



HAL
open science

Douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine. Physiopathologie et approches thérapeutiques

Jeremy Ferrier

► **To cite this version:**

Jeremy Ferrier. Douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine. Physiopathologie et approches thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1PP06 . tel-01845586

HAL Id: tel-01845586

<https://theses.hal.science/tel-01845586>

Submitted on 20 Jul 2018

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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

UNIVERSITÉ D'Auvergne

Année 2013

N° d'ordre :

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Neurosciences

Soutenue le Jeudi 03 octobre 2013

Jérémy FERRIER

**Douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine
Physiopathologie et approches thérapeutiques**

Président: Mr Alain Eschalier, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Membres: Mr David Balayssac, Docteur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
Mme Laurence Terrail, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Rapporteurs: Mme Sophie Pezet, Docteur, ESPCI-ParisTech, Paris.
Mr Roland Peyron, Professeur, Université Jean Monnet, Saint-Etienne

Remerciements

A Monsieur le Professeur Alain Eschalié,

Votre passion pour la recherche est un véritable moteur pour nous, et vous savez nous redonner *la niaque* quand nous en avons besoin. Vous m'avez permis de réaliser cette thèse dans votre laboratoire en vous rendant toujours disponible pour nos échanges durant ces trois années. Votre enthousiasme, l'étendue de vos connaissances et la richesse de votre raisonnement sont pour moi un modèle. Pour tout cela, soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Roland Peyron et Madame le Docteur Sophie Pezet,

Vous nous avez fait l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Merci pour toute l'attention apportée à la correction de ce manuscrit.

A Monsieur le Professeur Jacques-Philippe Moulinou,

Je vous remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury. Vous nous avez apporté votre aide et vos précieux conseils tout au long de ce travail, et permis la valorisation de nos résultats dans de nombreux congrès internationaux. Pour le soutien, la confiance et l'amitié que vous m'avez témoignés, veuillez croire à mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Laurence Terrail, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour ta confiance, l'enthousiasme et la bienveillance dont tu as toujours fait preuve concernant ce travail. Sois assurée de ma plus sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur David Balayssac, co-directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Merci pour la confiance et la grande liberté dont j'ai bénéficié dans l'orientation de cette thèse.

A Madame Bénédicte Elena-Herrmann et toute l'équipe du CRMN à Très Hauts Champs de Lyon pour leur accueil et leur sympathie, **à Monsieur le Professeur Denis Pezet** et tout le service d'oncologie digestive du CHU de Clermont-Ferrand pour leur confiance si facilement accordée, et à la **Ligue Contre le Cancer** et le **Conseil Régional d'Auvergne** pour leur soutien financier constant. Veuillez trouver ici l'expression de nos plus sincères remerciements.

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR U1107 NEURO-DOL dirigée par le Professeur Alain Eschalier. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Mathilde Bayet-Robert**, la véritable RMNiste de ce projet. Je ne saurais trouver les mots pour exprimer toute ma reconnaissance pour ta patience, ton investissement sans égal dans ce travail et toutes les choses inestimables que j'ai apprises à ton contact. Les personnes comme toi sont bien trop rares, c'est avec une immense fierté que j'ai pu travailler avec toi.

Je remercie chaleureusement **Abderrahim El Guerrab**, qui fait ressembler la biologie moléculaire à un jeu d'enfant. Merci pour ta bonne humeur et ton investissement.

Au docteur **Fabien Marchand**, bien qu'arrivé tardivement sur ce projet, pour son soutien et sa grande contribution à ce travail. Merci pour toutes nos discussions et tes conseils avisés. A **Maryse Chalus**, la spécialiste du supraspinal, pour sa bonne humeur infaillible et son aide technique inestimable : merci infiniment. Sans oublier **Bruno Pereira** pour son aide à l'analyse statistique des données.

Je remercie également **Danielle Gaveron-Demilly**, directrice adjointe du laboratoire Creatis-Lrnm de Lyon, pour son aide à la quantification des signaux HRMAS. J'ai parfois la sensation que ma thèse a vraiment commencé le jour où je vous ai rencontré. Merci pour votre aide précieuse et votre accueil chaleureux.

A tous mes amis-collègues[®], *les moches*, avec qui j'ai partagé bien plus qu'un bureau pendant ces trois années. A commencer par **Amandine Dupuis**, qui m'a un jour donné le meilleur conseil que je n'aie jamais reçu : toujours attendre le mouvement de foule pour faire sa place au-devant de la scène. Merci pour ton soutien et ton amitié sans faille, je n'en serais jamais arrivé jusqu'ici sans toi. Un grand merci à **Véronique Morel** qui complète notre trio des pioupious, pour m'avoir soutenu et aidé pendant la rédaction de ce manuscrit. A ton tour maintenant ;-). Aux anciens, **David**, **Stéphane** et **Mathieu**, qui nous ont montré la voie à suivre. A ceux qui ont continué de vendre du rêve après eux : **Maily**, **Vaness** et **Nico**. Aux prochains sur la liste : **AlissON**, **Roro** et **Poupou**. Sans vous, rien n'aurait été pareil !

A ma famille et mes amis, que le seul titre de ma thèse laisse un peu interdits, merci pour votre soutien inconditionnel.

*I hurt myself today, to see if I still feel
I focus on the pain, the only thing that's real*

*The needle tears a hole, the old familiar sting
Try to kill it all away but I remember everything*

*What have I become, my sweetest friend
Everyone I know goes away in the end*

*And you could have it all, my empire of dirt
I will let you down, I will make you hurt*

JOHNNY CASH, *Hurt*. Lyrics by, music by: Trent Reznor.

(3'38) Album: *American IV: The Man Comes Around*. American Recordings - 063 339-2 (2002)

Résumé

TITRE : Douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine - Physiopathologie et approches thérapeutiques.

L'oxaliplatine, anticancéreux utilisé pour le traitement du cancer colorectal, est responsable d'une neurotoxicité périphérique dose-limitante affectant une grande majorité de patients. La neurotoxicité de l'oxaliplatine se présente sous deux formes : une forme immédiate, se traduisant par des paresthésies transitoires, et une forme retardée et cumulative, caractérisée par l'apparition d'une neuropathie périphérique douloureuse fortement invalidante. A l'heure actuelle, la prise en charge des douleurs neuropathiques est souvent incomplète, principalement à cause du manque de traitements efficaces et bien tolérés. Dans ce contexte, il existe un réel besoin d'innovation thérapeutique pour améliorer le traitement de ces neuropathies, nécessitant au préalable une meilleure compréhension de leur physiopathologie.

La première partie de ce travail porte sur l'évaluation de l'effet d'une alimentation sans polyamines sur l'apparition et la chronicisation de la neurotoxicité de l'oxaliplatine chez le rat. En effet, en modulant positivement la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA, les polyamines alimentaires pourraient faciliter la sensibilisation douloureuse. Un régime sans polyamines a permis de prévenir l'hypersensibilité thermique et mécanique induite par l'oxaliplatine. Bien que ces symptômes nociceptifs ne soient pas associés à une augmentation de l'expression de la sous-unité NR2B au niveau spinal, l'ifenprodil (antagoniste NR2B spécifique) permet d'en diminuer l'intensité de manière dose-dépendante. Enfin, une étude métabolomique réalisée par spectroscopie RMN du proton a montré que le régime sans polyamines permettait de réguler la neurotransmission excitatrice (glutamate) au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière des animaux, expliquant ainsi son effet antalgique.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes supraspinaux impliqués dans la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine, à l'aide d'une approche métabolomique par ¹H-RMN HRMAS. Cette étude a révélé d'importantes modifications métaboliques cérébrales chez les animaux traités par oxaliplatine, notamment une augmentation de la choline dans le cortex insulaire postérieur corrélée de manière significative aux seuils douloureux. Une analyse transcriptomique et pharmacologique a permis de mettre en évidence une implication de la neurotransmission cholinergique dans cette structure. Le ciblage pharmacologique de cette neurotransmission pourrait représenter une stratégie potentiellement intéressante pour le développement de nouveaux traitements antalgiques.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux a permis l'identification de nouvelles pistes pour la compréhension et le traitement des douleurs neuropathiques chimio-induites. Dans une perspective de recherche translationnelle, ces deux approches précliniques sont en cours de transposition dans des protocoles de recherche clinique. Un essai clinique de phase II (NEUROXAPOL, NCT01775449) a débuté afin de confirmer l'intérêt d'un régime appauvri en polyamines chez des patients recevant une chimiothérapie à base d'oxaliplatine. Une seconde étude clinique (INSULOX) est actuellement en cours de préparation au CHU de Clermont-Ferrand afin de mesurer par IRM les concentrations en choline dans l'insula de patients souffrant de douleurs neuropathiques induites par oxaliplatine.

Mots-clés : oxaliplatine, douleurs neuropathiques, polyamines, analyse métabolomique, spectroscopie RMN du proton, choline, cortex insulaire postérieur.

Abstract

TITLE: Oxaliplatin-induced neuropathic pain – Pathophysiology and therapeutic approaches.

Oxaliplatin, an anticancer drug used for the treatment of colorectal cancer, is responsible for a dose-limiting peripheral neurotoxicity in the majority of treated patients. This neurotoxicity appears with two components: a rapid-onset acute neurotoxicity manifesting as transient paresthesias and cold-induced dysesthesias; and a late-onset cumulative neurotoxicity characterized by the development of a painful chronic neuropathy. To date, the management of chemotherapy-induced neuropathic pain is still challenging because of the lack of effective treatments. In this context, a better understanding of the pathophysiological mechanisms underlying this neurotoxicity could lead to the identification of new therapeutic targets.

Firstly, we aimed to assess the preventive effect of a polyamine deficient diet on the development of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity. Exogenous polyamines, by positively modulating spinal NR2B-containing NMDA receptors, could facilitate pain sensitization. This study has shown that a polyamine deficient diet for 7 days totally prevented oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. Although we observed no change in spinal NR2B expression or phosphorylation, intrathecal ifenprodil (a specific NR2B antagonist) reduced oxaliplatin-induced allodynia in a dose-dependent manner. Finally, proton NMR spectroscopy-based metabolomic analysis has revealed a regulation of spinal glutamate neurotransmission as the most likely mechanism underlying the preventive effect of the diet.

Secondly, the metabolic variations associated with oxaliplatin-induced chronic neuropathy were assessed at the supraspinal level using a ¹H-NMR HRMAS-based metabolomic approach. Among the neurochemical changes evidenced in this study, we observed a significant increase in choline within the posterior insular cortex, significantly correlated with the mechanical pain thresholds. A transcriptomic and pharmacological approach have revealed an implication of cholinergic neurotransmission in this brain area. Targeting the cholinergic system using centrally active muscarinic agents could represent an interesting strategy for the treatment of oxaliplatin-induced neuropathic pain.

These experimental results led to the identification of new molecular targets for the comprehension and the treatment of chemotherapy-associated painful neuropathy. In a translational approach, these preclinical data will be extended to the clinical setting. A phase II clinical trial (NEUROXAPOL, NCT01775449) is undergoing to confirm the therapeutic interest of a polyamine free diet in patients receiving oxaliplatin. A second clinical project (INSULOX) aiming at assessing the choline concentrations in the insula of patients suffering from oxaliplatin-induced neuropathy is in preparation.

Keywords: oxaliplatin, neuropathic pain, polyamines, metabolomics, proton NMR spectroscopy, choline, posterior insular cortex.

Liste des contributions scientifiques

Communications affichées:

Jérémy Ferrier et al. Oxaliplatin-induced neuropathic pain involves cholinergic system in the posterior insular cortex: a HR-MAS proton NMR spectroscopy-based metabolomic analysis. 4th International Congress on Neuropathic Pain (NEUPSIG), May 2013 – Toronto, ON.

Jérémy Ferrier et al. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute sensory disorders in rats. 4th International Congress on Neuropathic Pain (NEUPSIG), May 2013 – Toronto, ON.

Jérémy Ferrier et al. Neuropathie douloureuse aiguë induite par l'oxaliplatine: Analyse métabolomique de la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat. 5^{ème} Journées scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Mai 2011 – Paris.

Jérémy Ferrier et al. Impact of a polyamine deficient diet on the prevention of acute nociceptive disorders induced by oxaliplatin in rat. 6th Cancer Scientific Forum of CLARA (*paru dans le Bulletin du Cancer Volume 98 issue 1*), March 28 & 29, 2011 - Lyon.

Jérémy Ferrier et al. Neuropathie douloureuse aiguë induite par l'oxaliplatine: Analyse métabolomique de la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat. Journée scientifique régionale de cancérologie d'Auvergne, Janvier 2011 – Clermont-Ferrand.

Jérémy Ferrier et al. Impact of a polyamine deficient diet on the prevention of acute nociceptive disorders induced by oxaliplatin in rat. 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, 2010, Tivoli.

Communications orales:

Jérémy Ferrier et al. Implication supraspinale de la neurotransmission cholinergique dans la physiopathologie de la douleur neuropathique chimio-induite, Journées de l'Ecole Doctorale. Mai 2013 – Clermont-Ferrand.

Jérémy Ferrier. Physiopathologie des neuropathies chimio-induites, Deuxième Journée Auvergnate de la Douleur. Samedi 9 Juin 2012 – Clermont-Ferrand (Conférence invitée).

Jérémy Ferrier et al. Prévention de la neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine avec un régime sans polyamines. Journée de la recherche, IFR 79 Santé Auvergne. Jeudi 1^{er} décembre 2011 – Clermont-Ferrand.

Jérémy Ferrier et al. Implication du cortex insulaire dans la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine chez le rat. Journée de la recherche, IFR 79 Santé Auvergne. Jeudi 1^{er} décembre 2011 – Clermont-Ferrand.

Jérémy Ferrier et al. Impact of a polyamine deficient diet on the prevention of acute nociceptive disorders induced by oxaliplatin in rat. 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, 2010, Tivoli.

Publications internationales:

Jérémy Ferrier et al. Emerging trends in understanding chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr Pain Head Rep.* 2013 (accepted)

Yildiz Zengin-Toktas, **Jérémy Ferrier**, Franck Durif, Pierre-Michel Llorca, Nicolas Authier. Bilateral lesions of the nigrostriatal pathways is associated with chronic mechanical pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience Research* (in press)

Christine Courteix, **Jérémy Ferrier**, Fabien Marchand, Nicolas Authier, Amandine Dupuis, David Balayssac, Alain Eschalier. Animal models of toxic and metabolic neuropathic pain, in “Pain Models: Translational Relevance and Applications”. IASP Press (in press)

David Balayssac, **Jérémy Ferrier**, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf.* 2011 May;10(3):407-17.

Liste des abréviations

1D : Une dimension	DACH : Diaminocyclohexane
¹ H : Proton	DFMO : α -Difluorométhylornithine
5-FU : 5-Fluorouracile	DN4 : Douleur Neuropathique en 4 questions
A : adenine	DRG : Dorsal Root Ganglia
ABD : Agonist-Binding Domain	EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer
Ace : acétate	ESM : Erreur standard à la moyenne
ADDFMS : Aliment Diététique Destiné à des Fins Médicales Spéciales	ERCC1 : excision repair cross- complementation group 1
ADN : acide désoxyribonucléique	ERK : Extracellular signal-regulated kinases
AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien	EVA : Echelle Visuelle Analogique
Ala : alanine	FAD: Flavine adénine dinucléotide
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	FDA : Food & Drug Administration
AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3- hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque	FOLFOX : 5-FU + folinate + oxaliplatine
APAO: polyamine oxydase	G : guanine
AQSES: Automated Quantitation of Short Echo Time magnetic resonance Spectroscopy	GABA: acide γ -aminobutyrique
ARNm : Acide ribonucléique messenger	Gln : glutamine
Asp : aspartate	Glu : glutamate
ATP : adenosine triphosphate	GPC: Glycérophosphocholine
AXP : adenosine phosphates	GSTP1 : Glutathion-S-transférase pi 1
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic factor	HAD : Hospital Anxiety and Depression scale
BHB : β -hydroxybutyrate	HCN : Hyperpolarization-activated, cyclic- nucleotide-gated channel
C : cytosine	HPLC: High Performance Liquid Chromatography
CA/CP : Commissure Antérieure/Commissure Postérieure	HRMAS: High Resolution Magic Angle Spinning
CCI : Chronic Constriction Injury	IC50: Concentration inhibitrice 50
CDK : Cycline-Dependent Kinase	ip : intrapéritonéale
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
Cho : choline	Lac : Lactate
CHT: High-affinity choline transporter	LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
CL: noyau thalamique centro-latéral	LTP: Long-Term Potentiation
Cmax : concentration plasmatique maximale	MyI ou m-ins : myo-inositol
COX-2 : cyclooxygénase 2	NAA : N-acétylaspartate
Cp : comprimé	NAAG : N- acétylaspartylglutamate
CREB: c-AMP Response Element-binding protein	NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
CRLB ou CRB : Cramér-Rao Lower Bounds	NCI-CTC : National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria
CT: contrôle	NER : Nucleotide Excision Repair
CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Events	NK1 : neurokinine 1
CTR1 : Copper transporter 1	NMDA : N-méthyl-D-Aspartate

NPCI : neuropathie périphérique chimio-induite
NPSI : Neuropathic Pain Symptom Inventory
NTD : N-Terminal Domain
OCT : Organic cation transporter
ODC : Ornithine Décarboxylase
OMS : Organisme Mondial de la Santé
OXA : oxaliplatine
PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
PC : Phosphocholine
PCD: polyamine containing diet (normal diet)
PCR : Polymérase Chain Reaction
PDD: polyamine deficient diet
PDZ : PSD95, Dlg1, Zo-1
pIC : cortex insulaire postérieur
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PNQ : Patient Neurotoxicity Questionnaire
po : per os (voie orale)
PO : noyau thalamique postérieur
Po-SG : complexe supragéniculé postérieur
PRESS : Point REsolved SpectroScopy
PtC : phosphatidylcholine
PV: aire pariétale ventrale
QCD : Questionnaire Concis des Douleurs
QLQ-C30 : Quality-of-Life Questionnaire-C30
QLQ-CIPN20 : Quality of Life Questionnaire - Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy-C20
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR : Rétrotranscription-PCR

SAMDC : S-adenosylméthionine décarboxylase :
SI : cortex somatosensoriel primaire
SII : cortex somatosensoriel secondaire
SMO: spermine oxydase
SNL : Spinal Nerve Ligation
SPDS : spermidine synthase
SPMS : spermine synthase
SRM : Spectroscopie par Résonance Magnétique
SSAT : spermine/spermidine N1-acétyltransférase
Succ : succinate
T : thymine
tCr : créatine totale
TE : Temps d'Echo
TEP : Tomographie par Emission de Positron
TLDA : Taqman low Density Array
TR : Temps de Répétition
TRP : Transient Receptor Potential
UMR : Unité Mixte de Recherche
VMpC : noyau thalamique ventro-postéro-médian
VMpo : noyau thalamique ventro-médian postérieur
VOI : Volume Of Interest
VPI : noyau thalamique ventro-postéro-inférieur
VPL : noyau thalamique ventro-postéro-latéral
VS : aire ventral somatosensorielle

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : L'OXALIPLATINE	3
I. Généralités	3
I.1. Structure chimique.....	3
I.1. Biotransformation	4
I.2. Pharmacocinétique.....	5
I.3. Pharmacodynamie.....	6
I.3.1. Pénétration dans la cellule	6
I.3.2. Formation d'adduits à l'ADN génomique	8
II. Neurotoxicité.....	9
II.1. Sémiologie	9
II.1.1. Neurotoxicité aiguë	9
II.1.2. Neurotoxicité chronique	10
II.2. Facteurs de risque.....	10
II.3. Evaluation	12
II.4. Traitements.....	14
II.4.1. Modifications du protocole d'administration de l'oxaliplatine.....	14
II.4.1. Perfusions de calcium/magnésium	15
II.4.2. Approches pharmacologiques	17
II.5. Modèles animaux	19
II.6. Toxicodynamie.....	21
II.6.1. Neurotoxicité aiguë	21
II.6.2. Neurotoxicité chronique	23
II.6.3. Comparaison aux autres anticancéreux neurotoxiques	24
<i>ARTICLE 1: "EMERGING TRENDS IN UNDERSTANDING CHEMOTHERAPY-INDUCED NEUROPATHY"</i>	25
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	47
CHAPITRE 2 : EFFET PREVENTIF D'UN REGIME SANS POLYAMINES	49
I. Le récepteur NMDA	49
I.1. Structure.....	49
I.1.1. NR1	51
I.1.2. NR2	51
I.1.3. NR3	52
I.2. Cinétique d'activation.....	52

I.3.	Régulation de l'activité des récepteurs NMDA.....	54
I.3.1.	Modulateurs allostériques endogènes.....	54
	• Protons extracellulaires	54
	• Zinc extracellulaire	55
	• Polyamines extracellulaires.....	55
I.3.2.	Modulateurs pharmacologiques	59
I.4.	Implication du récepteur NMDA dans la plasticité synaptique.....	60
I.4.1.	Plasticité immédiate	62
	• <i>Wind-up</i> : plasticité synaptique réversible pendant un stimulus nociceptif.....	62
	• Sensibilisation centrale classique : plasticité synaptique prolongée après stimulation nociceptive	62
	• Potentialisation à long terme des neurones de la corne dorsale (LTP).....	63
I.4.2.	Plasticité tardive	65
I.4.3.	Cas des douleurs neuropathiques	66
II.	Les polyamines	68
II.1.	Description	68
II.2.	Origine	69
	II.2.1. Biosynthèse endogène	69
	II.2.2. Absorption intestinale.....	70
II.3.	Régulation	72
II.4.	Rôles physiologiques	73
	II.4.1. Prolifération cellulaire	73
	II.4.2. Apoptose.....	74
	II.4.3. Interaction avec l'ADN	75
	II.4.4. Douleur.....	75
III.	Travail expérimental	77
III.1.	Introduction et résumé	77
	<i>ARTICLE 2: "A POLYAMINE-DEFICIENT DIET PREVENTS OXALIPLATIN-INDUCED ACUTE COLD AND MECHANICAL HYPERSENSITIVITY IN RATS"</i>	80
III.2.	Données complémentaires	105
	III.2.1. Matériels et méthodes	105
	III.2.2. Résultats.....	106
III.3.	Discussion	110
III.4.	Conclusion et perspectives.....	118
IV.	Etude clinique : NEUROXAPOL	119
IV.1.	Rationnel de l'étude	119
IV.2.	Synopsis de l'étude	127

CHAPITRE 3 : MECANISMES SUPRASPINAUX IMPLIQUES DANS LA NEUROPATHIE INDUITE PAR L'OXALIPLATINE.....	135
I. Réponses cérébrales à la douleur	135
I.1. De la définition de la douleur	135
I.2. Concept de matrice de la douleur	137
I.3. Le cortex operculo-insulaire : un cortex primaire de la douleur ?.....	139
I.3.1. Rappels anatomiques	139
• L'aire somatosensorielle secondaire	139
• L'insula	143
I.3.2. Implication dans la thermo-sensation et la nociception	145
• Afférences thalamiques.....	145
• Activations	146
• Stimulations	147
• Pathologie.....	147
II. Altérations cérébrales dans les douleurs neuropathiques.....	149
II.1. Modifications fonctionnelles.....	149
II.2. Modifications morphologiques	150
II.3. Modifications neurochimiques.....	152
III. Travail expérimental	155
III.1. Introduction et résumé des travaux	155
<i>ARTICLE 3: "METABOLOMIC ANALYSIS REVEALS THE ROLE OF INSULAR CHOLINERGIC SYSTEM IN THE MODULATION OF CHEMOTHERAPY- INDUCED NEUROPATHIC PAIN IN RATS."</i>	101
III.2. Données complémentaires	185
III.2.1. Matériels et méthodes	185
III.2.2. Résultats.....	190
III.3. Discussion	195
III.4. Conclusion et perspectives.....	202
IV. Etude clinique : INSULOX.....	203
IV.1. Rationnel de l'étude	203
IV.2. Synopsis de l'étude	209
CONCLUSION.....	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	219

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Avec plus de 40 000 nouveaux cas estimés en 2011, le cancer colorectal représente 10,4% des cancers chez l'homme et 12% des cancers chez la femme. C'est le 3^{ème} cancer le plus fréquent et la 2^{ème} cause de décès par cancer en France. En dépit de l'augmentation constante de son incidence, le pronostic du cancer colorectal s'est amélioré ces dernières années, attestant des progrès thérapeutiques notamment dans le dépistage de la maladie, les pratiques chirurgicales mais aussi dans le développement de la chimiothérapie adjuvante et palliative.

Le traitement du cancer colorectal dépend du stade et de la localisation de la tumeur au moment de son diagnostic. Le seul traitement curatif consiste en l'exérèse du segment atteint avec des marges saines de côlon (< 5 cm de part et d'autre de la tumeur), associée à l'exérèse du mésocôlon et des relais ganglionnaires. Cependant, dans près de la moitié des cas, le cancer est déjà localement avancé ou métastatique au moment du diagnostic, rendant l'exérèse totale impossible. La chimiothérapie (qualifiée de néo-adjuvante ou pré-opératoire) est alors indispensable, offrant une possibilité de résection secondaire. Pour les tumeurs résécables d'emblée, une chimiothérapie adjuvante (post-opératoire) est également proposée afin de limiter le risque de récurrence locale et à distance, surtout en cas d'envahissement ganglionnaire sur la pièce de colectomie (stade III).

La chimiothérapie a donc pris une place importante dans la prise en charge des cancers digestifs. Initialement basée sur l'utilisation du 5-fluorouracile (5-FU) en association avec le lévamisole, la chimiothérapie a considérablement évolué ces 15 dernières années avec l'introduction de nouvelles molécules telles que l'irinotécan, l'oxaliplatine ou encore le bévacizumab. A l'heure actuelle, le protocole FOLFOX4 (5-FU + acide folinique + oxaliplatine) est devenu le traitement adjuvant de référence pour la prise en charge des cancers coliques, permettant d'augmenter considérablement le taux de réponse au traitement mais également la survie globale et la survie sans progression des patients. Cependant, la stratégie thérapeutique anticancéreuse est par définition agressive, utilisant des doses à la limite de la tolérance afin d'obtenir une réponse optimale et limiter les phénomènes de résistance. De plus, les médicaments anticancéreux sont des molécules à marge thérapeutique étroite, fortement toxiques et avec des effets indésirables potentiellement graves. La survenue de toxicités iatrogènes est donc quasi inévitable.

Face au nombre croissant de patients concernés par la chimiothérapie et à l'amélioration de leur survie, la prise en charge des séquelles à long terme des traitements anticancéreux apparaît primordiale. Cette démarche s'inscrit dans les objectifs généraux de l'axe V du Plan cancer (2009-2013) intitulé « Vivre pendant et après un cancer ».

Le protocole FOLFOX4 présente un profil de tolérance clinique plutôt favorable. Les nausées et vomissements sont efficacement contrôlés par l'administration d'antagonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃ et de corticoïdes. L'alopécie, un des symptômes les plus redoutés par les patients, n'est jamais observée. Le risque de neutropénie est élevé mais ne nécessite pas l'espacement des cures, une adaptation posologique ou l'arrêt du traitement. Cependant, l'oxaliplatine est fréquemment responsable d'une toxicité neurologique dose-limitante et très invalidante. Cette neurotoxicité se manifeste sous deux formes : une neurotoxicité immédiate ou aiguë, se traduisant par des paresthésies et des dysesthésies déclenchées par le froid au niveau péri-oral et distal, et une neurotoxicité retardée, chronique et cumulative, se manifestant sous forme de neuropathie périphérique douloureuse avec atteinte fonctionnelle dans les cas les plus sévères. Afin de prévenir ces neuropathies douloureuses, plusieurs approches thérapeutiques ont été évaluées mais sans succès jusqu'à présent. La réduction des doses d'oxaliplatine, l'augmentation de la durée de perfusion et pour finir l'arrêt prématuré du traitement constituent la seule alternative pour les oncologues, mais ces adaptations posologiques peuvent se traduire par une perte de chance pour le patient face à la maladie cancéreuse. Ainsi, il existe un réel besoin d'innovation thérapeutique pour la prise en charge de ces neuropathies douloureuses, nécessitant au préalable une connaissance plus précise de leur physiopathologie.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Ce mémoire s'organise en 3 chapitres, dont 2 parties expérimentales distinctes. Le premier chapitre reprend les données de la littérature sur l'oxaliplatine et décrit plus particulièrement les données cliniques et biologiques de sa neurotoxicité. Le deuxième chapitre expose le premier travail expérimental concernant l'évaluation d'un régime alimentaire sans polyamines sur la prévention de la symptomatologie sensitive associée à l'administration d'oxaliplatine chez le rat. Un rappel bibliographique sur le rôle des polyamines dans les processus algiques et les résultats obtenus seront présentés. Enfin, le troisième chapitre est consacré à la deuxième partie expérimentale qui concerne l'évaluation des mécanismes supraspinaux associés à la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine. Les projets cliniques (NEUROXAPOL et INSULOX) issus directement de ces résultats précliniques seront également présentés en perspective.

