., Terwilliger, R., Newton, S.S., Duman, R.S., Behar, K.L., and Sanacora, G. (2010). Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol. Psychiatry* *15*, 501–511.
- Bankston, J.R., Camp, S.S., DiMaio, F., Lewis, A.S., Chetkovich, D.M., and Zagotta, W.N. (2012). Structure and stoichiometry of an accessory subunit TRIP8b interaction with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 7899–7904.
- Baron, R., Binder, A., and Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* *9*, 807–819.
- Le Bars, D., and Adam, F. (2002). [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation* *21*, 315–335.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* *139*, 267–284.

- Bayliss, D.A., and Barrett, P.Q. (2008). Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 566–575.
- Beijers, A.J.M., Mols, F., Tjan-Heijnen, V.C.G., Faber, C.G., van de Poll-Franse, L.V., and Vreugdenhil, G. (2015). Peripheral neuropathy in colorectal cancer survivors: The influence of oxaliplatin administration. Results from the population-based PROFILES registry. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 54, 463–469.
- Bellingham, M.C. (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *Cns Neurosci. Ther.* 17, 4–31.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 330, 585–591.
- Berdeaux, A., Tissier, R., Couvreur, N., Salouage, I., and Ghaleh, B. (2009). [Heart rate reduction: beneficial effects in heart failure and post-infarcted myocardium]. *Thérapie* 64, 87–91.
- Bisgaard, M.L., Fenger, K., Bülow, S., Niebuhr, E., and Mohr, J. (1994). Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum. Mutat.* 3, 121–125.
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2002a). Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 109, 231–241.
- Blondeau, N., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2002b). A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 821–834.
- Bonaccini L (2010). Oxaliplatin-induced neuropathy: glial activation in spinal cord and brain.
- Borsotto, M., Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Devader, C., Mazella, J., and Heurteaux, C. (2015). Targeting two-pore domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br. J. Pharmacol.* 172, 771–784.
- Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., Divoux, D., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P., and Freret, T. (2009). The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* 4, 1560–1564.
- Brix Finnerup, N., Hein Sindrup, S., and Staehelin Jensen, T. (2013). Management of painful neuropathies. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 279–290.
- Brooks, S.P., and Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 519–529.
- Bullinger, K.L., Nardelli, P., Wang, Q., Rich, M.M., and Cope, T.C. (2011). Oxaliplatin neurotoxicity of sensory transduction in rat proprioceptors. *J. Neurophysiol.* 106, 704–709.
- Cadaveira-Mosquera, A., Ribeiro, S.J., Rebores, A., Perez, M., and Antonio Lamas, J. (2011). Activation of TREK Currents by the Neuroprotective Agent Riluzole in Mouse Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* 31, 1375–1385.

References bibliographiques

- Cadaveira-Mosquera, A., Pérez, M., Reboreda, A., Rivas-Ramírez, P., Fernández-Fernández, D., and Lamas, J.A. (2012). Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci.* **48**, 86–96.
- Cain, S.M., Meadows, H.J., Dunlop, J., and Bushell, T.J. (2008). mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 32–39.
- Calejo, A.I., Reverendo, M., Silva, V.S., Pereira, P.M., Santos, M.A.S., Zorec, R., and Gonçalves, P.P. (2014). Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 297–307.
- Calvino, B., and Thibault, K. (2010). Apport des modèles expérimentaux dans la compréhension des douleurs en cancérologie. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* **11**, 26–36.
- Carozzi, V.A., Marmioli, P., and Cavaletti, G. (2010). The role of oxidative stress and anti-oxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity. *Curr. Cancer Drug Targets* **10**, 670–682.
- Cavaletti, G., Tredici, G., Petruccioli, M.G., Dondè, E., Tredici, P., Marmioli, P., Minoia, C., Ronchi, A., Bayssas, M., and Etienne, G.G. (2001). Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **37**, 2457–2463.
- Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9075–9080.
- Cen, P., Liu, C., and Du, X.L. (2012). Comparison of toxicity profiles of fluorouracil versus oxaliplatin regimens in a large population-based cohort of elderly patients with colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **23**, 1503–1511.
- Cersosimo, R.J. (2005). Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. *Ann. Pharmacother.* **39**, 128–135.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Micheli, L., Tani, A., Zanardelli, M., and Ghelardini, C. (2014). Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Exp. Neurol.* **261**, 22–33.
- Chaplan, S.R., Guo, H.-Q., Lee, D.H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A.A., Butler, M.P., Brown, S.M., and Dubin, A.E. (2003). Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 1169–1178.
- Cheah, B.C., Vucic, S., Krishnan, A.V., and Kiernan, M.C. (2010). Riluzole, Neuroprotection and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1942–1959.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2005). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* **24**, 44–53.
- Cheung, A.F., Carter, A.M., Kostova, K.K., Woodruff, J.F., Crowley, D., Bronson, R.T., Haigis, K.M., and Jacks, T. (2010). Complete deletion of Apc results in severe polyposis in mice. *Oncogene* **29**, 1857–1864.
- Chiechio, S., and Nicoletti, F. (2012). Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 28–34.

- Cho, H.-J., Staikopoulos, V., Furness, J.B., and Jennings, E.A. (2009). Inflammation-induced increase in hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel protein in trigeminal ganglion neurons and the effect of buprenorphine. *Neuroscience* 162, 453–461.
- Cho, Y.S., Kim, Y.S., Moozhayil, S.J., Yang, E.S., and Bae, Y.C. (2015). The expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1) and HCN2 in the rat trigeminal ganglion, sensory root, and dental pulp. *Neuroscience* 291C, 15–25.
- Choti, M.A. (2009). Chemotherapy-associated hepatotoxicity: do we need to be concerned? *Ann. Surg. Oncol.* 16, 2391–2394.
- Cohen, A., Sagron, R., Somech, E., Segal-Hayoun, Y., and Zilberberg, N. (2009). Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K2P2.1 channel. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 382–389.
- Coriat, R., Alexandre, J., Nicco, C., Quinquis, L., Benoit, E., Chéreau, C., Lemaréchal, H., Mir, O., Borderie, D., Tréluyer, J.-M., et al. (2014). Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J. Clin. Invest.* 124, 262–272.
- Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 501–507.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., and Müller-Röber, B. (1997). New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.* 16, 2565–2575.
- Dalle, C., and Eisenach, J.C. (2005). Peripheral block of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) reduces mechanical allodynia in animal models of postoperative and neuropathic pain. *Reg. Anesth. Pain Med.* 30, 243–248.
- Dallel, R., Villanueva, L., Woda, A., and Voisin, D. (2003). [Neurobiology of trigeminal pain]. *Médecine Sci. MS* 19, 567–574.
- Darian-Smith, I., and Mayday, G. (1960). Somatotopic organization within the brain-stem trigeminal complex of the cat. *Exp. Neurol.* 2, 290–309.
- DeBerg, H.A., Bankston, J.R., Rosenbaum, J.C., Brzovic, P.S., Zagotta, W.N., and Stoll, S. (2015). Structural mechanism for the regulation of HCN ion channels by the accessory protein TRIP8b. *Struct. Lond. Engl.* 1993 23, 734–744.
- Descœur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 3, 266–278.
- Deuis, J.R., Zimmermann, K., Romanovsky, A.A., Possani, L.D., Cabot, P.J., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2013). An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain* 154, 1749–1757.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lolignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., Christin, M., Mazet, B., Delmas, P., Noel, J., et al. (2013). Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 4, 2941.
- DiFrancesco, D. (2010). The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circ. Res.* 106, 434–446.

- Dimitrov, A.G., and Dimitrova, N.A. (2012). A possible link of oxaliplatin-induced neuropathy with potassium channel deficit. *Muscle Nerve* 45, 403–411.
- Donzelli, E., Carfi, M., Miloso, M., Strada, A., Galbiati, S., Bayssas, M., Griffon-Etienne, G., Cavaletti, G., Petruccioli, M.G., and Tredici, G. (2004). Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurooncol.* 67, 65–73.
- Du, X., and Gamper, N. (2013). Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 621–640.
- Du, X., Hao, H., Gigout, S., Huang, D., Yang, Y., Li, L., Wang, C., Sundt, D., Jaffe, D.B., Zhang, H., et al. (2014). Control of somatic membrane potential in nociceptive neurons and its implications for peripheral nociceptive transmission. *Pain* 155, 2306–2322.
- Dulawa, S.C., and Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 771–783.
- Dunlop, J., Vasilyev, D., Lu, P., Cummons, T., and Bowlby, M.R. (2009). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels and pain. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1767–1772.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57, 906–912.
- Durand, J.P., Deplanque, G., Montheil, V., Gornet, J.M., Scotte, F., Mir, O., Cessot, A., Coriat, R., Raymond, E., Mitry, E., et al. (2012). Efficacy of venlafaxine for the prevention and relief of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: results of EFFOX, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 23, 200–205.
- Dzagnidze, A., Katsarava, Z., Makhalova, J., Liedert, B., Yoon, M.-S., Kaube, H., Limmroth, V., and Thomale, J. (2007). Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9451–9457.
- Emery, E.C., Young, G.T., Berrocoso, E.M., Chen, L., and McNaughton, P.A. (2011). HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333, 1462–1466.
- Enyedi, P., and Czirjak, G. (2010). Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol. Rev.* 90, 559–605.
- Ewertz, M., Qvortrup, C., and Eckhoff, L. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients treated with taxanes and platinum derivatives. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 54, 587–591.
- Extra, J.M., Marty, M., Brienza, S., and Misset, J.L. (1998). Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin. Oncol.* 25, 13–22.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B., and Woynarowski, J.M. (2003). DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 66, 225–237.
- Fariñas, I., Cano-Jaimez, M., Bellmunt, E., and Soriano, M. (2002). Regulation of neurogenesis by neurotrophins in developing spinal sensory ganglia. *Brain Res. Bull.* 57, 809–816.

References bibliographiques

- Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D., and Lesage, F. (2014). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J. Physiol.*
- Fenske, S., Mader, R., Scharr, A., Papparizos, C., Cao-Ehlker, X., Michalakis, S., Shaltiel, L., Weidinger, M., Stieber, J., Feil, S., et al. (2011). HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circ. Res.* *109*, 1015–1023.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* *15*, 6854–6862.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., et al. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.*
- Franks, N.P., and Honoré, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 601–608.
- Fumagalli, E., Funicello, M., Rauen, T., Gobbi, M., and Mennini, T. (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur. J. Pharmacol.* *578*, 171–176.
- Galer, B.S., Twilling, L.L., Harle, J., Cluff, R.S., Friedman, E., and Rowbotham, M.C. (2000). Lack of efficacy of riluzole in the treatment of peripheral neuropathic pain conditions. *Neurology* *55*, 971–975.
- Gamelin, E., Gamelin, L., Bossi, L., and Quasthoff, S. (2002). Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin. Oncol.* *29*, 21–33.
- Gamelin, L., Boisdrion-Celle, M., Morel, A., and Gamelin, E. (2006). [Oxaliplatin neurotoxicity]. *Bull. Cancer (Paris)* *93 Suppl 1*, S17–S22.
- Gao, L.L., McMullan, S., Djouhri, L., Acosta, C., Harper, A.A., and Lawson, S.N. (2012). Expression and properties of hyperpolarization-activated current in rat dorsal root ganglion neurons with known sensory function. *J. Physiol.* *590*, 4691–4705.
- Gasser, H.S. (1941). *The Classification of Nerve Fibers.*
- Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A., and Kuraishi, Y. (2009). Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci. Lett.* *458*, 93–95.
- George, A., Serra, J., Navarro, X., and Bostock, H. (2007). Velocity recovery cycles of single C fibres innervating rat skin. *J. Physiol.* *578*, 213–232.
- Goldberg, R.M. (2004). Current approaches to first-line treatment of advanced colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* *4 Suppl 1*, S9–S15.
- Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N., and Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13256–13261.

- Gornet, J.-M., Savier, E., Lokiec, F., Cvitkovic, E., Misset, J.-L., and Goldwasser, F. (2002). Exacerbation of oxaliplatin neurosensory toxicity following surgery. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *13*, 1315–1318.
- Gourley, S.L., Espitia, J.W., Sanacora, G., and Taylor, J.R. (2012). Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *219*, 805–814.
- Graham, M.A., Lockwood, G.F., Greenslade, D., Brienza, S., Bayssas, M., and Gamelin, E. (2000). Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1205–1218.
- Gramont, A. de, Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* *18*, 2938–2947.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 2938–2947.
- Gregg, R.W., Molepo, J.M., Monpetit, V.J., Mikael, N.Z., Redmond, D., Gadia, M., and Stewart, D.J. (1992). Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *10*, 795–803.
- Grisold, W., Cavaletti, G., and Windebank, A.J. (2012). Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro-Oncol.* *14 Suppl 4*, iv45–iv54.
- Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdrion-Celle, M., Lapied, B., Pelhate, M., and Gamelin, E. (2001). A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J. Neurophysiol.* *85*, 2293–2297.
- Grossman, R.G., Fehlings, M.G., Frankowski, R.F., Burau, K.D., Chow, D.S.L., Tator, C., Teng, A., Toups, E.G., Harrop, J.S., Aarabi, B., et al. (2014). A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J. Neurotrauma* *31*, 239–255.
- Grothey, A. (2003). Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin. Oncol.* *30*, 5–13.
- Grothey, A. (2005). Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. *Clin. Colorectal Cancer* *5 Suppl 1*, S38–S46.
- Grothey, A. (2010). Reintroduction of oxaliplatin: a viable approach to the long-term management of metastatic colorectal cancer. *Oncology* *79*, 389–399.
- Grothey, A., and Goldberg, R.M. (2004). A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* *5*, 2159–2170.
- Grunnet, M., Jespersen, T., Angelo, K., Frøkjaer-Jensen, C., Klaerke, D.A., Olesen, S.P., and Jensen, B.S. (2001). Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology* *40*, 879–887.

References bibliographiques

- Gruss, M., Bushell, T.J., Bright, D.P., Lieb, W.R., Mathie, A., and Franks, N.P. (2004). Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol.* *65*, 443–452.
- Guirimand, F., and Le Bars, D. (1996). [Physiology of nociception]. *Ann. Fr. Anesthésie Rénanimation* *15*, 1048–1079.
- Haigis, K.M., Hoff, P.D., White, A., Shoemaker, A.R., Halberg, R.B., and Dove, W.F. (2004). Tumor regionality in the mouse intestine reflects the mechanism of loss of Apc function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9769–9773.
- Hama, A., and Sagen, J. (2011). Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J. Neurotrauma* *28*, 127–134.
- Hammer, N.A., Lillesø, J., Pedersen, J.L., and Kehlet, H. (1999). Effect of riluzole on acute pain and hyperalgesia in humans. *Br. J. Anaesth.* *82*, 718–722.
- Hartmann, J.T., and Lipp, H.-P. (2003). Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin. Pharmacother.* *4*, 889–901.
- Hatch, R.J., Jennings, E.A., and Ivanusic, J.J. (2013). Peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels contribute to inflammation-induced hypersensitivity of the rat temporomandibular joint. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *17*, 972–982.
- Hausheer, F.H., Schilsky, R.L., Bain, S., Berghorn, E.J., and Lieberman, F. (2006). Diagnosis, management, and evaluation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Semin. Oncol.* *33*, 15–49.
- Herrmann, S., Schnorr, S., and Ludwig, A. (2015). HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 1429–1447.
- Hershman, D.L., Lacchetti, C., Dworkin, R.H., Lavoie Smith, E.M., Bleeker, J., Cavaletti, G., Chauhan, C., Gavin, P., Lavino, A., Lustberg, M.B., et al. (2014). Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 1941–1967.
- Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Gray, C.W., Green, P.J., Ranson, J.L., Randall, A.D., and Meadows, H.J. (2001). Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* *103*, 899–919.
- Herzog, T.J., Monk, B.J., Rose, P.G., Braly, P., Hines, J.F., Bell, M.C., Wenham, R.M., Secord, A.A., Roman, L.D., Einstein, M.H., et al. (2014). A phase II trial of oxaliplatin, docetaxel, and bevacizumab as first-line therapy of advanced cancer of the ovary, peritoneum, and fallopian tube. *Gynecol. Oncol.* *132*, 517–525.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* *23*, 2684–2695.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., Yacoubi, M. El, Thümmel, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., et al. (2006). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* *9*, 1134–1141.

References bibliographiques

- Hjerling-Leffler, J., Marmigère, F., Heglind, M., Cederberg, A., Koltzenburg, M., Enerbäck, S., and Ernfors, P. (2005). The boundary cap: a source of neural crest stem cells that generate multiple sensory neuron subtypes. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 2623–2632.
- Hong, J.S., Tian, J., and Wu, L.H. (2014). The influence of chemotherapy-induced neurotoxicity on psychological distress and sleep disturbance in cancer patients. *Curr. Oncol.* *21*, 174–180.
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1.
- Hwang, I.G., Jang, J.-S., Oh, S.Y., Rho, M.H., Lee, S., Park, Y.S., Park, J.O., Nam, E.M., Lee, H.R., Jun, H.J., et al. (2015). Phase II study of mFOLFOX3 (5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin) as second-line treatment after gemcitabine failure in patients with unresectable/metastatic biliary tract cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Jaggi, A.S., and Singh, N. (2012). Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology* *291*, 1–9.
- JANSSEN, P.A., NIEMEGEREERS, C.J., and DONY, J.G. (1963). The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung.* *13*, 502–507.
- Jardim, D.L., Rodrigues, C.A., Novis, Y. a. S., Rocha, V.G., and Hoff, P.M. (2012). Oxaliplatin-related thrombocytopenia. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *23*, 1937–1942.
- Jiang, Y.-Q., Xing, G.-G., Wang, S.-L., Tu, H.-Y., Chi, Y.-N., Li, J., Liu, F.-Y., Han, J.-S., and Wan, Y. (2008). Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat. *Pain* *137*, 495–506.
- Joseph, E.K., Chen, X., Bogen, O., and Levine, J.D. (2008). Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *9*, 463–472.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* *413*, 203–210.
- Kagiava, A., Tsingotjidou, A., Emmanouilides, C., and Theophilidis, G. (2008). The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. *Neurotoxicology* *29*, 1100–1106.
- Kanner, R. (2001). Diagnosis and management of neuropathic pain in patients with cancer. *Cancer Invest.* *19*, 324–333.
- Kato, Y., Tateai, Y., Ohkubo, M., Saito, Y., Amagai, S., Kimura, Y.-S., Iimura, N., Okada, M., Matsumoto, A., Mano, Y., et al. (2014). Gosha-jinki-gan reduced oxaliplatin-induced hypersensitivity to cold sensation and its effect would be related to suppression of the expression of TRPM8 and TRPA1 in rats. *Anticancer. Drugs* *25*, 39–43.
- Katopodis, O., Souglakos, J., Stathopoulos, E., Christopoulou, A., Kontopodis, E., Kotsakis, A., Kalbakis, K., Kentepozidis, N., Polyzos, A., Hatzidaki, D., et al. (2014). Frontline treatment with gemcitabine, oxaliplatin and erlotinib for the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Cancer Chemother. Pharmacol.* *74*, 333–340.

- Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* *63*, 235–257.
- Kautio, A.-L., Haanpää, M., Saarto, T., and Kalso, E. (2008). Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. *J. Pain Symptom Manage.* *35*, 31–39.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Watanabe, H., Ikegami, Y., Hirakawa, S., Mihara, Y., Yano, T., Ikesue, H., and Oishi, R. (2011). Prevention of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration by neurotrophin in the rat model. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *15*, 344–350.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Yano, T., and Oishi, R. (2012). L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* *8*, 7.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Yano, T., and Oishi, R. (2012c). L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* *8*, 7.
- Kettunen, H.L., Kettunen, A.S.L., and Rautonen, N.E. (2003). Intestinal immune responses in wild-type and Apcmin/+ mouse, a model for colon cancer. *Cancer Res.* *63*, 5136–5142.
- Koller, W.C., and Cersosimo, M.G. (2004). Neuroprotection in Parkinson's disease: an elusive goal. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *4*, 277–283.
- Kouranova, E.V., Strassle, B.W., Ring, R.H., Bowlby, M.R., and Vasilyev, D.V. (2008). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience* *153*, 1008–1019.
- Kudlowitz, D., and Muggia, F. (2014). Clinical features of taxane neuropathy. *Anticancer. Drugs* *25*, 495–501.
- Kunkel, M.T., Johnstone, D.B., Thomas, J.H., and Salkoff, L. (2000). Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 7517–7524.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* *50*, 277–289.
- Kweekel, D.M., Gelderblom, H., and Guchelaar, H.-J. (2005). Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat. Rev.* *31*, 90–105.
- Lalonde, R., Le Pêcheur, M., Strazielle, C., and London, J. (2005). Exploratory activity and motor coordination in wild-type SOD1/SOD1 transgenic mice. *Brain Res. Bull.* *66*, 155–162.
- LaPointe, N.E., Morfini, G., Brady, S.T., Feinstein, S.C., Wilson, L., and Jordan, M.A. (2013). Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding: implications for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* *37*, 231–239.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* *19*, 1784–1793.

- Lavoie Smith, E.M., Barton, D.L., Qin, R., Steen, P.D., Aaronson, N.K., and Loprinzi, C.L. (2013). Assessing patient-reported peripheral neuropathy: the reliability and validity of the European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-CIPN20 Questionnaire. *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.* *22*, 2787–2799.
- Lawson, J.J., McIlwrath, S.L., Woodbury, C.J., Davis, B.M., and Koerber, H.R. (2008). TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *9*, 298–308.
- Le, M.N., Chan, J.L.-K., Rosenberg, S.A., Nabatian, A.S., Merrigan, K.T., Cohen-Solal, K.A., and Goydos, J.S. (2010). The Glutamate Release Inhibitor Riluzole Decreases Migration, Invasion, and Proliferation of Melanoma Cells. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2240–2249.
- Lee, C.S., Ryan, E.J., and Doherty, G.A. (2014). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World J. Gastroenterol. WJG* *20*, 3751–3761.
- Lehky, T. j., Leonard, G. d., Wilson, R. h., Grem, J. l., and Floeter, M. k. (2004). Oxaliplatin-induced neurotoxicity: Acute hyperexcitability and chronic neuropathy. *Muscle Nerve* *29*, 387–392.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.* *15*, 6400–6407.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 28398–28405.
- Lévi, F., Zidani, R., and Misset, J.L. (1997). Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *International Organization for Cancer Chronotherapy. Lancet* *350*, 681–686.
- Lévi, F., Metzger, G., Massari, C., and Milano, G. (2000). Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin. Pharmacokinet.* *38*, 1–21.
- Levy, D.B., Smith, K.J., Beazer-Barclay, Y., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1994). Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res.* *54*, 5953–5958.
- Lewis, A.S., Schwartz, E., Chan, C.S., Noam, Y., Shin, M., Wadman, W.J., Surmeier, D.J., Baram, T.Z., Macdonald, R.L., and Chetkovich, D.M. (2009). Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 6250–6265.
- Lewis, A.S., Vaidya, S.P., Blaiss, C.A., Liu, Z., Stoub, T.R., Brager, D.H., Chen, X., Bender, R.A., Estep, C.M., Popov, A.B., et al. (2011). Deletion of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel auxiliary subunit TRIP8b impairs hippocampal Ih localization and function and promotes antidepressant behavior in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 7424–7440.
- Lin, D.-H., Zhang, X.-R., Ye, D.-Q., Xi, G.-J., Hui, J.-J., Liu, S.-S., Li, L.-J., and Zhang, Z.-J. (2015). The Role of the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 in the Therapeutic Effects of Escitalopram in a Rat Model of Poststroke Depression. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 504–512.
- Lindå, H., Sköld, M.K., and Ochsmann, T. (2011). Activating Transcription Factor 3, a Useful Marker for Regenerative Response after Nerve Root Injury. *Front. Neurol.* *2*.

- Ling, B., Coudoré-Civiale, M.-A., Balayssac, D., Eschalier, A., Coudoré, F., and Authier, N. (2007). Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 234, 176–184.
- Liou, Y.-J., Chen, T.-J., Tsai, S.-J., Yu, Y.W.-Y., Cheng, C.-Y., and Hong, C.-J. (2009). Support for the involvement of the KCNK2 gene in major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 735–741.
- Liu, J.J., Jamieson, S.M.F., Subramaniam, J., Ip, V., Jong, N.N., Mercer, J.F.B., and McKeage, M.J. (2009). Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: association with platinum neurotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 847–856.
- Loprinzi, C.L., Qin, R., Dakhil, S.R., Fehrenbacher, L., Flynn, K.A., Atherton, P., Seisler, D., Qamar, R., Lewis, G.C., and Grothey, A. (2014). Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (N08CB/Alliance). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 997–1005.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., et al. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* 22, 216–224.
- Lunn, M.P.T., Hughes, R.A.C., and Wiffen, P.J. (2014). Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD007115.
- Luo, L., Chang, L., Brown, S.M., Ao, H., Lee, D.H., Higuera, E.S., Dubin, A.E., and Chaplan, S.R. (2007). Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience* 144, 1477–1485.
- Luong, T.N., Carlisle, H.J., Southwell, A., and Patterson, P.H. (2011). Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Ma, Y.C., and Huang, X.Y. (2002). Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 456–462.
- Maingret, F. (1999). Mechano- or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000a). TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* 19, 2483–2491.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000b). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* 275, 10128–10133.
- Mallecourt, C., and Delattre, J.Y. (2000). [Paraneoplastic neuropathies]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 29, 447–452.
- Manfredi, P.L., Gonzales, G.R., Sady, R., Chandler, S., and Payne, R. (2003). Neuropathic pain in patients with cancer. *J. Palliat. Care* 19, 115–118.
- Mani, S., Manalo, J., and Bregman, D. (2000). Novel combinations with oxaliplatin. *Oncol. Williston Park N* 14, 52–58.

- Mantyh, P.W. (2006). Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 797–809.
- Marchetti, P., Galla, D.A.P., Russo, F.P., Ricevuto, E., Flati, V., Porzio, G., Ficorella, C., and Cifone, M.G. (2004). Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Res.* 24, 219–226.
- Mathie, A. (2010). Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1089–1095.
- Mathie, A., and Veale, E.L. (2015). Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 931–943.
- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1983). A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J. Physiol.* 340, 19–45.
- Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., et al. (2010). Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biol* 8, e1000355.
- McKeage, M.J., Hsu, T., Screnci, D., Haddad, G., and Baguley, B.C. (2001). Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. *Br. J. Cancer* 85, 1219–1225.
- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kellsell, R.E., Gloger, I.I., and Pangalos, M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86, 101–114.
- Michot, B., Kayser, V., Bastian, G., Bourgoin, S., and Hamon, M. (2014). Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 79, 432–443.
- Millan, M.J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol. Ther.* 110, 135–370.
- Miltenburg, N.C., and Boogerd, W. (2014). Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat. Rev.* 40, 872–882.
- Mirkovic, K., Palmersheim, J., Lesage, F., and Wickman, K. (2012). Behavioral characterization of mice lacking Trek channels. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 60.
- Moha Ou Maati, H., Veyssiere, J., Labbal, F., Coppola, T., Gandin, C., Widmann, C., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2012). Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology* 62, 278–288.
- Moha Ou Maati, H., Bourcier-Lucas, C., Veyssiere, J., Kanzari, A., Heurteaux, C., Borsotto, M., Haddjeri, N., and Lucas, G. (2014). The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT4 and mGluR 2 receptors in the control of serotonergic function. *Brain Struct. Funct.*
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., and McNaughton, P.A. (2008). Role of the hyperpolarization-activated current Ih in somatosensory neurons. *J. Physiol.* 586, 5911–5929.

- Monneret, C. (2011). Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann. Pharm. Fr.* *69*, 286–295.
- Montana, M.C., and Gereau, R.W. (2011). Metabotropic glutamate receptors as targets for analgesia: antagonism, activation, and allosteric modulation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *12*, 1681–1688.
- Moon, E.S., Karadimas, S.K., Yu, W.-R., Austin, J.W., and Fehlings, M.G. (2014). Riluzole attenuates neuropathic pain and enhances functional recovery in a rodent model of cervical spondylotic myelopathy. *Neurobiol. Dis.* *62*, 394–406.
- Moore-Morris, T., Varrault, A., Mangoni, M.E., Le Digarcher, A., Negre, V., Dantec, C., Journot, L., Nargeot, J., and Couette, B. (2009). Identification of Potential Pharmacological Targets by Analysis of the Comprehensive G Protein-Coupled Receptor Repertoire in the Four Cardiac Chambers. *Mol. Pharmacol.* *75*, 1108–1116.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 1646–1652.
- Morrison, J.G., White, P., McDougall, S., Firth, J.W., Woolfrey, S.G., Graham, M.A., and Greenslade, D. (2000). Validation of a highly sensitive ICP-MS method for the determination of platinum in biofluids: application to clinical pharmacokinetic studies with oxaliplatin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *24*, 1–10.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322–324.
- Moser, A.R., Dove, W.F., Roth, K.A., and Gordon, J.I. (1992). The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J. Cell Biol.* *116*, 1517–1526.
- Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., McNeley, M.K., Shoemaker, A.R., and Dove, W.F. (1995). ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *31A*, 1061–1064.
- de Moura, J.C., Noroes, M.M., Rachetti, V. de P.S., Soares, B.L., Preti, D., Nassini, R., Materazzi, S., Marone, I.M., Minocci, D., Geppetti, P., et al. (2014). The blockade of transient receptor potential ankirin 1 (TRPA1) signalling mediates antidepressant- and anxiolytic-like actions in mice. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 4289–4299.
- Nakayama, G., Kodera, Y., Yokoyama, H., Okuda, N., Watanabe, T., Tanaka, C., Iwata, N., Ohashi, N., Koike, M., Fujiwara, M., et al. (2011). Modified FOLFOX6 with oxaliplatin stop-and-go strategy and oral S-1 maintenance therapy in advanced colorectal cancer: CCOG-0704 study. *Int. J. Clin. Oncol.* *16*, 506–511.
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., et al. (2011). Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN* *152*, 1621–1631.
- Nayak, T.K., Harinath, S., Nama, S., Somasundaram, K., and Sikdar, S.K. (2009). Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol. Pharmacol.* *76*, 903–917.

References bibliographiques

- Nishimura, H., Tsuda, A., Oguchi, M., Ida, Y., and Tanaka, M. (1988). Is immobility of rats in the forced swim test “behavioral despair”? *Physiol. Behav.* *42*, 93–95.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., et al. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* *28*, 1308–1318.
- Noel, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels* *5*, 400–407.
- Noh, S., Kumar, N., Bukhanova, N., Chen, Y., Stemkowski, P.L., and Smith, P.A. (2014). The heart-rate-reducing agent, ivabradine, reduces mechanical allodynia in a rodent model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *18*, 1139–1147.
- Nolan, M.F., Malleret, G., Lee, K.H., Gibbs, E., Dudman, J.T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R.F., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., et al. (2003). The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* *115*, 551–564.
- Nolan, M.F., Malleret, G., Dudman, J.T., Buhl, D.L., Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., et al. (2004). A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* *119*, 719–732.
- Nukatsuka, M., Saito, H., Sakamoto, K., Nakagawa, F., Uchida, J., Kobunai, T., Shiraishi, K., and Takechi, T. (2012). Efficacy of combination chemotherapy using oral fluoropyrimidine S-1 with oxaliplatin (SOX) against colorectal cancer in vivo. *Anticancer Res.* *32*, 2807–2812.
- Ohira, K., Takeuchi, R., Shoji, H., and Miyakawa, T. (2013). Fluoxetine-induced cortical adult neurogenesis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *38*, 909–920.
- Orio, P., Madrid, R., la Peña, E. de, Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D.A., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *J. Physiol.* *587*, 1961–1976.
- Palazzo, E., Marabese, I., de Novellis, V., Rossi, F., and Maione, S. (2014). Supraspinal metabotropic glutamate receptors: a target for pain relief and beyond. *Eur. J. Neurosci.* *39*, 444–454.
- Papp, I., Holló, K., and Antal, M. (2010). Plasticity of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 expression in the spinal dorsal horn in inflammatory pain. *Eur. J. Neurosci.* *32*, 1193–1201.
- Park, S.B., Krishnan, A.V., Lin, C.S.-Y., Goldstein, D., Friedlander, M., and Kiernan, M.C. (2008). Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr. Med. Chem.* *15*, 3081–3094.
- Park, S.B., Lin, C.S.Y., Krishnan, A.V., Goldstein, D., Friedlander, M.L., and Kiernan, M.C. (2011). Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. *The Oncologist* *16*, 708–716.
- Park, S.B., Goldstein, D., Krishnan, A.V., Lin, C.S.-Y., Friedlander, M.L., Cassidy, J., Koltzenburg, M., and Kiernan, M.C. (2013). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A critical analysis. *CA. Cancer J. Clin.* *63*, 419–437.