CHAPITRE 1 : L'OXALIPLATINE

CHAPITRE 1 : L'OXALIPLATINE

I. Généralités

L'oxaliplatine est un anticancéreux appartenant à la famille des sels de platine. C'est un composé de troisième génération, qui succède au cisplatine et au carboplatine. Initialement synthétisé en 1976 par l'équipe du professeur Yoshinori Kidani à l'université de Nagoya au Japon, l'oxaliplatine a démontré un large spectre d'activité antitumorale ainsi qu'une absence de résistance croisée avec le cisplatine (Mathe et al., 1986). C'est en France que le développement clinique de l'oxaliplatine a été conduit, d'abord par le laboratoire Debiopharm puis par Sanofi dès 1994. Suite à des résultats très prometteurs chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique et notamment grâce à la synergie observée avec le 5-FU, l'oxaliplatine obtient sa première AMM en France en 1996 sous le nom d'Eloxatine[®] pour le traitement de seconde ligne des tumeurs coliques. L'efficacité de l'oxaliplatine en première ligne a ensuite été démontrée par une étude de phase III, permettant son enregistrement en France en 1998, puis en Europe en 1999 (de Gramont et al., 2000). Aux Etats-Unis, ce n'est que bien plus tard que l'AMM sera accordée par la FDA suite à d'autres études de phase III, en 2002 pour l'indication en deuxième ligne (Rothenberg et al., 2003) et en 2004 pour l'indication en première ligne (Goldberg et al., 2004). Parallèlement, les résultats de l'étude européenne MOSAIC démontrent l'intérêt de l'oxaliplatine en association avec le 5-FU et la leucovorine (schéma 5FULV2) après résection complète (stade II et III), permettant une augmentation significative du taux de survie sans récurrence (Andre et al., 2004). Ces résultats conduisent à l'obtention d'une nouvelle AMM en situation adjuvante fin 2004 aux Etats-Unis et début 2005 en Europe. A l'heure actuelle, le schéma FOLFOX4 (5-FU + leucovorine + oxaliplatine) demeure encore le standard international pour le traitement adjuvant du cancer colorectal.

I.1. Structure chimique

L'oxaliplatine ou cis-[(1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-N,N'] [oxalato(2)-O,O'] platinum est constitué d'un groupement 1,2-diaminocyclohexane (DACH) et d'un groupement oxalate hydrolysable complexés autour d'un atome de platine (Figure 1). Sa formule chimique est $C_8H_{12}N_2O_4Pt$.

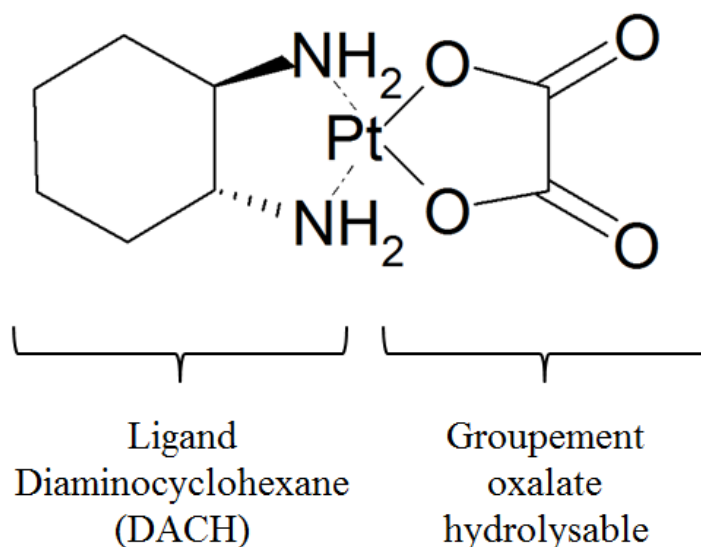


Figure 1 : Structure chimique de l'oxaliplatine.

I.1. Biotransformation

In vivo, l'oxaliplatine subit une série de réactions non enzymatiques correspondant à l'hydrolyse du groupement oxalate ainsi qu'à des substitutions par des nucléophiles endogènes tels que les ions Cl^- et HCO_3^- (Figure 2). Plusieurs métabolites réactifs sont ainsi formés, notamment le monochloro-, dichloro- et diaquo-DACH platine, capables de se fixer aux acides aminés et aux groupements sulfures des protéines, de l'ADN et d'autres macromolécules plasmatiques et tissulaires (Graham et al., 2000). Une autre voie de biotransformation consiste à la fixation irréversible à l'albumine, la cystéine, la méthionine et le glutathion réduit (Kweekel et al., 2005). Ces réactions conduisent à la formation de conjugués non cytotoxiques et constituent la première étape de détoxification cellulaire (Levi et al., 2000).

La contribution de chaque métabolite à la cytotoxicité de l'oxaliplatine est encore inconnue. Bien que le diaquo-DACH platine soit le plus réactif de tous les dérivés *in vitro*, la forme intacte de l'oxaliplatine est considérée comme le principal composé cytotoxique *in vivo* (Jerremalm et al., 2009).

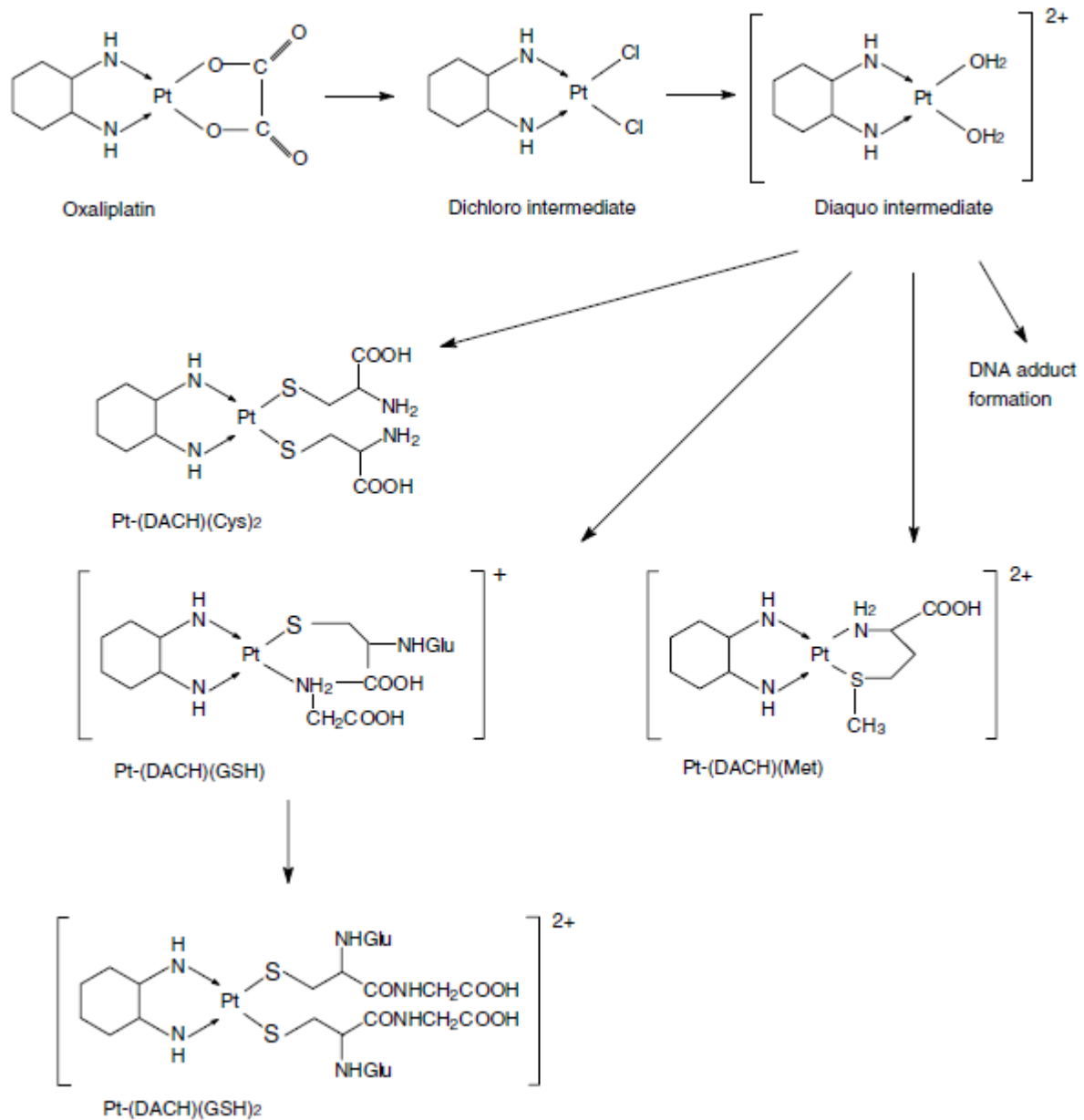


Figure 2 : Réactions d'hydrolyse non enzymatique de l'oxaliplatine (Kweekel et al., 2005).

I.2. Pharmacocinétique

Après une perfusion de 2 h, la concentration plasmatique maximale est en moyenne de $1,92 \pm 0,338 \mu\text{g/ml}$, soit approximativement $5 \mu\text{M}$ (Graham et al., 2000). Environ 40% de la dose d'oxaliplatine administrée s'accumule dans les érythrocytes de manière irréversible (Mani et al., 2002). La demi-vie érythrocytaire de l'oxaliplatine est de 29 à 50 jours ce qui correspond à la demi-vie des érythrocytes eux-mêmes, indiquant qu'une fois à l'intérieur des hématies, l'oxaliplatine est piégé et ne diffuse pas dans le plasma (Levi et al., 2000). Le platine intra-érythrocytaire n'est pas considéré comme un réservoir pharmacologiquement actif à cause du caractère irréversible de la liaison platine-érythrocyte et de l'absence d'efflux (Graham et al., 2000). Environ la moitié du

platine restant se lie aux protéines plasmatiques (majoritairement l'albumine), perdant ainsi son activité antitumorale. Le platine restant est ultrafiltrable, et représenterait donc la fraction active de la dose administrée (« platine libre »). Cependant, les études sur plasma ultrafiltré donnent en réalité une surestimation des concentrations en platine libre, car il contient également de l'oxaliplatine lié aux acides aminés et autres petites molécules présentes dans le sang. La fraction libre de l'oxaliplatine diffuse très largement dans l'organisme, avec un volume apparent de 440 L dû à la forte diffusion tissulaire des dérivés DACH-platine et à leur fixation aux macromolécules. Aucune accumulation de platine n'a été observée dans le plasma ultrafiltré des patients suivant des administrations de 85 mg/m² toutes les 2 semaines. En revanche, une accumulation significative a été observée au sein des érythrocytes. L'état d'équilibre plasmatique est atteint dès le 1^{er} cycle de chimiothérapie (Graham et al., 2000).

La demi-vie plasmatique de l'oxaliplatine est très brève, de l'ordre de 14,1 minutes due à son hydrolyse excessive en présence d'ions chlorure et à une clairance rénale rapide (Alcindor and Beuger, 2011). Approximativement 50% de la dose reçue est éliminée dans le 1^{er} jour suivant l'administration. Seuls 2% de la dose est éliminée dans les fèces. Le platine issu de l'oxaliplatine est décrit comme ayant un schéma d'élimination tri-exponentiel, caractérisé par des phases initiales de distribution α et β très rapides (0,28 et 16,3 heures, respectivement) suivies d'une phase terminale γ très longue de 273 h (Graham et al., 2000). Les premières phases correspondraient à la clairance rapide de l'oxaliplatine et ses dérivés (diffusion dans les tissus et filtration glomérulaire). En revanche, la longue demi-vie terminale du platine dans l'ultrafiltrat plasmatique correspondrait à la libération lente et progressive de platine lié à des acides-aminés lors de la dégradation des macromolécules cellulaires telles que les protéines (Graham et al., 2000). La clairance rénale du platine ultrafiltrable est relativement importante, et corrélée directement au débit de filtration glomérulaire. Cependant, à l'inverse du carboplatine, aucune adaptation posologique n'est nécessaire en cas d'insuffisance rénale chronique (Takimoto et al., 2003).

I.3. Pharmacodynamie

I.3.1. Pénétration dans la cellule

Les sels de platine sont des molécules hautement polaires qui ne diffusent pas facilement à travers les membranes lipidiques. Les mécanismes d'influx et d'efflux de ces molécules ne sont pas encore clairement élucidés. Les premiers arguments expérimentaux suggéraient que le cisplatine traversait la membrane plasmique principalement par diffusion passive, car ce processus n'est ni

saturable, ni inhibé en présence d'analogues structuraux. De plus, l'entrée du cisplatine n'est pas dépendante du pH (Binks and Dobrota, 1990, Hromas et al., 1987, Mann et al., 1991).

Des travaux plus récents ont mis en évidence un lien direct entre l'influx cellulaire du cuivre et les concentrations en platine. La première étude, réalisée chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, a montré que l'inactivation du gène codant pour le transporteur CTR1 (*Copper Transporter Receptor 1*) provoquait une diminution de l'assimilation du cuivre et des concentrations intracellulaires en cisplatine. Une diminution de l'accumulation d'oxaliplatine a également été observée dans cette étude (Lin et al., 2002). En revanche, l'influx d'oxaliplatine semble être moins affecté par la délétion de CTR1 comparé au cisplatine, ce qui suggère que d'autres mécanismes moléculaires prennent part à ce processus (Holzer et al., 2006).

Les transporteurs OCT1 et OCT2 (*Organic Cation Transporter*) jouent également un rôle critique dans l'accumulation intracellulaire de l'oxaliplatine et donc dans sa cytotoxicité. La surexpression de OCT1 et surtout de OCT2 augmentent très sensiblement les concentrations intracellulaires de platine mais également la formation d'adduits à l'ADN génomique, sans modifier la cinétique du cisplatine ou du carboplatine (Zhang et al., 2006). L'étude de la relation structure-activité suggère que c'est la nature organique du ligand non labile de l'oxaliplatine qui lui confère son affinité pour ces deux transporteurs, notamment sous sa forme intermédiaire monoqua/monochloro (Zhang et al., 2006). OCT1 semble exprimé dans toutes les tumeurs colorectales contrairement à OCT2, ce qui pourrait expliquer la variabilité de la réponse au traitement. Cependant, l'expression de OCT2 est faible dans les tumeurs ovariennes et n'est pas corrélée avec leur sensibilité à l'oxaliplatine (Burger et al., 2010).

Les transporteurs d'efflux du cuivre ATP7A et ATP7B (*ATPase membrane protein*) jouent également un rôle dans la pharmacodynamie des sels de platine. Ces protéines transmembranaires ont pour rôle de séquestrer le cuivre cytoplasmique pour l'exporter hors de la cellule via le réseau trans-golgien. Comme pour CTR1, les sels de platine ont une certaine affinité pour ces transporteurs. Une étude *in vitro* a montré que la surexpression d'ATP7A et ATP7B est accompagnée d'une augmentation de l'accumulation de cisplatine, de carboplatine et d'oxaliplatine dans les cellules (Samimi et al., 2004a). Bien que les cellules exprimant ces deux transporteurs développent une résistance à l'effet cytotoxique du cisplatine et du carboplatine, elles deviennent légèrement plus sensibles à l'effet de l'oxaliplatine (Samimi et al., 2004a). Ces données suggèrent qu'ATP7A et ATP7B sont capables de séquestrer les sels de platine dans des compartiments subcellulaires, les rendant inactifs, excepté pour l'oxaliplatine qui resterait capable d'accéder au noyau pour former des adduits à l'ADN. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec

d'autres études qui ont montré que les cellules cancéreuses sur-exprimant ATP7A et ATP7B développaient une résistance à l'oxaliplatine (Martinez-Balibrea et al., 2009, Samimi et al., 2004b).

I.3.2. Formation d'adduits à l'ADN génomique

Le mécanisme cytotoxique de l'oxaliplatine, comme celui des autres sels de platine, fait intervenir la formation d'adduits à l'ADN, avec un tropisme particulier pour les séquences riches en GC (Faivre et al., 2003). Lorsque l'oxaliplatine entre dans la cellule, un des ligands chlore se dissocie pour former un dérivé mono-aqua/monochloro qui va réagir rapidement avec l'azote 7 du cycle imidazole des guanines de l'ADN accessibles à l'intérieur du grand sillon (Raymond et al., 1998b). La dissociation du deuxième ligand chlore va permettre la transformation du mono-adduit ainsi formé en un di-adduit plus stable. Ces réactions de premier ordre sont favorisées par la faible concentration intracellulaire en ions chlorure. La majorité des adduits formés sont des adduits intra-brin, entre deux guanines adjacentes ou plus rarement, entre une base guanine et une base adénine (Faivre et al., 2003). Des adduits inter-brins sont également formés, mais en quantité bien plus faible. Néanmoins, ces adduits semblent contribuer à la cytotoxicité de l'oxaliplatine, mais de manière moins importante que les adduits intra-brins (Woynarowski et al., 2000). Les liaisons formées entre les bases sont irréversibles. L'ensemble de ces adduits va provoquer une perturbation de la structure tridimensionnelle de l'ADN, induisant courbure et torsion de la double hélice (Todd and Lippard, 2009). Des ponts ADN-protéine ont également été mis en évidence *in vitro*, mais leur cytotoxicité n'a jamais été démontrée (Zwelling et al., 1979).

La formation d'adduits à l'ADN va perturber les mécanismes cellulaires nécessitant la séparation des deux brins tels que la transcription et la réplication. Les cellules cancéreuses ont une forte activité de prolifération qui nécessite à la fois une synthèse protéique importante et la réplication du matériel génétique, expliquant leur sensibilité particulière à ce type d'agents génotoxiques. Quand le nombre de lésions à l'ADN excède les capacités de réparation cellulaire, les voies de signalisation conduisant à la mort de la cellule sont alors activées. De fortes doses de platine vont être responsables des phénomènes nécrotiques (Gonzalez et al., 2001), notamment par l'hyperactivation de la protéine PARP qui induit une déplétion en NAD/ATP conduisant à la mort cellulaire par nécrose (Wang and Lippard, 2005). A l'inverse, une exposition à des doses plus faibles va conduire à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et déclencher la mort programmée par apoptose sur plusieurs jours. Ce mécanisme est responsable de l'activité antitumorale des dérivés du platine (Arango et al., 2004). Les deux voies de signalisation conduisant à l'apoptose semblent être impliquées dans ce mécanisme : la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) faisant

intervenir la protéine p53 (Siddik, 2003), et la voie extrinsèque via l'activation des caspases (Blanc et al., 2000). La formation d'adduits directement à l'ADN mitochondrial peut également conduire à la mort cellulaire par l'intermédiaire d'une voie de signalisation faisant intervenir la libération du cytochrome c (Park et al., 2002).

II. Neurotoxicité

II.1. Sémiologie

II.1.1. Neurotoxicité aiguë

Chez plus de 90% des patients traités, l'oxaliplatine est responsable d'un ensemble de symptômes sensoriels comprenant des paresthésies et des dysesthésies induites par le froid au niveau des mains et de la région péri-orale (principalement dans la gorge mais pouvant survenir au niveau de la bouche et des joues), des engourdissements, une fatigue musculaire et des douleurs neuropathiques (Raymond et al., 1998a, Raymond et al., 1998b). Très souvent, ces symptômes sont accompagnés de troubles moteurs tels qu'une paralysie des cordes vocales, des spasmes massétéris (trismus), un ptosis ou des crampes. Ces symptômes apparaissent très rapidement après la cure de chimiothérapie (dans les heures voire les jours suivant l'injection) et disparaissent spontanément en quelques jours. Cependant, ils réapparaissent généralement lors de la perfusion suivante et augmentent à la fois en termes de durée et d'intensité. En outre, les patients peuvent présenter une sensation de dyspnée ou dysphagie dans les heures suivant la perfusion d'oxaliplatine, sans signe physique d'obstruction des voies aériennes supérieures ni de modification des gaz du sang (Haller, 2000). Cette sensation est connue sous le nom de spasme pharyngolaryngé et affecte moins de 1% des patients (de Gramont et al., 2000). En plus de ces symptômes déclenchés par le froid, une neuromyotonie peut apparaître, caractérisée par une raideur musculaire, un ralentissement de la relaxation musculaire et une augmentation de la transpiration (Saif and Hashmi, 2008). Quelques patients peuvent également présenter une dysphonie temporaire (Berretta et al., 2004). L'évaluation quantitative des troubles sensitifs révèle, en plus de l'hypersensibilité au froid, une hyperalgie mécanique ainsi qu'une hyperalgie au chaud et une augmentation du seuil de perception des températures chaudes (Binder et al., 2007). D'un point de vue électrophysiologique, l'administration d'oxaliplatine provoque une augmentation de l'excitabilité axonale des neurones sensitifs (Park et al., 2009).

Bien que ces symptômes neurologiques aigus ne soient jamais dose-limitants à cause de leur caractère transitoire et de leur évolution spontanément résolutive, ils affectent profondément la qualité de vie des patients traités par l'oxaliplatine (Toftthagen et al., 2011). Ainsi, il est important d'informer les patients de cet effet indésirable avant l'instauration de la chimiothérapie. Des instructions simples comme éviter le contact direct avec le froid, porter des gants et éviter les boissons froides permettent de limiter les symptômes (Saif and Reardon, 2005).

II.1.2. Neurotoxicité chronique

Avec la répétition des cures de chimiothérapie, 50 à 70% des patients développent une neuropathie périphérique persistante et fortement invalidante, similaire à celle observée avec le cisplatine et le carboplatine. Elle se manifeste par une atteinte principalement sensitive, symétrique et distale, caractérisée par une persistance des paresthésies entre les cures de chimiothérapie, un engourdissement des membres et des douleurs spontanées. Dans les cas les plus sévères, les patients peuvent présenter une ataxie sensorielle ainsi qu'une perte de la sensibilité superficielle et profonde, entraînant un déficit fonctionnel dans les gestes fins de la vie quotidienne (écrire, boutonner une chemise, conduire, etc.) (Toftthagen et al., 2011). L'incidence et la sévérité de cette neuropathie dépendent à la fois de la dose cumulée et de la dose intensité. La médiane de survenue d'une neuropathie de grade 3 se situe autour de la 10^{ème} cure, soit une dose cumulée moyenne de 874 mg/m² (Grothey, 2003). Une amélioration de la symptomatologie est généralement observée après l'arrêt du traitement, avec une médiane de récupération de 13 semaines (Grothey, 2003). Cependant, une étude récente a mis en évidence une persistance des symptômes neuropathiques chez 80% des patients atteints, 29 mois après le dernier cycle de chimiothérapie, remettant en cause la réversibilité complète de la neuropathie induite par l'oxaliplatine (Park et al., 2011). De plus, chez certains patients, la neuropathie peut progresser voire s'installer plusieurs mois après la fin de la chimiothérapie (Toftthagen, 2010). Ce phénomène, également décrit après traitement au cisplatine, est appelé « *coasting*¹ » et rend l'apparition de cette neuropathie difficilement prédictible.

II.2. Facteurs de risque

Plusieurs études ont été conduites afin de déterminer des facteurs cliniques et biologiques permettant de prédire de manière fiable le risque de développer une neuropathie. L'identification

¹ Comprendre « *roue libre* ». Ce terme n'a pas trouvé de traduction française dans la littérature. En anglais, le verbe « *to coast* » désigne l'action de continuer à avancer sans aucune force de propulsion, par exemple en prenant de l'élan ou en utilisant la gravité.

d'une prédisposition à la neurotoxicité chronique permettrait d'adapter rapidement la posologie de l'oxaliplatine et donc de limiter l'installation de la neuropathie cumulative. Il a ainsi été montré que l'intensité de l'hypersensibilité thermique en aigu (et particulièrement l'allodynie au froid) était corrélée de manière significative au risque de développer une neuropathie chronique (Attal et al., 2009). Cette observation a également été confirmée dans une étude récente, ce qui suggère que la neurotoxicité aiguë et la neurotoxicité chronique de l'oxaliplatine ne sont pas deux syndromes distincts ou qu'elles partagent des facteurs de susceptibilité communs (Argyriou et al., 2013b). Bien que l'incidence et la sévérité de la neuropathie chronique ne semblent pas influencées par l'âge du patient (Vincenzi et al., 2013), la durée des symptômes est significativement plus longue chez les patients jeunes (Argyriou et al., 2013a). D'un point de vue biologique, l'incidence de la neuropathie a été corrélée avec la présence d'une anémie avant le traitement, d'une hypoalbuminémie, d'une hypomagnésémie ainsi qu'avec la consommation régulière d'alcool (Vincenzi et al., 2013). L'hypoalbuminémie et l'hypomagnésémie ont également été corrélées à la persistance des symptômes. En revanche, le sexe du patient ou la présence d'un diabète, d'une hypocalcémie ou d'une insuffisance rénale chronique ne semblent pas influencer le développement et le maintien de la neuropathie chronique (Vincenzi et al., 2013).

Des études de toxicogénétique ont également été mises en place afin d'identifier les polymorphismes associés au développement de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Les patients présentant un polymorphisme particulier pour le gène SK3 codant pour un canal potassique (13 à 15 répétitions du motif CAG) étaient plus susceptibles de développer une hyperexcitabilité nerveuse aiguë suite à un traitement par l'oxaliplatine (Basso et al., 2011). Une étude a également montré qu'un haplotype mineur de la glyoxylate aminotransférase (AGXT), associé à une diminution de son activité, était prédictif à la fois de la neurotoxicité aiguë et chronique de l'oxaliplatine (Gamelin et al., 2007). Les auteurs attribuent cet effet à une diminution du métabolisme de l'oxalate. L'étude du polymorphisme d'ERCC1² C118T a révélé une précocité accrue du développement de la neuropathie de grade 1 chez les patients porteurs du génotype C/C comparés aux patients de génotype C/T ou T/T (Inada et al., 2010). Une autre étude a établi un lien entre le polymorphisme Leu33Pro de l'intégrine β 3 (protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire) et la sévérité de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine. L'intégrine β 3 jouerait un rôle de neuroprotection en favorisant l'activité de ERK1/2 dans les neurones périphériques (Antonacopoulou et al., 2010). Enfin, un des polymorphismes les plus étudiés concerne l'enzyme Glutathion-S-transférase P1 (GSTP1) qui participe à l'inactivation de plusieurs substances toxiques, y compris les

² ERCC1 est impliquée dans le système NER (Nucleotide excision repair) permettant de réparer les lésions à l'ADN, et notamment les d'adduits de platine. Le polymorphisme C118T affecte la stabilité et l'expression de l'ARN messager d'ERCC1, diminuant ainsi son activité.

anticancéreux. Une substitution nucléotidique sur le codon 5 (A313G) conduit à la substitution d'une isoleucine par une valine (Ile105Val) au niveau du site catalytique de GSTP1, diminuant ainsi l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ce polymorphisme (GSTP1 Ile105Val) a été associé à une augmentation de la fréquence et/ou de la sévérité de neurotoxicité chronique de l'oxaliplatine dans plusieurs études (Chen et al., 2010b, Lecomte et al., 2006, Li et al., 2010, Ruzzo et al., 2007). A l'inverse, Inada et al. ont rapporté une apparition plus précoce de la neuropathie chronique chez les patients possédant le génotype de référence (Ile/Ile) comparés aux patients porteurs du génotype Ile/Val ou Val/Val (Inada et al., 2010). Cependant, cette étude ainsi qu'une autre (Kweekel et al., 2009) n'ont pas retrouvé d'association entre ce polymorphisme et l'incidence ou la sévérité de la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

II.3. Evaluation

Le diagnostic des neuropathies chimio-induites est souvent hétéroclite, ce qui peut expliquer la variabilité de l'incidence rapportée des neuropathies d'une étude à l'autre. Plusieurs échelles internationales telles que l'échelle NCI-CTC ou l'échelle de l'OMS permettent de grader la sévérité de la neuropathie (Tableau 1). La singularité des symptômes de la neurotoxicité de l'oxaliplatine a conduit à l'élaboration d'une échelle plus spécifique lors de sa phase de développement (Levi et al., 1993). Cependant, cette échelle s'est révélée comparable à celle du NCI-CTC en termes de sensibilité de détection de la neurotoxicité (Kautio et al., 2011). La surveillance clinique des symptômes est réalisée par l'oncologue et le médecin traitant ainsi que, le cas échéant, par les professionnels assurant la prise en charge à domicile. L'examen clinique est itératif et programmé, afin d'identifier les symptômes évocateurs d'une neuropathie chimio-induite, à savoir une atteinte symétrique, distale, principalement sensitive avec une distribution en « gants et chaussettes » et une survenue liée à l'administration de la chimiothérapie. En complément de l'évaluation générale, le médecin peut avoir recours à un examen physique évaluant la force globale et segmentaire aux quatre membres, les réflexes ostéo-tendineux (achilléens, rotuliens, tricipitaux, stylo-radicaux et cubito-pronateurs), la sensibilité au toucher et/ou à la piquûre ainsi que la proprioception (signe de Romberg). L'exploration de la fonction des nerfs périphériques peut être réalisée par la mesure des vitesses de conduction nerveuse, le tracé électromyogramme des muscles distaux ainsi que l'évaluation sensitive quantitative (mesure des seuils vibratoires et thermoalgiques). Ces tests permettent de préciser le type de fibres atteintes mais leurs résultats montrent davantage d'hétérogénéité et discordent souvent avec les symptômes cliniques observés. Les biopsies cutanées, bien qu'invasives, représenteraient une alternative à la biopsie nerveuse et permettraient

d'évaluer l'évolution de la neuropathie, notamment par la présence d'une ré-innervation (Cavaletti and Marmioli, 2010).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus pour l'évaluation des neuropathies chimio-induites, ni de méthode standardisée à l'échelle internationale. L'utilisation des échelles de notation a montré une variabilité importante entre les utilisateurs, associée à une sous-estimation de la sévérité des symptômes (Postma et al., 1998). De plus en plus d'études s'intéressent au développement et la validation de critères d'évaluation subjectifs utilisant des auto-questionnaires. Ces outils ont l'avantage d'intégrer la notion de qualité de vie et de s'intéresser au vécu du patient. C'est le cas par exemple du PNQ (*Patient Neurotoxicity Questionnaire*) qui permet d'évaluer l'impact de la neuropathie sur l'exécution des tâches de la vie courante (écrire, conduire, lacer ses chaussures, boutonner ses vêtements, etc.) (Shimozuma et al., 2009). Une étude réalisée chez des patients traités par l'oxaliplatine a montré une forte discordance entre l'incidence de la neuropathie rapportée par les cliniciens (selon l'échelle NCI-CTC) et les résultats de ce questionnaire. Alors que seulement 10% des patients avaient été diagnostiqués avec une neurotoxicité sévère, les résultats du PNQ ont mis en évidence une limitation physique substantielle due aux symptômes neuropathiques chez 60% des patients (Bennett et al., 2012). Ainsi, l'intégration de la perspective du patient dans l'évaluation des neuropathies chimio-induites semble donc être une mesure importante pour augmenter la sensibilité et la fiabilité du diagnostic. Cependant, la spécificité de ces questionnaires doit encore être démontrée par des études à grande échelle afin d'être intégrés dans la pratique courante.