References bibliographiques

- Patel, A.J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* *17*, 4283–4290.
- Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* *2*, 422–426.
- Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 422–428.
- Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., et al. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *PAIN*[®].
- Pergolizzi, J.V., Raffa, R.B., Taylor, R., Rodriguez, G., Nalamachu, S., and Langley, P. (2013). A review of duloxetine 60 mg once-daily dosing for the management of diabetic peripheral neuropathic pain, fibromyalgia, and chronic musculoskeletal pain due to chronic osteoarthritis pain and low back pain. *Pain Pract. Off. J. World Inst. Pain* *13*, 239–252.
- Pike, C.T., Birnbaum, H.G., Muehlenbein, C.E., Pohl, G.M., and Natale, R.B. (2012). Healthcare costs and workloss burden of patients with chemotherapy-associated peripheral neuropathy in breast, ovarian, head and neck, and nonsmall cell lung cancer. *Chemother. Res. Pract.* *2012*, 913848.
- Piskorowski, R., Santoro, B., and Siegelbaum, S.A. (2011). TRIP8b splice forms act in concert to regulate the localization and expression of HCN1 channels in CA1 pyramidal neurons. *Neuron* *70*, 495–509.
- Poduri, A. (2014). HCN1 Gain-Of-Function Mutations – A New Cause of Epileptic Encephalopathy. *Epilepsy Curr.* *14*, 348–349.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* *229*, 327–336.
- Postma, T.J., Aaronson, N.K., Heimans, J.J., Muller, M.J., Hildebrand, J.G., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K., Lantéri-Minet, M., Grant, R., Huddart, R., et al. (2005). The development of an EORTC quality of life questionnaire to assess chemotherapy-induced peripheral neuropathy: the QLQ-CIPN20. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *41*, 1135–1139.
- Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., and Cvitkovic, E. (2002). Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.* *1*, 227–235.
- Renn, C.L., Carozzi, V.A., Rhee, P., Gallop, D., Dorsey, S.G., and Cavaletti, G. (2011). Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol. Pain* *7*, 29.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* *96*, 414–495.
- Rixe, O., Ortuzar, W., Alvarez, M., Parker, R., Reed, E., Paull, K., and Fojo, T. (1996). Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem. Pharmacol.* *52*, 1855–1865.

- Rodrigues, N., Bennis, K., Vivier, D., Pereira, V., C Chatelain, F., Chapuy, E., Deokar, H., Busserolles, J., Lesage, F., Eschaliere, A., et al. (2014). Synthesis and structure-activity relationship study of substituted caffeine esters as antinociceptive agents modulating the TREK-1 channel. *Eur. J. Med. Chem.* *75*, 391–402.
- Rush, A.J., Fava, M., Wisniewski, S.R., Lavori, P.W., Trivedi, M.H., Sackeim, H.A., Thase, M.E., Nierenberg, A.A., Quitkin, F.M., Kashner, T.M., et al. (2004). Sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D): rationale and design. *Control. Clin. Trials* *25*, 119–142.
- Safaei, R., Adams, P.L., Maktabi, M.H., Mathews, R.A., and Howell, S.B. (2012). The CXXC motifs in the metal binding domains are required for ATP7B to mediate resistance to cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* *110*, 8–17.
- Saif, M.W., and Reardon, J. (2005). Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Ther. Clin. Risk Manag.* *1*, 249–258.
- Saif, M.W., Syrigos, K., Kaley, K., and Isufi, I. (2010). Role of pregabalin in treatment of oxaliplatin-induced sensory neuropathy. *Anticancer Res.* *30*, 2927–2933.
- Sakaguchi, S., Takahashi, S., Sasaki, T., Kumagai, T., and Nagata, K. (2011). Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *26*, 30–46.
- Sałat, K., Cios, A., Wyska, E., Sałat, R., Mogilski, S., Filipek, B., Więckowski, K., and Malawska, B. (2014). Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *122*, 173–181.
- Sanacora, G., and Banasr, M. (2013). From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol. Psychiatry* *73*, 1172–1179.
- Sanacora, G., Kendell, S.F., Levin, Y., Simen, A.A., Fenton, L.R., Coric, V., and Krystal, J.H. (2007). Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. *Biol. Psychiatry* *61*, 822–825.
- Sandoz, G., Thümmeler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2006). AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J.* *25*, 5864–5872.
- Sandoz, G., Tardy, M.P., Thümmeler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2008). Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 8545–8552.
- Sandoz, G., Bell, S.C., and Isacoff, E.Y. (2011). Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2605–2610.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* *301*, 805–809.
- Santoro (2004). Regulation of HCN Channel Surface Expression by a Novel C-Terminal Protein-Protein Interaction.

References bibliographiques

- Santoro, B., Piskorowski, R.A., Pian, P., Hu, L., Liu, H., and Siegelbaum, S.A. (2009). TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron* 62, 802–813.
- Scheeff, E.D., Briggs, J.M., and Howell, S.B. (1999). Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* 56, 633–643.
- Schmoll, H.J. (2002). The role of oxaliplatin in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer: prospects and future directions. *Semin. Oncol.* 29, 34–39.
- Schnorr, S., Eberhardt, M., Kistner, K., Rajab, H., Käßer, J., Hess, A., Reeh, P., Ludwig, A., and Herrmann, S. (2014). HCN2 channels account for mechanical (but not heat) hyperalgesia during long-standing inflammation. *Pain* 155, 1079–1090.
- Scholz, J., and Woolf, C.J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* 10, 1361–1368.
- Screnci, D., McKeage, M.J., Galettis, P., Hambley, T.W., Palmer, B.D., and Baguley, B.C. (2000). Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br. J. Cancer* 82, 966–972.
- Scroggs, R.S., Todorovic, S.M., Anderson, E.G., and Fox, A.P. (1994). Variation in IH, IIR, and ILEAK between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Neurophysiol.* 71, 271–279.
- Scuteri, A., Galimberti, A., Maggioni, D., Ravasi, M., Pasini, S., Nicolini, G., Bossi, M., Miloso, M., Cavaletti, G., and Tredici, G. (2009). Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology* 30, 312–319.
- Serra, J., Solà, R., Quiles, C., Casanova-Molla, J., Pascual, V., Bostock, H., and Valls-Solé, J. (2009). C-nociceptors sensitized to cold in a patient with small-fiber neuropathy and cold allodynia. *Pain* 147, 46–53.
- Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R.T., Pan, Z., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., and Cohen, I.S. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* 85, e1–e6.
- Shoemaker, A.R., Moser, A.R., and Dove, W.F. (1995). N-ethyl-N-nitrosourea treatment of multiple intestinal neoplasia (Min) mice: age-related effects on the formation of intestinal adenomas, cystic crypts, and epidermoid cysts. *Cancer Res.* 55, 4479–4485.
- Sittl, R., Lampert, A., Huth, T., Schuy, E.T., Link, A.S., Fleckenstein, J., Alzheimer, C., Grafe, P., and Carr, R.W. (2012). Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6704–6709.
- Smith, E.M.L., Beck, S.L., and Cohen, J. (2008). The total neuropathy score: A tool for measuring chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Oncol. Nurs. Forum* 35, 96–102.
- Song, J.H., Huang, C.S., Nagata, K., Yeh, J.Z., and Narahashi, T. (1997). Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 707–714.

- Sprowl, J.A., Ciarimboli, G., Lancaster, C.S., Giovinazzo, H., Gibson, A.A., Du, G., Janke, L.J., Cavaletti, G., Shields, A.F., and Sparreboom, A. (2013). Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11199–11204.
- Stefani, A., Spadoni, F., and Bernardi, G. (1997). Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp. Neurol.* *147*, 115–122.
- Stein, A., and Arnold, D. (2012). Oxaliplatin: a review of approved uses. *Expert Opin. Pharmacother.* *13*, 125–137.
- Steinberg, E.A., Wafford, K.A., Brickley, S.G., Franks, N.P., and Wisden, W. (2015). The role of K₂p channels in anaesthesia and sleep. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *467*, 907–916.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., and Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *85*, 367–370.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Löster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2003). The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15235–15240.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* *256*, 668–670.
- Sun, S., Wang, L.P., Zhang, J., Yang, X.Y., Zhang, Q.L., Jia, Z., Hu, X.C., and Wang, B.Y. (2012). Phase II study of oxaliplatin plus leucovorin and 5-fluorouracil in heavily pretreated metastatic breast cancer patients. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *29*, 418–424.
- Sun, W., Sohal, D., Haller, D.G., Mykulowycz, K., Rosen, M., Soulen, M.C., Caparro, M., Teitelbaum, U.R., Giantonio, B., O'Dwyer, P.J., et al. (2011). Phase 2 trial of bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin in treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* *117*, 3187–3192.
- Ta, L.E., Espeset, L., Podratz, J., and Windebank, A.J. (2006). Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology* *27*, 992–1002.
- Ta, L.E., Low, P.A., and Windebank, A.J. (2009). Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol. Pain* *5*, 9.
- Ta, L.E., Bieber, A.J., Carlton, S.M., Loprinzi, C.L., Low, P.A., and Windebank, A.J. (2010). Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol. Pain* *6*, 15.
- Takahira, M., Sakurai, M., Sakurada, N., and Sugiyama, K. (2005). Fenamates and diltiazem modulate lipid-sensitive mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *451*, 474–478.
- Takasu, K., Ono, H., and Tanabe, M. (2010). Spinal hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels at primary afferent terminals contribute to chronic pain. *Pain* *151*, 87–96.
- Takimoto, C.H., Remick, S.C., Sharma, S., Mani, S., Ramanathan, R.K., Doroshov, J.H., Hamilton, A., Mulkerin, D., Graham, M., Lockwood, G.F., et al. (2003). Administration of oxaliplatin to patients with

- renal dysfunction: a preliminary report of the national cancer institute organ dysfunction working group. *Semin. Oncol.* *30*, 20–25.
- Tal, M., and Bennett, G.J. (1994). Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* *57*, 375–382.
- Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q.B., Kim, D., and Bayliss, D.A. (2001). CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* *21*, 7491–7505.
- Tator, C.H., Hashimoto, R., Raich, A., Norvell, D., Fehlings, M.G., Harrop, J.S., Guest, J., Aarabi, B., and Grossman, R.G. (2012). Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* *17*, 157–229.
- Terrazzino, S., Argyriou, A.A., Cargnin, S., Antonacopoulou, A.G., Briani, C., Bruna, J., Velasco, R., Alberti, P., Campagnolo, M., Lonardi, S., et al. (2015). Genetic determinants of chronic oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: a genome-wide study replication and meta-analysis. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS*.
- Thompson, S.W., Davis, L.E., Kornfeld, M., Hilgers, R.D., and Standefer, J.C. (1984). Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* *54*, 1269–1275.
- Tibbs, G.R., Rowley, T.J., Sanford, R.L., Herold, K.F., Proekt, A., Hemmings, H.C., Andersen, O.S., Goldstein, P.A., and Flood, P.D. (2013). HCN1 channels as targets for anesthetic and nonanesthetic propofol analogs in the amelioration of mechanical and thermal hyperalgesia in a mouse model of neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *345*, 363–373.
- Todd, R.C., and Lippard, S.J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Met. Integr. Biometal Sci.* *1*, 280–291.
- Toftthagen, C. (2010). Surviving Chemotherapy for Colon Cancer and Living with the Consequences. *J. Palliat. Med.* *13*, 1389–1391.
- Tong, L., Cai, M., Huang, Y., Zhang, H., Su, B., Li, Z., and Dong, H. (2014). Activation of K(2)P channel-TREK1 mediates the neuroprotection induced by sevoflurane preconditioning. *Br. J. Anaesth.* *113*, 157–167.
- Tournigand, C., Cervantes, A., Figer, A., Lledo, G., Flesch, M., Buyse, M., Mineur, L., Carola, E., Etienne, P.-L., Rivera, F., et al. (2006). OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer--a GERCOR study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *24*, 394–400.
- Toyama, S.M.D., Shimoyama, N.M.D., Ishida, Y.M.D., Koyasu, T., Szeto, H.H.M.D., and Shimoyama, M.M.D. (2014). Characterization of Acute and Chronic Neuropathies Induced by Oxaliplatin in Mice and Differential Effects of a Novel Mitochondria-targeted Antioxidant on the Neuropathies. [Miscellaneous Article]. *Anesthesiol. Febr.* 2014 *120*, 459–473.
- Treede, R.-D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., and Serra, J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* *70*, 1630–1635.

References bibliographiques

- Trevisan, G., Materazzi, S., Fusi, C., Altomare, A., Aldini, G., Lodovici, M., Patacchini, R., Geppetti, P., and Nassini, R. (2013). Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res.*
- Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* *37*, 146–158.
- Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Kawashiri, T., Kaname, T., Fujita, S., Oishi, R., and Egashira, N. (2014). Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. *Neurosci. Res.* *80*, 86–90.
- Tu, H., Deng, L., Sun, Q., Yao, L., Han, J.-S., and Wan, Y. (2004). Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels: roles in the differential electrophysiological properties of rat primary afferent neurons. *J. Neurosci. Res.* *76*, 713–722.
- Ulens, C., and Siegelbaum, S.A. (2003). Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron* *40*, 959–970.
- Vandewauw, I., Owsianik, G., and Voets, T. (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neurosci.* *14*, 21.
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 787–801.
- Veale, E.L., Moubarak, E. Al-, Bajaria, N., Omoto, K., Cao, L., Tucker, S.J., Stevens, E.B., and Mathie, A. (2014). Influence of the N terminus on the biophysical properties and pharmacology of TREK1 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* *85*, 671–681.
- Verkerk, A.O., and Wilders, R. (2015). Pacemaker Activity of the Human Sinoatrial Node: An Update on the Effects of Mutations in HCN4 on the Hyperpolarization-Activated Current. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 3071–3094.
- Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Mazella, J., Gaudriault, G., Moreno, S., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2015). Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology (Berl.)* *232*, 561–574.
- Vincenzi, B., Frezza, A.M., Schiavon, G., Spoto, C., Silvestris, N., Addeo, R., Catalano, V., Graziano, F., Santini, D., and Tonini, G. (2013). Identification of clinical predictive factors of oxaliplatin-induced chronic peripheral neuropathy in colorectal cancer patients treated with adjuvant Folfox IV. *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* *21*, 1313–1319.
- Visovsky, C. (2003). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Cancer Invest.* *21*, 439–451.
- Wainger, B.J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (2001). Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* *411*, 805–810.
- Wang, Y.-J., Lin, M.-W., Lin, A.-A., and Wu, S.-N. (2008). Riluzole-induced block of voltage-gated Na⁺ current and activation of BKCa channels in cultured differentiated human skeletal muscle cells. *Life Sci.* *82*, 11–20.

- Warwick, R.A., and Hanani, M. (2013). The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain: Satellite glial cells and chemotherapy-induced pain. *Eur. J. Pain* 17, 571–580.
- Waxman, S.G., and Zamponi, G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* 17, 153–163.
- Webster, R.G., Brain, K.L., Wilson, R.H., Grem, J.L., and Vincent, A. (2005). Oxaliplatin induces hyperexcitability at motor and autonomic neuromuscular junctions through effects on voltage-gated sodium channels. *Br. J. Pharmacol.* 146, 1027–1039.
- Weickhardt, A., Wells, K., and Messersmith, W. (2011). Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer. *J. Oncol.* 2011, 201593.
- Wells, J.E., Rowland, K.C., and Proctor, E.K. (2007). Hyperpolarization-activated channels in trigeminal ganglia innervating healthy and pulp-exposed teeth. *Int. Endod. J.* 40, 715–721.
- Wen, F., Zhou, Y., Wang, W., Hu, Q.C., Liu, Y.T., Zhang, P.F., Du, Z.D., Dai, J., and Li, Q. (2013). Ca/Mg infusions for the prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 24, 171–178.
- Weng, X., Smith, T., Sathish, J., and Djouhri, L. (2012). Chronic inflammatory pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I_h) in C- but not A δ -nociceptors. *Pain* 153, 900–914.
- Wilkars, W., Wollberg, J., Mohr, E., Han, M., Chetkovich, D.M., Bähring, R., and Bender, R.A. (2014). Nedd4-2 regulates surface expression and may affect N-glycosylation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN)-1 channels. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 2177–2190.
- Wilson, R.H., Lehky, T., Thomas, R.R., Quinn, M.G., Floeter, M.K., and Grem, J.L. (2002). Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 1767–1774.
- Wolf, S., Barton, D., Kottschade, L., Grothey, A., and Loprinzi, C. (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 44, 1507–1515.
- Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuroscience - Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765–1768.
- Wu, X., Liu, Y., Chen, X., Sun, Q., Tang, R., Wang, W., Yu, Z., and Xie, M. (2013). Involvement of TREK-1 activity in astrocyte function and neuroprotection under simulated ischemia conditions. *J. Mol. Neurosci.* MN 49, 499–506.
- Xie, W., Strong, J.A., Kim, D., Shahrestani, S., and Zhang, J.-M. (2012). Bursting activity in myelinated sensory neurons plays a key role in pain behavior induced by localized inflammation of the rat sensory ganglion. *Neuroscience* 206, 212–223.
- Xu, X.T., Dai, Z.H., Xu, Q., Qiao, Y.Q., Gu, Y., Nie, F., Zhu, M.M., Tong, J.L., and Ran, Z.H. (2013). Safety and efficacy of calcium and magnesium infusions in the chemoprevention of oxaliplatin-induced sensory neuropathy in gastrointestinal cancers. *J. Dig. Dis.* 14, 288–298.

References bibliographiques

- Yao, H., Donnelly, D.F., Ma, C., and LaMotte, R.H. (2003). Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 2069–2074.
- Yin, X., Su, B., Zhang, H., Song, W., Wu, H., Chen, X., Zhang, X., Dong, H., and Xiong, L. (2012). TREK1 activation mediates spinal cord ischemic tolerance induced by isoflurane preconditioning in rats. *Neurosci. Lett.* *515*, 115–120.
- Ying, S.-W., Tibbs, G.R., Picollo, A., Abbas, S.Y., Sanford, R.L., Accardi, A., Hofmann, F., Ludwig, A., and Goldstein, P.A. (2011). PIP2-mediated HCN3 channel gating is crucial for rhythmic burst firing in thalamic intergeniculate leaflet neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 10412–10423.
- Yip, D., Le, M.N., Chan, J.L.-K., Lee, J.H., Mehnert, J.A., Yudd, A., Kempf, J., Shih, W.J., Chen, S., and Goydos, J.S. (2009). A Phase 0 Trial of Riluzole in Patients with Resectable Stage III and IV Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3896–3902.
- Yoon, D.H., Jang, G., Kim, J.H., Kim, Y.-H., Kim, J.Y., Kim, H.R., Jung, H.-Y., Lee, G.-H., Song, H.Y., Cho, K.-J., et al. (2015). Randomized phase 2 trial of s1 and oxaliplatin-based chemoradiotherapy with or without induction chemotherapy for esophageal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *91*, 489–496.
- Yoon, S.-Y., Robinson, C.R., Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2013). Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *14*, 205–214.
- Young, G.T., Emery, E.C., Mooney, E.R., Tsantoulas, C., and McNaughton, P.A. (2014). Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain* *155*, 1708–1719.
- Yu, H.-G., Lu, Z., Pan, Z., and Cohen, I.S. (2004). Tyrosine kinase inhibition differentially regulates heterologously expressed HCN channels. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *447*, 392–400.
- Yu, L.J., Wall, B.A., and Chen, S. (2015). The current management of brain metastasis in melanoma: a focus on riluzole. *Expert Rev. Neurother.* *15*, 779–792.
- Zafar, S.Y., Marcello, J.E., Wheeler, J.L., Rowe, K.L., Morse, M.A., Herndon, J.E., and Abernethy, A.P. (2010). Treatment-related toxicity and supportive care in metastatic colorectal cancer. *J. Support. Oncol.* *8*, 15–20.
- Zarate, C.A., Payne, J.L., Quiroz, J., Sporn, J., Denicoff, K.K., Luckenbaugh, D., Charney, D.S., and Manji, H.K. (2004). An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. *Am. J. Psychiatry* *161*, 171–174.
- Zedan, A.H., Hansen, T.F., Svenningsen, Å.F., and Vilholm, O.J. (2014). Oxaliplatin-Induced Neuropathy in Colorectal Cancer: Many Questions With Few Answers. *Clin. Colorectal Cancer* *13*, 73–80.
- Zhang, C., Yuan, X.-R., Li, H.-Y., Zhao, Z.-J., Liao, Y.-W., Wang, X.-Y., Su, J., Sang, S.-S., and Liu, Q. (2015). Anti-Cancer Effect of Metabotropic Glutamate Receptor 1 Inhibition in Human Glioma U87 Cells: Involvement of PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *35*, 419–432.

- Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2012). Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain* 8, 55.
- Zheng, H., Xiao, W.H., and Bennett, G.J. (2011). Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. *Exp. Neurol.* 232, 154–161.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., and Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447, 855–858.
- Zolles, G., Klöcker, N., Wenzel, D., Weisser-Thomas, J., Fleischmann, B.K., Roeper, J., and Fakler, B. (2006). Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 52, 1027–1036.
- Zolles, G., Wenzel, D., Bildl, W., Schulte, U., Hofmann, A., Müller, C.S., Thumfart, J.-O., Vlachos, A., Deller, T., and Pfeifer, A. (2009). Association with the Auxiliary Subunit PEX5R/Trip8b Controls Responsiveness of HCN Channels to cAMP and Adrenergic Stimulation. *Neuron* 62, 814–825.
- Zong, X., Eckert, C., Yuan, H., Wahl-Schott, C., Abicht, H., Fang, L., Li, R., Mistrik, P., Gerstner, A., Much, B., et al. (2005). A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 34224–34232.
- Zorzi, D., Laurent, A., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Vauthey, J.-N., and Abdalla, E.K. (2007). Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* 94, 274–286.

ANNEXES

ANNEXE 1

REVIEW -“MINIMISING CHEMOTHERAPY- INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY: preclinical and clinical development of new perspectives”

Authors

Laura Poupon¹ (MSc), Nicolas Kerckhove^{1,2} (PhD), Julie Vein¹ (PhD, DVM), Sylvain Lamoine¹ (MSc), Nicolas Authier^{1,2} (PhD, MD, PharmD), Jérôme Busserolles¹ (PhD), David Balayssac^{1,3} (PhD, PharmD)

Address

1. INSERM U1107, NEURO-DOL, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France
2. CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, 63000 Clermont-Ferrand cedex 1, France
3. CHU Clermont-Ferrand, Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation, 63000 Clermont-Ferrand cedex 1, France

Corresponding author

David Balayssac

INSERM U1107, NEURO-DOL, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 28 Place Henri Dunant- BP 38, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France

Tel: +33 4 73 17 82 30 - Fax: +33 4 73 17 82 33

dbalayssac@chu-clermontferrand.fr

**EXPERT
OPINION**

1. Introduction
2. Classical treatment options to prevent or cure CIPN
3. New strategies for preventing and treating CIPN
4. Conclusion
5. Expert opinion

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy: preclinical and clinical development of new perspectives

Laura Poupon, Nicolas Kerckhove, Julie Vein, Sylvain Lamoine, Nicolas Authier, Jérôme Busserolles & David Balayssac[†]

[†]INSERM U1107, NEURO-DOL, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France

Introduction: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies (CIPN) are a dose-limiting adverse effect of certain anticancer drugs (platinum salts, vinca alkaloids, taxanes, bortezomib, thalidomide, epothilones, eribulin). CIPN are mainly responsible for sensory disturbances and are associated with a decrease in quality of life. After the end of chemotherapy, CIPN can last for several months and even years. Unfortunately, recent meta-analyses of clinical trials have demonstrated that there is no univocal gold standard for the prevention and treatment of CIPN.

Areas covered: Using animal models of CIPN, several new strategies to prevent or treat CIPN are under development. These new strategies involve several pathways, including ion channels, neuroprotectants, glutamatergic neurotransmission, oxidative stress, cannabinoid system, inflammation, and mitochondrial functions.

Expert opinion: To date, based on meta-analyses of clinical trials, no drug can be proposed as a gold standard to prevent or treat CIPN. Consequently, there is a strong discrepancy between the optimistic results of animal studies and the poor outcomes of clinical trials. Pain assessment in preclinical and clinical studies is probably not the best outcome measurement tool and all these studies should include composite outcomes including the full complexity of CIPN symptoms, such as positive symptoms (pain, paresthesia, and dysesthesia) and negative ones (numbness).

Keywords: analgesics, chemotherapy-induced peripheral neuropathy, ion channels, neuropathic pain

Expert Opin. Drug Saf. [Early Online]

1. Introduction

Chemotherapy-induced peripheral neuropathies (CIPN) are a dose-limiting adverse effect of neurotoxic anticancer drugs including: platinum salts (cisplatin and oxaliplatin), vinca alkaloids (vincristine), taxanes (paclitaxel, docetaxel), epothilones (ixabepilone), eribulin, bortezomib, and thalidomide [1,2]. CIPN result from various lesions of the peripheral nervous system, such as axonopathy, myelinopathy, or neuronopathy [1]. Symptoms include paresthesia, dysesthesia, pain, thermal hyper- or hyposensitivity, mechanical hyper- or hyposensitivity, numbness, and autonomic disturbances. The type of anticancer drug and the cumulative dose may impact the incidence (possibly up to 90% of patients for oxaliplatin), the symptoms, and the severity/grade of neuropathy [1]. For example, the rate of numbness and tingling is significantly higher in patients with colorectal cancer (oxaliplatin treatments) than with other types of cancer (lung, breast, prostate), whereas neuropathic pain rates

informa
healthcare

L. Poupon *et al.***Article highlights.**

- To date, there is no gold standard for the prevention and treatment of CIPN.
- Previous clinical trials have led to poor extrapolation to real life practice.
- The methodology of clinical trials should conform to a double-blind, randomized, placebo-controlled design, with an ‘in intention to treat’ analysis.
- Preclinical and clinical studies should take into account the complexity of CIPN symptoms and include both positive symptoms (pain, paresthesia, and dysesthesia) and negative ones (numbness).
- New perspectives of treatment include ion channels, neuroprotectants, glutamatergic neurotransmission, oxidative stress, cannabinoid system, inflammation, and mitochondrial functions.

This box summarizes key points contained in the article.

remain the same among these cancers [3]. Recent meta-analyses have demonstrated that among 31 studies (4179 patients), 68% (57.7 – 78.4) of patients suffered from CIPN 1 month after chemotherapy, 60% (36.4 – 81.6) after 3 months, and 30% (6.4 – 53.5) at 6 months or longer [4]. Oxaliplatin, probably one of the most neurotoxic anticancer drugs, is responsible of two types of neurological adverse effects. First, oxaliplatin infusion induces a self-limited acute neuronal hyperexcitability, usually appearing within hours and lasting about 72 h. Thereafter, the repetition of oxaliplatin infusions induces chronic neuropathy [1]. Symptoms of this chronic neuropathy can last for several years after the end of chemotherapy cycles, 2 years in the study by André *et al.* [5] and 8 years in the study by Yothers *et al.* [6]. The neurotoxicity mechanisms of anticancer drugs are not fully understood, but they may result from interactions with DNA, mitochondria, ion channels, glutamate neurotransmission, and/or kinases, at various levels such as dorsal root ganglia (DRG) and peripheral nerves involving sensory neurons, Schwann cells, or satellite cells (for a review, see [1,7]).

The health consequences of CIPN remain worrying, because these adverse drug reactions are associated with psychological disorders such as depression, anxiety, and sleeping difficulties [8]. More generally, patients suffering from CIPN have a significant decrease in their health-related quality of life [9]. Moreover, CIPNs result in a strong economic burden. For example, in the USA, patients suffering from CIPN have an average increase of their healthcare costs of \$17,344 per year [10]. Consequently, minimizing the incidence of CIPN is a cornerstone in the improvement of the benefit/risk ratio of neurotoxic anticancer drugs. Numerous therapeutic strategies, both pharmacological and non-pharmacological, have been assessed for the prevention and treatment of CIPN. Up to now, the CIPN management has mainly been based on conventional neuropathic pain treatments, including anticonvulsants (gabapentin, pregabalin, carbamazepine,

lamotrigine), antidepressants (amitriptyline, nortriptyline, duloxetine), opioids (hydromorphone, morphine, oxycodone, fentanyl, codeine), and topicals (lidocaine; for a review, see [11]). First-line treatments are based on α -2-delta ligand anticonvulsants, tricyclic antidepressants, and selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors and topical lidocaine. Second-line treatments are composed of opioids. Third-line treatments are based on other anticonvulsants and antidepressants, NMDA receptor antagonists, and topical agents [11]. However, recent meta-analyses have shown baffling results, as it appears that hardly any agent is capable of preventing or treating CIPN [12,13]. The meta-analysis by Hershman *et al.* [12], assessing 48 randomized controlled trials, demonstrated that no agent can be recommended for the prevention of CIPN, and that only duloxetine can be suggested for its treatment. On the basis of 29 studies, Albers *et al.* [13] concluded that the data were insufficient to conclude on any agents able to prevent the neurotoxicity of platinum drugs. More worrying, the quality of these clinical trials was mainly judged of low or intermediate quality, with strong methodological heterogeneity. Many of these studies had insufficient power and possibly too low doses to garner a significant benefit [12,13].

Therapeutic strategies to minimize CIPN still represent an unsolved issue in oncology, but much effort has been made to understand the pathophysiology of these CIPN, and to identify new pharmacological targets. Mainly focused on the nociceptive disorders associated with CIPN, the aims of this review are to present the classical treatment options for preventing or treating CIPN, the new strategies for preventing or treating CIPN, and expert opinion on studies and strategies to minimize CIPN.

2. Classical treatment options to prevent or cure CIPN

Recently, Finnerup *et al.* proposed a revision of the NeuPSIG (Special Interest Group on Neuropathic Pain, from the International Association for the Study of Pain) recommendations for the pharmacotherapy of neuropathic pain as follows: first-line treatment for tricyclic antidepressants, serotonin-noradrenalin reuptake inhibitors, pregabalin, and gabapentin; second line for lidocaine patches, capsaicin high-concentration patches, and tramadol; third line for strong opioids and botulinum toxin A [14]. They also stated that topical agents and botulinum toxin A are recommended only for peripheral neuropathic pain with presumed local pain generator. Neuropathic pain is only one symptom among others in CIPNs and CIPNs are relatively distinct from other forms of neuropathic pain, including pathophysiology and symptomatology [15,16]. Given the conclusions made by Hershman *et al.* on the poor clinical efficacy of these drugs in CIPN [12], it remains tempting to examine the results obtained with recommended drugs for neuropathic pain that have not yet been tested on CIPN patients, but for which

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

Table 1. Completed clinical trials in the treatment of CIPN.

Compound/intervention	Category	Agents	Results	Main ID
Angiotensin II type 2 receptor antagonist	Analgesic	Taxanes, platinum	Result unpublished	ACTRN12611001092987
Nabilone	Analgesic	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	Result unpublished	NCT00380965
Topical gel (Baclofen, amitriptyline and ketamine)	Analgesic	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	No effect on CIPN	PMID: 24531792
Topical menthol	Analgesic	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	Result unpublished	JPRN-UMIN00004913
Gabapentin	Anticonvulsant	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	No effect on CIPN	PMID: 17853395
Lamotrigine	Anticonvulsant	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	No effect on CIPN	PMID: 18428211
Duloxetine	Antidepressant	Paclitaxel, docetaxel, nab-paclitaxel, oxaliplatin, cisplatin	Decrease in CIPN pain (<i>Per protocol</i>)	PMID: 23549581
Mangafodipir	Antioxidant	Oxaliplatin	Decreased CIPN (<i>No control</i>)	PMID: 24355920
Amifostine	Cytoprotectant	Platinum, paclitaxel	Result unpublished	NCT00058071
Acetyl-L-carnitine	Neuroprotectant	Paclitaxel, cisplatin	Decreased CIPN (<i>No control</i>)	PMID: 15948540
Vitamin B6	Neuroprotectant	Cisplatin	Decreased CIPN (<i>No control</i>)	PMID: 1735009
Lafutidine	Histamine H2-receptor antagonist	Taxanes + carboplatin	Decreased CIPN (<i>No control</i>)	PMID: 22750259
Leteprinim	Neuroprotectant	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	Result unpublished Result unpublished	JPRN-UMIN000005338 NCT00041795

Trials were collated from PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (<http://apps.who.int/trials/registry/>) on 3 December 2014, using the search terms ‘neuropathy,’ ‘chemotherapy,’ and ‘neurotoxicity.’