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Echelle NCI-CTC AE						
Neuropathie sensitive	Normal	Paresthésies légères, perte des réflexes ostéo-tendineux	Paresthésies modérées, perte sensitive objective légère ou modérée	Paresthésies causant un déficit fonctionnel, perte sensitive objective sévère	Perte sensitive permanente avec déficit fonctionnel	Mort
Echelle OMS						
	Normal	Diminution des réflexes ostéo-tendineux ou paresthésies	Paresthésies sévères	Perte sensitive invalidante, douleur neuropathique sévère		
Echelle de Lévi (oxaliplatine)						
	Normal	Paresthésie, dysesthésie de courte durée (< 7 jours)	Paresthésies, persistant entre 8 et 14 jours	Paresthésies, persistant entre les cycles	Paresthésies causant un déficit fonctionnel	

Tableau 1 : Echelles de gradation de la neurotoxicité périphérique.

II.4. Traitements

Le traitement et la prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine reposent sur l'information aux patients des risques de l'exposition au froid, la modification du protocole d'administration, l'administration de cations divalents ou l'utilisation d'agents pharmacologiques.

I.1.1. Modifications du protocole d'administration de l'oxaliplatine

Les adaptations posologiques consistent en premier lieu à diminuer la dose administrée d'oxaliplatine. Les principaux critères décisionnels sont la persistance des symptômes entre les cures, leur relation avec une exposition au froid, la présence de douleurs ainsi qu'une atteinte fonctionnelle et/ou des anomalies sensibles à l'examen neurologique. Dans ce cas, la dose administrée de 85 mg/m² est réduite à 75 mg/m² en situation adjuvante et à 65 mg/m² en situation métastatique (Saif and Reardon, 2005). Un prolongement de la durée de la perfusion d'oxaliplatine

(d'initialement 2 h à 6 h) permet généralement de diminuer les dysesthésies pharyngolaryngées en diminuant le Cmax d'environ 30%. Dans ce cas, les réductions de doses ne sont pas nécessaires.

Des pauses thérapeutiques, basée sur la réversibilité des symptômes de la neurotoxicité aiguë, ont également été envisagées. La stratégie proposée consiste à interrompre les perfusions d'oxaliplatine après 6 cycles tout en continuant les perfusions de 5-FU/Leucovorine, puis de réintroduire l'oxaliplatine dans le protocole de chimiothérapie. L'étude OPTIMOX visait à comparer l'efficacité et la tolérance du schéma FOLFOX4 classique (oxaliplatine 85 mg/m²) et du schéma FOLFOX7 intermittent (oxaliplatine 130 mg/m² et perfusion de 5-FU/Leucovorine pendant 6 cycle suivi d'un arrêt complet de l'oxaliplatine associé à un maintien du 5-FU puis d'une réitération de FOLFOX7 pendant 6 cycles) (Tournigand et al., 2006). L'incidence de la neuropathie était plus faible dans le bras « oxaliplatine en intermittence » que dans le bras « oxaliplatine en continu ». Cependant, le nombre de neurotoxicité de grade 3 n'était pas significativement différent d'un bras à l'autre (13% avec FOLFOX7 intermittent versus 19% avec FOLFOX4 continu). L'étude CONCePT a également comparé l'intérêt d'une pause thérapeutique dans la chimiothérapie. Cet essai clinique a utilisé un schéma FOLFOX7 modifié (oxaliplatine 85 mg/m²) associé au bévacizumab dans les deux bras de l'étude, mais avec un arrêt de l'oxaliplatine au 8^{ème} cycle (avec maintenance du 5-FU/Leucovorine/bévacizumab pendant 8 cycles). L'incidence de la neuropathie de grade 3 était significativement réduite dans le bras intermittent par rapport au bras continu (8% versus 22%). De plus, le schéma intermittent était associé à une meilleure survie sans progression que le bras continu (Grothey et al., 2008). Ainsi, les pauses thérapeutiques semblent au moins aussi efficaces que l'utilisation de l'oxaliplatine en continu, et semblent être associées à une réduction de la neurotoxicité sévère. Cependant, le délai de réintroduction de l'oxaliplatine dans le protocole de chimiothérapie est encore incertain, et le schéma optimal d'administration à utiliser avec cette approche reste encore à être déterminé.

II.4.1. Perfusions de calcium/magnésium

L'hypothèse de l'implication de l'oxalate dans la genèse des troubles sensoriels aigus (voir paragraphe II.6.1) a conduit à l'évaluation de l'efficacité de la perfusion de cations divalents dans la prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Les résultats obtenus sont souvent contradictoires et encore très controversés dans la littérature.

Une étude rétrospective non randomisée a d'abord montré des résultats encourageants suite à une perfusion de glucuronate de calcium et de sulfate de magnésium (1 g/1 g, pendant 15 min avant et après la cure de chimiothérapie), suggérant une réduction de l'incidence et de la sévérité de la neurotoxicité ainsi qu'un délai de rémission plus précoce (Gamelin et al., 2004). Trois études

prospectives, randomisées et contrôlées ont ensuite été conduites afin de confirmer ces résultats. L'étude CONcePT a également évalué, en plus de la stratégie *stop and go*, l'effet des perfusions de calcium/magnésium (Hochster et al., 2007). La suspicion d'un taux de réponse au traitement inférieur dans le bras recevant ces perfusions lors de l'analyse intermédiaire a conduit à l'arrêt prématuré de l'essai. Cependant, une analyse indépendante a démontré rétrospectivement l'absence d'effet des perfusions de calcium/magnésium sur la progression du cancer, mais également aucun bénéfice sur l'incidence de la neurotoxicité, que ce soit dans le groupe recevant de l'oxaliplatine en continu ou par intermittence. Une étude rétrospective sur les résultats de l'étude CAIRO2 n'a également rapporté aucun bénéfice substantiel des perfusions sur l'incidence des neuropathies de grade 3/4 (Knijn et al., 2011). A l'inverse, l'étude prospective N04C7 sur des patients traités par FOLFOX en continu a démontré que les perfusions de calcium/magnésium permettaient de réduire significativement la neurotoxicité de grade 2 ou plus (22% *versus* 41%). En outre, les patients présentaient moins de crampes musculaires, mais toujours autant de dysesthésies induites par le froid (Grothey et al., 2011). Malheureusement, cette étude a été interrompue prématurément au regard des résultats de l'étude CONcePT et de l'interprétation erronée sur la diminution de l'efficacité du traitement anticancéreux. Les résultats préliminaires de l'étude NEUROXA semblent également indiquer une diminution significative de l'incidence des neuropathies de grade 3 dans un des groupes (5% *versus* 24%), mais sans indiquer de quel groupe il s'agit afin de maintenir l'aveugle (Gamelin et al., 2008). Une autre étude conduite à Singapour par Chay et ses collaborateurs a évalué de manière objective l'utilité des perfusions de calcium et de magnésium en utilisant les vitesses de conduction nerveuse. Les résultats n'ont montré aucun effet sur l'incidence de la neuropathie cumulative ni sur l'évaluation subjective des troubles sensoriels aigus. A l'inverse, les auteurs ont rapporté une augmentation du nombre de conductions nerveuses anormales dans le groupe recevant le calcium et le magnésium (Chay et al., 2010). Enfin, une étude japonaise a également obtenu des résultats négatifs concernant le bénéfice de ces perfusions (Ishibashi et al., 2010).

Ainsi, l'hétérogénéité des résultats concernant cette stratégie ne permet pas de conclure au bénéfice des perfusions de calcium et de magnésium pour la prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Une méta-analyse récente ayant regroupé les résultats de ces études a permis de conclure à un effet bénéfique des perfusions de calcium/magnésium (Xu et al., 2013), alors qu'une seconde a montré l'absence d'effet significatif sur la neurotoxicité de l'oxaliplatine (Wu et al., 2012). Cependant, toutes deux s'accordent sur l'innocuité de cette stratégie concernant l'efficacité des chimiothérapies du cancer colorectal. Cette discordance peut s'expliquer par les différences au niveau de l'évaluation de la neurotoxicité, reposant presque exclusivement sur l'échelle NCI-CTC

qui a déjà montré des limites de sensibilité et de reproductibilité d'un investigateur à l'autre (Postma et al., 1998). L'intégration de critères de mesure objectifs associés à des questionnaires d'auto-évaluation de l'intensité des symptômes et de la qualité de vie permettrait d'augmenter la sensibilité et la fiabilité de l'évaluation de la neurotoxicité ainsi que la reproductibilité des résultats.

Très récemment, Loprinzi et ses collaborateurs ont communiqué les résultats de l'étude de phase III N08CB évaluant l'effet neuroprotecteur des perfusions de calcium/magnésium, en utilisant le questionnaire EORTC QLQ-CIPN20 comme critère d'évaluation principal. Cette étude randomisée en double aveugle a été conduite sur 353 patients traités par chimiothérapie FOLFOX. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les groupes concernant l'incidence de la neuropathie cumulative, la dose cumulée reçue ou encore le taux de discontinuation de la chimiothérapie. De plus, l'incidence de la neurotoxicité aiguë n'était pas significativement plus faible dans le groupe à l'essai comparé au groupe contrôle (Loprinzi et al., 2013). Au vu de ces résultats, les perfusions de glucuronate de calcium et de sulfate de magnésium seraient donc totalement inefficaces pour prévenir la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

II.4.2. Approches pharmacologiques

Plusieurs traitements pharmacologiques ont fait l'objet d'études cliniques afin d'évaluer leur efficacité dans la prévention et le traitement de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Cependant, aucun médicament n'a montré une efficacité substantielle justifiant son utilisation en routine (Tableau 2).

A l'heure actuelle, il existe très peu d'études comparatives permettant de guider les cliniciens dans le choix d'un traitement approprié pour soulager la douleur neuropathique chimio-induite. Les recommandations actuelles favorisent l'utilisation d'antidépresseurs et d'antiépileptiques en première ligne et des opioïdes en seconde ligne, par analogie avec les douleurs neuropathiques d'étiologie traumatique, métabolique ou post-infectieuse (Dworkin et al., 2010, Piano et al., 2013). Cependant, les neuropathies chimio-induites représentent une condition douloureuse bien particulière, pour plusieurs raisons. Premièrement, les mécanismes physiopathologiques sont différents, et varient même en fonction de l'anticancéreux neurotoxique considéré (voir paragraphe II.6). Deuxièmement, ces neuropathies affectent des patients déjà fragilisés par le cancer, une pathologie lourde qui affecte profondément la qualité de vie. En sus, l'efficacité antalgique de ces molécules, bien que démontrée chez les patients souffrant de douleurs neuropathiques « non cancéreuse », s'est souvent révélée décevante dans le traitement de ces neuropathies iatrogènes (Bennett, 2011, Mitchell et al., 2006). Une étude randomisée a récemment montré l'efficacité antalgique de la duloxétine chez des patients traités par le paclitaxel ou par l'oxaliplatine (Smith et al., 2013). C'est actuellement la seule étude de phase III contrôlée montrant

qu'un médicament possède un effet bénéfique dans ce type de douleur. Cependant, même si l'effet de la duloxétine est significatif, il est à noter que seulement 59% des patients ont présenté une réduction de la douleur suite au traitement (ainsi que 39% des patients dans le groupe placebo).

Ainsi, il n'existe à l'heure actuelle aucune recommandation spécifique pour le traitement des neuropathies post-chimiothérapie, et le niveau de preuve scientifique justifiant l'utilisation d'une molécule plutôt qu'une autre est souvent insuffisant (Piano et al., 2013).

Traitement étudié	Stratégie	Résultats sur la neuropathie	Références
Glutathion (versus placebo)	Préventive	Réduction grade 3	(Cascinu et al., 2002)
N-acétylcystéine (versus placebo)	Préventive	Réduction grade ≥ 2	(Lin et al., 2006)
Glutamine	Préventive	Réduction grade 3	(Wang et al., 2007)
Amifostine (versus glutamine)	Préventive	Réduction grade 1-2 et 3-4	(Lu et al., 2008)
Carbamazépine	Préventive	Aucune différence statistique	(von Delius et al., 2007)
Oxcarbazépine	Préventive	Réduction de l'incidence	(Argyriou et al., 2006)
Gabapentine	Préventive	Aucune différence significative	(Mitchell et al., 2006)
Venlafaxine (versus placebo)	Préventive	Réduction grade 3	(Durand et al., 2003)
Xaliproden (versus placebo)	Préventive	Réduction grade 3	(Cassidy et al., 2006)
Acide lipoïque (versus placebo)	Préventive	Aucune différence significative	(Guo et al., 2011)
Bloqueurs de canaux calciques	Préventive	Réduction de l'incidence de la neurotoxicité aiguë	(Tatsushima et al., 2013)
Vitamine E (versus placebo)	Préventive	Aucune différence significative	(Afonseca et al., 2013)
Neurotropine (versus placebo)	Préventive	Réduction grade ≥ 2	(Zhang et al., 2012)
Venlafaxine (versus placebo)	Curative	Réduction grade 3	(Durand et al., 2003)
Lamotrigine (versus placebo)	Curative	Aucune différence significative	(Rao et al., 2008)

Tableau 2: Prévention et traitement de la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine.

II.5. Modèles animaux

Afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la genèse et le maintien des neuropathies induites par l'oxaliplatine, de nombreux modèles animaux reproduisant la symptomatologie clinique de cette neurotoxicité ont été développés. Ces modèles ont été principalement utilisés pour l'étude des mécanismes intégrés de la douleur neuropathique et l'évaluation préclinique de nouveaux antalgiques (Authier et al., 2009). Les principaux modèles de neuropathie induite par l'oxaliplatine sont décrits dans le Tableau 3.

Les modèles animaux de neuropathie toxique sont considérés comme des modèles de douleur très pertinents, en comparaison aux modèles de neuropathie traumatique qui ne visent pas à reproduire une étiologie mais plutôt une symptomatologie clinique. Cependant, la prédictibilité clinique de ces modèles, notamment en terme d'efficacité des antalgiques, s'est révélée décevante. La disparité des protocoles d'administration des anticancéreux utilisés dans la littérature peuvent expliquer ce constat.

Espèce	Souche	Sexe	Age / Poids	Traitement	Durée	Voie	Dose cumulée	Symptomatologie	Référence
Rat	Sprague-Dawley	Male	220-250 g	2 mg/kg x1	1	i.v.	2 mg/kg	Allodynie mécanique et thermique (chaud et froid)	(Joseph and Levine, 2009)
Rat	Sprague-Dawley	Male	175-200 g	6 mg/kg x1	1	i.p.	6 mg/kg	Allodynie mécanique, allodynie au froid, hyperalgie au froid	(Ling et al., 2007b)
Rat	Sprague-Dawley	Male	220-250 g	2 mg/kg x1	1	i.v.	2 mg/kg	Hyperalgie mécanique, allodynie au froid et au chaud	(Joseph et al., 2008)
Souris	C57BL/6	Male	6 sem	3 mg/kg x1	1	i.p.	3 mg/kg	Allodynie mécanique	(Gauchan et al., 2009)
Souris	C57BL/6	Male	20-25 g	6 mg/kg x1	1	i.p.	6 mg/kg	Allodynie mécanique, allodynie et hyperalgie au froid	(Descoeur et al., 2011)
Rat	Sprague-Dawley	Male	175-200 g	2 mg/kg 2x/sem	28	i.v.	18 mg/kg	Allodynie et hyperalgie mécanique, hyperalgie au froid et au chaud, allodynie au froid	(Ling et al., 2007a)
Rat	Sprague-Dawley	Male	175-200 g	2 mg/kg x5	5	i.p.	10 mg/kg	Allodynie et hyperalgie mécanique, allodynie au froid	(Xiao et al., 2012)
Souris	C57BL/6	Male	14 sem	3 mg/kg x5, x2 à 5j d'écart	21	i.p.	30 mg/kg	Allodynie mécanique, Hyperalgie au froid	(Ta et al., 2009)
Souris	C57BL/6	Femelle	20 g	3,5 mg/kg, 2x/sem	28	i.v.	28 mg/kg	Allodynie mécanique, Hyperalgie au froid	(Renn et al., 2011)
Souris	C57BL/6	Male	5-12 sem	40 µg	1	intraplantaire	40 µg	Allodynie mécanique, allodynie au froid	(Deuis et al., 2013)

Tableau 3: Principaux modèles animaux de neuropathie induite par l'oxaliplatine.

II.6. Toxicodynamie

II.6.1. Neurotoxicité aiguë

La neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine a été décrite comme une canalopathie³, impliquant les canaux ioniques dépendants du voltage. Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'oxaliplatine était capable d'altérer la cinétique d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants, provoquant une diminution de l'amplitude des courants entrants, un déplacement du seuil d'activation de ces canaux vers des valeurs plus négatives (ces canaux deviennent activés par des voltages moins positifs) ainsi qu'un allongement de la période réfractaire, conduisant ainsi à un état d'hyperexcitabilité nerveuse transitoire (Adelsberger et al., 2000, Grolleau et al., 2001, Webster et al., 2005). Un effet sur les canaux potassiques a également été mis en évidence (Benoit et al., 2006, Kagiava et al., 2008).

Comme initialement proposé par Grolleau et ses collaborateurs en 2001, les symptômes neurologiques aigus induits par l'oxaliplatine ont été attribués à la formation d'oxalate (libéré lors du métabolisme de l'oxaliplatine) qui pourrait induire une perturbation de l'activation des canaux ioniques en chélatant les ions calciques intracellulaires au niveau neuronal (Grolleau et al., 2001). Cependant, cette hypothèse est très controversée. Premièrement, il a été montré *in vitro* qu'une exposition aiguë à l'oxaliplatine ne modifie pas les concentrations intracellulaires en calcium (Schulze et al., 2011). De plus, les concentrations d'oxaliplatine utilisées dans ces études sont parfois très élevées, allant jusqu'à 500 μM , alors que chez l'Homme, la concentration plasmatique maximale atteinte après une perfusion de 2 h à 85 mg/m² (protocole FOLFOX4) est d'environ 5 μM (Graham et al., 2000). Seules deux de ces études ont utilisé des concentrations d'oxaliplatine plus pertinentes (1 μM), toutes deux rapportant un effet sur les canaux potassiques (Benoit et al., 2006, Kagiava et al., 2008). Deuxièmement, l'oxalate est bien connu pour causer une atteinte rénale due à la précipitation de cristaux d'oxalate de calcium, notamment dans le cas d'intoxication à l'éthylène glycol⁴ (Fraser, 2002). Il est probable qu'à des concentrations capables de modifier les propriétés biophysiques des canaux ioniques voltage-dépendants, l'oxalate serait également responsable d'une forte toxicité rénale associée à une hypocalcémie, ce qui est très rarement observé chez les patients traités par l'oxaliplatine (Haller, 2000). Réciproquement, bien que l'ingestion d'éthylène glycol provoque certains troubles neuromusculaires (myoclonies et crise de tétanie) qui pourraient

³ Atteinte fonctionnelle des canaux ioniques

⁴ Ether de glycol utilisé comme antigel dans les liquides de refroidissement. L'intoxication à l'éthylène glycol (par ingestion) est rare, seulement une centaine de cas recensés en France. Les symptômes comprennent une atteinte neurologique est digestive en premier lieu (nausées, vomissements, somnolence, coma puis convulsions), suivie de troubles de la fonction cardiaque, pulmonaire et rénale. Le décès survient suite à la défaillance multiviscérale. La toxicité de l'éthylène glycol est due à la formation de dérivés toxiques (oxalate et glyoxylate) lors de son métabolisme.

ressembler à ceux observés après l'administration aiguë d'oxaliplatine, des dysesthésies induites par le froid n'ont jamais été rapportées dans les cas d'intoxication (Fraser, 2002). Cet argument pourrait expliquer l'échec relatif des perfusions de calcium/magnésium dans la prévention de ces troubles neurosensoriels (voir paragraphe II.4.).

Des données récentes suggèrent un effet plus spécifique de l'oxaliplatine sur les canaux ioniques voltage-dépendants, bien que celui-ci reste à être démontré. Dimitrov et Dimitrova ont récemment mis en évidence un mécanisme intéressant qui pourrait expliquer l'hyperexcitabilité nerveuse induite par l'oxaliplatine. Cette étude a montré qu'un blocage des canaux potassiques au niveau des internodes d'axones myélinisés pouvait créer une source de décharges secondaires suite à un potentiel d'action saltatoire (Dimitrov and Dimitrova, 2011). Ainsi, l'oxaliplatine pourrait sensibiliser les fibres myélinisées A δ , et n'importe quel stimulus mineur (tel qu'un contact avec le froid) pourrait induire une réponse beaucoup plus forte de ces fibres. Cependant, la pertinence de ce mécanisme reste encore à être démontrée *in vivo*.

Beaucoup d'études se sont intéressées à l'implication des canaux ioniques TRP (*Transient Receptor Potential*) dans la pathogénie de la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine, notamment à cause de leur rôle dans la thermo-sensation et la mécano-transduction qui sont fréquemment altérées chez les patients. Plus particulièrement, l'hypersensibilité au froid a été reliée à une anomalie de certains acteurs moléculaires impliqués dans la transduction du froid tels que TRPM8 et TRPA1. Chez la souris, une surexpression du canal TRPM8 (activé par des températures froides ou par le menthol) a été observée dans les ganglions de racine dorsale trois jours après administration aiguë d'oxaliplatine. L'injection systémique de capsazépine, un antagoniste non sélectif de TRPM8, permet d'atténuer l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine (Gauchan et al., 2009). Une autre étude a également retrouvé une surexpression de TRPM8 dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine chez le rat (Kawashiri et al., 2012). Cependant, les résultats obtenus par deux autres études suggèrent une implication préférentielle de TRPA1, sans modification de l'expression de TRPM8 (Descœur et al., 2011, Zhao et al., 2012). L'étude de Descœur et ses collaborateurs a mis en évidence une modification du profil d'expression de plusieurs canaux ioniques dans les ganglions spinaux après une administration d'oxaliplatine chez la souris. Les auteurs ont retrouvés une sous-expression des canaux potassiques inhibiteurs TREK-1, TRAAK et K_v1.1 ainsi qu'une surexpression des canaux pro-exciteurs Na_v1.8, TRPA1 et HCN1 (Descœur et al., 2011). Les auteurs émettent l'hypothèse que ce remodelage transcriptionnel concernerait les nocicepteurs exprimant le canal TRPM8 et TRPA1, conduisant à un état d'hyperexcitabilité des fibres impliquées dans la transduction du froid. 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, ainsi que

par l'utilisation de l'ivabradine, antagoniste non sélectif des canaux HCN, capable d'atténuer l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011).

Ainsi, les données de la littérature concernant l'implication de ces canaux sont souvent contradictoires et semblent fortement dépendantes du modèle utilisé. De plus, l'implication de ces canaux est souvent basée sur l'observation d'une sous-expression ou surexpression de l'ARN messenger par la technique de transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR). Cependant, la formation d'adduits de platine au niveau des acides nucléiques peut théoriquement perturber la fixation des amorces et donc biaiser les résultats quantitatifs obtenus.

II.6.2. Neurotoxicité chronique

La neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine ressemble cliniquement à celle observée avec le cisplatine et le carboplatine, ce qui suggère un mécanisme d'action commun. La neurotoxicité des sels de platine serait directement due à la formation d'adduits à l'ADN des neurones périphériques des ganglions spinaux (McDonald et al., 2005, Ta et al., 2006), pour lesquels ils ont une affinité particulière (Gregg et al., 1992). L'expression des transporteurs membranaires CTR1, ATP7A, OCT1 et OCT2 a été retrouvée dans les ganglions spinaux chez le rat et pourrait être responsable du tropisme de l'oxaliplatine pour le tissu nerveux périphérique (Ip et al., 2010, Jong et al., 2011). Lorsque le nombre d'adduits à l'ADN surpasse les capacités de réparation cellulaire, les neurones entrent en phase de mort cellulaire programmée par apoptose. Plus précisément, il a été montré que des neurones post-mitotiques exposés au cisplatine subissaient une entrée dans le cycle cellulaire. Ce phénomène déclenche ainsi des mécanismes pro-apoptotiques via l'activation des voies de signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire (Gill and Windebank, 1998). D'un point de vue histologique, un traitement chronique à l'oxaliplatine induit une diminution des vitesses de conduction nerveuses sensitives chez le rat associée à une diminution de la taille des noyaux, des nucléoles et du soma des neurones des ganglions spinaux de la racine dorsale (Holmes et al., 1998).

La neurotoxicité de l'oxaliplatine pourrait également être due à la formation d'adduits à l'ADN mitochondrial au sein des neurones des ganglions spinaux comme cela a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* suite à une exposition au cisplatine (Garrido et al., 2008). Ces adduits sont responsables d'une altération fonctionnelle de la chaîne respiratoire, une diminution de la production d'ATP ainsi qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Dans des neurones en culture, une exposition au cisplatine induit une inhibition de la réplication de l'ADN mitochondrial, une diminution de l'expression des gènes et des modifications morphologiques caractérisées par une vacuolisation des mitochondries (Podratz et al., 2011). Sur un

modèle animal de neuropathie induite par l'oxaliplatine, l'administration d'antioxydants tels que l'acétyl-L-carnitine, l'acide α -lipoïque ou la vitamine C, ainsi que l'administration d'inhibiteurs de la chaîne de transport des électrons permet d'atténuer l'hypersensibilité douloureuse (Joseph and Levine, 2009).

La contribution des cellules satellites gliales au développement de la neuropathie induite par l'oxaliplatine a également été démontrée. Plus précisément, les animaux traités par l'oxaliplatine présentent une augmentation de l'expression de GFAP, un marqueur de l'activation astrocytaire, ainsi qu'une augmentation des protéines de jonctions communicantes (« gap junctions »), à la fois dans les ganglions spinaux (Warwick and Hanani, 2013) et dans la corne dorsale de la moelle épinière (Yoon et al., 2013). L'administration d'un bloqueur de ces jonctions, la carbenoxolone, produit un effet antalgique chez l'animal.

II.6.3. Comparaison aux autres anticancéreux neurotoxiques

La neurotoxicité est un effet indésirable important de nombreux anticancéreux comprenant les taxanes (paclitaxel et docétaxel), les sels de platine (cisplatine, oxaliplatine et carboplatine), les vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine, vindésine et vinorelbine), les épothilones (ixabepilone), l'étoposide, la thalidomide et le bortézomib. Toutes ces molécules sont responsables d'une neurotoxicité dose-limitante qui se manifeste par des neuropathies périphériques très invalidantes. Bien que le mode d'action anticancéreux de ces molécules diffère d'une classe à l'autre, des études précliniques tendent à mettre en évidence des mécanismes neurotoxiques communs. Une revue de la littérature, présentée ci-après, résume les principales hypothèses mécanistiques émergentes concernant la physiopathologie des neuropathies chimio-induites.

ARTICLE 1: "EMERGING TRENDS IN UNDERSTANDING
CHEMOTHERAPY-INDUCED NEUROPATHY"

(ACCEPTÉ DANS CURR PAIN HEAD REP)

Emerging trends in understanding chemotherapy-induced peripheral neuropathy

Jérémy Ferrier (MSc)^{1,2}, Vanessa Pereira (MSc)^{1,2}, Jérôme Busserolles (PhD)^{1,2}, Nicolas Authier (PhD, MD, PharmD)^{1,2,3}, David Balayssac (PhD, PharmD)^{1,2,3}

1. Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
2. INSERM, U1107 NEURO-DOL, F-63001 Clermont-Ferrand, France.
3. CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author: David Balayssac, Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, 28, place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand cedex 01, France. Tel: +33 473178041; Fax: +33 473274621; E-mail address: dbalayssac@chu-clermontferrand.fr

Keywords: anticancer drugs; neurotoxicity; ion channels; mitochondria; oxidative stress; glial cells; neuropathic pain.

Abstract

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a major concern in oncology practice given the increasing number of cancer survivors and the lack of effective treatment. The incidence of peripheral neuropathy depends upon the anticancer drug used, but is commonly under-reported in clinical trials. Several animal models have been developed in an attempt to better characterize the pathophysiological mechanisms underlying these CIPN and to find more specific treatments. Over the past two decades, three main trends have emerged from preclinical research on CIPN. There is a compelling body of evidence that neurotoxic anticancer-drugs affect the peripheral sensory nerve by directly targeting the mitochondria and producing oxidative stress, by functionally impairing the ion channels and/or by triggering immunological mechanisms through the activation of satellite glial cells. These various neurotoxic events may account for the lack of effective treatment, as neuroprotection may probably only be achieved using a polytherapy that targets all of these mechanisms. The aim of this review is to describe the clinical features of CIPN and to summarize the recent trends in understanding its pathophysiology.

Introduction

The number of cancer survivors is constantly increasing in the western world, attesting to the therapeutic progress of improved cancer management and increased survival rates. Consequently, taking into account the long-term consequences of cancer treatments is of major importance in oncology practice. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a major dose-limiting adverse effect of many anticancer drugs such as platinum salts (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin), spindle poisons (taxanes and vinca alkaloids), bortezomib and thalidomide [1]. Patients experience a combination of sensory and motor symptoms that can be both painful and painless, the most reported being numbness, loss of balance, muscle weakness, tingling and burning pain [2].

The incidence, severity and persistence of these neuropathies strongly depend on the anticancer drug involved. Clinical assessment is challenging due to the lack of reliable, standardized and validated tests that could help the physician to identify the presence and severity of CIPN [3]. Subjective methods, such as the Patient Neurotoxicity Questionnaire (PNQ), have been developed that could help to identify patients at risk of developing a CIPN or to measure the patient's response to a treatment. A recent study has reported a very significant difference between the physician's diagnosis of CIPN, using a standardized neurological examination with National Cancer Institute – Common Terminology Criteria (NCI-CTC) grading, and the patients self-reported intensity and severity using the PNQ [4]. Hence, CIPN is very likely to be under-reported by physicians and the severity and functional impact on daily activities are often underestimated regarding patients subjective experience.