CIPN: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies.

preclinical results are available. Several clinical trials assessing these classical treatments to prevent or treat CIPN have been performed (Tables 1 and 2).

2.1 Antidepressants and anticonvulsants

Three trials investigated the efficacy of tricyclic antidepressants, amitriptyline [17,18] and nortriptyline [19] in the prevention or treatment of CIPN, and failed to demonstrate any improvement in patients. However, Hershman *et al.* suggested that a tricyclic antidepressant such as nortriptyline may be prescribed to treat painful CIPN despite the absence of proven efficacy in randomized controlled trials for CIPN, based on its moderate effects on other types of neuropathies [12]. On the contrary, they made a moderate-to-strong recommendation against amitriptyline for the prevention of CIPN. Selective serotonin reuptake inhibitors and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors have also been tested in clinical trials. Venlafaxine was reported to significantly decrease oxaliplatin-induced acute neurotoxicity when compared to placebo [20]. However, the evidence was not strong enough to recommend its use in clinical practice [12]. Duloxetine is the only compound shown to be efficacious in a randomized clinical trial, for the treatment of neuropathic

pain associated with oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, based on the study of Smith *et al.* [12,21]. Only one animal study has demonstrated the efficacy of duloxetine on acute cold hypersensitivity induced by a single injection of oxaliplatin in rats (Table 3) [22].

Anticonvulsants represent a heterogeneous family of compounds with distinct mechanism of actions that have been used in the treatment of neuropathic pain of various etiologies. Gabapentin and pregabalin are selective inhibitors of the α -2-delta subunit of voltage-gated calcium channels (Cav). So far, only one trial has been completed and no evidence of a positive effect for the treatment of CIPN was observed [23]. Ongoing clinical trials are assessing the effect of gabapentin in the treatment of vincristine-induced neuropathy (primary objective: reduced daily total dose of morphine; Table 4), and of pregabalin in the prevention of oxaliplatin- and paclitaxel-induced neuropathy (primary objective: reduced incidence of CIPN; Table 5). Based on the magnitude of the unmet need for treating CIPN patients, and regarding their relative safety, these compounds may be prescribed to patients despite not having efficacy in randomized controlled trials for the treatment of CIPN [12]. Other anticonvulsants, such as carbamazepine, lamotrigine, and

L. Poupon et al.

Table 2. Completed clinical trials in the prevention of CIPN.

Compound/ intervention	Category	Agents	Results	Main ID
Neurotrophin	Neurotrophic factor	Oxaliplatin	Decreased CIPN	PMID: 22664945
Pregabalin	Anticonvulsant	Oxaliplatin	No effect on CIPN	NCT00380874
Carbamazepine				PMID: 16983507
Venlafaxine	Antidepressant	Oxaliplatin	Decreased CIPN (Per protocol)	PMID: 21427067
Glutathione	Antioxidant	Paclitaxel, carboplatin	No effect on CIPN	PMID: 24619793
		Oxaliplatin	Decreased CIPN	PMID: 12177109
		Cisplatin	(Per protocol)	PMID: 7799029
N-acetylcysteine	Antioxidant	Oxaliplatin	Decreased CIPN (No blinding)	PMID: 16450089
Acetyl-L-carnitine	Neuroprotectant	Paclitaxel, docétaxel	Result unpublished	NCT00775645
α-lipoic acid	Ion channel modulator	Oxaliplatin, cisplatin	No effect on CIPN	PMID: 24362907
Glutamine	Neuroprotectant	Paclitaxel, Oxaliplatin	Decreased CIPN (No control)	PMID: 11350883
Omega-3 fatty acid	Neuroprotectant	Taxanes	Decreased CIPN (Per protocol)	PMID: 17405895
			Result unpublished	PMID: 22894640
Retinoic acid	Neuroprotectant	Oxaliplatin	Result unpublished	IRCT201112158397N2
Vitamin B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9 and B12	Neuroprotectant	Cisplatin + paclitaxel	Decreased CIPN	PMID: 21865574
Vitamin E	Antioxidant	Paclitaxel, vincristine, oxaliplatin	Result unpublished	ACTRN12611000078954
		Taxanes, platinum	No effect on CIPN	PMID: 20936417
		Cisplatin	Decreased CIPN (No control)	PMID: 20194916
				PMID: 16622646
		Paclitaxel, cisplatin		PMID: 16939848
Amifostine	Neuroprotectant	Platinum; taxanes	Improve Quality of Life (Per protocol)	PMID: 15642899
			Decreased CIPN	PMID: 16025262
			Decreased CIPN	PMID: 8683243
			Decreased CIPN	PMID: 10442192
			Decreased CIPN	PMID: 12853351
			Decreased CIPN	PMID: 14514973
Calcium gluconate	Neuroprotectant	Oxaliplatin	No effect on CIPN	PMID: 24297951
Magnesium sulfate				PMID: 21114776
				PMID: 23432969
			Decreased CIPN (Retrospective study)	PMID: 15217938
GM1	Neuroprotectant	Oxaliplatin	Decreased CIPN (Retrospective study)	PMID: 22397758
Emfilemin	Neuroprotectant	Paclitaxel/carboplatin	No effect on CIPN	PMID: 15756015
Org 2766	Neuroprotectant	Cisplatin	Decreased CIPN (Per protocol)	PMID: 2152972
Goshajinkigan	Phytotherapy	Oxaliplatin	Decreased CIPN Decreased CIPN (No control)	PMID: 24121454
				PMID: 24307899
				PMID: 21258836
				PMID: 22753712
				PMID: 19952054
				JPRN-UMIN000004282
		Paclitaxel/carboplatin	Result unpublished No effect on CIPN (No blinding)	PMID: 22969845
Nimodipine	Calcium channel blocker	Cisplatin	Decreased CIPN (No blinding and randomization)	PMID: 9443630
Epoetin α	-	Taxanes + platinum	No effect on CIPN	NCT00267007
Erythropoietin	-	Paclitaxel	Decreased CIPN (No blinding and randomization)	PMID: 23420555

Trials were collated from PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (<http://apps.who.int/trialsearch/>) on 3 December 2014, using the search terms ‘neuropathy’, ‘chemotherapy’, and ‘neurotoxicity’.

CIPN: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies; GM1: Monosialotetrahexosylganglioside.

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

Table 3. Pre-clinical studies in the treatment of CIPN.

Compound/ intervention	Category	Anticancer drug	Dose compound	Results	Ref.
Duloxetine	Antidepressants	Oxaliplatin	2.5 mg/kg intraperitoneal	Decrease of cold hypersensitivity	[21]
Ethosuximide	Anticonvulsants	Paditaxel Vincristine	100 – 450 mg/kg intraperitoneal	Decrease of CIPN	[30]
Lidocaine	Anti-arrhythmic Anesthetic local	Oxaliplatin	3 mg/kg intravenous	Decrease of cold allodynia	[34,35]
Morphine	Opioids	Oxaliplatin Vincristine	4 - 10 mg/kg intravenous intraperitoneal	Decrease of cold hypersensitivity & allodynia	[34,35,38] [36]
Fentanyl	Opioids	Cisplatin	0.2 mg/kg intraperitoneal	Decrease of mechanical allodynia	[39]
Oxycodone	Opioids	Vincristine	0.33 mg/kg intraperitoneal	Decrease of CIPN	[40]
Tramadol	Opioids	Oxaliplatin	10 – 20 mg/kg subcutaneous	Decrease of cold hypersensitivity	[38]
LPP1	Ion channel modulator	Oxaliplatin	10 mg/kg intraperitoneal	Decrease of cold and tactile allodynia	[64]
Ivabradine	Ion channel modulator	Oxaliplatin	3 mg/kg intraperitoneal	Decrease of cold allodynia	[63]
HC-030031	Ion channel modulator	Oxaliplatin	100 mg/kg intraperitoneal	Decrease of cold allodynia	[63]
α -lipoic acid	Ion channel modulator	Bortezomib Oxaliplatin	100 mg/kg intraperitoneal	Decrease of global hypersensitivity	[65]
Capsazepine	Ion channel modulator	Oxaliplatin	10 – 30 mg/kg intraperitoneal	Decrease of cold allodynia	[66]
Tetrodotoxin	Ion channel modulator	Vincristine	8 μ g/kg	Decrease of allodynia	[67]
Dextromethorphan	Glutamate related strategy	Vincristine	94 μ mol/kg (ED ₅₀) oral gavage	Analgesic effect	[74]
Deficient polyamine diet	Glutamate related strategy	Oxaliplatin	Food <i>ad libitum</i>	Prevention of cold and mechanical allodynia	[78]
Selenium	Antioxidant	Cisplatin	3 mg/kg/day oral gavage	Decrease of CIPN	[70]
Quercetin/rutin	Antioxidant	Oxaliplatin	25 – 100 mg/kg intraperitoneal	Decrease of CIPN	[68]
Curcumin	Antioxidant	Vincristine	10, 15, 30 – 60 mg/ kg oral gavage	Improve of thermal hyperalgesia, thermal allodynia, mechanical hyperalgesia and functional loss	[71]
WIN55,212-2/AM1710	Cannabinoids	Paditaxel	0.5 mg/kg 3.2 mg/kg subcutaneous	Decrease of CIPN	[88]
Cannabidiol	Cannabinoids	Paditaxel	2.5 – 10 mg/kg intraperitoneal	Decrease of mechanical sensitivity	[89]
URB597	Cannabinoids	Cisplatin	9 μ g intraplantar	Decrease of mechanical allodynia	[90]
Minocycline	Antibiotic Immunomodulator	Paclitaxel	1 - 10 nmol intrathecal	Decrease of thermal hyperalgesia	[56]
Olesoxime	Mitochondrial modulator	Vincristine Oxaliplatin Paclitaxel	3 - 300 mg/kg/day oral gavage	Decrease of mechanical allodynia	[84-86]

CIPN: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies; LPP1: 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one.

lacosamide, modulate voltage-gated sodium channels (Nav) by enhancing slow inactivating states [24]. To date, carbamazepine [25], oxcarbazepine [26], and lamotrigine [27] have failed to demonstrate any efficacy against CIPN. In addition, a

moderate recommendation against lamotrigine for the treatment of established CIPN has been made because of limited evidence of efficacy and risk of Stevens-Johnson rash [12]. No ongoing clinical study is assessing the effect of lacosamide

L. Poupon *et al.*

Table 4. Current clinical trials in the treatment of CIPN.

Compound/ intervention	Category	Agents	Primary endpoint	Main ID
<i>Ongoing (active recruiting, active not recruiting, not yet recruiting, authorized)</i>				
Dextromethorphan	Analgesic	Taxanes, platinum	Pain intensity (NRS)	NCT02271893
Tetradotoxin	Analgesic	Taxanes, platinum	Pain intensity	NCT01655823
Topical gel (Baclofen, amitriptyline and ketamine)	Analgesic	Taxanes, platinum, vinca- alkaloids, proteasome inhibitors	Severity of neuropathy (EORTC QLQ-CIPN20)	NCT00516503
Topical menthol	Analgesic	Taxanes, oxaliplatin	Neuropathic pain (BPI)	NCT01855607
Ethosuximide	Anticonvulsant	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	Pain intensity (NRS)	NCT01278004
Gabapentin	Anticonvulsant	Vincristine	Daily total dose of oral morphine (mg/kg/day)	NCT01506453
Duloxetine	Antidepressant	Vincristine, paclitaxel, docetaxel, bortezomib, oxaliplatin	Numbness and pain (VAS)	JPRN-UMIN000011554
Olesoxime	cholesterol-like compound	Taxanes	Percentage of responders (decrease of 50% of neuropathic pain severity)	EUCTR2008-001218-26-FR
Vitamin B12	Neuroprotectant	Vincristine, paclitaxel, docetaxel, bortezomib, oxaliplatin	Numbness and pain (VAS)	JPRN-UMIN000011554

Trials were collated from PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (<http://apps.who.int/trialssearch/>) on 3 December 2014, using the search terms ‘neuropathy,’ ‘chemotherapy,’ and ‘neurotoxicity.’

BPI: Brief pain inventory; CIPN: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies; NRS: Numeric rating scale; VAS: Visual analogue scale.

on CIPN, but this anticonvulsant agent prevented vincristine-induced cold allodynia in rats [28] and clinical studies have shown a reduction of neuropathic pain in diabetic patients [29,30]. Ethosuximide, a T-type Cav blocker, has been shown to be effective in reversing paclitaxel-, oxaliplatin-, and vincristine-induced painful peripheral neuropathy in rats [31,32], and a clinical study is currently assessing the curative effect of ethosuximide on CIPN (taxanes, platinum salts, vinca-alkaloids; Table 4).

2.2 Topical agents

Although topical agents were recently recommended for peripheral neuropathic pain [14], few of these compounds have been tested in clinical trials on CIPN patients. In a large ($n = 208$) double-blind, placebo-controlled trial, topical gel containing baclofen (10 mg), amitriptyline (40 mg), and ketamine (20 mg) had little or no effect on CIPN patients [33]. However, in a pilot study, the application of topical 1% menthol (transient receptor potential M8 agonist) cream twice daily improved pain symptoms in a patient suffering from neuropathic pain (including 69% CIPN and 20% scar pain) [34]. Based on its activity in neuropathic pain, topical lidocaine can be offered for the treatment of CIPN if the site of pain is limited [11]. No assessment of topical agents has been performed in preclinical studies, but intraperitoneal lidocaine injections in rat models of CIPN improved cold allodynia induced by single and repeated administrations of oxaliplatin [35,36] and tactile allodynia induced by vincristine [37]. Finally, no clinical trial is currently assessing topical lidocaine in CIPN.

2.3 Opioids

The efficacy and safety of opioids for CIPN has rarely been investigated, although opioid analgesics have shown efficacy in several high-quality randomized clinical trials involving patients with different types of neuropathic pain (for a review, see Dworkin *et al.* [38]). In animals, morphine tends to inhibit oxaliplatin-induced chronic and subacute cold hypersensitivity and allodynia [35,39]. Fentanyl alleviates cisplatin-induced mechanical allodynia but remains ineffective in oxaliplatin-induced cold allodynia (intraplantar administration of platinum salts) [40]. Oxycodone and morphine are effective in vincristine-induced neuropathic pain [37,41]. In two recent clinical trials, oxycodone (controlled release) attenuated the severity of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, while FOLFOX (5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin) chemotherapy [42] was extended and decreased pain symptoms associated with bortezomib-induced peripheral neuropathy [43]. These results appear to support the use of opioids in first-line therapy for immediate relief at the same time as the therapeutic adaptation of antidepressants and anticonvulsants [38]. Nevertheless, as a result of concerns regarding their long-term safety, opioids are not recommended for routine first-line use and should generally be reserved for patients who do not respond to first-line and second-line medications [38]. Tramadol, a mu receptor agonist and reuptake of serotonin and norepinephrine inhibitor, has been shown to be effective in animal models of acute oxaliplatin-induced neuropathy [39], and tramadol/acetaminophen combination tablets have been shown to be effective in the management of oxaliplatin-induced painful neuropathy in humans [44].

3. New strategies for preventing and treating CIPN

In parallel with the empirical strategy mostly based on the known analgesic properties for neuropathic pain of the drugs cited above, other strategies resulting from better understanding of the pathophysiology of CIPN are now being developed.

Chemotherapeutic agents cross the blood-brain barrier poorly and have been found to accumulate in the DRG and peripheral nerves [45]. Activation of innate immunity in the DRG appears to be a key early event in the initiation of CIPN [46,47]. Moreover, modulation of ion channel expression and/or function triggers changes in intracellular calcium that, together with mitochondrial damage, lead to the release of free radicals [48] which are cytotoxic to axons and neuronal cell bodies [49]. Although microglial activation has been observed in the DRG of animals treated with paclitaxel [50], microglial activation seems to be absent at the central level whatever the chemotherapeutic drug considered [51,52]. On the contrary, spinal astrocytes appear to play a more important role than microglia in the generation of chronic neuropathic pain in bortezomib and oxaliplatin [51,52]. At the spinal level, a global state of glutamate excitotoxicity has also been reported [53]. Based on these observations, multiple therapeutic strategies to prevent or treat CIPN have been investigated and recent reports from preclinical studies have revealed new therapeutic approaches (Table 3).