Several therapeutic strategies have been tried in order to prevent or overcome the neurotoxic effects of these compounds, but so far without success. CIPN is currently treated symptomatically, but no effective neuroprotective agent has been reported. CIPN is considered to be resistant to most of first-line treatments for neuropathic pain [5]. Dose reduction or treatment discontinuation is the only recourse of the oncologists to limit the apparition of neuropathic symptoms. However, these dosage adjustments may strongly affect the prognosis of cancer remission. In addition, neurotoxicity of anticancer drugs has an important negative impact on patients quality of life and especially on daily living activities [6], eventually leading to emotional distress [2]. Patients with CIPN are also associated with a great economic burden, with considerably higher healthcare costs than cancer patients without peripheral neuropathy [7]. Hence, there is a strong need for improvement in CIPN management and prevention, which requires a greater understanding of its particular pathophysiology.

The molecular and cellular mechanisms leading to CIPN have been extensively studied over the past two decades. Animal models that mimic the clinical neuropathic symptoms have been developed in an attempt to understand the integrated mechanisms of neurotoxicity and the molecular events leading to CIPN [8]. However, the pathophysiology of these neuropathies is still a matter of debate. Three main mechanisms have emerged from preclinical studies: 1) mitotoxicity and oxidative stress, 2) ion channel involvement and 3) inflammatory processes through the activation of glial cells. This article will review and discuss the latest findings on CIPN research and highlight the recent advances in its therapeutic treatment.

Clinical features

Platinum Salts

Cisplatin is used as a first or second-line of treatment against a wide range of solid tumors (lung, ovary, bladder, testicular, head and neck, esophagus, stomach, colon, pancreas, melanoma, breast, prostate, mesothelioma, leiomyosarcoma and glioma) [9]. Cisplatin-induced neuropathy is dependent on the cumulative dose and generally appears after 400–700 mg/m² [10]. About 28% of patients develop symptomatic neuropathies, of which 6% suffer from incapacitating polyneuropathies [11]. This CIPN is primarily sensory-based, with paresthesias, sensory ataxia, loss of vibratory sensitivity and a decrease or loss of tendon reflexes [10]. Proprioceptive alterations, muscular cramps and Lhermitte's sign are described in severe cases of neuropathy [12]. These symptoms are usually reversible after discontinuation of treatment, but recovery is often very slow.

Oxaliplatin is widely used for the treatment of advanced colorectal cancer. Neurotoxicity is the dose-limiting adverse effect, with two components: an acute nerve hyperexcitability and a chronic cumulative peripheral neuropathy. In more than 90% of treated patients, oxaliplatin is responsible for sensory symptoms including cold-induced dysesthesias in the hands and the circumoral area, numbness and tingling in the extremities, muscle weakness and neuropathic pain [13, 14]. Muscle spasms or cramps are often reported, sometimes described as stiffness in the hands and feet or an inability to release the grip. These symptoms are more likely to develop shortly after chemotherapy (within hours or a couple of days of completion) and are usually self-limited, resolving in a few days. However, they usually reoccur following subsequent administration and increase in both duration and severity. In addition, pharyngolaryngospasm syndrome, distinct from cold-induced pharyngolaryngeal dysesthesias, can appear in less than 1% of patients within hours of oxaliplatin infusion and without any sign of respiratory distress [15, 16].

With the repetition of chemotherapy cycles, 50 to 70% of patients develop a persistent peripheral neuropathy, manifesting as a symmetric, distal, primarily sensory polyneuropathy

characterized by the persistence of paresthesias between the chemotherapy cycles, numbness in the hands and feet and neuropathic pain. In the most severe cases, patients may suffer from sensory ataxia as well as a deep and superficial sensory loss, eventually leading to functional impairment [17]. The severity of this CIPN depends on both the cumulated dose received and its intensity. The median time to onset of grade 3 neurotoxicity is at the 10th cycle, namely a cumulative dose of 874 mg/m² [18]. Improvement of the neurological symptoms is observed after discontinuation of treatment, with a median time to recovery of 13 weeks [18]. However, a recent study has shown the persistence of neuropathic symptoms 29 months after the last chemotherapy cycle for almost 80% of treated patients, seriously challenging the reversibility of this neuropathy [19]. Moreover, peripheral neuropathy may develop and worsen several months after cessation of chemotherapy [20]. This phenomenon, known as coasting, is shared by all platinum drugs and highlights the importance of finding early clinical markers of chronic neuropathy. Interestingly, the intensity of acute thermal hypersensitivity (especially cold allodynia) is a relevant clinical marker of early oxaliplatin neurotoxicity and may predict an increased risk of developing chronic and severe CIPN [21].

Spindle poisons

Vinca Alkaloids

Vincristine is a major anticancer drug in hematology and pediatrics (sarcoma) but represents the most neurotoxic among the *Vinca* alkaloids [22]. Around 50% of patients experience sensory-motor peripheral neuropathies [23]. Vincristine neurotoxicity is cumulative and dose-dependent [24]. Symptoms appear after a cumulative dose of 12 mg while chemotherapy should be stopped after a cumulative dose of 30-50 mg [25, 26]. Neuropathy includes numbness and tingling of the hands and feet with paresthesias and dysesthesias, and a loss of deep tendon reflexes. The most severe cases can be associated with distal muscle weakness. Autonomic disorders can also be found in more than a third of patients [24]. More rarely, patients develop eye movement disturbances and paralysis of the vocal cords [24]. After treatment discontinuation, the reversal of neurological symptoms is usually slow, taking several months [25].

Taxanes

Paclitaxel is approved for the treatment of various tumors (ovary, breast, head and neck, and lung) [27]. It is responsible for sensory neuropathy which may begin as early as 24-72 hours after the administration of a single high dose and affects 59% to 78% of patients [23, 28]. The neuropathy is dependent on the cumulative dose (>1,400 mg/m²), the dose magnitude during each

cycle (>200 mg/m²) and the perfusion duration (short duration) [10, 29]. This CIPN is associated with paresthesia, numbness, tingling and burning, and mechanical and cold allodynia. Patients describe the symptoms as a “stocking-and-glove” distribution that affects the feet and the toes [28]. Perioral numbness has also been reported [30]. Loss of tendon reflexes, vibration sensation and proprioception can also be observed [28]. More rarely, motor symptoms such as mild distal weakness with myalgia are found, affecting toe extensor muscles [31, 32].

As with paclitaxel, docetaxel is mainly used for the treatment of solid tumors (breast, lung, stomach and androgen-independent prostate cancer). Docetaxel-induced neuropathy is mainly sensory and correlated to cumulative dose [33]. Severe neuropathies may appear after a cumulative dose of 600 mg/m² [34] and can be associated with motor impairment [35]. However, compared to paclitaxel, docetaxel-induced neuropathy is less frequent (1% to 9% - grade 3/4) [36], with only mild sensory symptoms that reverse spontaneously after treatment discontinuation [34].

Thalidomide

Thalidomide is used in the treatment of multiple myeloma [37]. About 40% of patients experience neuropathy and this proportion increases to 100% after 7 months of thalidomide therapy [38, 39]. This CIPN is characterized by sensory neuropathy associated with paresthesia, tingling, dysesthesia and a slight loss of tactile sensation at the extremities of the limbs [39]. The severity of the neuropathy is probably dose-dependent but definitive correlation with doses or treatment durations has yet to be clarified [40-41].

Bortezomib

Bortezomib is also approved for the treatment of multiple myeloma [42]. Neurotoxicity, generally occurring within the first chemotherapy courses, is one of the most non-hematological and dose-limiting toxicities of bortezomib [22]. Pain is the most prominent symptom in neuropathic patients [43] and is reported in approximately 50% of previously untreated patients and 81% of previously treated patients [44]. In the majority of cases, the neuropathy is reversible [45].

Pathophysiology: cellular and subcellular targets

In the past two decades, the development of *in vitro* and *in vivo* models has provided valuable tools for the study of the pathogenesis of CIPN [8]. Nowadays, it is well known that one anticancer drug may act on various subcellular targets of peripheral sensory nerves, and that one mechanism of neurotoxicity may be shared by several chemotherapeutic agents, independent of their antitumor properties. Hence, there is still no consensus on the molecular mechanisms leading

to the development of CIPN. The main neurotoxic mechanisms of anticancer drugs identified so far are summarized in Figure 3.

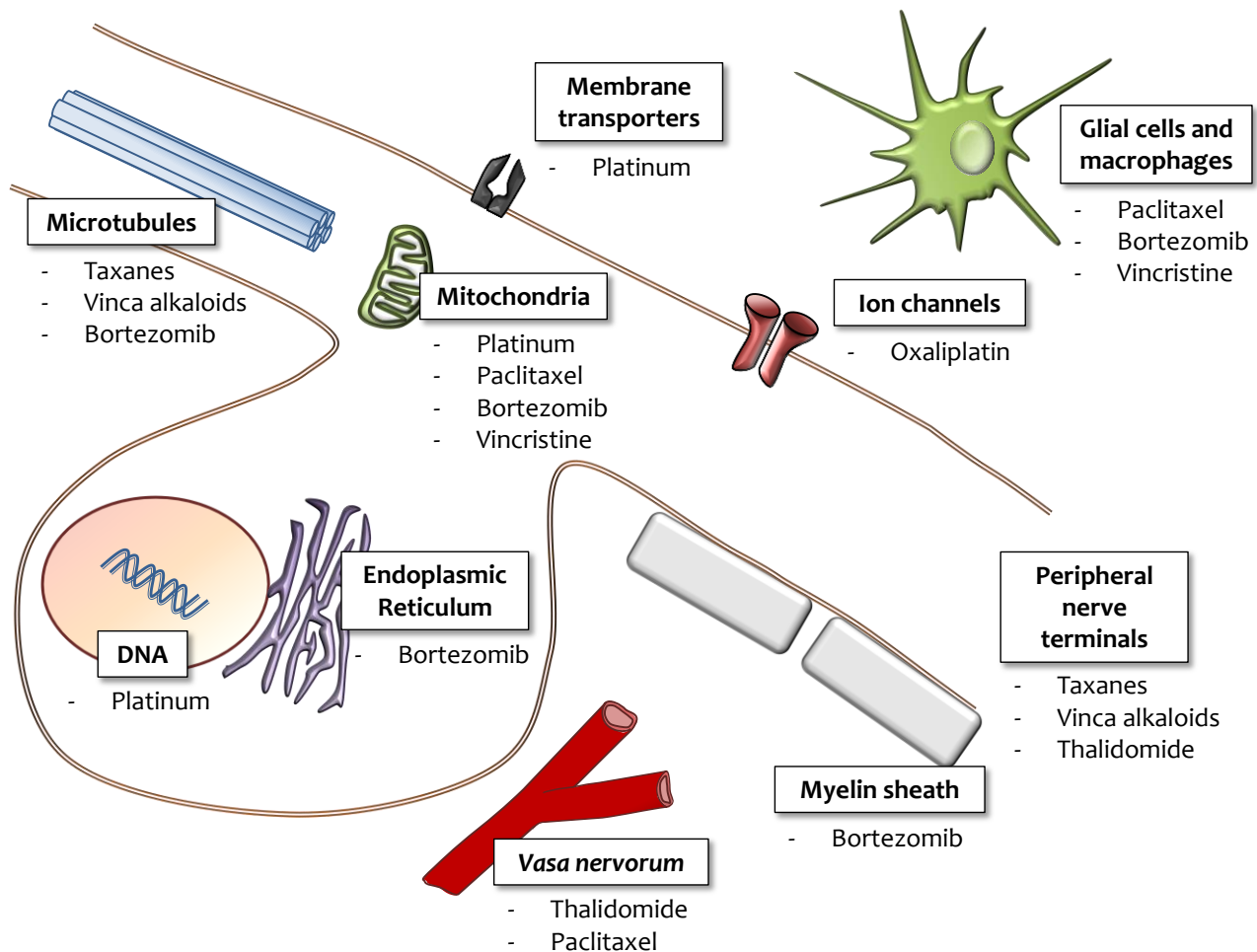


Figure 3 : Schematic representation of the main cellular and subcellular actors involved in the pathogenesis of CIPN at the dorsal root ganglia level. Although neurotoxic anticancer drugs display different pharmacological mechanisms, several neurotoxic mechanisms (i.e. neuronal targets) are shared by various chemotherapeutic agents from different classes.

Toxicokinetics of anticancer drugs

Recent work has suggested a specific relationship between the toxicokinetics of anticancer drugs and their neurotoxicity, suggesting that several membrane transporters could contribute to the uptake of the anticancer drugs by dorsal root ganglia (DRG) and nerves [46-48]. Platinum salts are substrates for ATP-Binding Cassette (ABC) proteins (ABCC1, 2 and 4), solute carrier (SLC) proteins (SLC22A, 31A and 47A) and ATPase membrane proteins (ATP7A and 7B), which means that these drug carriers can influence the influx or efflux of platinum salts across cell membranes, and consequently their cellular uptake [48]. For example, copper transporters may be associated

with the neurotoxicity of platinum drugs in rats [49, 50]. Ctr1 and ATP7A transporters were overexpressed in rat DRG with a neuron specific pattern; large-sized neurons expressed rCtr1 and medium- or small-sized neurons expressed ATP7A [49, 50]. What's more, in treated rats, equitoxic doses of oxaliplatin, cisplatin or carboplatin caused a selective toxicity in rCtr1-expressing DRG neurons, but not in ATP7A expressing neurons [49]. The organic cation/carnitine transporters rOcn1 (SLC22A4) and rOcn2 (SLC22A5) can mediate oxaliplatin neurotoxicity and are strongly expressed in rat DRG [51]. Inversely, low level ABCC2 (Multidrug Resistance Protein 2 – MRP2) gene expression was found in DRG compared to the brain and spinal cord of the rat, which could facilitate peripheral neurotoxicity with cisplatin by decreasing the platinum salt efflux out of cells [47]. The same observation has been made for *Vinca* alkaloids and taxanes, which are substrates of ABCB1 (P-glycoprotein – P-gp). In the rats, ABCB1 genes were less expressed in the DRG compared to the brain and spinal cord, and the activity of the efflux proteins (measured by the incorporation of a radioactive substrate - ^{99m}Tc -sestamibi) was lower in the peripheral nervous system (PNS) (DRG and sciatic nerve) compared to the central nervous system (CNS) (brain and spinal cord). These results suggest that the PNS would be less protected by the blood nerve barrier than the CNS would be with the blood brain barrier, explaining the susceptibility of the PNS to neurotoxic anticancer drugs [46, 47]. In agreement with this suggestion, DRG concentrations of platinum salts or paclitaxel are close to those achievable in tumor tissue, while much lower concentrations can be detected in the CNS [52-54]. However, more experiments (histology, pharmacology and toxicology) will be required to advance our understanding of these cellular transportation mechanisms.

Platinum salts

Oxaliplatin-induced acute neurotoxicity has been described as a channelopathy, involving voltage-gated sodium and potassium channels. Oxaliplatin would shift the voltage dependence of both Na^+ and K^+ channels toward more negative voltages (the channels become activated by lower positive charges), thus leading to a transient nerve hyperexcitability [55-59]. As first hypothesized by Grolleau *et al.* (2001), oxaliplatin-associated acute neurologic disorders have long been attributed to oxalate, an oxaliplatin metabolite, which could induce a transient and non-functional disruption of voltage-gated ion channels by chelating intracellular calcium ions in neurons [57]. However, recent evidence questions this hypothesis. Firstly, intracellular calcium concentrations have been shown to be unaffected following acute exposure to oxaliplatin [60]. Secondly, the concentrations of oxaliplatin used in these studies were sometimes very high (up to 500 μM), while it has been shown that the maximum plasmatic concentration of oxaliplatin after a dose of 85 mg/m²

infused over 2 hours (FOLFOX regimen) is about 5 μM [61]. Oxalate is known to be responsible for renal and neurological damage caused by the formation of calcium oxalate crystals, as in ethylene glycol poisoning [62]. It is very likely that an oxalate concentration sufficiently high to influence the voltage dependency of sodium channels would also cause a strong renal toxicity associated with hypocalcaemia, which is rarely observed in patients receiving oxaliplatin [15]. Similarly, although ethylene glycol toxicity is associated with neuromuscular symptoms that resemble those induced by oxaliplatin, cold-induced dysesthesia has never been documented in any case of ethylene glycol intoxication [62]. Recent evidence suggests that oxaliplatin has a specific effect on voltage-gated channels [63], although the exact mechanism of action remains unknown. Dimitrov and Dimitrova (2011) recently provided a new potential mechanism for oxaliplatin-induced acute nerve hyperexcitability that involves the impairment of fast potassium channel functioning in myelinated axon internodes, forming internodal sources of after-discharges in response to a saltatory action potential [64].

Oxaliplatin-induced chronic neuropathy resembles that of the other platinum compounds, cisplatin and carboplatin. In the same way, animal studies have demonstrated similar morphological changes in nervous tissues [65]. Cisplatin was responsible of nucleolar alterations (rather than nuclear ones) and a disorganization of ribosomes, with a shrinkage of the Nissl substance and an increase in neurofilaments. The somatic, nuclear and nucleolar size of DRG neurons showed a significant and dose dependent cellular atrophy without obvious neuronal loss [66]. In contrast, satellite cells were less altered than neurons [66]. Pathological changes in the peripheral nerves were very mild in comparison to neuron body cells [67]. Platinum salts have a strong affinity for the DNA of DRG cells and the neurotoxicity is believed to result from the effect of their alkylating properties on the DNA [68, 69] [53]. When platinum adducts exceed the DNA-repair capacity, neurons undergo cell death through apoptotic mechanisms. More precisely, cisplatin is able to induce cell cycle re-entry in postmitotic neurons, thus triggering apoptosis through cell cycle checkpoint signaling [70]. Recently, the formation of platinum adducts on mitochondrial DNA following cisplatin exposure has been demonstrated *in vitro* and *in vivo*. Mitochondrial toxicity could also represent an important pathophysiological basis for platinum salt neurotoxicity [71], as well as satellite glial cell activation in DRG [72].

Several studies in animal models of CIPN have pointed out the involvement of ion channels in the pathogenesis of neuropathic pain. In particular, transient receptor potential (TRP) channels have been extensively studied for their role in temperature perception and mechanosensation, two commonly altered features in patients with CIPN. Oxaliplatin-induced acute and chronic sensory disorders have been associated with sensitization of TRPV1 and TRPA1 in cultured rat DRG

neurons, potentially accounting for hot and cold hypersensitivity, respectively [73]. TRPM8 was found to be up-regulated in mice DRG at day 3 after a single oxaliplatin administration, while capsazepine (a non-selective TRPM8 channel blocker) significantly decreased cold allodynia [74]. More recently, Descoeur *et al.* (2011) demonstrated an impaired expression profile of several ion channels in mice DRG following a single oxaliplatin injection: a decreased expression of TREK-1, TRAAK and Kv1.1 and an up-regulation of Nav1.8, TRPA1 and HNC1 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 1) mRNA. Ivabradine, a non-selective HCN inhibitor, successfully reduced oxaliplatin-evoked cold allodynia in mice [75]. Oxaliplatin-induced acute and chronic sensory disorders have been associated with sensitization of TRPV1 and TRPA1 in cultured rat DRG neurons, potentially accounting for hot and cold hypersensitivity, respectively [73]. In mice lacking TRPA1, Nassini *et al.* (2011) demonstrated that oxaliplatin- and cisplatin-induced mechanical allodynia were absent and reduced, respectively [76]. Additionally, cisplatin-induced mechanical hypersensitivity has been associated with an increased expression of TRPV2, P2X3 and ASIC3 channels in DRG neurons [77].

Spindle poisons

The mechanism of action of taxanes and vinca-alkaloids involves, respectively, excessive stabilization and inhibition of mitotic spindle microtubule formation. Although DRG cells are non-proliferative, differentiated neurons, microtubules are essential for the transport of proteins from the cell body into and down the length of the axon. By impairing microtubule formation, the spindle poisons disrupt the axoplasmic transport which eventually leads to neuronal death. Longer axons are more vulnerable to axonal transport disruption which explains the stocking-and glove pattern of the resulting neuropathy, affecting primarily the lower limbs.

Nerve sections from paclitaxel or docetaxel treated animals showed an axonopathy with axonal degeneration and collapsed or fragmented myelin sheaths, when examined by light microscopy [78]. Electron microscopic examination of peripheral nerves showed primary axonal degeneration, but also the presence of Schwann cells with condensed chromatin and “nucleolus-like” formations or enlarged cytoplasmic organelles [78]. In skin biopsies of rat foot pads, intra-epidermal nerve fiber density was decreased and correlated with the neurophysiological assessment [79]. Paclitaxel induces mitochondrial abnormalities in peripheral nerves by impairing Complex I- and Complex II-mediated respiration and ATP production [80], manifesting as an increase incidence of swollen and vacuolated mitochondria in sensory axons [81] but without affecting the motor nerves [82]. This mitochondrial impairment results in the production of reactive oxygen species (ROS) reinforced by a reduction of the antioxidant defenses in peripheral neurons,

suggesting a strong involvement of oxidative stress in paclitaxel-induced neuropathy [83]. The pharmacological inhibition of ROS by a non-specific scavenger prevented mechanical hypersensitivity and attenuated established paclitaxel-induced pain [84]. The involvement of glial cells in the pathogenesis of paclitaxel-induced neuropathy has also been demonstrated. In rodents, paclitaxel treatment induces an activation of satellite glial cells in the DRG [72] and spinal cord [80], and a loss of intraepidermal nerve fibers associated with the activation of Langerhans cells [85]. An accumulation of macrophages within the DRG has also been described following paclitaxel treatment in rats [86]. A marked reduction of DRG nerve blood supply by a direct toxicity on the endothelial cells of the vasa nervorum has also been demonstrated in animals [87]. Finally, a role for TRP receptors in the pathogenesis of paclitaxel-associated pain symptoms has been shown in animals. Paclitaxel-induced pain hypersensitivity was strongly reduced by selective antagonists of TRPV1, TRPV4 and TRPA1 (depending on stimulus modality) [88] as well as in mice lacking TRPV4 [89].

The pathophysiology of *Vinca* alkaloids induced peripheral neuropathy remains poorly understood. In animals, vincristine induces an axonopathy with Wallerian-like degeneration of myelinated and unmyelinated fibers correlated with neuropathic pain symptoms [65]. In a rat model, this CIPN has been associated with an increase of calcium levels and oxidative stress in peripheral nerves, probably mediated by a mitochondrial impairment [90]. An important role of inflammatory mediators has also been linked to vincristine-induced neuropathy. An increased number of Langerhans cells and a loss of intra-epidermal nerve fibers have also been observed in the skin of vincristine-treated animals [85], as well as an increased number of macrophages in the DRG [91]. TRPV4 has also been found to be involved in the development of sensory disorders following vincristine treatment [89]. Finally, abnormal serotonin neurotransmission may be involved in the development of neuropathic pain following vincristine administration, as evidenced by an increased expression of 5HT_{2A} receptors in the superficial layers of the dorsal horn spinal cord and in the small- and medium-sized DRG cells [92]. Mice lacking the serotonin transporter 5HTT are also less sensitive to vincristine-induced neuropathic pain but not to neurotoxicity [91].

Bortezomib

Bortezomib-induced neurotoxicity has been correlated with morphological changes in DRG, affecting predominantly the Schwann and satellite cells [93]. Mitochondrial toxicity and endoplasmic reticulum stress represent the two main responses in Schwann cells following bortezomib treatment, leading to pathological adaptive responses such as demyelination and macrophage recruitment [94]. Inhibition of transcription, transport and cytoplasmic translation of

mRNAs in DRG neurons, caused by the accumulation of ubiquitin-conjugated proteins, has also been reported [95]. Recent findings suggest that bortezomib neurotoxicity may also be independent from its proteasome inhibition properties [96]. This CIPN may be caused by an indirect increase in microtubules stabilization due to an increased expression of microtubule-associated proteins [97]

Thalidomide

The toxicodynamic effects of thalidomide on peripheral nerves remains poorly elucidated. Neurotoxicity may result from the inhibition of NF- κ B leading to a dysregulation of neurotrophin sensitivity and to impaired nerve growth factor-mediated neuron survival [98]. However, this hypothesis is yet to be demonstrated. Interestingly, thalidomide has been shown to induce microvascular damage at the *vasa nervorum* level due to its antiangiogenic properties. Subsequent decreased nerve blood flow in DRG could represent a core pathological mechanism of neurotoxicity [87]. Further studies are needed to understand the pathogenesis of thalidomide-associated neuropathy, especially in animals.

Therapeutic strategies

Two therapeutic strategies have been proposed to manage CIPN, with symptomatic and preventive treatments [99]. The current pharmacotherapies used to treat CIPN involve tricyclic antidepressants (amitriptyline, nortriptyline) and anticonvulsants (gabapentin, valproic acid, lamotrigine). However these drugs have limited to no efficacy in the treatment of CIPN and are associated with important adverse drug effects that limit their chronic use [99]. A recent and robust clinical trial has demonstrated the efficacy of duloxetine (5 weeks of treatment) in reducing pain symptoms in patients suffering from paclitaxel- or oxaliplatin-induced neuropathies compared to placebo [100]. This is the first phase III study demonstrating a beneficial effect in the treatment of CIPN. However, although duloxetine has been proven to be superior to placebo with regards to pain relief, its efficacy remains relative (59% of patients reported a pain reduction versus 38% in the placebo group). New therapeutic opportunities have emerged for the treatment of CIPN with the use of cannabinoids, which must be assessed in large scale trials [101].

The use of neuroprotectants, according to the profile of anticancer drug cytotoxicity (e.g. amifostine/platinum salts and neurotrophic factors/taxanes), has also revealed a very weak efficacy in limiting or preventing CIPN [102]. In this context, the nutraceuticals (e.g. vitamin E, vitamin B6, magnesium, calcium, acetyl-L-carnitine, glutamine, glutathione, n-acetyl cysteine, omega-3 fatty acids, alpha lipoic acid), as alternative strategies to pharmacotherapy, have given promising early results in the treatment or the prevention of CIPN (for review see [103]).

Overall, the clinical assessment of therapeutic strategies suffers from the lack of harmonization among outcome measures (qualitative or quantitative) and the standardization of CIPN assessment procedures (objective versus subjective evaluation) [103]. Consequently, for a validated evidenced based medicinal treatment, therapeutic strategies for the management of CIPN must be assessed in large scale randomized controlled trials.

Conclusion

As highlighted in this review, CIPN still represents a real problem for the therapeutic management of cancer patients as it compromises both the oncological prognosis and the patient's quality of life. The number of affected patients each year is probably very high. In clinical trials, CIPN is often under-rated and under-reported by clinicians due to the lack of consensus about its evaluation. A lot of effort has been made to characterize the cellular and subcellular mechanisms underlying the neurotoxicity of anticancer drugs. Actual knowledge suggests that neurotoxicity result from several molecular events in peripheral nerves that may account for the failure of investigated drugs to prevent CIPN. Indeed, it is highly likely that only a combination of several treatments that target the highlighted mechanisms will be successful in providing neuroprotection.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

• Of importance

•• Of major importance

1. Balayssac D, Ferrier J, Descoeur J, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf* 2011,10(3):407-417.
2. Tofthagen C. Patient perceptions associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Clin J Oncol Nurs* 2010,14(3):E22-28.
3. Cleeland CS, Farrar JT, Hausheer FH. Assessment of cancer-related neuropathy and neuropathic pain. *Oncologist* 2010,15 Suppl 2:13-18.
4. Shimozuma K, Ohashi Y, Takeuchi A, et al. Feasibility and validity of the Patient Neurotoxicity Questionnaire during taxane chemotherapy in a phase III randomized trial in patients with breast cancer: N-SAS BC 02. *Support Care Cancer* 2009,17(12):1483-1491.
5. 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.
6. Driessen CM, de Kleine-Bolt KM, Vingerhoets AJ, et al. Assessing the impact of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity on the quality of life of cancer patients: the introduction of a new measure. *Support Care Cancer* 2011,20(4):877-881.
7. 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.
8. Authier N, Balayssac D, Marchand F, et al. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics* 2009,6(4):620-629.
9. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncology reports* 2004,11(3):559-595.
10. Chaudhry V, Chaudhry M, Crawford TO, et al. Toxic neuropathy in patients with pre-existing neuropathy. *Neurology* 2003,60(2):337-340.
11. Strumberg D, Brugge S, Korn MW, et al. Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Ann Oncol* 2002,13(2):229-236.
12. Siegal T, Haim N. Cisplatin-induced peripheral neuropathy. Frequent off-therapy deterioration, demyelinating syndromes, and muscle cramps. *Cancer* 1990,66(6):1117-1123.

13. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998,9(10):1053-1071.
14. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998,25(2 Suppl 5):4-12.
15. Haller DG. Safety of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2000,14(12 Suppl 11):15-20.
16. de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000,18(16):2938-2947.
17. Tofthagen C, McAllister RD, McMillan SC. Peripheral neuropathy in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin. *Clin J Oncol Nurs* 2011,15(2):182-188.
18. Grothey A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 2003,30(4 Suppl 15):5-13.
19. Park SB, Lin CS, Krishnan AV, et al. Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. *Oncologist* 2011,16(5):708-716.
20. Tofthagen C. Surviving chemotherapy for colon cancer and living with the consequences. *J Palliat Med* 2010,13(11):1389-1391.
21. Attal N, Bouhassira D, Gautron M, et al. Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 2009,144(3):245-252.
22. Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008,13(1):27-46.
23. Wilkes G. Peripheral neuropathy related to chemotherapy. *Seminars in oncology nursing* 2007,23(3):162-173.
24. Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Journal of neurology* 2002,249(1):9-17.
25. Legha SS. Vincristine neurotoxicity. Pathophysiology and management. *Medical toxicology* 1986,1(6):421-427.
26. Verstappen CC, Koeppen S, Heimans JJ, et al. Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. *Neurology* 2005,64(6):1076-1077.
27. Mekhail TM, Markman M. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2002,3(6):755-766.
28. Rowinsky EK, Chaudhry V, Cornblath DR, Donehower RC. Neurotoxicity of Taxol. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 1993(15):107-115.

29. Smith RE, Brown AM, Mamounas EP, et al. Randomized trial of 3-hour versus 24-hour infusion of high-dose paclitaxel in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-26. *J Clin Oncol* 1999,17(11):3403-3411.
30. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer research* 1987,47(9):2486-2493.
31. Berger T, Malayeri R, Doppelbauer A, et al. Neurological monitoring of neurotoxicity induced by paclitaxel/cisplatin chemotherapy. *European journal of cancer* 1997,33(9):1393-1399.
32. Chaudhry V, Rowinsky EK, Sartorius SE, et al. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. *Annals of neurology* 1994,35(3):304-311.
33. Engels FK, Verweij J. Docetaxel administration schedule: from fever to tears? A review of randomised studies. *European journal of cancer* 2005,41(8):1117-1126.
34. Hilkens PH, Verweij J, Stoter G, et al. Peripheral neurotoxicity induced by docetaxel. *Neurology* 1996,46(1):104-108.
35. Freilich RJ, Balmaceda C, Seidman AD, et al. Motor neuropathy due to docetaxel and paclitaxel. *Neurology* 1996,47(1):115-118.
36. Lee JJ, Swain SM. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. *J Clin Oncol* 2006,24(10):1633-1642.
37. Teo SK, Stirling DI, Zeldis JB. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug discovery today* 2005,10(2):107-114.
38. Corso A, Zappasodi P, Barbarano L, et al. Long-term outcome in relapsed and refractory multiple myeloma treated with thalidomide. Balancing efficacy and side-effects. *Leukemia research* 2009,33(9):e145-149.
39. Plasmati R, Pastorelli F, Cavo M, et al. Neuropathy in multiple myeloma treated with thalidomide: a prospective study. *Neurology* 2007,69(6):573-581.
40. Kocer B, Sucak G, Kuruoglu R, et al. Clinical and electrophysiological evaluation of patients with thalidomide-induced neuropathy. *Acta neurologica Belgica* 2009,109(2):120-126.
41. Zara G, Ermani M, Rondinone R, et al. Thalidomide and sensory neurotoxicity: a neurophysiological study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2008,79(11):1258-1261.
42. Jackson G, Einsele H, Moreau P, Miguel JS. Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer treatment reviews* 2005,31(8):591-602.

43. Rampen AJ, Jongen JL, van Heuvel I, et al. Bortezomib-induced polyneuropathy. *The Netherlands journal of medicine* 2013,71(3):128-133.
44. Corso A, Mangiacavalli S, Varettoni M, et al. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comparison between previously treated and untreated patients. *Leukemia research* 2010,34(4):471-474.
45. El-Cheikh J, Stoppa AM, Bouabdallah R, et al. Features and risk factors of peripheral neuropathy during treatment with bortezomib for advanced multiple myeloma. *Clinical lymphoma & myeloma* 2008,8(3):146-152.
46. Balayssac D, Cayre A, Authier N, et al. Patterns of P-glycoprotein activity in the nervous system during vincristine-induced neuropathy in rats. *J Peripher Nerv Syst* 2005,10(3):301-310.
47. Balayssac D, Cayre A, Authier N, et al. Involvement of the multidrug resistance transporters in cisplatin-induced neuropathy in rats. Comparison with the chronic constriction injury model and monoarthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2006,544(1-3):49-57.
48. Liu JJ, Lu J, McKeage MJ. Membrane transporters as determinants of the pharmacology of platinum anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2012,12(8):962-986.
49. Ip V, Liu JJ, Mercer JF, McKeage MJ. Differential expression of ATP7A, ATP7B and CTR1 in adult rat dorsal root ganglion tissue. *Mol Pain* 2010,6:53.
50. Liu JJ, Jamieson SM, Subramaniam J, et al. Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: association with platinum neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009,64(4):847-856.
51. Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, et al. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2011,338(2):537-547.
52. Cavaletti G, Tredici G, Pizzini G, Minoia A. Tissue platinum concentrations and cisplatin schedules. *Lancet* 1990,336(8721):1003.
53. 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.
54. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, et al. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 1984,54(7):1269-1275.
55. Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, et al. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 2000,406(1):25-32.
56. Benoit E, Brienza S, Dubois JM. Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na⁺ and K⁺ channels in frog peripheral myelinated axons. *Gen Physiol Biophys* 2006,25(3):263-276.

57. 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):2293-2297.
58. 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):1100-1106.
59. Webster RG, Brain KL, Wilson RH, et al. Oxaliplatin induces hyperexcitability at motor and autonomic neuromuscular junctions through effects on voltage-gated sodium channels. *Br J Pharmacol* 2005,146(7):1027-1039.
60. Schulze C, McGowan M, Jordt SE, Ehrlich BE. Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signaling: a new mechanism to explain oxaliplatin-associated peripheral neuropathy. *Clin Colorectal Cancer* 2011,10(2):126-133.
61. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, et al. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000,6(4):1205-1218.
62. Fraser AD. Clinical toxicologic implications of ethylene glycol and glycolic acid poisoning. *Ther Drug Monit* 2002,24(2):232-238.
63. Broomand A, Jerremalm E, Yachnin J, et al. Oxaliplatin neurotoxicity--no general ion channel surface-charge effect. *J Negat Results Biomed* 2009,8:2.
64. Dimitrov AG, Dimitrova NA. A possible link of oxaliplatin-induced neuropathy with potassium channel deficit. *Muscle Nerve* 2011,45(3):403-411.
65. • Marmiroli P, Nicolini G, Miloso M, et al. The fundamental role of morphology in experimental neurotoxicology: the example of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* 2012,117(2):75-97.
- This review gives a very good overview of morphology in animal models of CIPN.*
66. Tredici G, Braga M, Nicolini G, et al. Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin neurotoxicity in rats. *Exp Neurol* 1999,159(2):551-558.
67. Cavaletti G, Tredici G, Marmiroli P, et al. Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. *Acta neuropathologica* 1992,84(4):364-371.
68. McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2005,18(2):305-313.

69. 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.
70. Gill JS, Windebank AJ. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 1998,101(12):2842-2850.
71. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, et al. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* 2011,41(3):661-668.
72. Warwick RA, Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain* 2013,17(4):571-580.
73. Anand U, Otto WR, Anand P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain* 2010,6:82.
74. 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.
75. Descoeur 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):266-278.
76. Nassini R, Gees M, Harrison S, et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 2011,152(7):1621-1631.
77. Hori K, Ozaki N, Suzuki S, Sugiura Y. Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain* 2010,149(2):393-405.
78. Persohn E, Canta A, Schoepfer S, et al. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *European journal of cancer* 2005,41(10):1460-1466.
79. Lauria G, Lombardi R, Borgna M, et al. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J Peripher Nerv Syst* 2005,10(2):202-208.
80. Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol* 2011,232(2):154-161.
81. Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 2006,122(3):245-257.
82. Xiao WH, Zheng H, Zheng FY, et al. Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2011,199:461-469.

83. Barriere DA, Rieusset 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):553-561.
84. Fidanboyly M, Griffiths LA, Flatters SJ. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. *PLoS One* 2011,6(9):e25212.
85. Siau C, Xiao W, Bennett GJ. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp Neurol* 2006,201(2):507-514.
86. Nishida K, Kuchiiwa S, Oiso S, et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy. *Cancer Sci* 2008,99(8):1618-1625.
87. Kirchmair R, Tietz AB, Panagiotou E, et al. Therapeutic angiogenesis inhibits or rescues chemotherapy-induced peripheral neuropathy: taxol- and thalidomide-induced injury of vasa nervorum is ameliorated by VEGF. *Mol Ther* 2007,15(1):69-75.
88. Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* 2011,193:440-451.
89. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, et al. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* 2008,28(5):1046-1057.
90. Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Singh D. Ameliorative effects of amiloride and pralidoxime in chronic constriction injury and vincristine induced painful neuropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2008,587(1-3):104-111.
91. Hansen N, Uceyler N, Palm F, et al. Serotonin transporter deficiency protects mice from mechanical allodynia and heat hyperalgesia in vincristine neuropathy. *Neurosci Lett* 2011,495(2):93-97.
92. Thibault K, Van Steenwinckel J, Brisorgueil MJ, et al. Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* 2008,140(2):305-322.
93. Merregalli C, Canta A, Carozzi VA, et al. Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *Eur J Pain* 2009,14(4):343-350.
94. Shin YK, Jang SY, Lee HK, et al. Pathological adaptive responses of Schwann cells to endoplasmic reticulum stress in bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Glia* 2010,58(16):1961-1976.

95. Casafont I, Berciano MT, Lafarga M. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox Res* 2009,17(2):167-178.
96. Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res* 2011,17(9):2734-2743.
97. Poruchynsky MS, Sackett DL, Robey RW, et al. Proteasome inhibitors increase tubulin polymerization and stabilization in tissue culture cells: a possible mechanism contributing to peripheral neuropathy and cellular toxicity following proteasome inhibition. *Cell Cycle* 2008,7(7):940-949.
98. Briani C, Zara G, Rondinone R, et al. Thalidomide neurotoxicity: prospective study in patients with lupus erythematosus. *Neurology* 2004,62(12):2288-2290.
99. Kaley TJ, Deangelis LM. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *British journal of haematology* 2009,145(1):3-14.
100. •• Smith EM, 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 : the journal of the American Medical Association* 2013,309(13):1359-1367.
This study presents a very recent and robust trial on the duloxetine efficacy.
101. Lynch ME, Cesar-Rittenberg P, Hohmann AG. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Pilot Trial With Extension Using an Oral Mucosal Cannabinoid Extract for Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Journal of pain and symptom management* 2013.
102. Argyriou AA, Bruna J, Marmioli P, Cavaletti G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Critical reviews in oncology/hematology* 2012,82(1):51-77.
103. • Schloss JM, Colosimo M, Airey C, et al. Nutraceuticals and chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN): A systematic review. *Clinical nutrition* 2013.
This review gives a very good overview of nutraceuticals used to treat CIPN.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

La neurotoxicité de l'oxaliplatine demeure un problème non résolu qui affecte un grand nombre de patients chaque année. Les perfusions de sels de calcium et de magnésium n'apportent finalement aucun bénéfice aux patients au regard des études récentes. L'aspect positif de ce constat est qu'il soulève à nouveau la problématique de la gestion des effets indésirables de l'oxaliplatine, un domaine qui s'est longtemps reposé sur une pratique qui se révèle finalement empirique et inefficace. Ainsi, plus que jamais, la recherche de nouveaux traitements neuroprotecteurs devient indispensable. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques exige au préalable une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la pathogénie de cette neurotoxicité. Une stratégie de recherche translationnelle «*from bench to bedside*»⁵ utilisant des techniques innovantes et des modèles pré-cliniques pertinents permettrait ainsi d'ouvrir des perspectives thérapeutiques jusqu'alors inexplorées.

L'ensemble du travail expérimental exposé dans ce manuscrit utilise une approche métabolomique basée sur l'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (¹H-RMN). La métabolomique est définie comme l'analyse qualitative et quantitative du métabolome, c'est-à-dire l'ensemble des molécules de faible poids moléculaire synthétisées par un système biologique. D'une manière simplifiée, un métabolite peut être considéré comme une petite molécule qui n'est pas le résultat direct de l'expression d'un gène. L'analyse métabolomique est une approche globale, au même titre que la protéomique et la transcriptomique et qui s'inscrit en complément de celles-ci. Elle permet d'évaluer les variations quantitatives et qualitatives du métabolome sans *a priori*, afin de comprendre et/ou prédire la réponse d'un organisme à divers stimuli extérieurs et de formuler des hypothèses mécanistiques précises, en lien avec le phénotype observé. L'étude du métabolome est une approche infiniment pertinente, puisque celui-ci peut être considéré comme l'ultime réponse d'un organisme à un stimulus (une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou toute autre variation de son environnement), comme illustré ci-après (Figure 4).

⁵ Terme anglo-saxon signifiant littéralement « de la paille au chevet du malade ».

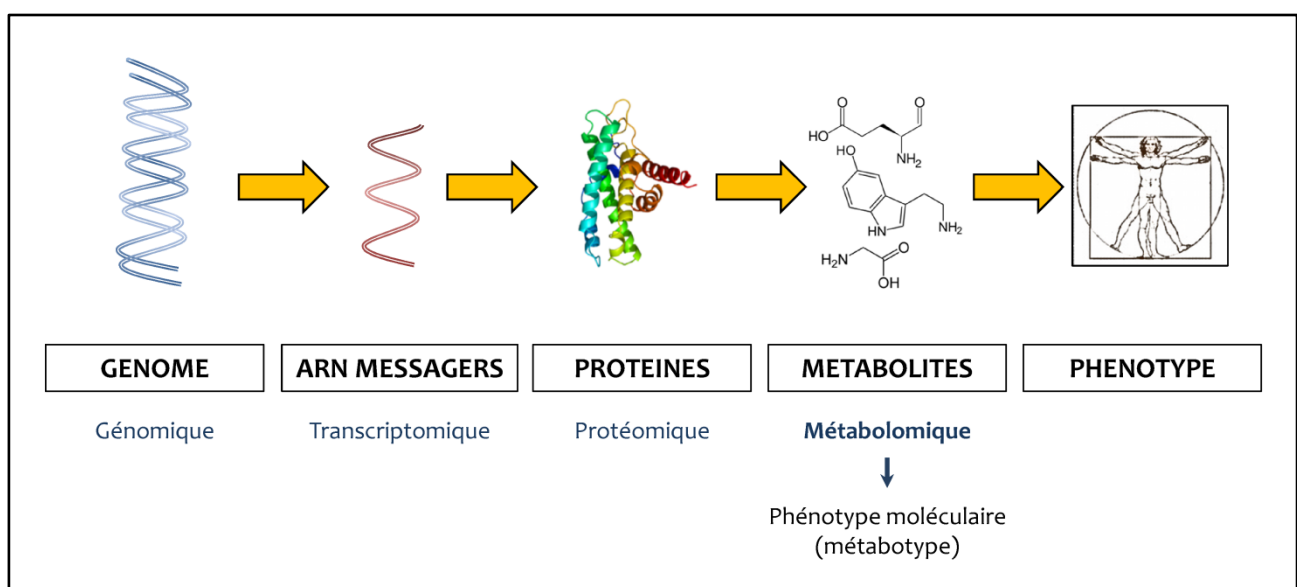


Figure 4 : Place de la métabolomique parmi les autres « omics ».

Cette technique a été très largement utilisée en toxicologie afin d'identifier des biomarqueurs de toxicité en comparant les empreintes métaboliques d'un système biologique en réponse à un xénobiotique. A l'heure actuelle, le domaine d'application de la métabolomique s'est étendu à l'oncologie, la pharmacologie, l'écologie, la microbiologie/parasitologie ou encore la nutrition. Dans cette étude, l'utilisation de la RMN a permis d'évaluer les variations métaboliques au niveau du système nerveux central chez le rat, d'une part au niveau spinal en réponse à l'oxaliplatine et/ou une nutrithérapie induisant des modifications phénotypiques au niveau comportemental (Chapitre 2), et d'autre part au niveau supraspinal en réponse à la chronicisation de la neuropathie périphérique (Chapitre 3).

CHAPITRE 2 : EFFET PREVENTIF D'UN REGIME SANS POLYAMINES

CHAPITRE 2 : EFFET PREVENTIF D'UN REGIME SANS POLYAMINES

I. Le récepteur NMDA

Le récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) est un récepteur ionotropique pro-excitateur, largement exprimé au niveau du système nerveux central. Il s'agit d'un récepteur-canal à ouverture conditionnelle, dont l'activation est dépendante de la fixation de son ligand endogène, le glutamate, et d'un co-agoniste, la glycine (ou la D-sérine). Le récepteur NMDA est perméable non seulement aux cations monovalents, mais également aux ions calcium (Ca^{2+}). Cette propriété lui confère un véritable rôle de transducteur cellulaire, capable de convertir un signal extracellulaire (libération synaptique de glutamate) en une réponse intracellulaire (activation de voies de signalisation en cascade dépendante du calcium).

I.1. Structure

La famille du récepteur NMDA est composée de 7 sous-unités (NR1, NR2A-D, NR3A et NR3B), assemblées sous forme de structure tétramérique, formant un canal ionique perméable aux ions Ca^{2+} (Chazot, 2004). Ces sous-unités possèdent une organisation en quatre domaines (Figure 5). On distingue tout d'abord un domaine C-terminal intracellulaire, impliqué dans les régulations post-traductionnelles du récepteur et extrêmement variable d'une sous-unité à l'autre. Au niveau des sous-unités NR2, il contient des domaines PDZ⁶ à l'origine d'interactions avec des protéines d'échafaudage, d'adhésion et d'ancrage à la membrane ou des complexes de signalisation (Niethammer et al., 1996). Ce domaine contient également de nombreux sites de phosphorylation capables de modifier l'activité du récepteur. Toutes les sous-unités sont ensuite constituées de 4 segments hydrophobes (M1, M2, M3 et M4) mais seulement 3 d'entre eux forment des domaines transmembranaires (M1, M3 et M4). Le segment M2 forme une boucle ré-entrante à l'origine de la formation du canal. Il possède un résidu asparagine dans une séquence de 3 acides-aminés (le site

⁶ Domaines permettant l'interaction avec les protéines de la densité post-synaptique (PSD). Ces protéines appartiennent à la famille des MAGUKs (*Membrane Associated GUanylate Kinases*) telles que PSD-95 ou SAP102. Ce sont des protéines d'échafaudage impliquées dans l'ancrage et le regroupement des récepteurs NMDA au niveau de la membrane ainsi que dans le couplage du récepteur à certaines voies de signalisation.

QRN) qui lui confère une haute perméabilité pour le calcium et une forte sensibilité au magnésium (Burnashev, 1996). Les résidus qui le composent jouent donc un rôle primordial dans la perméabilité du canal ainsi que dans ses propriétés de conductance et de sensibilité au voltage.

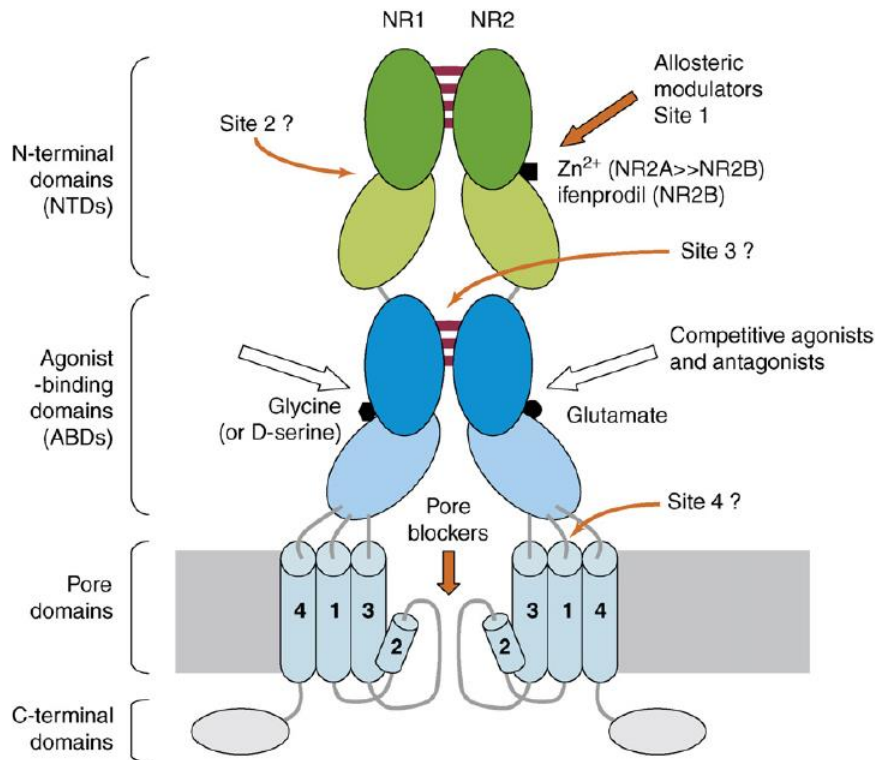


Figure 5 : Topologie membranaire du récepteur NMDA (Paoletti and Neyton, 2007).

Le domaine ABD (*Agonist Binding Domain*) est constitué de deux segments extracellulaires (de N-terminal à M1 et de M3 à M4) formant les domaines de fixation des ligands S1 et S2 (Wollmuth and Sobolevsky, 2004). Ces domaines de fixation possèdent une structure tertiaire remarquable, organisée selon un motif de type « *clamshell*⁷ » (Paoletti et al., 2013). La fixation des agonistes au niveau de la poche centrale provoque un remaniement tri-dimensionnel de ces deux domaines selon un mode dit « *Venus Flytrap*⁸ » correspondant au repliement des domaines S1 et S2 sur le ligand (fermeture du coquillage). Enfin, le domaine NTD (*N-terminal Domain*) joue non seulement un rôle important dans l'assemblage des sous-unités (Meddows et al., 2001) mais également dans la formation de sites de liaisons aux ligands allostériques (non compétitifs) qui modulent l'activité du récepteur NMDA. C'est le cas par exemple des ions zinc (Zn^{2+}) capables de se lier aux NTD des sous-unités NR2A et NR2B avec une forte (nM) et une faible (μM) affinité, respectivement (voir paragraphe I.3.1). Des études de mutagenèse dirigée couplée à la modélisation

⁷ Coquilles d'un coquillage

⁸ Terme anglo-saxon faisant référence à la Dionée attrape-mouche (*Dionaea muscipula*), la plus emblématique des plantes carnivores.

moléculaire ont montré que les ions Zn^{2+} se fixent au niveau du sillon central du NTD et favorisent la fermeture des deux domaines, à l'instar du glutamate sur le site ABD (Paoletti et al., 2000). Le domaine NTD permet donc de rendre compte, en partie, de la variabilité observée entre les récepteurs NMDA de composition différente en sous-unités NR2, en termes de propriétés intrinsèques mais également pharmacologiques.

I.1.1. NR1

La sous-unité NR1 est encodée par un seul gène (NMDAR1 ou GRIN1), mais son transcrit peut générer au moins 8 variants fonctionnels par épissage alternatif (Stephenson, 2001). L'expression de NR1 est ubiquitaire dans le système nerveux central (Takai et al., 2003). En effet, son intégration dans la composition du récepteur NMDA est nécessaire, quoi que non suffisante, à la fonctionnalité de celui-ci car elle contient le site de reconnaissance de la glycine.

I.1.2. NR2

Les quatre sous-unités NR2 (NR2A à NR2D) sont codées par 4 gènes différents (GRIN2A-D) et possèdent approximativement 50% d'homologie de séquence entre elles. Les sous-unités NR2 possèdent un profil d'expression particulier, qui diffère de celui de NR1 autant d'un point de vue spatial que temporel. Au stade embryonnaire, l'expression des sous-unités NR2B et NR2D prédomine alors que celle de NR2A et NR2C est absente (Takai et al., 2003). A l'inverse, dans le cerveau adulte, NR2A prédomine avec une expression ubiquitaire, NR2B est restreinte au prosencéphale alors que NR2C est hautement exprimée dans le cervelet et les bulbes olfactifs (Monyer et al., 1994). Au niveau spinal, la sous-unité NR2A est restreinte aux couches III et IV de la corne dorsale et possède une distribution variable au niveau ventral. NR2B est retrouvée au niveau des couches superficielles de la corne dorsale et également au niveau ventral (Mutel et al., 1998, Sundstrom et al., 1997). A l'inverse, NR2C et NR2D sont très peu exprimées au niveau spinal (Tolle et al., 1993). La présence de NR2B, NR2C et NR2D a également été mise en évidence dans les fibres sensibles périphériques. En revanche, les fibres afférentes primaires ne semblent pas exprimer NR2A (Marvizon et al., 2002). La sous-unité NR2 détermine la diversité fonctionnelle des récepteurs NMDA, ainsi que leur sensibilité, leur conductance et leur cinétique d'activation/désactivation. Le domaine C-terminal intracellulaire de la sous-unité NR2 est généralement plus long que celui de NR1. Il est depuis longtemps associé à la capacité des récepteurs NMDA à interagir avec certains complexes intracellulaires qui vont contrôler sa mobilité membranaire ainsi que sa localisation cellulaire (voir paragraphe I.1).

I.1.3. NR3

La découverte des sous-unités NR3A et NR3B est plus récente que celle des autres sous-unités du récepteur NMDA. Elles contiennent un site de fixation pour la glycine au niveau de leur domaine ABD. Chez le rat, NR3A est largement exprimée au niveau du cortex, du mésencéphale et de l'hippocampe pendant le développement (Al-Hallaq et al., 2002), puis son expression diminue progressivement jusqu'à devenir restreinte au thalamus, l'amygdale et le tractus olfactif à l'âge adulte (Nishi et al., 2001, Sucher et al., 1995). NR3B est fortement exprimé dans les neurones somatiques moteurs de l'encéphale, du tronc cérébral et de la moelle épinière à partir du 10^{ème} jour post-natal (Fukaya et al., 2005, Nishi et al., 2001).

L'incorporation d'une sous-unité NR3 dans la conformation du récepteur induit une diminution de la conductance du canal, de la perméabilité aux ions Ca^{2+} ainsi qu'une diminution de la sensibilité au Mg^{2+} (Sasaki et al., 2002).

I.2. Cinétique d'activation

Il est généralement admis que la majorité des récepteurs NMDA sont présents sous forme de « dimères de dimères », intégrant le plus souvent deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 (Dingledine et al., 1999). Dans cette conformation « classique », il a été suggéré que ces deux types de sous-unités adoptent une organisation en tandem (NR1/NR1/NR2/NR2) (Qiu et al., 2005, Schorge and Colquhoun, 2003), mais des données récentes sont davantage en faveur d'une configuration alternée (NR1/NR2/NR1/NR2) autour du pore (Riou et al., 2012). Des formes hétérotrimériques (composées d'une sous-unité NR1 et d'au moins deux sous-unités NR2 différentes) ont également été mises en évidence au niveau cortical (Luo et al., 1997) et cérébelleux (Chazot et al., 1994) chez le rat. Outre cette diversité conformationnelle, les récepteurs NMDA présentent des propriétés remarquables qui les distinguent des autres récepteurs ionotropiques (Paoletti et al., 2013) :

- (1) Le canal ionique des récepteurs NMDA est sujet à un blocage voltage-dépendant par le magnésium.
- (2) Ils possèdent une forte perméabilité aux ions Ca^{2+} .
- (3) Ils présentent une cinétique lente (de 100 ms à 1 s) due à la longue rétention du glutamate au niveau de son site de fixation.
- (4) Leur activation nécessite à la fois la fixation du glutamate et d'un co-agoniste (glycine ou D-sérine).

- (5) Ils sont constitués d'une série de sites de modulation qui leur confèrent une sensibilité exceptionnelle au microenvironnement extracellulaire.

Les récepteurs NMDA participent très peu à la neurotransmission de base car leur activation est conditionnée par plusieurs phénomènes. Au potentiel de repos, ils demeurent bloqués par un bouchon Mg^{2+} . Cette inhibition ne peut être levée que par une dépolarisation de la membrane dans laquelle ils sont ancrés. Cette dépolarisation peut être obtenue par l'activation des récepteurs AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), une autre classe de récepteurs ionotropiques au glutamate. Ces derniers sont directement activables par le glutamate, sans autre condition, et sont responsables d'un courant entrant dans l'élément post-synaptique, qui peut suffire à réduire la force entrante du Mg^{2+} et le blocage exercé par ces ions sur la perméabilité des récepteurs NMDA.

Le mécanisme d'activation du récepteur NMDA (conduisant à l'ouverture du canal) n'implique que le domaine ABD et le domaine transmembranaire. Dans un premier temps, la liaison du glutamate et du co-agoniste sur le site de reconnaissance du domaine ABD induit la fermeture du motif « *clamshell* » (mécanisme *Vénus flytrap*). Cette modification de la structure tri-dimensionnelle du récepteur va provoquer un écartement de la partie inférieure du domaine ABD de chaque dimère, en raison de leur association par la partie supérieure. En conséquence, cet écartement va exercer une traction sur la partie intermédiaire qui relie les domaines ABD au domaine transmembranaire, provoquant l'ouverture du canal par réorientation d'une hélice transmembranaire (Mayer, 2006). S'il est maintenant bien admis que l'activation du récepteur NMDA nécessite la fixation de 2 molécules de glutamate et de 2 molécules de glycine, le modèle conformationnel d'ouverture du canal n'est que partiellement connu. Deux grands modèles d'activation ont été décrits dans la littérature (Wollmuth and Sobolevsky, 2004). Dans le premier, les quatre sites de reconnaissance des ligands doivent être occupés afin de déclencher l'ouverture concertée du canal. A l'inverse, dans le deuxième modèle, chaque sous-unité apporte sa contribution à l'ouverture du canal, donnant lieu à différents états d'activation intermédiaires avec une ouverture partielle du canal. L'activation des récepteurs NMDA obéit probablement à un mécanisme d'ouverture concertée (Banke and Traynelis, 2003), alors que le deuxième modèle concernerait plus probablement les récepteurs AMPA, pour lesquels différents niveaux de conductance ont été décrits, reflétant les différents niveaux d'ouverture du canal ionique (Rosenmund et al., 1998).

I.3. Régulation de l'activité des récepteurs NMDA

I.3.1. Modulateurs allostériques endogènes

Comme énoncé précédemment, plusieurs molécules (principalement des ions) présentes dans le milieu synaptique vont être capables de moduler l'activité des récepteurs NMDA. La sensibilité à ces modulateurs dépend fortement de la composition sous-unitaire du récepteur.

- Protons extracellulaires

Le pH extracellulaire au niveau du système nerveux central est très dynamique et influence la fonction d'une multitude de processus biochimiques et de protéines, y compris les récepteurs glutamatergiques. Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2A, NR2B ou NR2D sont inhibés par les protons extracellulaires avec une IC₅₀ proche des concentrations physiologiques (pH 7,0 – 7,4), suggérant une inhibition tonique de ces récepteurs en conditions normales (Gielen et al., 2009, Traynelis et al., 1995). Les protons sont responsables d'une réduction de la fréquence d'ouverture du canal indépendamment du voltage ou de la fixation des agonistes (McBain and Mayer, 1994). Cette inhibition est contrôlée par la sous-unité NR2 mais également par la présence d'un exon de la sous-unité NR1. L'intégration de l'exon 5 lors de l'épissage alternatif de NR1 provoque une diminution de la sensibilité au pH (IC₅₀ = pH 6,6 - 6,8) (Traynelis et al., 1995). A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus concernant l'existence d'un site senseur des protons ou sa localisation au sein du récepteur. Cependant, des études de mutagenèse dirigée ont montré qu'un groupe de résidus situés à l'interface dimérique des sites ABD, à proximité du canal, étaient impliqués dans la sensibilité au pH (Gielen et al., 2008, Low et al., 2003).