3.1 Inflammatory and immune system modulating drugs

Inflammatory cascade activation, proinflammatory cytokine upregulation, and neuro-immune communication pathways play essential roles in the initiation and progression of CIPN [54]. Minocycline, a metalloproteinase 3 inhibitor [55], has been shown to prevent the development of CIPN symptoms without any sign of microglial activation [51,56], suggesting that it may act through global anti-inflammatory mechanisms. Minocycline was effective against thermal hyperalgesia associated with paclitaxel-induced neuropathy [57]. Currently, two clinical studies are assessing the preventive effect of minocycline on CIPN (Table 5). Putative glial activation inhibitors have also been shown to decrease CIPN in animal models. Ibudilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor and macrophage migration inhibitory factor inhibitor, is efficacious in preventing the onset of mechanical allodynia and attenuating mechanical allodynia in a paclitaxel-treated rat model [58]. In an animal model of vincristine-induced peripheral neuropathy, propentofylline, a phosphodiesterase 3 inhibitor, has been shown to reduce neuropathic pain with a decrease of the spinal microglial and astrocytic activation [59].

3.2 Modulators of ion channels

Some data suggest that the role of oxidative stress in CIPN involves the ion channel Transient receptor potential ankyrin

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

1 (TRPA1), which is a sensor of reactive oxygen species [60]. The same authors demonstrated *in vivo* that HC-030031, a TRPA1 antagonist, reduces acute oxaliplatin-induced pain symptoms in mice. The neurotoxic effect of several anticancer drugs was also shown to be mediated by their action on different ion channel functions [61,62] and expression [63,64]. Given these data and their role in neuronal functions in pain processing, in neuroprotection, and so on, ionic channels represent interesting putative therapeutic targets for the prevention or treatment of CIPN.

Inhibitors of transient receptor potential (TRP), such as the TRPV1 and TRPA1 blocker LPP1 (3-[4-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one) attenuated cold and tactile allodynia in oxaliplatin (single injection) and only tactile allodynia in paclitaxel-treated mice (single injection) [65]. Ivabradine (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN) blocker) and HC-030031 (TRPA1 blocker) improved cold allodynia induced by a single injection of oxaliplatin [60,64]. Moreover, HC-030031 and α -lipoic acid (antioxidant and T-type calcium channel (Cav 3.2) blocker) completely prevented bortezomib- and oxaliplatin-evoked hypersensitivity in animal models (single injection) [66]. Peak cold allodynia induced by a single injection of oxaliplatin was inhibited by capsaizepine (TRPM8 and TRPV1 blocker), but not by 5-iodoresiniferatoxin (TRPV1 blocker) [67]. Currently, there are no ongoing clinical studies to assess the effect of these drugs on CIPN.

Tetrodotoxin (TTX), a potent neurotoxin, is known to inhibit the firing of action potentials in nerves by binding to the Nav channels in neurons and blocking the influx of sodium ions into neurons. Low doses of TTX can be useful to prevent and treat paclitaxel-induced neuropathic pain, and TTX-sensitive subtypes of sodium channels are known to play a role in the pathogenesis of CIPN [68], but systemic TTX produced no significant reduction of allodynia in an animal model of vincristine-induced neuropathy [37]. Currently, only one clinical study is assessing the preventive and curative effects of these ion channel modulators (TTX) on CIPN (Tables 4 and 5). Interestingly, in cancer patient, TTX may potentially relieve moderate-to-severe cancer pain not related to CIPN [69].

3.3 Antioxidants

For several years, oxidative stress and neuronal damage have been identified as being involved in the development and maintenance of CIPN [7,70]. Treatments with antioxidants have been shown to reduce sensory hypersensitivity related to CIPN in animals [48,71].

Selenium has been shown to prevent neurotoxicity in rats. Selenium-treated rats had greater nerve conduction velocity, amplitude of compound action potential, and a larger number of axons compared to a control group [72].

Quercetin and rutin, two antioxidant flavonoids, were able to prevent mechanical and thermal nociceptive hypersensitivity in a mouse model of chronic oxaliplatin-induced

L. Poupon et al.

Table 5. Current clinical trials in the prevention of CIPN.

Compound/ intervention	Category	Agents	Primary endpoint	Main ID
<i>Ongoing (active recruiting, active not recruiting, not yet recruiting, authorized)</i>				
Minocycline	Antibiotic	Bortezomib	Touch detection thresholds	NCT01283997
		Paclitaxel	Quality of Life	NCT02297412
Pregabalin	Anticonvulsant	Oxaliplatin, paclitaxel	Incidence of CIPN	JPRN-UMIN000006421
Venlafaxine	Antidepressant	Oxaliplatin	Severity of neuropathy (EORTC QLQ-CIPN20)	NCT01611155
N-acetylcysteine	Antioxidant	Platinum	Severity of neuropathy (PNP)	NTR1046
Acetyl-L-carnitine	Neuroprotectant	Taxanes, platinum	Severity of neuropathy (NCI-CTC)	EUCTR2005-000004-13-BE
Ginger	Neuroprotectant	Paclitaxel, carboplatin	Incidence and severity of neuropathy (TNS)	IRCT2013121415780N1
Glutamine	Neuroprotectant	Paclitaxel	Severity of neuropathy	NCT00195013
Omega-3 Fatty Acid + vitamin D3	Neuroprotectant	Taxanes, platinum	Percentage of responders (decrease of 50% of TNS score)	NCT02294149
Polyamine-depleted diet	Glutamate related strategy	Oxaliplatin	Cold pain thresholds	NCT01775449
Vitamin B6 + B12	Neuroprotectant	Taxanes, platinum, vinca-alkaloids	Severity of neuropathy (TNS)	NCT00659269
Calcium gluconate	Neuroprotectant	Oxaliplatin	Quantitation of intact oxaliplatin in plasma	ACTRN12611000738921
Magnesium sulfate	Neuroprotectant	Oxaliplatin, cisplatin	Severity of neuropathy (EORTC, FACT-NTX)	NCT02251977
GM1	Neuroprotectant	Oxaliplatin, cisplatin	Severity of neuropathy (TNS)	NCT01882621
Riluzole	Neuroprotectant	Oxaliplatin	Severity of neuropathy (TNS)	ACTRN12611000514909
Goshajinkigan	Phytotherapy	Taxanes	Improvement of CIPN (VAS, NRS)	JPRN-UMIN000008021 JPRN-UMIN000011332 JPRN-UMIN000010969 JPRN-UMIN000010988

Trials were collated from PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (<http://apps.who.int/trialsearch/>) on 3 December 2014, using the search terms ‘neuropathy,’ ‘chemotherapy,’ and ‘neurotoxicity.’

GM1: Monosialotetrahexosylganglioside; PNP: Peripheral neuropathy score; TNS: Total neuropathy score.

neuropathy. Moreover, these flavonoids decreased the oxidative stress process (peroxidation, induction of nitric oxide synthase, nitrotyrosine) [70].

Curcumin, an antioxidant polyphenol isolated from *Curcuma longa*, has presented interesting effects in an animal model of chronic cisplatin-, oxaliplatin-, and vincristine-induced neuropathy [73,74]. On the one hand, curcumin had no effect on the pain behavior of platinum-treated animals but improved morphological alterations of sciatic nerves [74]. On the other hand, curcumin improved thermal hyperalgesia, thermal allodynia, mechanical hyperalgesia and functional loss in vincristine-treated animals. These behavioral improvements were also associated with a decrease of oxidative stress process in the sciatic nerve [73].

3.4 Glutamate-related strategies

The involvement of glutamatergic neurotransmission has been described in the development of CIPN (cisplatin, paclitaxel, and bortezomib). The use of a glutamate production inhibitor improved nerve conduction velocity, and in some cases limited morphological and morphometric alteration

(cisplatin and bortezomib) [75]. Dextromethorphan, an NMDA receptor antagonist, had an analgesic effect in an animal model of vincristine-induced peripheral neuropathy [76]. Moreover, several clinical studies have demonstrated its analgesic effect on painful diabetic and post-herpetic neuropathies [77-79]. Currently, dextromethorphan is being tested in breast cancer patients suffering from CIPN (Table 4).

Similarly, a dietary strategy using a polyamine-deficient diet was assessed in animal models of pain. Polyamines are small polycations (spermine, spermidine, putrescine) mainly originated from diet. These polyamines can facilitate the opening of NMDA receptors containing the NR2B subunit, glutamatergic neurotransmission, and, consequently, the pain message. Therefore, decreasing the intake of polyamines should indirectly decrease the activation of NMDA receptors. Indeed, this polyamine-deficient diet totally prevented cold and mechanical allodynia in animal models of acute oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. Moreover, this polyamine-deficient diet suppressed the increase of the spinal glutamate concentration found in neuropathic rats subjected to pain [80]. A clinical trial is ongoing and assessing

the preventive effect of a polyamine-depleted diet on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (Table 5). For this study, the polyamine-depleted diet associates nutritional drinks containing all the requisite nutrients but with low polyamine content (357 nmol/l of polyamines) and meals with low polyamine content [81]. This polyamine-depleted diet has already been assessed in cancer patient and is well tolerated [81].

3.5 Neuroprotectants and cytoprotectants

Vitamin B12 and derivatives such as methylcobalamin (activated form of vitamin B12) play a key role in the normal functioning of the nervous system and may act as neuroprotectants. Methylcobalamin may limit neuropathic pain symptoms of various etiologies, improving nerve conduction and promoting the regeneration of injured nerves [82]. Two clinical studies are now being conducted to assess the preventive and curative effects of vitamin B12 on CIPN (Tables 4 and 5).

Regarding neuroprotectants, several nutritional strategies have been assessed on the assumption that diet can be related to various pathologies and modulate pain syndromes [83]. Thus, several clinical trials have assessed the preventive and curative impact of diets on CIPN symptoms. Two recent studies have shown a neuroprotective effect of ginger (6-shogaol and 6-dehydrogingerone) *in vitro* and *in vivo* in an animal model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide [84,85]. Indeed, this is the first time that this novel mechanism of 6-dehydrogingerone has been shown to be an Nrf2 (nuclear factor (erythroid 2)-related factor 2) activator against oxidative injury. Also, 6-shogaol showed significant neuroprotective effects *in vivo* on transient global ischemia via the inhibition of microglia. These results suggest that ginger is an effective neuroprotective agent for treating neurodegenerative diseases like CIPN. Nevertheless, the effect of ginger should be assessed and confirmed in animal models of CIPN. Currently, one clinical study is assessing the preventive effect of ginger on CIPN (Table 5).

Olesoxime, a cholesterol-oxime compound, has neuroprotective and pro-regenerative effects through mitochondrial targets [86]. In animal models, olesoxime reversed mechanical allodynia induced by vincristine [87], and mechanical allodynia and hyperalgesia associated with chronic oxaliplatin- and paclitaxel-induced neuropathy [88,89]. Interestingly, olesoxime was able to prevent neuron lesions induced by microtubule-targeting drugs, such as paclitaxel and vincristine [89,90], without interacting with the cytotoxicity of microtubule-targeting drugs in a wide range of tumor cells [90]. Currently, one clinical study is assessing the curative effect of olesoxime on CIPN (Table 4).

3.6 Cannabinoids

Cannabinoid agonists, WIN55,212-2 and AM1710, have recently shown neuroprotective and antinociceptive actions on paclitaxel-induced neuropathy in rats [91]. Other data suggest that the non-psychoactive cannabinoid, cannabidiol

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

(CBD), protects against paclitaxel-induced neurotoxicity mediated in part by the 5-HT(1A) receptor system [92]. Another study showed that allodynia produced by cisplatin treatment was associated with the sensitization of cutaneous nociceptors and that the intraplantar administration of the fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, attenuated the sensitization of C-fiber nociceptors by reducing spontaneous activity, increasing mechanical response thresholds, and decreasing evoked responses to suprathreshold mechanical stimulation. Co-treatment with CB1 (AM281) or CB2 (AM630) receptor antagonists showed that the effect of URB597 was mediated primarily by CB1 receptors [93]. Currently, there are no ongoing clinical studies to assess these drugs on CIPN.

4. Conclusion

In conclusion, minimizing CIPN remains a major issue in oncology because so far no strategy has been shown to be really effective. Regarding adjuvant chemotherapy, the neurotoxicity of anticancer drugs can be responsible for a decrease in health-related quality of life. As for palliative chemotherapy, this neurotoxicity can compel the oncologist to decrease and even stop chemotherapy, with an unknown effect on patient survival. As these neurotoxic drugs are used in the main solid cancers, such as breast cancer (taxanes), colorectal cancer (oxaliplatin) and lung cancer (taxanes and cisplatin), these CIPN affect a very large population of cancer patients. Finally, these CIPN can be a remaining adverse effect in a large population of cancer survivors (e.g., breast and colorectal cancers).

5. Expert opinion

If we consider the large number of preclinical and clinical studies performed up to now, the recent meta-analysis by Hershman *et al.* is quite disconcerting, as it seems that hardly any drug can be proposed unequivocally to prevent or treat CIPN, except duloxetine [12]. Consequently, there is a strong discrepancy between the optimistic results of animal studies and the poor outcome in clinical trials. We have to admit that the methodology of both animal and clinical studies lead to certain biases and raise issues. We propose to discuss some of these points.

The choice of good primary outcome is essential in both animal and human trials. A large majority of animal studies assessed the efficacy of anti-CIPN drugs using nociceptive outcomes such as allodynia and hyperalgesia through tests of stimulus-evoked pain. Likewise, in clinical trials, the efficacy of anti-CIPN drugs is commonly assessed through pain levels (questionnaires or the visual analogic scale). But pain is clearly not the main or unique debilitating symptom for these patients. In the case of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (oxaliplatin cumulative doses of 790 - 2300 mg), 80 - 90% of patients had abnormal quantitative sensory

L. Poupon et al.

thresholds, 60 – 80% distal numbness, and only 5 – 20% neuropathic pain [16]. Consequently, pain is not the main outcome that should be measured in both animals and humans. From the preclinical viewpoint, animal studies should assess a combination of sensorimotor and nociceptive symptoms which may better reflect the neurological deficits found in humans. Then, in clinical trials, the main outcome should be used to assess the plurality of neuropathy symptoms through specific CIPN questionnaires (e.g., PNS, FACT/GOG-NTX12, EORTC QLQ-CIPN20, CIPNS-32, PNQ, APN) instead of focusing on pain scores [94]. These specific CIPN questionnaires assess numerous symptoms of neuropathy syndromes including pain, numbness, thermal sensitivity, motor, and autonomic dysfunctions [94]. Likewise, CIPNs are frequently assessed in clinical trials using the neuropathy grading scale of the NCI-CTCAE (National Cancer Institute – Common Terminology Criteria for Adverse Events). However, the grading of adverse effects using the NCI-CTCAE scale is relevant for measurable outcomes, such as hematological toxicity, but a quantitative assessment of the CIPN grade is limited in scope since many CIPN symptoms are subjective and only specific CIPN questionnaires are able to assess the plurality of these symptoms [95].

The principal aim of anti-CIPN drugs is to prevent or reduce CIPN in cancer patients. To be effective, and besides their anti-neuropathic effect, these drugs must preserve the antineoplastic effect of the chemotherapy regimen administered at the same time. Consequently, *in vitro* and *in vivo* studies should also assess the effects of anti-CIPN drugs on the viability of cancer cells and the efficacy of anticancer drugs before clinical trials are conducted. Both positive and negative interactions between chemotherapy and anti-CIPN drugs should be monitored in clinical trials. For example, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ infusions have been assessed in the prevention of oxaliplatin-induced neuropathy. The first results were encouraging, with a reduction of the incidence and intensity of acute oxaliplatin-induced symptoms and a delay of cumulative neuropathy [96]. Afterward, the CONcEPT trial (Combined Oxaliplatin Neurotoxicity Prevention Trial) was prematurely terminated in 2007 as the independent data-monitoring committee found that the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ infusion reduced the response rate of the chemotherapy regimen. These intermediate results were very worrying because they underlined that a preventive strategy to limit CIPN could interfere with chemotherapy efficacy. Fortunately, these results were invalidated following a new analysis [97]. Finally, a Phase III randomized,

placebo-controlled, double-blind study found no effect of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ infusion in oxaliplatin-treated patients [98].