L'importance physiologique de cette inhibition par les protons est encore inconnue. Cependant, le pH extracellulaire varie sensiblement au cours de la transmission synaptique, lors de l'activation des récepteurs au glutamate ou encore lors de la recapture du glutamate (Chesler and Kaila, 1992), ce qui signifie que l'amplitude des courants NMDA peut être régulée au gré de l'intensité de la transmission de l'information. Une acidification est également observée en conditions pathologiques, notamment en cas d'ischémie ou de convulsions (Giffard et al., 1990, Nedergaard et al., 1991). Ainsi, l'inhibition exercée par les protons au niveau des récepteurs NMDA jouerait un rôle de boucle de rétrocontrôle négatif, permettant de limiter leur contribution à la neurotoxicité (régulation du flot calcique au niveau post-synaptique et donc de l'excitotoxicité du glutamate).

- Zinc extracellulaire

Les ions Zn^{2+} , outre leur importance dans la biochimie de nombreuses cellules, peuvent être concentrés par certains neurones dans des vésicules synaptiques et être libérés de manière calcium-dépendante (Frederickson et al., 2000). Au niveau des synapses glutamatergiques, un des rôles majeurs de la libération de Zn^{2+} est l'inhibition des courants NMDA via deux mécanismes distincts. Les ions Zn^{2+} peuvent exercer un blocage voltage-dépendant qui semble impliquer les mêmes résidus que le blocage induit par le Mg^{2+} , bien que ce dernier soit bien plus important en conditions physiologiques (Paoletti et al., 1997).

Une inhibition voltage-indépendante est également observée, impliquant à la fois une diminution de la fréquence et de la durée d'ouverture du canal (Christine and Choi, 1990). Le site de fixation des ions Zn^{2+} se situe entre les deux lobes des domaines NTD des sous-unités NR2 (Chen and Lipton, 2006, Paoletti et al., 2000). Ainsi, la composition en sous-unité NR2 influence fortement la sensibilité du récepteur au zinc extracellulaire, celle-ci étant plus forte pour les hétérodimères NR1/NR2A ($IC_{50} \approx 5-30$ nM) tandis que les sous-unités NR2B ($IC_{50} \approx 2$ μ M) et NR2C/NR2D ($IC_{50} \approx 10-20$ μ M) confèrent une sensibilité 100 et 1000 fois moins importante, respectivement (Chen et al., 1997, Paoletti et al., 1997, Traynelis et al., 1998, Williams, 1996). Le zinc représente donc l'inhibiteur pharmacologique le plus efficace pour discriminer les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2A. Une des propriétés intéressante de ce blocage voltage-indépendant est qu'il n'est pas total. Une concentration en Zn^{2+} de l'ordre du nM inhibe 70 à 80% du courant généré par des hétérodimères NR1/NR2A, et agirait donc en tant qu'antagoniste partiel du récepteur NMDA (Chen et al., 1997, Paoletti et al., 1997, Williams, 1996). Ce phénomène serait dû au mécanisme d'action du zinc qui potentialiserait l'inhibition tonique exercée par les protons extracellulaires (Erreger and Traynelis, 2008). Un autre mécanisme a également été mis en évidence : la fixation du zinc au niveau du domaine NTD diminue l' EC_{50} du glutamate, induisant un état de désensibilisation du récepteur (Zheng et al., 2001). Parallèlement, la fixation du glutamate au niveau de son site de reconnaissance provoque une augmentation de l'affinité des ions Zn^{2+} . Ce phénomène est connu sous le nom de désensibilisation zinc-dépendante et permettrait la fine régulation du déroulement temporel des courants NMDA, un facteur déterminant dans la plasticité synaptique (Erreger and Traynelis, 2005).

- Polyamines extracellulaires

Les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) sont des polycations ubiquitaires dérivés de l'ornithine (voir paragraphe II). Elles sont présentes à des concentrations relativement

importantes dans le cerveau, avec une distribution variable en fonction des régions (Seiler, 1981). Les polyamines (et en particulier la spermine) s'accumulent dans des vésicules synaptiques et sont libérées suite à une dépolarisation (Masuko et al., 2003) (Figure 6). Elles sont capables de moduler l'activité de certains canaux ioniques dont le récepteur NMDA.

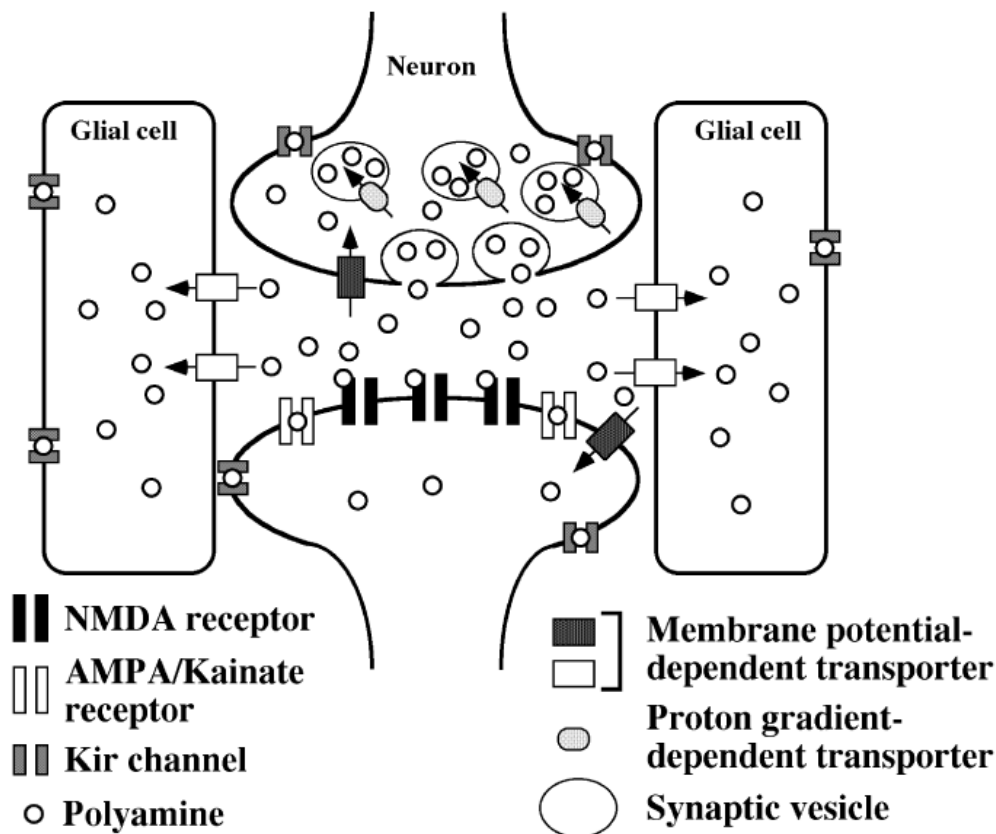


Figure 6 : Libération des polyamines au niveau du système nerveux (Masuko et al., 2003).

L'interaction entre les polyamines et le récepteur NMDA a été décrite pour la première fois en 1988 par Ransom et Stec (Ransom and Stec, 1988). L'effet stimulant ou bloquant des polyamines dépend à la fois du type de sous-unité NR2 présent au sein du récepteur ainsi que du variant d'épissage de NR1 (Williams et al., 1994).

La spermine potentialise le courant NMDA en présence de concentrations saturantes en glycine (stimulation glycine-indépendante), impliquant une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal et une diminution de la désensibilisation du récepteur NMDA (Benveniste and Mayer, 1993). La stimulation du récepteur NMDA par la spermine dépend du type de variant d'épissage de NR1 et du type de sous-unité NR2 présents. Cette stimulation n'est observée que pour les récepteurs hétérodimériques recombinants NR1a/NR2B. Il est possible que le site stimulateur des polyamines soit formé par interaction entre NR1a et NR2B mais pas avec NR2A et NR2C

(Williams et al., 1994). Cette stimulation glycine-indépendante du récepteur NMDA passerait par une diminution de l'inhibition tonique exercée par les protons. Les variants de NR1 qui contiennent l'exon 5 tels que NR1b sont moins sensibles aux protons que les variants qui ne l'ont pas. La partie codée par cet exon pourrait masquer le senseur de proton (Traynelis et al., 1995) ou pourrait agir comme un modulateur « spermine-like » constitutif (Williams, 1997). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que des mutations sur le résidu Glu342, situé sur la partie N-terminale extracellulaire, ainsi que sur le résidu Asp669, situé dans la boucle extracellulaire entre M3 et M4, diminuent à la fois la stimulation par la spermine et l'inhibition par les protons (Kashiwagi et al., 1996, Williams et al., 1995). Toutefois, la modification de la sensibilité à la spermine apparaît comme largement secondaire à la modification de la sensibilité aux protons. Ces résidus ne contribuent donc probablement pas à la fixation de la spermine mais feraient plutôt partie du senseur des protons sur NR1 (Kashiwagi et al., 1996, Williams et al., 1995). Récemment, Mony et ses collaborateurs ont décrit un modèle moléculaire potentiel expliquant cette potentialisation glycine-indépendante. Les polyamines seraient capables de se fixer à la jonction des lobes NTD formée par le dimère NR1/NR2B, rendant ainsi leur fermeture moins favorable en les solidarissant l'un avec l'autre. Ceci aurait pour effet une stabilisation accrue de l'interface dimérique des domaines ABD (Figure 7), diminuant ainsi la sensibilité aux protons (Gielen et al., 2008). Cette hypothèse est appuyée par la présence de résidus acides (chargés négativement) présents à l'interface des domaines NTD des sous-unités NR1 et NR2B, connus pour influencer cette potentialisation glycine-indépendante. Le site de fixation des polyamines se situerait donc à ce niveau (Huggins and Grant, 2005), et non pas sur la sous-unité NR2B comme cela a longtemps été supposé⁹. L'absence de certains de ces résidus sur les autres sous-unités NR2 pourrait expliquer la sélectivité des polyamines pour la sous-unité NR2B (Mony et al., 2009).

⁹ Le site de fixation de l'ifenprodil, antagoniste spécifique de la sous-unité NR2B, est souvent appelé « site polyamines » du fait de l'interaction compétitive entre ces deux composés. Le site d'action de l'ifenprodil se situe au niveau de la fente du domaine NTD de la sous-unité NR2B.

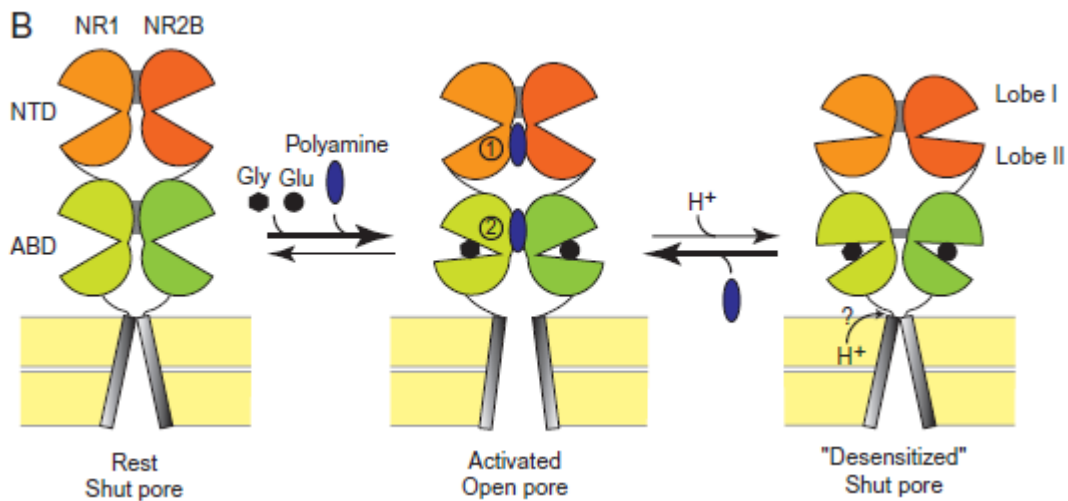


Figure 7 : Mécanisme supposé de la potentialisation des récepteurs NMDA-NR2B par les polyamines (Mony et al., 2009).

Un deuxième effet implique une augmentation de l'affinité du récepteur pour la glycine (stimulation glycine-dépendante) (Benveniste and Mayer, 1993). Cette stimulation glycine-dépendante se produit pour les récepteurs contenant NR2B ou NR2A mais pas NR2C ou NR2D. Par contre, cette stimulation ne dépend pas du type de sous-unité NR1 (Mony et al., 2009).

Enfin, la spermine extracellulaire peut produire un blocage partiel du récepteur NMDA qui reflète probablement la pénétration de la spermine dans le canal. En plus d'un blocage direct du canal, la spermine peut interagir directement avec des résidus chargés négativement sur le récepteur NMDA, possiblement proches de la « bouche » du canal, et faire obstacle au courant ionique (Williams, 1997). Ce blocage voltage-dépendant de la spermine est négligeable en conditions physiologiques, car il est faible et se développe beaucoup plus lentement que le blocage au Mg^{2+} . Les différences de sensibilité au blocage voltage-dépendant par la spermine en fonction des sous-unités NR1/NR2 sont semblables aux différences de sensibilité au Mg^{2+} (Williams, 1994). Le blocage est plus prononcé pour les récepteurs contenant NR2A ou NR2B que pour les récepteurs contenant NR2C ou NR2D (Mony et al., 2009). La sensibilité au Mg^{2+} est altérée par un résidu asparagine présent dans la boucle qui forme le pore (M2). Il a également été montré que ce résidu Asp616 situé au niveau de la sous-unité NR1 influence le blocage voltage-dépendant de la spermine (Chao et al., 1997).

Une diminution de l'affinité pour le glutamate a également été observée pour des récepteurs NMDA recombinants (Williams et al., 1994). Le mécanisme exact sous-tendant cet effet demeure encore inconnu, mais il peut refléter une augmentation de la dissociation du glutamate par rapport au récepteur en présence de spermine. Cette dernière permettrait ainsi de réguler le déroulement de la

transmission synaptique NMDA-dépendante, celle-ci étant directement liée à la vitesse de dissociation du glutamate (Williams, 1997).

I.3.2. Modulateurs pharmacologiques

L'inhibition pharmacologique des récepteurs NMDA peut être obtenue par une action à différents niveaux : le site de fixation du glutamate (antagonistes compétitifs), le site de fixation de la glycine insensible à la strychnine (glycine_B), le « site polyamines » (antagonistes sélectifs NR2B) et le site de fixation de la phencyclidine à l'intérieur du canal (Parsons, 2001). Les principaux antagonistes et leur sélectivité sont présentés dans le Tableau 4.

L'utilisation d'antagonistes qui inhibent entièrement le récepteur NMDA est responsable de nombreux effets indésirables, comprenant des troubles de la mémoire, des effets psychotomimétiques, une ataxie et une incoordination motrice. A l'inverse, des antagonistes non compétitifs avec une affinité modérée pour le récepteur NMDA tels que la mémantine ou le dextrométorphan semblent être mieux tolérés. Cette meilleure tolérance a été attribuée à leur cinétique de déblocage rapide, permettant d'inhiber le récepteur tout en permettant son activation physiologique (Parsons, 2001, Parsons et al., 1999). Le site de modulation glycine_B représente également une cible intéressante pour l'inhibition du récepteur. Ces antagonistes permettent d'augmenter la désensibilisation glycine-dépendante du récepteur NMDA. Bien que le site glycine_B soit situé sur la sous-unité NR1, une inhibition préférentielle des récepteurs NR1/NR2D a été mise en évidence (Danysz and Parsons, 1998). Enfin, les antagonistes spécifiques des sous-unités NR2B tels que l'ifenprodil ou le Ro 25-6985 ont longtemps été considérés comme des antagonistes compétitifs du site de fixation des polyamines. Cependant, il a été montré que l'inhibition qu'ils exercent implique une interaction allostérique non compétitive, conduisant à une diminution de l'affinité du récepteur pour les polyamines (Childers and Baudy, 2007). Ces antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA comprenant une sous-unité NR2B ont largement été étudiés dans le traitement de la douleur inflammatoire et neuropathique (voir paragraphe I.4.3)

Molécule	Antagonisme	Site de liaison	Spécificité
(R)-AP5	Antagoniste compétitif	NR2 (site ABD)	2A>2B>2C>2D
(R)-AP7	Antagoniste compétitif	NR2 (site ABD)	2A>2B>2C>2D
PMPA	Antagoniste compétitif	NR2 (site ABD)	2A>2B>2C>2D
(R)-CPP	Antagoniste compétitif	NR2 (site ABD)	2A>2B>2C>2D
PPDA	Antagoniste compétitif	NR2 (site ABD)	2A>2C>2B>2D
7-CKA	Antagoniste compétitif	NR1 (site ABD)	2D>2C>2B>2A
5,7-DCKA	Antagoniste compétitif	NR1 (site ABD)	2C>2B>2A>2D
CGP 61594	Antagoniste compétitif	NR1 (site ABD)	2A>2B>2D>2C
PCP	Bloqueur du canal	Canal	2A≈2B≈2C≈2D
Kétamine	Bloqueur du canal	Canal	2A≈2B≈2C≈2D
Mémantine	Bloqueur du canal	Canal	2A≈2B≈2D
MK-801 (dizocilpine)	Bloqueur du canal	Canal	2A≈2B>2C≈2D
N1-dansyl-spermine	Bloqueur du canal	Canal	2A≈2B>>2C≈2D
Ifenprodil	Inhibiteur allostérique	NR2B (site NTD)	2B>>2A≈2C≈2D
Ro 25-6981	Inhibiteur allostérique	NR2B (site NTD)	2B>>2A≈2C≈2D
CP 101,606	Inhibiteur allostérique	Non déterminé	2B>>2A≈2C≈2D

Tableau 4 : Principaux antagonistes des récepteurs NMDA.

I.4. Implication du récepteur NMDA dans la plasticité synaptique

La douleur physiologique (ou douleur aiguë) est initiée par des fibres sensibles périphériques spécialisées appelées nocicepteurs, qui répondent à des stimulations nociceptives. Ces fibres afférentes de premier ordre sont de deux types : des fibres A δ faiblement myélinisés et des fibres C amyéliniques (Basbaum et al., 2009). En présence d'une inflammation ou d'une lésion nerveuse, les nocicepteurs deviennent sensibilisés et acquièrent de nouvelles caractéristiques (Bennett, 2000) :

- (1) Ils présentent des décharges ectopiques spontanées qui vont être responsables en partie de la douleur continue consécutive à une lésion tissulaire
- (2) Leur seuil d'activation est diminué, de sorte qu'une stimulation normalement non nociceptive peut alors induire leur activation (phénomène d'allodynie)
- (3) L'amplitude de leur réponse à la stimulation est augmentée, de sorte qu'une stimulation nociceptive va provoquer une douleur anormalement plus importante (phénomène d'hyperalgie)

Ce phénomène est appelé sensibilisation périphérique et implique un nombre important d'acteurs moléculaires, comprenant des médiateurs de la soupe inflammatoire et certains canaux ioniques (Basbaum et al., 2009). Ces modifications pourraient être la conséquence d'une augmentation du calcium intracellulaire dans les nocicepteurs (Guenther et al., 1999).

Une douleur excessive peut également être le résultat d'une réponse exacerbée des neurones de second et troisième ordre à un stimulus normal provenant de la périphérie. Ce phénomène, appelé sensibilisation centrale, peut agir de concert avec la sensibilisation périphérique : un signal amplifié provenant de la périphérie peut être encore plus amplifié au niveau central (Woolf and Salter, 2000). La sensibilisation centrale représente donc une forme de plasticité synaptique fonctionnelle au niveau de la moelle épinière, initiée par des stimulations intenses ou répétées et contribuant à l'hyperexcitabilité douloureuse post-lésionnelle (Woolf, 1983, Woolf and Salter, 2000). Cette sensibilisation activité-dépendante est normalement uniquement initiée par des influx sensoriels provenant des nocicepteurs et se caractérise par un abaissement des seuils d'activation des neurones de la corne dorsale médullaire, une amplification de leur réponse ainsi qu'un élargissement de leur champs récepteur cutané (Cook et al., 1987). Après induction de cette sensibilisation centrale, un stimulus infraliminaire devient capable d'activer directement les neurones de la corne dorsale de manière accrue (facilitation homosynaptique). Les fibres à bas seuil A β , normalement activées par un stimulus inoffensif (tact non douloureux) vont également être capables d'activer les neurones nociceptifs spécifiques à haut seuil (facilitation hétérosynaptique) et donc d'initier une perception douloureuse (allodynie tactile). Cette forme de sensibilisation centrale dite « classique », apparaît rapidement en cas de stimulation intense et répétée des nocicepteurs et peut perdurer plusieurs heures (Dickenson and Sullivan, 1991, Latremoliere and Woolf, 2009, Woolf, 1983).

Le premier mécanisme moléculaire impliqué dans l'initiation et la maintenance de la sensibilisation centrale est un mécanisme dépendant de l'activité des récepteurs NMDA (Woolf and Thompson, 1991), révélant un rôle majeur de la neurotransmission glutamatergique médullaire dans l'hypermensibilité douloureuse. En plus de cette forme immédiate de sensibilisation centrale activité-dépendante que nous venons de décrire (sensibilisation centrale classique), il existe d'autres formes de plasticité synaptique au niveau médullaire qui vont également altérer l'efficacité synaptique en modifiant la transmission nociceptive. La sensibilisation centrale fait donc partie d'un phénomène global et multiphasique, comprenant d'autres mécanismes immédiats et indépendant de la transcription comme le *Wind-up* et la Potentialisation à Long Terme (LTP) ainsi que des mécanismes de facilitation tardifs et persistants, dépendant de la transcription.

I.4.1. Plasticité immédiate

- Wind-up : plasticité synaptique réversible pendant un stimulus nociceptif

Le *Wind-up* correspond à un phénomène de plasticité homosynaptique activité-dépendante caractérisée par une augmentation progressive des potentiels d'action des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière provoquée par la stimulation répétitive des afférences nociceptives à basse fréquence (Mendell, 1966). Les fibres C amyéliniques libèrent à la fois du glutamate et des neuromédiateurs peptidergiques (substance P et CGRP) qui vont être à l'origine de potentiels synaptiques lents qui vont durer plusieurs centaines de millisecondes (Baranauskas and Nistri, 1998, Herrero et al., 2000). Le *Wind-up* correspond à la sommation temporelle de ces potentiels synaptiques lents dans la corne dorsale de la moelle épinière, provoquant une dépolarisation cumulative qui va conduire à la suppression du blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA par le Mg^{2+} . Ainsi, les neurones de la corne dorsale vont devenir hypersensibles à la libération de glutamate (Thompson et al., 1990). En outre, la stimulation répétée des fibres afférentes primaires va conduire à la mobilisation des canaux calciques voltage-dépendants de type L qui vont contribuer au développement d'une dépolarisation progressive et soutenue des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Morisset and Nagy, 2000). Cependant, le *Wind-up* n'excède pas la durée de la stimulation. Le corrélat comportemental du *Wind-up* correspond ainsi à l'augmentation de la perception douloureuse observée lors de stimulations nociceptives répétées (mécaniques ou thermiques), sans que l'intensité de ces stimulations ne change (Price et al., 1977).

- Sensibilisation centrale classique : plasticité synaptique prolongée après stimulation nociceptive

La sensibilisation centrale activité-dépendante est à l'origine de la double potentialisation homo- et hétérosynaptique observée en cas de douleur clinique, correspondant d'une part à une augmentation de l'activité synaptique des fibres provenant du site de la lésion, et d'autre part à l'induction d'une douleur par les fibres à bas seuil innervant la zone entourant la lésion. Ces mécanismes correspondent à l'hyperalgie primaire et secondaire, respectivement (Basbaum et al., 2009). La sensibilisation centrale activité-dépendante est la conséquence de l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaires dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, déclenchée par certains neurotransmetteurs tels que le glutamate, la substance P ou encore le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Latremoliere and Woolf, 2009). L'activation des

récepteurs NMDA, normalement à l'état quiescent, représente l'étape clé de l'initiation et du maintien de cette sensibilisation centrale (Dickenson and Sullivan, 1991, Woolf and Salter, 2000, Woolf and Thompson, 1991). Comme décrit précédemment, les récepteurs NMDA exprimés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière sont le plus souvent des complexes constitués des sous-unités NR1-NR2A ou NR1-NR2B. Deux mécanismes majeurs vont contribuer à l'augmentation de l'efficacité synaptique : l'augmentation de l'activité des récepteurs via des modifications post-traductionnelles et l'augmentation de leur adressage membranaire (Ji et al., 2003).

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire consécutive à l'activation des récepteurs AMPA et NMDA va, lorsqu'elle atteint un certain seuil, être à l'origine de l'activation de certaines protéines kinases intracellulaires (Figure 8). Les récepteurs NMDA, comme les récepteurs AMPA, peuvent être phosphorylés au niveau de plusieurs résidus situés dans leur partie C-terminale (Carvalho et al., 2000, Chen and Roche, 2007). Cette modification post-traductionnelle induit une modification de leur activité et de leur adressage membranaire (Chen and Huang, 1992). La sous-unité NR1 peut être phosphorylée par la PKC au niveau du résidu Ser880 (Chen and Roche, 2007) et par la PKA sur les résidus Ser890 et Ser897 (Leonard and Hell, 1997, Tingley et al., 1997). La phosphorylation des sous-unités NR2 par les tyrosines kinases telles que Src ou Fyn va modifier les propriétés de conductance du canal. Trois sites de phosphorylation ont été identifiés : Tyr1292, 1325 et 1387 pour NR2A ; et Tyr1252, 1336 et 1472 pour NR2B (Chen and Roche, 2007, Guo et al., 2002, Salter, 1998). La phosphorylation de NR1 par la PKA ou la PKC participe également à l'hypersensibilité douloureuse en augmentant la sensibilité des récepteurs NMDA au glutamate (Chen and Huang, 1992). La protéine kinase Src, en phosphorylant la sous-unité NR2B, va augmenter la probabilité d'ouverture du canal (Salter, 1998) et empêcher l'internalisation du récepteur NMDA en interrompant la liaison avec AP-2, une protéine impliquée dans la formation de vésicules d'endocytose (Chen and Roche, 2007). L'activation de la PKC va également augmenter la probabilité d'ouverture du canal et diminuer le blocage exercé par le Mg^{2+} , favorisant ainsi le maintien du récepteur NMDA dans un état activé (Chen and Huang, 1992).

- Potentialisation à long terme des neurones de la corne dorsale (LTP).

La LTP correspond à une facilitation homosynaptique des potentiels post-synaptiques, activité-dépendante et persistante, provoquée par des stimulations répétées à haute fréquence (≈ 100 Hz) et de courte durée (Sandkuhler, 2007). Bien que la LTP ait longtemps été étudiée au niveau cortical et hippocampique pour son rôle dans la mémorisation, elle peut également être déclenchée

au niveau médullaire (Randic et al., 1993). Comme la sensibilisation centrale, la LTP nécessite la co-expression du récepteur NMDA et NK1 et implique donc uniquement les synapses des fibres C (Figure 8). La différence entre LTP et sensibilisation centrale est relativement ambiguë et fait l'objet d'une divergence de définitions dans la littérature. En effet, ces deux processus partagent plus de 100 effecteurs moléculaires communs (Sanes and Lichtman, 1999), y compris les protéines kinases (Ji et al., 2003, Sandkuhler, 2007). Cependant, la LTP est considérée comme un processus neural convergent, où le stockage d'une information bien définie est permis grâce à une coïncidence spatiale et temporelle entre plusieurs stimuli. A l'inverse, la sensibilisation centrale est un mécanisme divergent, permettant à une stimulation de provoquer des changements diffus conduisant à une potentialisation hétérosynaptique. Ensuite, contrairement à la sensibilisation centrale activité-dépendante qui persiste seulement quelques heures après la fin de la stimulation, la LTP (comme décrite dans l'hippocampe et qui sous-tend le processus de mémorisation) persiste au moins pendant plusieurs jours (Fukazawa et al., 2003). Les enregistrements de LTP réalisés au niveau de la moelle épinière n'excèdent jamais une durée de 30 minutes, et la stimulation produisant une LTP n'induit pas d'hypersensibilité douloureuse persistante (van den Broeke et al., 2010). Ainsi, si la facilitation synaptique observée pendant la sensibilisation centrale peut s'apparenter à la phase précoce d'une LTP, l'existence d'une phase tardive de LTP au niveau spinal demeure encore indéterminée.

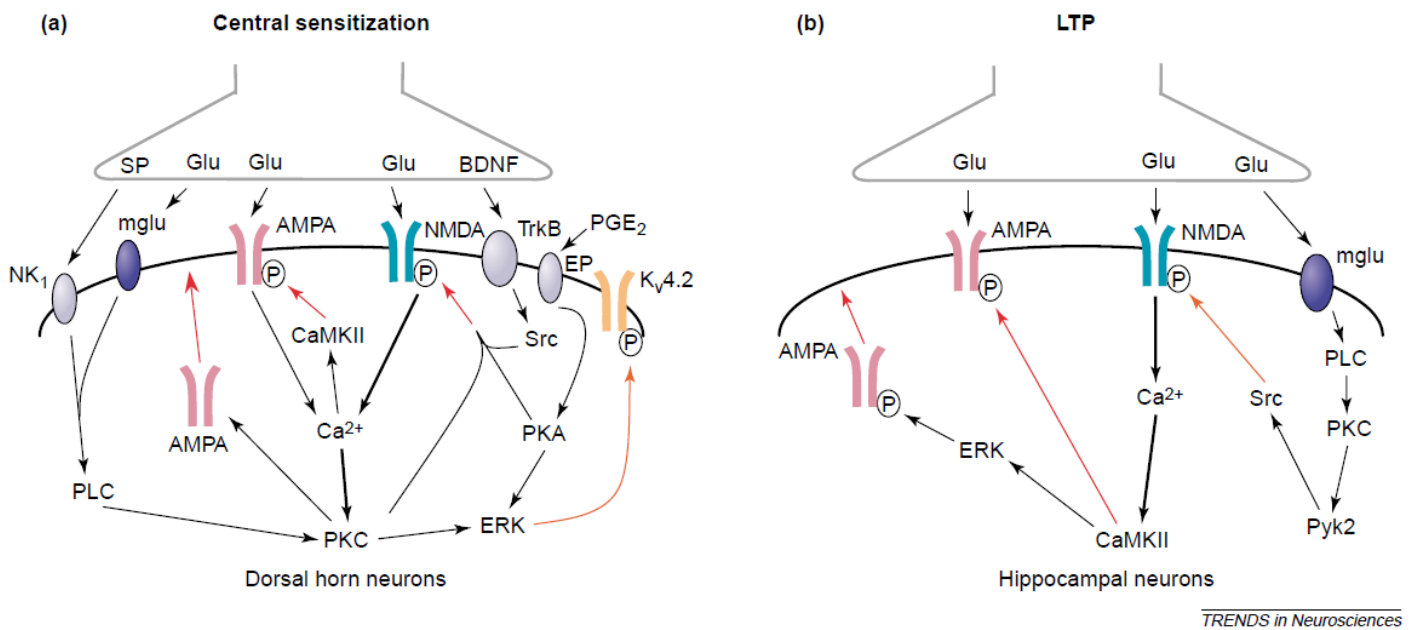


Figure 8 : Induction de la sensibilisation centrale et de la LTP (Ji et al., 2003).

I.4.2. Plasticité tardive

Si l'existence d'une phase tardive de LTP n'a pas encore été démontrée dans la moelle épinière, il existe une phase tardive de sensibilisation centrale dépendante de l'activation de facteurs de transcription (Latremoliere and Woolf, 2009). L'activation soutenue des nocicepteurs provoque l'activation des récepteurs NMDA, trkB, NK1 ainsi que des récepteurs métabotropiques de type mGlu suite à la libération excessive de glutamate, substance P et BDNF (Figure 9). Ceci va conduire à l'activation de la voie MAPK par l'activation de la PKA et de la PKC, notamment par la phosphorylation de la protéine ERK (Ji and Woolf, 2001). Une fois activée, la protéine ERK va déclencher des mécanismes traductionnels et post-traductionnels qui vont participer à la maintenance de la sensibilisation centrale. L'effet transcriptionnel de la kinase ERK implique notamment la phosphorylation de la protéine CREB (cAMP-response-element-binding) sur le résidu Ser133, qui contrôle l'expression de plusieurs gènes comprenant entre autres c-Fos, NK1, trkB et COX-2. La protéine ERK est donc considérée, sous sa forme phosphorylée, comme un marqueur de la plasticité neuronale (Ji et al., 2003).

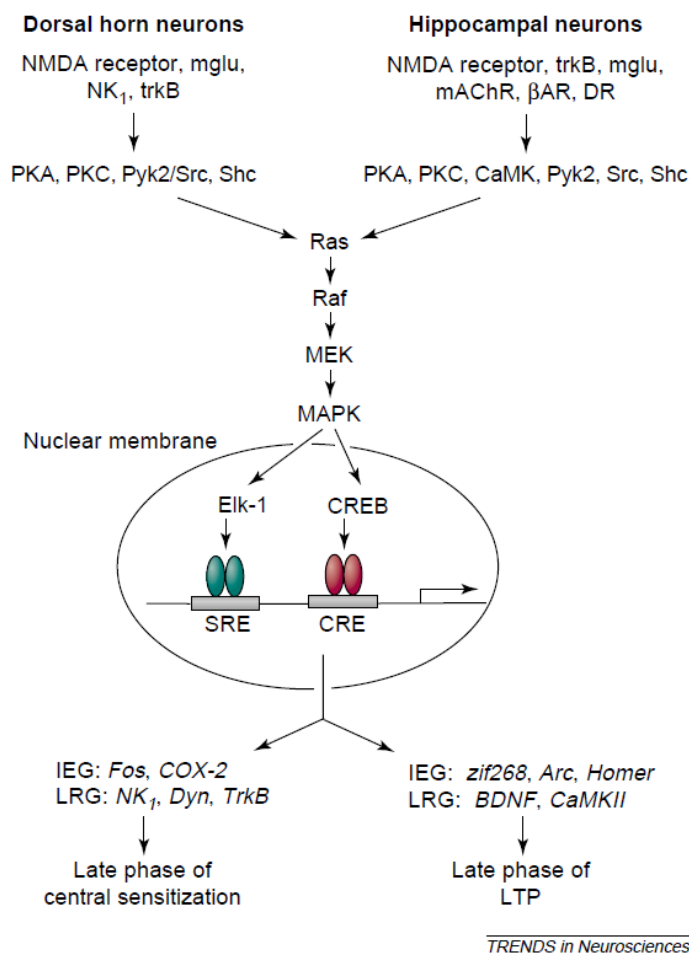


Figure 9 : Phase tardive de la sensibilisation centrale ou de la LTP (Ji et al., 2003).

I.4.3. Cas des douleurs neuropathiques

Après une lésion des nerfs périphériques, les fibres A et C lésées et non lésées vont générer des décharges ectopiques qui vont pouvoir initier et maintenir une sensibilisation centrale activité-dépendante au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans des modèles animaux de douleur neuropathique, l'administration intrathécale d'antagonistes des récepteurs NMDA permet bien souvent de diminuer voire de supprimer l'hypersensibilité douloureuse installée (Petrenko et al., 2003). Cependant, les antagonistes du récepteur NMDA sont responsables de nombreux effets indésirables, comprenant des troubles de la mémoire et une ataxie, qui limitent leur utilisation thérapeutique. Ces effets indésirables sont principalement dus au rôle physiologique des récepteurs NMDA dans les processus mnésiques et cognitifs, ainsi que dans la coordination motrice. De nombreuses études se sont donc concentrées sur les antagonistes sélectifs de la sous-unité NR2B, qui possède une distribution relativement restreintes aux voies somesthésiques (Mony et al., 2009). La sous-unité NR2B est exprimée au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que dans les centres supérieurs impliqués dans le relai et la perception consciente de la douleur tels que le thalamus ou le cortex cingulaire antérieur.

Les antagonistes NR2B-sélectifs ont montré un effet antalgique dans de nombreux modèles de douleur neuropathique, avec une efficacité variable selon le modèle et le symptôme considéré (Boyce et al., 1999, Hama et al., 2003, Qu et al., 2009). De plus, une régulation traductionnelle de la sous-unité NR2B a également été mise en évidence, variable d'un modèle à l'autre. Dans le modèle de neuropathie induite par la ligature du nerf sciatique (CCI ou Chronic Constriction Injury), une augmentation de l'expression de NR2B a été retrouvée au niveau des couches II et III de la corne dorsale de la moelle épinière (Wilson et al., 2005). Cette surexpression a également été observée dans un modèle de compression des ganglions spinaux (Zhang et al., 2009). A l'inverse, aucune modification de l'expression spinale de NR2B n'a été observée dans le modèle de ligature du nerf spinal (SNL ou Spinal Nerve Ligation) (Hummel et al., 2008, Ultenius et al., 2006). La phosphorylation des résidus tyrosine des sous-unités NR2B semble également être impliquée dans le maintien de la douleur neuropathique. Suite à une transection du nerf spinal chez la souris, une augmentation de la phosphorylation du résidu Tyr1472 est observée au niveau de la corne dorsale (Abe et al., 2005). La douleur neuropathique est significativement atténuée chez les souris présentant une mutation *knock-in* au niveau de ce résidu (remplacement de la tyrosine par une phenylalanine) (Katano et al., 2011), ainsi que chez les souris invalidées pour le gène codant pour la protéine kinase Fyn (Abe et al., 2005). De la même manière, l'interruption du couplage entre la protéine kinase Src et le récepteur NMDA permet de supprimer la douleur neuropathique chez le rat (Liu et al., 2008). A l'inverse, dans un modèle de neuropathie alcoolique chronique, la sous-unité

NR2B semble être régulée par la phosphorylation du résidu Tyr1336 et non du résidu 1472 (Narita et al., 2007). Ainsi, les modifications traductionnelles et post-traductionnelles de la sous-unité NR2B au niveau spinal seraient impliquées dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique. D'autres études ont également montré une implication supraspinale de l'effet antalgique des antagonistes NR2B-sélectifs (Chizh et al., 2001). Les souris transgéniques surexprimant la sous-unité NR2B au niveau du prosencéphale présentent une allodynie persistante (Wei et al., 2001).

L'utilisation des modulateurs allostériques spécifiques de la sous-unité NR2B semble donc être une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement des douleurs chroniques (Mony et al., 2009). Cependant, le développement clinique de ces molécules a rapidement été interrompu, d'une part à cause de leur faible biodisponibilité orale, et d'autre part à cause d'une cardiotoxicité sévère. En effet, les antagonistes spécifiques de la sous-unité NR2B semblent également bloquer les canaux potassiques « ether-a-go-go » (hERG), provoquant ainsi des torsades de pointe par allongement de l'intervalle QT (Parsons, 2001).

Ainsi, bien que les récepteurs NMDA représentent une cible de choix pour le traitement des douleurs neuropathiques, l'utilisation d'antagonistes bloquant leur activité s'accompagne de nombreux effets indésirables importants. Une stratégie thérapeutique consistant à limiter l'activité pathologique de ces récepteurs tout en permettant leur activation physiologique doit être privilégiée. Dans ce contexte, les modulateurs spécifiques de la sous-unité NR2B tels que les polyamines sont des outils de choix.

II. Les polyamines

II.1. Description

Le terme polyamines désigne généralement trois composés aliphatiques issus de la décarboxylation de l'ornithine :

- Putrescine [1,4 butane diamine ou tétraméthylènediamine]
- Spermidine [N-(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou aminopropyl-tétraméthylènediamine]
- Spermine [N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou diaminopropyl-tétraméthylènediamine]

Initialement découvertes en 1678 par van Leeuwenhoek dans le liquide séminal humain, la structure et la synthèse chimique de ces composés n'ont été établies qu'au début du XX^{ème} siècle (Dudley et al., 1927). D'autres molécules aminées telles que l'agmatine (dérivée de l'arginine), la thermine, l'histamine ou la cadavérine ont été identifiées mais ne sont généralement pas incluses dans le terme polyamines (Moinard et al., 2005).

Les polyamines sont des molécules hydrosolubles de faible poids moléculaire. Avec un pK_a compris entre 8,6 et 11,6, les polyamines sont entièrement protonées à pH physiologique (Figure 10). Ce sont donc des polycations, une caractéristique biochimique qui leur permet d'interagir avec les macromolécules polyanioniques telles que l'ADN, l'ARN, les protéines ou la chromatine. Ces interactions électrostatiques anion/cation vont être à l'origine de leur importance biologique, provoquant la stabilisation ou la déstabilisation de ces molécules.

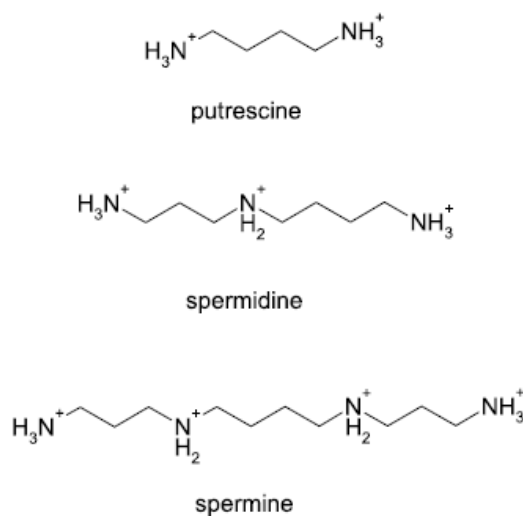


Figure 10 : Structure chimique des polyamines.

II.2. Origine

Chez les mammifères, les polyamines possèdent une origine multiple : une origine endogène par synthèse *de novo* et une origine exogène, par l'absorption intestinale des polyamines provenant de l'alimentation ou du métabolisme des bactéries de la flore commensale.

II.2.1. Biosynthèse endogène

Les polyamines sont présentes, à des concentrations variables, dans toutes les cellules eucaryotes et procaryotes. La synthèse des polyamines est réalisée essentiellement à partir de deux acides-aminés : la L-arginine et la L-méthionine. Un aperçu général des voies de biosynthèse des polyamines est présenté sur la Figure 11.

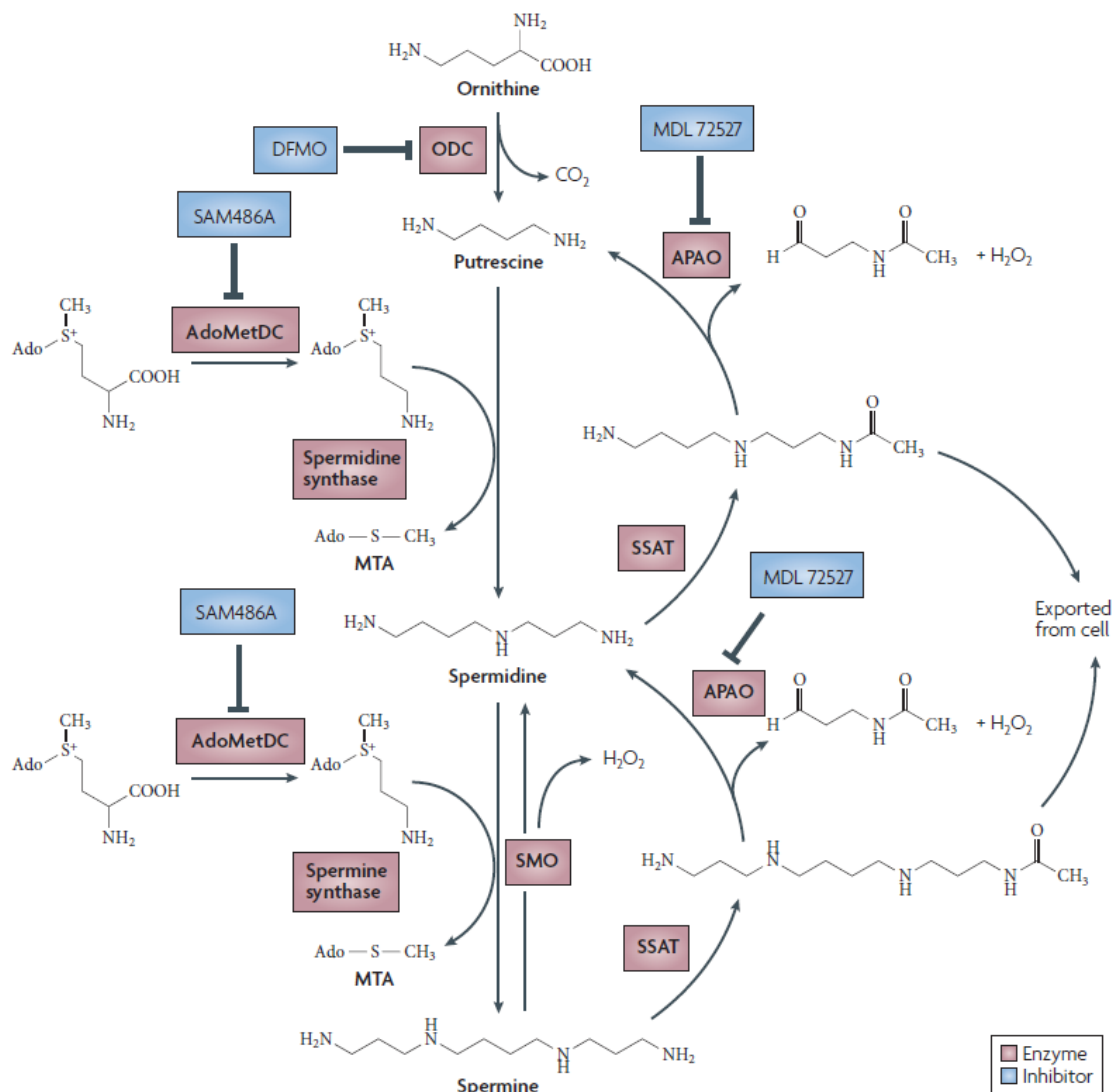


Figure 11 : Métabolisme cellulaire des polyamines (Casero and Marton, 2007).

La putrescine est principalement formée à partir de la décarboxylation de l'ornithine provenant du cycle de l'urée ; réaction catalysée par l'ornithine décarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17). La putrescine peut également être obtenue à partir de l'agmatine. La méthionine permet de fournir les groupements aminopropyls nécessaires à la conversion de la putrescine en spermidine puis spermine, réalisée respectivement par la spermidine synthase (SPDS, EC 2.5.1.16) et la spermine synthase (SPMS, EC 2.5.1.22). Ces groupements aminopropyls proviennent de la S-adénylméthionine décarboxylée qui est synthétisée à partir de la méthionine grâce à deux réactions séquentielles catalysées par la méthionine adényltransférase (EC 2.5.1.6) et la S-adénylméthionine décarboxylase (SAMDC, EC 2.5.1.6). La spermine- et spermidine synthase sont des enzymes constitutives, qui sont régulées par la disponibilité de leurs substrats (Moinard et al., 2005).

La spermine/spermidine N¹-acétyltransférase (SSAT, EC 2.3.1.57) constitue la première étape de rétroconversion des polyamines, en utilisant l'acétyl-coA pour former la N¹-acétylspermidine et la N¹-acétylspermine. Ces dérivés N¹-acétylés sont les substrats préférentiels de la polyamine oxydase (APAO, EC 1.5.3.11) qui utilise le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) comme co-facteur, produisant la spermidine et la spermine, respectivement. Cette étape d'oxydation est à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène qui est un inducteur de la SSAT, perpétuant ainsi le cycle (Wallace and Mackarel, 1998).

Les voies de synthèse des polyamines étaient considérées comme irréversibles, comprenant une voie de rétroconversion parallèle permettant le recyclage de la spermidine et de la putrescine à partir de la spermine et de la spermidine, respectivement. Cependant, une oxydase permettant la conversion directe de la spermine en spermidine sans étape d'acétylation a été découverte et clonée ultérieurement : la spermine oxydase (SMO, EC 1.5.3.16) (Vujcic et al., 2002). Il est maintenant bien admis que cette enzyme joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie des polyamines. La dérégulation de son activité a été reliée à plusieurs conditions pathologiques, allant de la dépression à la carcinogénèse (Cervelli et al., 2012).

II.2.2. Absorption intestinale

L'alimentation quotidienne constitue la source principale de polyamines pour l'organisme. Alors que la biosynthèse endogène peut produire environ 1-2 nmol dans les organes les plus actifs (Bardócz, 1995), le taux moyen de polyamines absorbées est de 250 à 550 µmol par jour, suivant le régime alimentaire (Atiya Ali et al., 2011). En Europe, l'apport journalier le plus élevé a été rapporté dans les régions méditerranéennes, avec une moyenne de 700 µmol/jour (Bardócz, 1995)

comparé à 350-550 $\mu\text{mol}/\text{jour}$ dans les pays d'Europe du Nord (Atiya Ali et al., 2011). Certains aliments sont plus riches que d'autres en polyamines (Cipolla et al., 2007). C'est le cas par exemple des produits fermentés tels que les fromages, très riches en putrescine (Larque et al., 2007).

Les polyamines présentes dans le tractus digestifs sont rapidement et complètement absorbées au niveau du duodénum et de la partie supérieure du jéjunum. Le mécanisme d'absorption comprend à la fois un transport actif et une absorption paracellulaire (Figure 12). Chez l'Homme, suite à une administration entérale de putrescine radio-marquée, 60 à 80% de la putrescine disparaît progressivement du lumen intestinal mais seulement 20% de la dose est retrouvée au niveau sanguin. En revanche, une augmentation progressive de spermine et de spermidine marquées est retrouvée au niveau sanguin, indiquant que la putrescine absorbée est partiellement métabolisée (au niveau des entérocytes et/ou au niveau hépatique) avant d'atteindre le plasma (Milovic, 2001). La grande majorité (90%) de la spermine et de la spermidine circulantes sont transportées par les érythrocytes sous forme libre (Bergeron et al., 1997, Moulinoux et al., 1981).

En condition de jeûne, des concentrations non négligeables de polyamines sont retrouvées dans l'intestin, provenant des sécrétions gastro-intestinales, de la desquamation des entérocytes mais également du métabolisme de la flore intestinale (Moinard et al., 2005).

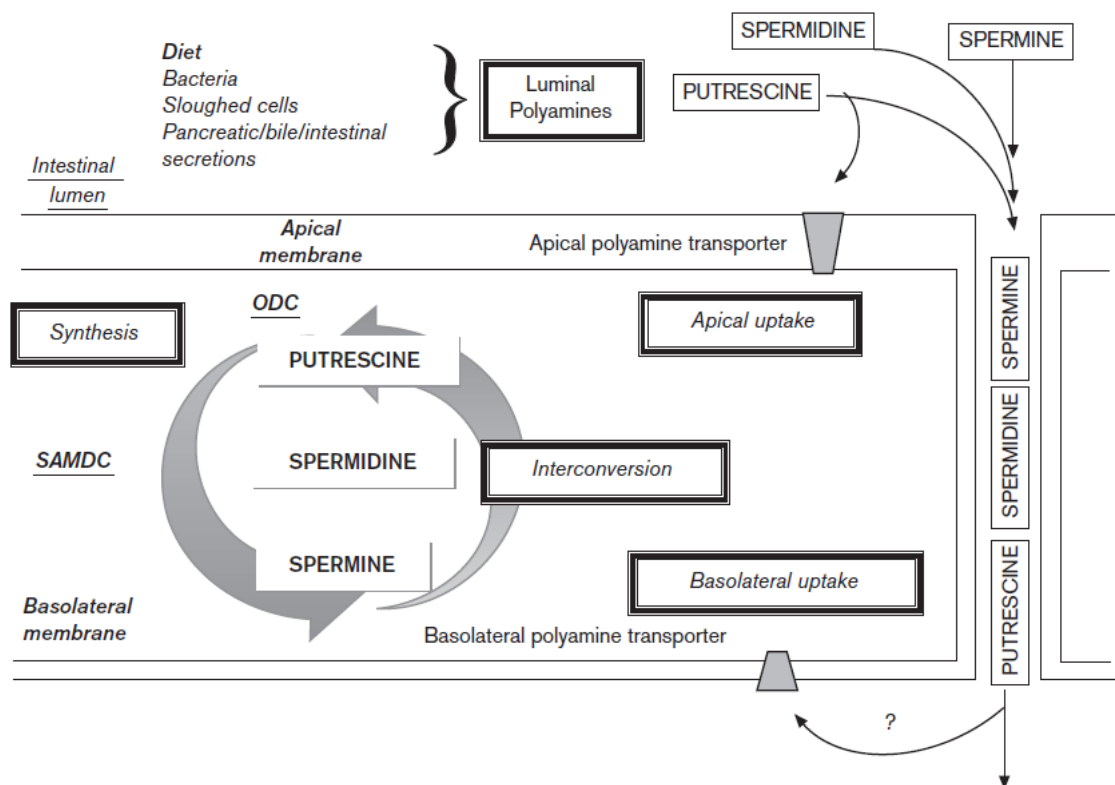


Figure 12 : Absorption intestinale des polyamines exogènes (Milovic, 2001).

II.3. Régulation

Le pool de polyamines intracellulaire est finement régulé par leur synthèse endogène, leur dégradation ainsi que par leur transport (équilibre influx/efflux). Les voies de biosynthèse sont régulées de manière à ajuster le taux intracellulaire de polyamines. Cette modulation implique une protéine unique appelée antizyme, capable non seulement d'inhiber l'ODC mais également de promouvoir sa dégradation (Figure 13). Les polyamines augmentent la synthèse de l'antizyme en permettant le décalage du cadre de lecture du ribosome (décalage +1) au niveau d'un codon stop, formant ainsi un cadre de lecture ouvert¹⁰ permettant la traduction de l'ARNm de l'antizyme (Matsufuji et al., 1995). Ainsi, une forte concentration en polyamines est associée à une forte expression de l'antizyme, et *vice versa*. L'antizyme se fixe alors sur l'ODC et promeut sa dégradation par le protéasome 26S (Murakami et al., 1992). L'antizyme inhibe également l'influx de polyamines et stimule leur excrétion (Mitchell et al., 1994). Les polyamines peuvent également réguler directement la traduction de l'ARNm de l'ODC en diminuant son initiation et sa vitesse d'élongation (Yuan et al., 2001). Enfin, une forte concentration intracellulaire en polyamines va provoquer une induction de la SSAT (et donc une augmentation de leur catabolisme) ainsi qu'une inhibition de la SAMDC, en agissant directement sur la transcription et la traduction de son ARNm (Bettuzzi et al., 1999, Ruan et al., 1996).

Chez les mammifères, le transporteur des polyamines n'a pas encore été cloné. Il a été montré que le transport des polyamines est un processus saturable et consommateur d'énergie. Cependant, un phénomène d'endocytose a récemment été mis en évidence et pourrait représenter un mécanisme alternatif pour la recapture des polyamines (Soulet et al., 2002). Bien que certaines cellules possèdent un seul transporteur pour les trois polyamines, la plupart des cellules semblent présenter deux types de transporteurs : un transporteur pour la putrescine et un transporteur pour la spermine et spermidine (Seiler et al., 1996). L'efflux des polyamines est également un processus spécifique, régulé par l'état de prolifération de la cellule. Dans la majorité des cas, les polyamines excrétées sont la putrescine et la N-acétylspermidine (Wallace and Mackarel, 1998). Ceci contraste avec le pool intracellulaire de polyamines qui est, du moins chez l'Homme, constitué majoritairement par la spermine. L'efflux des polyamines semble donc être un processus sélectif est régulé, fortement dépendant du métabolisme intracellulaire. Il est donc très probable que les transporteurs et les enzymes du catabolisme des polyamines soient régulés par les mêmes signaux.

¹⁰ Un cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame) est une séquence d'ARN débutant par un codon *start* en 3' et se terminant par un codon *stop* en 5'. Cette séquence est potentiellement traduisible en protéine.

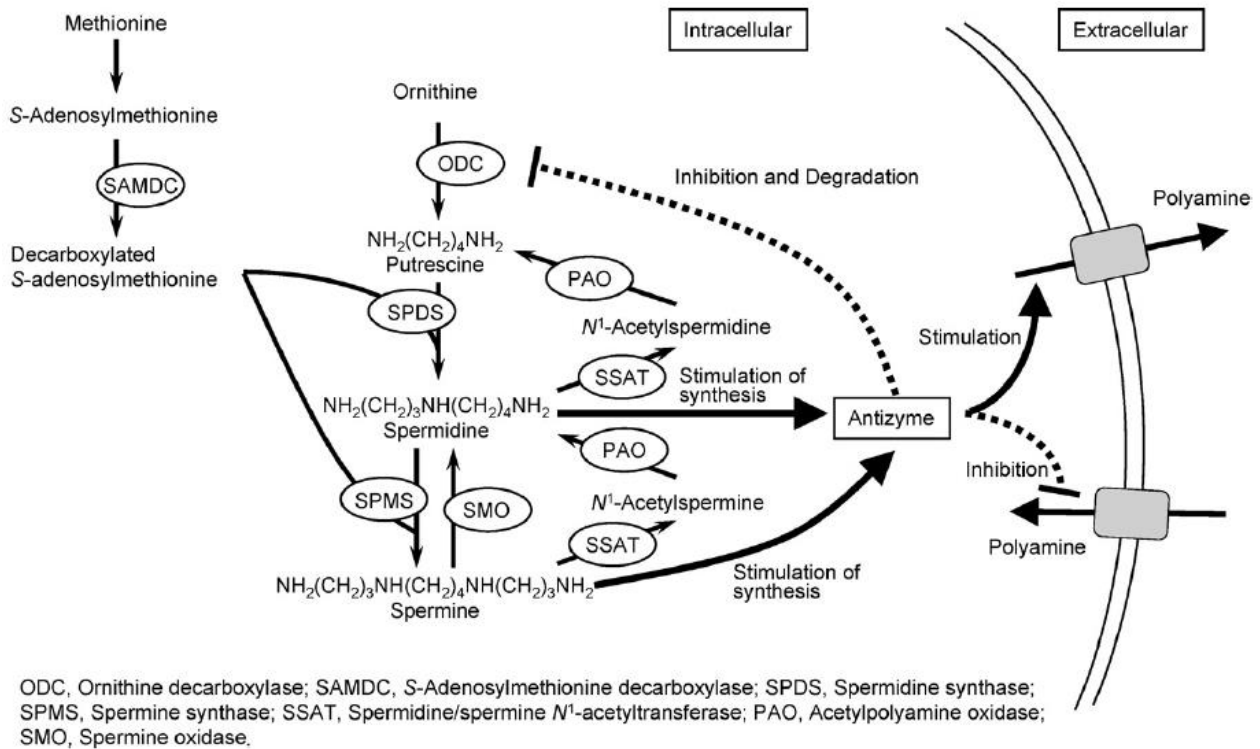


Figure 13 : Régulation du métabolisme cellulaire des polyamines (Igarashi and Kashiwagi, 2010).