Many of anti-CIPN drugs are associated with significant adverse drug reactions, thereby decreasing their benefit/risk ratio [11] and efforts should be made to improve the safety of these drugs. Consequently, the adverse effects of anti-CIPN drugs must be monitored systematically throughout preclinical and clinical studies.

To assess anti-neuropathic drugs, the choice of animal models is also essential. It is noteworthy that the majority of preclinical studies are performed using healthy animals, whereas it has been shown that before chemotherapy, cancer patients can have neuropathic symptoms and abnormal quantitative sensory thresholds [16]. Moreover, each neurotoxic anticancer drug has a specific pathophysiology [14] and consequently, one can probably talk about several different CIPNs. So these CIPNs may respond differently to anti-neuropathic drugs and the assessment of anti-neuropathic drugs should be done on different types of CIPNs involving different anticancer drugs.

The methodological quality of recent clinical trials is also questionable and heterogeneous. Consequently, it is difficult to conclude unequivocally on the beneficial effects of anti-neuropathic drugs [12]. Guidelines on CIPN assessment should be established, as has been done for neuropathic pain [99], to reinforce the robustness of clinical trials assessing anti-CIPN drugs. In the case of clinical trials, studies should respect a double-blind, randomized, placebo-controlled design, with an ‘in intention to treat’ analysis, and follow guidelines such as CONSORT 2010 [100]. Preclinical studies should conform to the ARRIVE guidelines [101].

Finally, several animal models have been designed to date and have allowed better comprehension of the complexity of CIPN [102]. We are now convinced that both preclinical and clinical studies will continue to improve together and will provide several answers to the issue of CIPN, to the benefit of patient quality of life.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- ▶1. Balayssac D, Ferrier J, Descneur J, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10(3):407-17
- ▶2. Vahdar LT, Garcia AA, Vogel C, et al. Eribulin mesylate versus ixabepilone in patients with metastatic breast cancer: a randomized Phase II study comparing the incidence of peripheral neuropathy. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140(2):341-51
3. Lewis MA, Zhao F, Jones D, et al. Neuropathic symptoms and their risk factors in medical oncology outpatients with colorectal versus breast, lung or prostate cancer: results from a prospective multicenter study. *J Pain Symptom Manage* 2015. [Epub ahead of print]
- ▶4. Seretny M, Currie GL, Sena ES, et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 2014;155(12):2461-70
- ▶5. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27(19):3109-16
- ▶6. Yothers G, O'Connell MJ, Allegri CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011;29(28):3768-74
- ▶7. Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A, Cavaletti G. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci Lett* 2015;596:90-107
- ▶8. Hong JS, Tian J, Wu LH. The influence of chemotherapy-induced neurotoxicity on psychological distress and sleep disturbance in cancer patients. *Curr Oncol Tor Ont* 2014;21(4):174-80
- ▶9. Mols F, Beijers T, Vreugdenhil G, van de Poll-Franse L. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review. *Support Care Cancer* 2014;22(8):2261-9
- ▶10. Pike CT, Birnbaum HG, Muehlenbein CE, et al. Healthcare costs and workloss burden of patients with chemotherapy-associated peripheral neuropathy in breast, ovarian, head and neck, and nonsmall cell lung cancer. *Chemother Res Pract* 2012;2012:913848
- ▶11. Kim JH, Dougherty PM, Abdi S. Basic science and clinical management of painful and non-painful chemotherapy-related neuropathy. *Gynecol Oncol* 2015;136(3):453-9
- ▶12. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2014;32(18):1941-67
- **Of considerable interest, very important review demonstrating that there is no gold standard to minimize CIPN, except duloxetine.**
13. Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;3:CD005228
- ▶14. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2015;14(2):162-73
- ▶15. Wolf SL, Barton DL, Qin R, et al. The relationship between numbness, tingling, and shooting/burning pain in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) as measured by the EORTC QLQ-CIPN20 instrument, N06CA. *Support Care Cancer* 2012;20(3):625-32
- ▶16. De Carvalho Barbosa M, Kosturakis AK, Eng C, et al. A quantitative sensory analysis of peripheral neuropathy in colorectal cancer and its exacerbation by oxaliplatin chemotherapy. *Cancer Res* 2014;74(21):5955-62
- ▶17. Kautio A-L, Haanpää M, Leminen A. Amitriptyline in the prevention of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. *Anticancer Res* 2009;29(7):2601-6
- ▶18. Hammack JE, Michalak JC, Loprinzi CL, et al. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy. *Pain* 2002;98(1-2):195-203
- ▶19. Kautio A-L, Haanpää M, Saarto T, Kalso E. Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. *J Pain Symptom Manage* 2008;35(1):31-9
- ▶20. Durand JP, Deplanque G, Montheil V, et al. Efficacy of venlafaxine for the prevention and relief of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: results of EFFOX, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Ann Oncol* 2012;23(1):200-5
- ▶21. Smith EML, Pang H, Cirrincione C, et al. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309(13):1359-67
- **Of interest, one of the first robust publications demonstrating the efficacy of duloxetine in CIPN.**
- ▶22. Balayssac D, Ling B, Ferrier J, et al. Assessment of thermal sensitivity in rats using the thermal place preference test: description and application in the study of oxaliplatin-induced acute thermal hypersensitivity and inflammatory pain models. *Behav Pharmacol* 2014;25(2):99-111
- ▶23. Rao RD, Michalak JC, Sloan JA, et al. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). *Cancer* 2007;110(9):2110-18
- ▶24. Curia G, Biagini G, Penuca E, Avoli M. Lacosamide: a new approach to target voltage-gated sodium currents in epileptic disorders. *CNS Drugs* 2009;23(7):555-68
- ▶25. Von Delius S, Eckel F, Wagenpfeil S, et al. Carbamazepine for prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with advanced colorectal cancer: final results of a randomised, controlled, multicenter phase II study. *Invest New Drugs* 2007;25(2):173-80
- ▶26. Argyriou AA, Chroni E, Polychronopoulos P, et al. Efficacy of oxcarbazepine for prophylaxis against

L. Poupon et al.

- cumulative oxaliplatin-induced neuropathy. *Neurology* 2006;67(12):2253-5
- ▶27. Rao RD, Flynn PJ, Sloan JA, et al. Efficacy of lamotrigine in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial, N01C3. *Cancer* 2008;112(12):2802-8
- ▶28. Geis C, Beyreuther BK, Stöhr T, Sommer C. Lacosamide has protective disease modifying properties in experimental vincristine neuropathy. *Neuropharmacology* 2011;61(4):600-7
- ▶29. Ziegler D, Hidvégi T, Gurieva I, et al. Efficacy and safety of lacosamide in painful diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2010;33(4):839-41
- ▶30. Wymer JP, Simpson J, Sen D, Bongardt S; Lacosamide SP742 Study Group. Efficacy and safety of lacosamide in diabetic neuropathic pain: an 18-week double-blind placebo-controlled trial of fixed-dose regimens. *Clin J Pain* 2009;25(5):376-85
- ▶31. Flatters SJJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109(1-2):150-61
- ▶32. Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, et al. L-type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain* 2012;8:7
- ▶33. Barton DL, Wos EJ, Qin R, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCCTG trial N06CA. *Support Care Cancer* 2011;19(6):833-41
34. Fallon MT, Storey DJ, Krishan A, et al. Cancer treatment-related neuropathic pain: proof of concept study with menthol-a TRPM8 agonist. *Support Care Cancer* 2015. [Epub ahead of print]
- ▶35. Ling B, Coudoré F, Decalonne L, et al. Comparative antiallodynic activity of morphine, pregabalin and lidocaine in a rat model of neuropathic pain produced by one oxaliplatin injection. *Neuropharmacology* 2008;55(5):724-8
- ▶36. Ling B, Authier N, Balyassac D, et al. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 2007;128(3):225-34
- ▶37. Nozaki-Taguchi N, Chaplan SR, Higuera ES, et al. Vincristine-induced allodynia in the rat. *Pain* 2001;93(1):69-76
- ▶38. Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* 2010;85(3 Suppl):S3-14
- ▶39. Zhao M, Nakamura S, Miyake T, et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *J Pharmacol Sci* 2014;124(4):514-17
- ▶40. Deuis JR, Lim YL, Rodrigues de Sousa S, et al. Analgesic effects of clinically used compounds in novel mouse models of polyneuropathy induced by oxaliplatin and cisplatin. *Neuro-Oncol* 2014;16(10):1324-32
- ▶41. Thibault K, Calvino B, Rivals I, et al. Molecular mechanisms underlying the enhanced analgesic effect of oxycodone compared to morphine in chemotherapy-induced neuropathic pain. *PLoS One* 2014;9(3):e91297
- ▶42. Nagashima M, Ooshiro M, Moriyama A, et al. Efficacy and tolerability of controlled-release oxycodone for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the extension of FOLFOX therapy in advanced colorectal cancer patients. *Support Care Cancer* 2014;22(6):1579-84
- ▶43. Carloni C, Brunetti GA, Federico V, et al. Controlled-release oxycodone for the treatment of bortezomib-induced neuropathic pain in patients with multiple myeloma. *Support Care Cancer* 2012;20(10):2621-6
- ▶44. Liu Y-C, Wang W-S. Human mu-opioid receptor gene A118G polymorphism predicts the efficacy of tramadol/acetaminophen combination tablets (ultract) in oxaliplatin-induced painful neuropathy. *Cancer* 2012;118(6):1718-25
- ▶45. Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJ, et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J Clin Oncol* 1992;10(5):795-803
- ▶46. Zhang H, Boyette-Davis JA, Kosturalis AK, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptor CCR2 in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *J Pain* 2013;14(10):1031-44
- ▶47. Li Y, Zhang Z, Kim H-S, et al. CD31 (+) cell transplantation promotes recovery from peripheral neuropathy. *Mol Cell Neurosci* 2014;62:60-7
- ▶48. Joseph EK, Chen X, Bogen O, Levine JD. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain* 2008;9(5):463-72
- ▶49. Massey RL, Kim HK, Abdi S. Brief review: chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy (CIPPN): current status and future directions. *Can J Anaesth* 2014;61(8):754-62
- ▶50. Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, et al. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Res* 2007;1168:46-59
- ▶51. Zhang H, Yoon S-Y, Zhang H, Dougherty PM. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of Paclitaxel-induced painful neuropathy. *J Pain* 2012;13(3):293-303
- ▶52. Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2014;274:308-17
- ▶53. Cata JP, Weng H-R, Chen J-H, Dougherty PM. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. *Neuroscience* 2006;138(1):329-38
- ▶54. Wang X-M, Lehly TJ, Bredl JM, Dorsey SG. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine* 2012;59(1):3-9
- ▶55. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Minoicycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of

Minimizing chemotherapy-induced peripheral neuropathy

- neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2007;560(2-3):142-9
- ▶56. Boyette-Davis J, Xin W, Zhang H, Dougherty PM. Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline. *Pain* 2011;152(2):308-13
- ▶57. Pevida M, Lastra A, Hidalgo A, et al. Spinal CCL2 and microglial activation are involved in paclitaxel-evoked cold hyperalgesia. *Brain Res Bull* 2013;95:21-7
- ▶58. Ledebor A, Hutchinson MR, Wadkins LR, Johnson KW. Ibudilast (AV-411). A new class therapeutic candidate for neuropathic pain and opioid withdrawal syndromes. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16(7):935-50
- ▶59. Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA. Propentofylline attenuates vincristine-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neurosci Lett* 2006;400(3):258-61
- ▶60. Nassini R, Gees M, Harrison S, et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 2011;152(7):1621-31
- ▶61. Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 2001;85(5):2293-7
- ▶62. Kagiava A, Tsingotjidou A, Emmanouilides C, Theophilidis G. The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. *Neurotoxicology* 2008;29(6):1100-6
- ▶63. Zhang H, Dougherty PM. Enhanced excitability of primary sensory neurons and altered gene expression of neuronal ion channels in dorsal root ganglion in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Anesthesiology* 2014;120(6):1463-75
- ▶64. Descœur J, Pereira V, Pizzoccaro A, et al. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *Embo Mol Med* 2011;3(5):266-78
- ▶65. Sałat K, Gros A, Wysła E, et al. Antiallodymic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;122:173-81
- ▶66. Trevisan G, Materazzi S, Fusi C, et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res* 2013;73(10):3120-31
- ▶67. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 2009;458(2):93-5
- ▶68. Nieto FR, Entrena JM, Cerdán CM, et al. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain* 2008;137(3):520-31
- ▶69. Hagen NA, du Souch P, Lapointe B, et al. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: a randomized, double blind, parallel design multicenter study. *J Pain Symptom Manage* 2008;35(4):420-9
- ▶70. Azevedo MI, Pereira AF, Nogueira RB, et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol Pain* 2013;9:53
- ▶71. Barrière DA, Rioussel J, Chanteranne D, et al. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. *Pain* 2012;153(3):553-61
- ▶72. Erken HA, Koç ER, Yazıcı H, et al. Selenium partially prevents cisplatin-induced neurotoxicity: a preliminary study. *Neurotoxicology* 2014;42:71-5
73. Babu A, Prasanth KG, Balaji B. Effect of curcumin in mice model of vincristine-induced neuropathy. *Pharm Biol* 2014;1-11
- ▶74. Al Moundhri MS, Al-Salam S, Al Mahrouqee A, et al. The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies. *J Med Toxicol Off* 2013;9(1):25-33
- ▶75. Carozzi VA, Chiorazzi A, Canta A, et al. Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotox Res* 2010;17(4):380-91
- ▶76. Lynch JJ, Wade CL, Zhong CM, et al. Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *Pain* 2004;110(1-2):56-63
- ▶77. Zhou H-Y, Chen S-R, Pan H-L. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011;4(3):379-88
- ▶78. Carlsson KC, Hoem NO, Moberg ER, Mathisen LC. Analgesic effect of dextromethorphan in neuropathic pain. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48(3):328-36
- ▶79. Sang CN, Booher S, Gilron I, et al. Dextromethorphan and memantine in painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: efficacy and dose-response trials. *Anesthesiology* 2002;96(5):1053-61
- ▶80. Ferrier J, Bayer-Robert M, Pereira B, et al. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. *PLoS ONE* 2013;8(10):e77828
- ▶81. Balayssac D, Ferrier J, Pereira B, et al. Prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by a polyamine-reduced diet-NEUROXAPOL: protocol of a prospective, randomised, controlled, single-blind and monocentric trial. *BMJ Open* 2015;5(4):e007479
- ▶82. Zhang M, Han W, Hu S, Xu H. Methylcobalamin: a potential vitamin of pain killer. *Neural Plast* 2013;2013:424651
- ▶83. Bell RF, Borzan J, Kalso E, Simonnet G. Food, pain, and drugs: does it matter what pain patients eat? *Pain* 2012;153(10):1993-6
- ▶84. Yao J, Ge C, Duan D, et al. Activation of the phase II enzymes for neuroprotection by ginger active constituent 6-dehydrogingerone in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 2014;62(24):5507-18
- ▶85. Ha SK, Moon E, Ju MS, et al. 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: a new approach to neuroprotection. *Neuropharmacology* 2012;63(2):211-23
- ▶86. Bordet T, Buissson B, Michaud M, et al. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, cime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic

L. Poupon et al.

- lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322(2):709-20
- ▶87. Bordet T, Buisson B, Michaud M, et al. Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326(2):623-32
- ▶88. Xiao WH, Zheng H, Bennett GJ. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience* 2012;203:194-206
- ▶89. Xiao WH, Zheng FY, Bennett GJ, et al. Olesoxime (cholest-4-en-3-one, oxime): analgesic and neuroprotective effects in a rat model of painful peripheral neuropathy produced by the chemotherapeutic agent, paclitaxel. *Pain* 2009;147(1-3):202-9
- ▶90. Rovini A, Carré M, Bordet T, et al. Olesoxime prevents microtubule-targeting drug neurotoxicity: selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 2010;80(6):884-94
- ▶91. Rahn EJ, Deng L, Thaler GA, et al. Prophylactic cannabinoid administration blocks the development of paclitaxel-induced neuropathic nociception during analgesic treatment and following cessation of drug delivery. *Mol Pain* 2014;10:27
- ▶92. Ward SJ, McAllister SD, Kawamura R, et al. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT (1A) receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *Br J Pharmacol* 2014;171(3):636-45
- ▶93. Uhelski ML, Khasabova IA, Simone DA. Inhibition of anandamide hydrolysis attenuates nociceptor sensitization in a murine model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 2015;113(5):1501-10
- ▶94. Sasane M, Tencer T, French A, et al. Patient-reported outcomes in chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a review. *J Support Oncol* 2010;8(6):e15-21
- ▶95. Cavalletti G. Calcium and magnesium prophylaxis for oxaliplatin-related neurotoxicity: is it a trade-off between drug efficacy and toxicity? *Oncologist* 2011;16(12):1667-8
- ▶96. Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 1):4055-61
- ▶97. Khattak MA. Calcium and magnesium prophylaxis for oxaliplatin-related neurotoxicity: is it a trade-off between drug efficacy and toxicity? *Oncologist* 2011;16(12):1780-3
- ▶98. Loprinzi CL, Qin R, Dakhil SR, et al. Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (N08CB/Alliance). *J Clin Oncol* 2014;32(10):997-1005
- **Of interest, the last publication demonstrating that calcium and magnesium infusions have no effect on oxaliplatin-induced neuropathy.**
- ▶99. Haanpää M, Artal N, Backonja M, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011;152(1):14-27
- **Of interest the guidelines for neuropathic pain assessment.**
- ▶100. Schulz KF, Altman DG, Moher D; CONSORT Group. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med* 2010;8:18
- ▶101. Gilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1(2):94-9
- ▶102. Authier N, Balayssac D, Marchand F, et al. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics* 2009;6(4):620-9

Affiliation

Laura Poupon¹ MSc, Nicolas Kerckhove^{2,3} PhD, Julie Vein¹ PhD DVM, Sylvain Lamoine¹ MSc, Nicolas Authier^{1,4} PhD MD PharmD, Jérôme Busserolles¹ PhD & David Balayssac^{1,2} PhD PharmD
¹Author for correspondence
¹INSERM U1107, NEURO-DOL, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 28 Place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France
 Tel: +33 4 73 17 82 30;
 Fax: +33 4 73 17 82 33;
 E-mail: dbalayssac@chu-clermontferrand.fr
²CHU Clermont-Ferrand, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, 63000 Clermont-Ferrand cedex 1, France
³Institut Analgesia, Faculté de Médecine, 63000 Clermont-Ferrand cedex 1, France
⁴CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, 63000 Clermont-Ferrand cedex 1, France

ANNEXE 2: Synopsis de l'étude RILUZOX

TITRE	Évaluation de l'efficacité thérapeutique du riluzole dans la prévention des neuropathies périphériques chimio-induites (RILUZOX)
PROMOTEUR	UNICANCER
INVESTIGATEURS & CENTRES	Dr. Nicolas AUTHIER , Service de Pharmacologie, CHU Clermont Ferrand
OBJECTIFS	<p>Objectif principal Evaluation de l'efficacité préventive du riluzole sur la sévérité des symptômes des neuropathies périphériques induites par l'oxaliplatine.</p> <p>Objectifs secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> •Á Impact du riluzole sur l'incidence des neuropathies, la douleur neuropathique et la qualité de vie. •Á Impact du riluzole sur la survie sans rechute à 6 mois après la chimiothérapie. •Á Détermination de marqueurs génétiques susceptibles de prédisposer les patients au développement de neuropathies chimio-induites et à la réponse au traitement par le riluzole.
CARACTERISTIQUES DE L'ESSAI	Etude multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée versus placebo.
NOMBRE DE PATIENTS	A définir
CRITERES D'INCLUSION	<ul style="list-style-type: none"> •Á Age \geq 18 ans, •Á Homme / Femme •Á Information et consentement signé, •Á Patient débutant une chimiothérapie anticancéreuse à base d'oxaliplatine (FOLFOX, GEMOX, XELOX, CAPOX, TOMOX, TLFOX, EOF, EOX, FOLFIRINOX, bévacizumab + FOLFOX). •Á Confirmation histologique ou cytologique d'un cancer, •Á Patients affiliés au régime de la Sécurité Sociale française.
CRITERES DE NON INCLUSION	<ul style="list-style-type: none"> •Á Grossesse ou allaitement (contraception requise), •Á Neuropathie périphérique préexistante connue, •Á Antécédent de traitement par une chimiothérapie neurotoxique, •Á Antécédents médicaux et chirurgicaux jugés incompatibles avec l'étude par l'investigateur, •Á ALAT / ASAT élevées de plus de 3 fois la valeur normale, •Á Traitement par riluzole, •Á Allergie connue au riluzole, •Á Dépendance à l'alcool et/ou aux stupéfiants, •Á Troubles psychotiques, •Á Patients en période d'exclusion, ou total d'indemnités autorisées dépassé, •Á Patients bénéficiant d'une mesure de protection légale (curatelle, tutelle...).
TRAITEMENTS	Schéma posologique précis avec Riluzole (1 comprimé de 50 mg 2 fois par jour) soit par un placebo administré avec les mêmes modalités. Le traitement sera délivré à chaque cycle de chimiothérapie.

<p>CRITERES D'EVALUATION</p>	<p>Critère d'évaluation principal Evaluation de l'efficacité thérapeutique du riluzole sur la sévérité des neuropathies périphériques induites par les chimiothérapies anticancéreuses :</p> <ul style="list-style-type: none"> •Á <u>Questionnaire QLQ-CIPN20 (EORTC):</u> Le questionnaire QLQ-CIPN20 est un auto-questionnaire sur les neuropathies chimio-induites, avec 20 questions, qui a été développé pour évaluer spécifiquement l'expérience des patients vis-à-vis des symptômes et des limitations fonctionnelles liées à leur neuropathie périphérique induite par les chimiothérapies anticancéreuses. Le questionnaire QLQ-CIPN20 possède trois sous-échelles : sensorielle, motrice et autonome. Le questionnaire QLQ-CIPN20 donne une image très complète de la nature, de la fréquence et de la sévérité des neuropathies périphériques chimio-induites, ceci dans un large éventail de populations de patients en oncologie. Ce questionnaire a été testé dans un grand essai clinique international de phase IV (Lavoie Smith et al., 2013; Postma et al., 2005). <p>Critères d'évaluations secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> •Á <u>Questionnaire QLQ-CIPN20 (EORTC)</u> Voir description ci-dessus. •Á <u>Questionnaire <i>Brief Pain Inventory</i> (BPI ; Annexe)</u> Cet auto-questionnaire comprend : <ul style="list-style-type: none"> - un schéma corporel - la douleur maximale, la douleur la plus faible, la douleur habituelle des 15 derniers jours (Echelle Numérique Simple (ENS) 0 à 10), - la description du traitement antalgique en cours, - une évaluation du soulagement par une échelle de pourcentage (0 à 100%), - l'étude de l'impact de la douleur sur l'humeur, les relations avec les autres personnes, la marche, le sommeil, le travail, la joie de vivre, les loisirs, les activités en général (échelles numériques, cotation de 0 (normal) à 10 (activité impossible)). •Á <u>Questionnaire DN4 interview (annexe)</u> Le questionnaire DN4 interview est un outil de dépistage des douleurs neuropathiques. •Á <u>Questionnaire <i>Neuropathic Pain Symptoms Inventory</i> (NPSI ; annexe)</u> Le questionnaire NPSI est un auto-questionnaire spécialement conçu pour évaluer les différents symptômes de la douleur neuropathique. La version française finale du NPSI comprend 12 items qui permettent de discriminer et de quantifier cinq dimensions distinctes cliniquement pertinentes. •Á <u>L'échelle d'impression clinique globale (<i>Patient's Global Impression of Change</i>, PGIC ; annexe)</u> Le questionnaire PGIC a pour but d'évaluer de façon générale l'efficacité d'un traitement du point de vue du patient. Cette échelle consiste en 7 niveaux de descripteurs répondant à la question "Comment allez-vous ?", répartis selon 3 modalités: <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration : très, moyen, légèrement - Inchangé - Aggravé : légèrement, moyen, très. •Á <u>Questionnaire QLQ-C30 (Annexe)</u>
-------------------------------------	--

Annexe II: Synopsis de l'étude RILUZOX

	<p>L'auto-questionnaire QLQ-C30 permet d'évaluer la qualité de vie reliée à la santé des patients cancéreux participant à des essais cliniques internationaux.</p> <p>Le QLQ-C30 comprend cinq échelles fonctionnelles (physiques, activité quotidienne, cognitifs, émotionnels et sociaux), trois échelles de symptômes (fatigue, douleur, nausées et vomissements), un état de santé / échelle qualité de vie globale et un certain nombre d'éléments simples évaluant les symptômes supplémentaires fréquemment rapportés par les patients atteints de cancer (dyspnée, perte d'appétit, insomnie, constipation et diarrhée) et l'impact financier perçu de la maladie.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Questionnaire HADS (annexe)</u> <p>L'auto-questionnaire HADS (<i>Hospital Anxiety and Depression Scale</i>) est un instrument qui permet de dépister les troubles anxieux et dépressifs.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE) version 4 (annexe)</u> <p>Le NCI-CTCAE v4 est largement accepté dans la communauté de la recherche en oncologie comme l'échelle de notation de référence pour les événements indésirables. Cette échelle permettra d'évaluer la gravité de l'atteinte neuropathique, ceci dérivé en 5 grades déterminés par l'investigateur.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Survie sans rechute</u> <p>La survie sans rechute sera évaluée dans le parcours de soin habituel du patient à 6 mois après la fin de l'étude.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Evènements indésirables liés au cancer, à la chimiothérapie et au traitement étudié</u> <p>Les EI seront notifiés par l'investigateur tout au long de l'étude aux visites V2, V3, V4 et V5.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Arrêt/diminution de la chimiothérapie</u> <p>Le nombre d'arrêt/diminution du traitement chimiothérapique, ayant pour cause une neuropathie sévère, sera notifié aux visites V2 et V3.</p>
DUREE DU TRAITEMENT	<p>Traitement durant le temps complet du plan de chimiothérapie prévu. Le temps total de traitement reçu par le patient sera notifié en visite V3 (fin de chimiothérapie).</p>
CALENDRIER DE L'ETUDE	<p>La chronologie de l'essai se découpe comme suit :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 7-10 jours entre V0 (inclusion) et V1 (début de chimiothérapie / traitement), - 168 jours de traitement (selon cancer et plan de chimiothérapie) entre V1 (début de chimiothérapie) et V3 (fin de chimiothérapie), - 6 mois de suivi post-chimiothérapie découpé en 2 visites, une à 3 mois (V4) et une à 6 mois (V5, fin d'étude). <p>Les patients seront également suivis à 5 et 10 ans après la fin de leur participation à l'étude (V5) pour évaluer leur survie sans rechute.</p>

Annexe II: Synopsis de l'étude RILUZOX

Plan de CT et d'étude	Bilan inclusion	Phase de CT et explorations					
		Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4	+3 mois post-CT	+6 mois post-CT
Visites n° / Dates des visites	V0	J0 V1	J21 V2	J42	J63 V3	J153 V4	J243 V5
Critères d'inclusion / non inclusion (antécédents, traitements concomitants, histoire de la maladie....)	X						
Informations et Consentement éclairé signés	X						
Randomisation	X						
Examens Cliniques							
Examen clinique	X		X	X	X	X	X
Gravité de la neuropathie (critères CTCAE)			X	X	X	X	X
Evaluation des EI itinérant à la CT (critères CTCAE)			X	X	X		
Bilans Biologiques							
Bilan hépatique (ASAT / ALAT)	X						
Questionnaires + Autres							
Questionnaires QLQ-CIPN20, HADS et QLQ C30	X		X		X	X	X
Evaluation de la douleur par ENS (si ENS ≥ 4 → DN4, si ≥ 4 → NPSI)	X		X		X	X	X
Traitements							
Début de chaque cycle de chimiothérapie à l'hôpital		X	X	X	X		
Traitement à l'étude (pour une durée d'un cycle de CT)		X	X	X	X		
Quantification des réductions de dose de CT suite à NP sévère		X	X	X	X		

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des examens de l'étude RILUZOX

ETUDE DE L'IMPLICATION DE CANAUX IONIQUES, CIBLES MOLECULAIRES POUR LE DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX ANTALGIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA NEUROPATHIE CHIMIO-INDUITE A L'OXALIPLATINE .

La neurotoxicité de certaines chimiothérapies anticancéreuses comme l'oxaliplatine engendre des neuropathies qui se caractérisent par des dommages du système nerveux périphériques et centrales responsables de l'apparition de troubles comme des douleurs neuropathiques, des symptômes sensitifs et moteurs mais également des troubles trophiques. Les traitements actuellement disponibles sont peu efficaces pour traiter ces douleurs qu'elles soient aiguës ou chroniques. Or elles sont à l'origine d'une altération de la qualité de vie des patients et peuvent conduire à une diminution des doses de chimiothérapie utilisées voire même à l'arrêt du traitement, compromettant ainsi les chances de guérison. Il apparaît alors essentiel de poursuivre les études permettant de comprendre le mécanisme de survenue de ces douleurs et de déterminer d'éventuelles cibles pour le développement de nouveaux antalgiques.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de neuropathie aiguë induit par une unique injection d'oxaliplatine afin d'étudier les symptômes décrits en clinique au niveau de la sphère orofaciale. En effet, les symptômes périphériques avaient déjà été étudiés et l'hypothèse d'un remodelage de l'expression de canaux ioniques avait été confirmée. Nous avons donc vérifié l'existence de symptômes douloureux au niveau orofacial et nous avons pu les corrélés à une surexpression des canaux HCN1 & HCN2. De plus, l'utilisation d'ivabradine (Procoralan®), antagoniste non sélectif de ces canaux, a permis de reverser l'hypersensibilité au froid à faibles doses et l'hypersensibilité mécanique lors d'utilisation à plus fortes doses.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la mise en place d'un modèle de neuropathie chronique chimio-induite à l'oxaliplatine, neuropathie qui en comparaison à la forme aiguë, s'accompagne en plus des symptômes douloureux de troubles sensitifs, moteurs et de comorbidités tel que l'anxiété et la dépression. De nombreuses propriétés du canal TREK-1 nous ont laissé penser qu'il apparaissait comme une cible intéressante pour le traitement de cette neuropathie de par son rôle connu dans la douleur, la dépression ou encore la neuroprotection. Afin de valider cette cible, nous avons donc utilisé deux approches : une approche génétique avec l'utilisation de souris KO TREK-1 et une approche pharmacologique avec l'utilisation du riluzole (Rilutek®), activateur non spécifique du canal TREK-1. Les résultats ont montré que le canal TREK-1 semblait donc bien impliqué dans l'apparition de l'ensemble des symptômes liés à la neuropathie chronique mais également que le riluzole apparaissait comme un traitement à cette neuropathie tant pour l'amélioration des symptômes douloureux que pour les troubles sensitifs, moteurs et l'amélioration de certaines comorbidités comme la dépression.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats expérimentaux a permis l'identification de nouvelles pistes pour la compréhension et le traitement des douleurs chimio-induites à l'oxaliplatine. Tout d'abord, les canaux HCN1 & HCN2 ont montré leur implication dans la neuropathie aiguë à l'oxaliplatine aussi bien pour les symptômes périphériques que pour les symptômes oraux. Le blocage de ces canaux par l'ivabradine a d'ailleurs permis de reverser particulièrement les symptômes d'hypersensibilité au froid. Egalement, le canal TREK-1 a montré un grand intérêt dans son implication dans la neuropathie chronique à l'oxaliplatine et le riluzole a montré de nombreuses propriétés intéressantes pour palier aux symptômes décrits dans cette neuropathie. Dans une perspective de recherche translationnelle, cette approche préclinique est en cours de transposition dans un protocole de recherche clinique. Un essai clinique de phase II (RILUZOX) devrait débuter prochainement afin de confirmer l'intérêt du riluzole chez des patients recevant une chimiothérapie à base d'oxaliplatine.