II.4. Rôles physiologiques

II.4.1. Prolifération cellulaire

Les polyamines sont connues pour présenter des variations spécifiques de leur concentration durant la progression du cycle cellulaire (Figure 14). Les premières études ont mis en évidence une augmentation des taux de polyamines intracellulaires pendant les phases G1 et S ainsi qu'une inhibition de la transition G1/S suite à une déplétion en polyamines. Les polyamines (et particulièrement la putrescine) sembleraient donc nécessaires au passage en phase S, probablement en permettant le passage du point de restriction G1 avant la synthèse d'ADN (Bettuzzi et al., 1999). Ainsi, les polyamines semblent interagir avec certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire. Les *cycline-dependent kinases* (CDK) sont des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire. Les signaux provenant des facteurs de croissance induisant une augmentation de la prolifération cellulaire agissent en augmentant l'expression des cyclines, capables d'activer les CDK. Il a été montré que les polyamines sont nécessaires à la régulation de l'expression de plusieurs cyclines dont la cycline B1, D1 et E (Thomas and Thomas, 1994, Thompson et al., 1990). L'effet antiprolifératif des inhibiteurs de la synthèse des polyamines passerait également par une surexpression de la phosphoprotéine nucléaire p53 (qui joue un rôle important dans la régulation de

plusieurs gènes intervenant dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire), ainsi que l'induction de p21, un inhibiteur des CDK (Kramer et al., 1999).

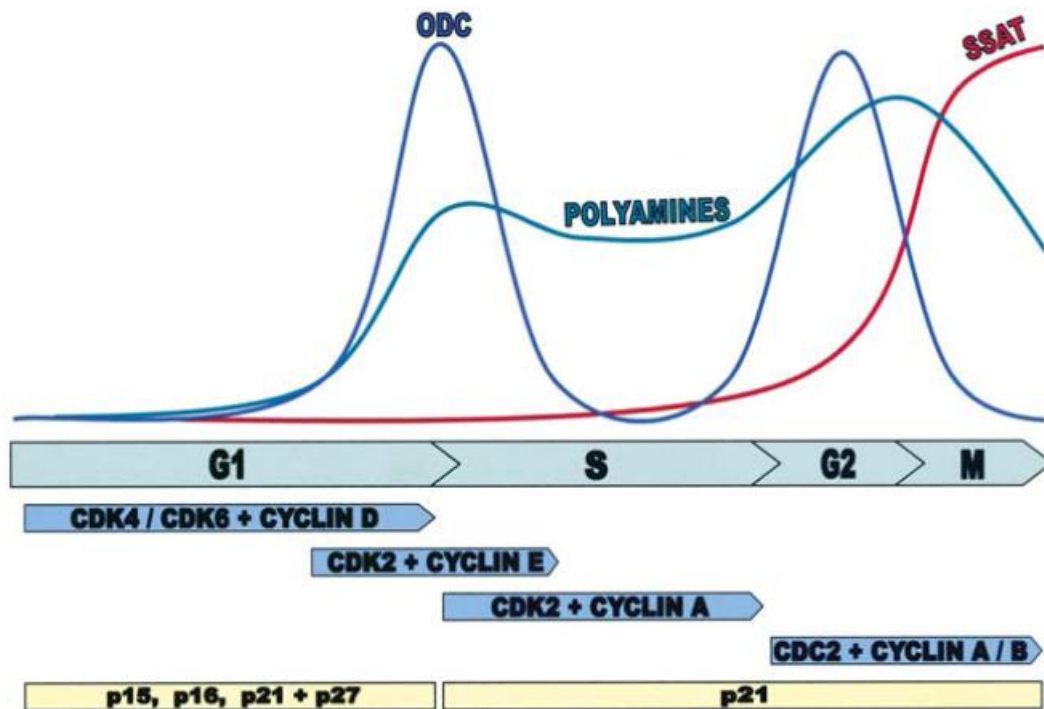


Figure 14: Relation entre le métabolisme des polyamines et les protéines de régulation du cycle cellulaire (Wallace et al., 2003).

II.4.2. Apoptose

Paradoxalement, les polyamines sont à la fois capables d'induire l'apoptose cellulaire et de la prévenir. Leur effet protecteur concorde avec leur effet stimulateur sur la croissance cellulaire. A l'inverse, il a été montré que le gène codant pour l'ODC est activement impliqué dans l'apoptose induite par la surexpression de c-Myc (Bello-Fernandez et al., 1993). Une autre explication concernant l'effet pro-apoptotique des polyamines est la production excessive de peroxyde d'hydrogène lors de l'oxydation des polyamines par la PAO. Ainsi, la co-administration de catalase avec des polyamines permet d'inhiber l'apoptose (Ha et al., 1997). D'autre part, l'accumulation excessive de polyamines (autant que leur déplétion) semble perturber un grand nombre de fonctions cellulaires dont les interactions ADN-protéine (Shah et al., 1999), les interactions protéine-protéine (Thomas et al., 1999) et l'intégrité mitochondriale (Stefanelli et al., 2000), conduisant ainsi à l'apoptose. En dépit de ces effets pro-apoptotiques, le rôle majeur des polyamines demeure la stimulation de la croissance cellulaire.

II.4.3. Interaction avec l'ADN

Grâce à leurs charges positives, les polyamines sont capables de stabiliser l'ADN double-brin (Tabor, 1962). La putrescine, la spermidine et la spermine peuvent ainsi augmenter la température de fusion de l'ADN de manière concentration-dépendante *in vitro* (Tabor, 1962, Thomas and Bloomfield, 1984). Etant donné que la concentration intracellulaire en polyamines est de l'ordre du μM , il est fortement probable que les polyamines jouent un rôle significatif dans la stabilisation de l'ADN *in vivo*. Ainsi, une accumulation de spermine a été observée dans les noyaux de cellules mitotiques (Sauve et al., 1999). Une autre conséquence de l'interaction polyamines-ADN concerne la condensation de l'ADN. Au cours du cycle cellulaire, la présence de spermine et de spermidine est associée avec une forte compaction des chromosomes mitotiques (Hougaard et al., 1987, Sauve et al., 1999).

II.4.4. Douleur

Les polyamines peuvent interagir avec plusieurs canaux ioniques et ainsi moduler leur activité (Williams, 1997). C'est notamment le cas des récepteurs NMDA comprenant une sous-unité NR2B (voir paragraphe I.3.1) qui sont connus pour être impliqués dans le processus algique (voir paragraphe I.4.3). En modulant positivement l'activité des récepteurs NMDA, les polyamines pourraient faciliter la sensibilisation centrale et donc la chronicisation de la douleur. Dans ce contexte, l'administration intrathécale de spermine provoque un comportement douloureux chez la souris, qui est inhibé de manière dose-dépendante par la morphine mais également par les antagonistes du récepteur NMDA-NR2B (Tan-No et al., 2000). Outre cet effet pro-algique au niveau spinal, les polyamines jouent également un rôle dans le développement de la douleur inflammatoire à la périphérie (Silva et al., 2011).

Plusieurs études se sont donc intéressées à l'effet d'une déplétion en polyamines sur les processus douloureux. Les polyamines provenant de plusieurs sources (voir paragraphe II.2), cette déplétion ne peut être obtenue qu'en utilisant un inhibiteur de la synthèse endogène, un régime alimentaire appauvri et/ou un antibiotique à large spectre non absorbable (Seiler et al., 1990). Les résultats présentés dans ces études sont parfois antinomiques, en fonction de la stratégie utilisée. Une première étude a ainsi montré qu'un régime alimentaire sans polyamines associé à l'administration systémique de néomycine et de l' α -difluorométhylornithine (DFMO¹¹) provoque une élévation des seuils de nociception chez le rat sur le test de pression de la patte. Cet effet

¹¹ La DFMO est un inhibiteur sélectif et irréversible de l'ODC. Ce composé établit une liaison covalente au niveau d'un résidu cystéine du site catalytique de l'enzyme, empêchant son activité (inhibiteur « suicide »).

antalgique est également retrouvé sur le test du *Tail Flick* par chaleur radiante, mais uniquement chez les animaux recevant un régime appauvri en polyamines associé à la DFMO (Kergozien et al., 1996). Ces résultats suggèrent que la modulation des taux de polyamines (endogènes et exogènes) permet d'influencer la transmission du message nociceptif. Cependant, cette étude n'a pas retrouvé de variations des concentrations de polyamines au niveau spinal ou cérébral en fonction du régime. Seule l'association du régime sans polyamines avec la néomycine a permis de diminuer la concentration en putrescine dans la moelle épinière (Kergozien et al., 1996). A l'inverse, suite à une administration intraplantaire de formol, une déplétion en polyamines exogènes augmente le comportement nociceptif durant l'interphase, sans modification pendant la phase précoce ou tardive. De plus, un régime sans polyamines semble inhiber l'effet antalgique de la morphine sur ce test (Kergozien et al., 1999).

Sur un autre modèle de douleur inflammatoire induite par l'administration intraplantaire de carragénine chez le rat, un régime sans polyamines seul permet d'induire un effet antalgique, sans modification des seuils nociceptifs de base. Cet effet est antagonisé par l'administration de naloxone et, d'une façon moindre, par la kétamine (Estebe et al., 2006). Une étude plus récente a également démontré qu'un régime alimentaire sans polyamines pendant 7 jours associé à l'administration systémique de néomycine permettait de diminuer l'hypersensibilité douloureuse sur les modèles animaux de mono-arthrite (injection tibio-tarsiale d'adjuvant de Freund) et de mononeuropathie périphérique (CCI). Une diminution de la phosphorylation des résidus tyrosines de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA induite par une inflammation a également été observée, en lien avec l'effet antalgique observé (Rivat et al., 2008). Cette stratégie permet également de prévenir l'hyperalgie secondaire induite par les opioïdes chez l'animal, démontrant l'implication du récepteur NMDA dans l'effet antalgique observé (Le Roy et al., 2013).

Cette stratégie thérapeutique a également été mise en œuvre en clinique chez des patients atteints de cancer de la prostate hormono-résistant. La réduction de l'apport alimentaire en polyamines (jusqu'à 20 fois la valeur moyenne) permettait de maintenir voire d'améliorer la qualité de vie des patients. Une amélioration significative du statut douloureux a également été observée chez ces patients (Cipolla et al., 2010). Ainsi, ces résultats mettent en avant l'importance de la nutrition qui pourrait conditionner la sensibilité douloureuse associée à certaines pathologies.

III. Travail expérimental

III.1. Introduction et résumé

En dépit des nombreuses études cliniques mises en œuvre pour évaluer l'intérêt pharmacologique de certaines molécules dans la prévention des douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine, aucun traitement n'a encore démontré une efficacité substantielle. Les données fondamentales et cliniques mettent en évidence la complexité des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'apparition de ces douleurs, probablement à l'origine de l'inefficacité des traitements antalgiques actuels.

Récemment, des données précliniques ont mis en évidence une implication des récepteurs NMDA au niveau spinal dans la physiopathologie de la neuropathie induite par l'administration répétée d'oxaliplatine (Mihara et al., 2011). Plus particulièrement, une surexpression de la sous-unité NR2B a été retrouvée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. L'administration intrathécale d'antagonistes sélectifs de cette sous-unité permet de supprimer l'allodynie tactile dans ce modèle (Mihara et al., 2011). Sur la base de ces données, une déplétion en polyamines par réduction de l'apport alimentaire pourrait limiter l'activité des récepteurs NMDA et donc, par extrapolation, la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine. La première partie de ce travail a été focalisée sur un modèle animal reproduisant les troubles nociceptifs aigus induits par une seule administration d'oxaliplatine chez le rat (Ling et al., 2007b). Dans ce modèle, les animaux développent les symptômes majeurs de la neuropathie chimio-induite similaires à ceux observés en clinique tels qu'une hypersensibilité tactile et thermique (Attal et al., 2009, Binder et al., 2007).

Cette étude a montré qu'un régime alimentaire sans polyamines pendant 7 jours permettait de prévenir entièrement l'hypersensibilité mécanique et thermique induite par l'oxaliplatine chez le rat. Aucune modification de l'expression ou de la phosphorylation de la sous-unité NR2B au niveau spinal n'a été mise en évidence suite à l'induction des troubles nociceptifs. Cependant, l'administration intrathécale d'ifenprodil, antagoniste de la sous-unité NR2B, a permis de supprimer l'hypersensibilité mécanique et thermique, confirmant ainsi l'implication de la sous-unité NR2B dans la physiopathologie de la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine. Une analyse métabolomique de la corne dorsale de la moelle épinière par spectroscopie RMN du proton a permis de mettre en évidence des variations métaboliques en réponse à l'oxaliplatine et/ou au régime sans polyamines. Un régime sans polyamines pendant 7 jours permet de prévenir l'augmentation des concentrations en glutamate au niveau spinal induite par une injection d'oxaliplatine, en lien avec son effet antalgique.

Ainsi, un régime sans polyamines permettrait de prévenir les troubles sensitifs précoces induits par l'oxaliplatine en limitant l'activité des récepteurs NMDA-NR2B par la modulation de la neurotransmission glutamatergique au niveau spinal. Cette étude fait l'objet d'une première publication, présentée ci-après et soumise dans PLOS One.

Des résultats complémentaires concernant la mesure des concentrations érythrocytaires et tissulaires des polyamines sont également présentés. Enfin, l'effet du régime sur la neuropathie chronique et cumulative de l'oxaliplatine chez le rat est également présenté.

ARTICLE 2: "A POLYAMINE-DEFICIENT DIET PREVENTS
OXALIPLATIN-INDUCED ACUTE COLD AND
MECHANICAL HYPERSENSITIVITY IN RATS"

(SOUMIS POUR PUBLICATION DANS PLOS ONE)

A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats

Jérémy Ferrier^{1,2}, Mathilde Bayet-Robert^{1,2}, Bruno Pereira³, Laurence Daulhac^{1,2}, Alain Eschalier^{1,2,3}, Denis Pezet³, Jacques-Philippe Moulinoux⁴, David Balayssac^{1,2,3}.

1. Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
2. INSERM, U1107 NEURO-DOL, F-63001 Clermont-Ferrand, France.
3. CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
4. Groupe de Recherche en Thérapeutique Anticancéreuse, EA 3891, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France.

Corresponding author: David Balayssac, Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand Cedex 01, France. Tel: +33 (0)473178041; Fax: +33 (0)473274621; E-mail address: dbalayssac@chu-clermontferrand.fr

Abstract

Background: Oxaliplatin is an anticancer drug used for the treatment of advanced colorectal cancer, but it can also cause painful peripheral neuropathies. The pathophysiology of these neuropathies has not been yet fully elucidated, but may involve spinal N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, particularly the NR2B subunit. As polyamines are positive modulators of NMDA-NR2B receptors and mainly originate from dietary intake, the modulation of polyamines intake could represent an interesting way to prevent/modulate neuropathic pain symptoms by opposing glutamate neurotransmission.

Methods: The effect of a polyamine deficient diet was investigated in an animal model of oxaliplatin-induced acute pain hypersensitivity using behavioral tests (mechanical and cold hypersensitivity). The involvement of spinal glutamate neurotransmission was monitored by using a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy based metabolomic approach and by assessing the expression and phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor.

Results: A 7-day polyamine deficient diet totally prevented oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity and mechanical allodynia. Oxaliplatin-induced pain hypersensitivity was not associated with an increase in NR2B subunit expression or phosphorylation, but with an increase of glutamate level in the spinal dorsal horn which was completely prevented by a polyamine deficient diet. As a validation that the oxaliplatin-induced hypersensitivity could be due to an increased activity of the spinal glutamate system, an intrathecal administration of the specific NR2B antagonist, ifenprodil, totally reversed oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity.

Conclusion: A polyamine deficient diet could represent a promising and valuable nutritional therapy to prevent oxaliplatin-induced neuropathic pain in cancer patients.

1. Introduction

Oxaliplatin is a third-generation platinum derivative that has become the standard treatment for advanced colorectal cancers [1]. However, oxaliplatin also has a unique pattern of neurotoxicity. In more than 90% of patients, oxaliplatin induces an acute and transient thermal hypersensitivity, with a rapid onset of distal paresthesias and cold-triggered dysesthesias [2,3]. Thereafter, with the repetition of chemotherapy cycles, 50-80% of patients experience a severe cumulative peripheral neuropathy that is poorly reversible [4,5]. As a consequence, oxaliplatin-induced neurotoxicity is strongly incapacitating for patients and affects their quality of life [5,6]. Moreover, the lack of neuroprotective strategies to prevent these peripheral neuropathies often compels oncologists to reduce or discontinue the chemotherapy cycles, thus decreasing the chances of survival [7].

The exact cause of this neurotoxicity is yet to be conclusively identified. Mihara *et al.* (2011) recently showed that repeated administrations of oxaliplatin induced N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2B (NR2B) up-regulation in the rat spinal cord [8], which is known to be involved in the development and maintenance of chronic pain resulting from peripheral nerve injury [9-11]. However, the clinical use of selective NR2B antagonists remains limited by severe adverse effects, despite their analgesic efficacy in neuropathic pain [12]. It has recently been shown that a polyamine-deficient diet (PDD) relieved pain hypersensitivity in animal models of chronic mononeuropathy and monoarthritis and decreased tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit in the rat spinal cord after intraplantar carrageenan injection [13]. Polyamines are biogenic polycations ubiquitously distributed in eukaryotic cells. The main source of polyamines is exogenous, through dietary intake and absorption of the gut flora metabolites [14]. An endogenous source is also provided by the decarboxylation of ornithine *via* ornithine decarboxylase (ODC) and by interconversion pathways [15]. Polyamines (including spermine, spermidine and putrescine) have been extensively studied as positive modulators of NR2B-containing NMDA receptor activity [16], thus facilitating pain sensitization [13]. The aim of the present study was to validate the concept that a PDD could be a beneficial strategy to reduce oxaliplatin-induced acute pain hypersensitivity by inhibiting glutamate neurotransmission in the spinal cord. First, the preventive effect of a PDD on oxaliplatin-induced acute pain hypersensitivity was investigated in an animal model of oxaliplatin-induced acute hypersensitivity using behavioral tests. Secondly, the involvement of spinal glutamate neurotransmission in this animal model was monitored by using a ¹HNMR-based metabolomic approach and assessing the expression and phosphorylation of the NR2B subunit. Thereafter, the impact of PDD on oxaliplatin-induced increase of spinal glutamate levels was explored. Finally, the implication of the NR2B subunit was confirmed by evaluating the

antihyperalgesic effect of ifenprodil, a NR2B-selective antagonist, on oxaliplatin-induced acute cold and mechanical pain hypersensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All experiments involving animals were performed in compliance with EU legislation (directive 86/609/EEC of 24 November 1986), and all procedures were approved by the local ethical review board for animal experiments (CEMEA - *Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne*) under agreement numbers CE14-11, CE26-10 and CE16-10.

2.2. Animals

The experiments used adult male Sprague-Dawley rats (Charles River, France) weighing 150 to 175 g at the beginning of the study. The rats were housed in a controlled environment (22°C ± 2°C; 50% relative humidity; 12/12 light-dark cycle) in groups of 4 rats per cage. To minimize stress during the behavioral tests, the rats were given an acclimatization period of 7 days to habituate them to the handling and testing procedures.

2.3. Diet

The synthetic diet was prepared with products from Sigma Chemical Co. (Sigma, France) according to the formulation of Kergozien *et al.* [17]. Two different synthetic diets were used in this study: (1) a normal diet providing an equivalent amount of polyamines to normal rat chow (54 mg/kg putrescine, 37 mg/kg cadaverine, 27 mg/kg spermidine and 7 mg/kg spermine) and fulfilling all rodent nutritional needs [17]; (2) a polyamine-deficient diet (PDD) equivalent to normal rodent chow but containing less than 10 µg/kg of polyamines. Dietary polyamine level was determined by atmospheric-pressure chemical ionization as previously described [18]. On reception at the animal housing facility, *i.e.* 7 days before the beginning of the experiments, the rats were assigned to a specific diet (normal diet or PDD) and left to become habituated to the experimental environment. Food and water were provided *ad libitum*.

2.4. Animal model of oxaliplatin-induced acute pain hypersensitivity

Acute neurotoxicity was induced in rats by a single intraperitoneal (i.p.) oxaliplatin injection (6 mg/kg), as described by Ling *et al.* [19]. Oxaliplatin (Debiopharm, Switzerland) was dissolved in

a 5% glucose solution (Freeflex®, Fresenius Kabi, France) at a final concentration of 2 mg/ml. Control rats received an equal i.p. injection of vehicle.

2.5. Behavioral testing procedures of hypersensitivity

Behavioral tests were chosen according to clinical symptoms (mechanical allodynia/hyperalgesia and cold hypersensitivity) observed in oxaliplatin-treated patients [20,21]. The electronic von Frey test was used to assess mechanical allodynia/hyperalgesia and the thermal place preference test was used to measure cold avoidance behavior.

2.5.1. Mechanical allodynia/hyperalgesia

The electronic von Frey test (Bioseb®, France) consists of a hand-held force transducer fitted with a plastic tip. Each rat was placed in a suspended plastic cage (17 x 11 x 13 cm) with a wire grid floor 15 min before the beginning of the test. The plastic tip was applied perpendicularly to the medial plantar surface of the hindpaw from below the wire grid floor. The force applied was gradually increased until withdrawal of the hindpaw. Mechanical pressure thresholds (g) were automatically registered by the electronic device and used as a pain parameter.

2.5.2. Cold hypersensitivity

The thermal place preference test (Bioseb®, France) was used to assess a cold avoidance behavior. This test consists of two contiguous metal plates surrounded by a plastic enclosure. The first plate was kept at neutral temperature (25°C) whereas the second plate was kept at cold temperature (12°C, determined by preliminary experiments). The test was performed in the morning, and in darkness. Each session lasted 3 minutes, during which the animals were left free to explore both plates. The time spent on the cold plate during the entire session was recorded using an infrared camera connected to a computer in order to determine cold avoidance behavior. To improve the explorative behavior of the rats used for this test, the light-dark cycle was inverted immediately after the animal arrived at the animal housing facility. A few days before the beginning of the experiment, the rats were repeatedly placed on the apparatus with both plates held at room temperature (25°C) during 3 minutes. In these conditions, rats spent an equal amount of time on each plate, thus showing no place preference. To avoid learning or any place preference unrelated to cold, the temperature of the plates were inverted between two consecutive sessions.

2.6. Immunoblotting

Dorsal spinal cord samples were homogenized in 400 μ L of ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 2 mM orthovanadate, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 20 μ M leupeptin, and 100 IU/mL aprotinin; Sigma, St-Quentin-Fallavier, France), as described in [22]. After 1-2 min sonication at 4°C, samples were centrifuged (16,000 g, 15 min, 4°C), and the pellets were discarded. Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid protein kit assay (BC Assay UP40840A®, Interchim, France). Protein content was then separated in 7.5% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore, France). Membranes were blotted overnight at 4°C with the antibodies indicated according to the manufacturer's recommendations. Tested antibodies were total NR2B (1:500, ref: 06-600, Upstate Biotechnology, Millipore, France), phospho-Tyr1472 (1:500, ref: AB5403, Millipore, France), phospho-Tyr1336 (1:500, ref: AB9690, Millipore, France) and phospho-Ser1303 (1:500, ref: 07-398, Millipore, France). The next day, the membranes were blotted with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:50,000, goat anti-rabbit, Pierce, France). Immunoreactivity was detected using a chemiluminescence kit (Immun-star™ WesternCTM Kit, Bio-rad®, France). Representative western blots were scanned using a ChemiDoc™ XRS system (Bio-rad®, France). The density of each band was quantified using Image Lab™ software (Biorad®, France) and normalized against the corresponding beta-actin signal used as a loading control (1:5000, A5441, Sigma-Aldrich, France). The resulting ratios were expressed as percentage of control (vehicle).

2.7. Proton NMR spectroscopy-based metabolomic analysis

2.7.1. Sample preparation

Spinal dorsal horn from 2 rats receiving the same regimen were pooled to reach a minimum of 80 mg of tissue (n=8 to 10 pooled by two, i.e. n=4 to 5 for each group). Aqueous metabolite extraction was performed as described by Angenstein *et al.* [23], with minor changes. Briefly, tissue samples were homogenized in a 6% perchloric acid solution (5 ml/g of tissue) and centrifuged (12,000 g, 10 min, 4°C). The supernatant was adjusted to pH 11 using a 10% potassium hydroxide solution. Potassium perchlorate precipitate was then removed by centrifugation (4,000 g, 10 min, 4°C). Samples were lyophilized overnight and stored at -80°C until NMR spectroscopy analysis. Dried samples were reconstituted in 600 μ l D₂O containing 1 mM of 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteropropionic acid (TSP, Sigma, France) used as internal standard for concentration and chemical shift.

2.7.2. *Data acquisition and processing*

Experiments were performed on a Bruker Avance 400MHz spectrometer (Bruker Biospin, Germany) equipped with a quad-nuclear probe. Spectral acquisitions were automated using ICON-NMR software (Bruker BioSpin GmbH, Germany). 1D ^1H -NMR spectra were obtained using a Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy sequence with low-power water signal PResaturation (NOESYPR), a 2.5-s presaturation delay, and a 1-s relaxation delay. Spectral width was 12 ppm with 16K complex datapoints and 128 repetitions. After Fourier transformation, low-order phase correction and spline baseline correction were applied in a standardized way. 1D ^1H -NMR spectra were processed using TopSpin 3.1 (Bruker BioSpin GmbH, Germany).

2.7.3. *Metabolite identification and quantification*

Representative high-resolution 1D ^1H -NMR spectra of the metabolite extract from control and oxaliplatin-treated rats fed a normal diet and oxaliplatin-treated rats fed a PDD are presented in Figure 15. Four to 5 ^1H -NMR spectra were recorded for each treatment condition. Eighteen metabolites were identified and quantified in each ^1H -NMR spectrum. Metabolite concentrations were measured by peak integration and compared to the integral of the reference compound TSP 1 mM in each spectrum. Metabolite concentration, expressed as a percentage of control fed a normal diet, was calculated as follows: [mean metabolite concentration in a treated group/mean metabolite concentration in the control group fed a normal diet] x 100.

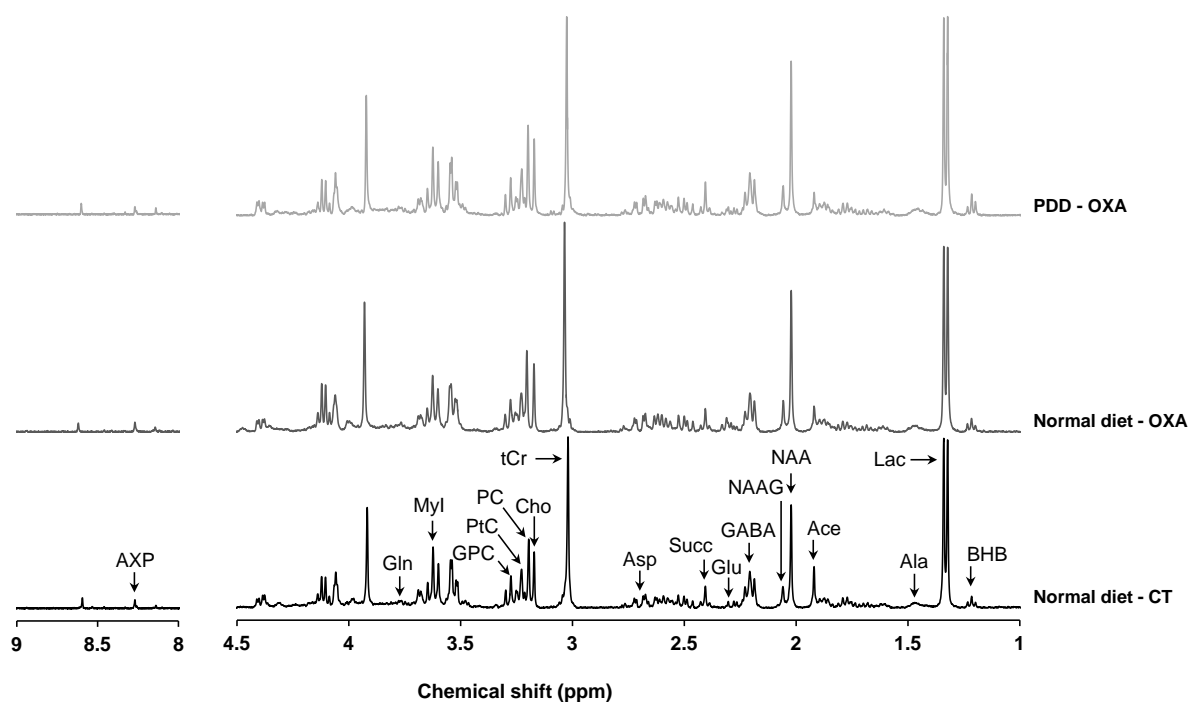


Figure 15 : Representative 1D ^1H -NMR spectra of perchloric acid extracts from rat spinal dorsal horn. A representative NMR spectrum is displayed for samples extracted from control rats fed a normal diet (normal diet - CT) (bottom panel, black), oxaliplatin-treated rats fed a normal diet (normal diet - OXA) (middle panel, dark grey) and oxaliplatin-treated rats fed a PDD (PDD - OXA) (upper panel, light grey). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm). Eighteen metabolites were identified and quantified (Ace, acetate; Ala, alanine; Asp, aspartate; AXP, adenosine phosphates; BHB, β -hydroxybutyrate; Cho, choline; GABA, γ -aminobutyric acid; Gln, glutamine; Glu, glutamate; GPC, glycerophosphocholine; Lac, lactate; MyI, myo-Inositol; NAA, N-acetylaspartate; NAAG, N-acetylaspartylglutamate; PC, phosphocholine; PtC, phosphatidylcholine; Succ, succinate; tCr, total creatine).

2.8. Experimental design

For *in vivo* studies, four different groups of diet and treatment were defined to determine the effect of a PDD on oxaliplatin-induced acute nociceptive disorders. They included control rats fed a normal diet or PDD, and oxaliplatin-treated rats fed a normal diet or PDD. The inhibition of NR2B-containing NMDA receptors was evaluated in oxaliplatin treated rats fed a normal diet with the specific inhibitor ifenprodil. Ifenprodil tartrate (Sigma, France) was dissolved in a saline solution (0.9% NaCl) just before administration. At 3 days post-oxaliplatin injection, neuropathic rats were randomly assigned to 4 groups (n=8 per group) according to ifenprodil dose administered: 0 μg (NaCl 0.9%), 2.5 $\mu\text{g}/\text{rat}$, 5 $\mu\text{g}/\text{rat}$ or 10 $\mu\text{g}/\text{rat}$. Ifenprodil was intrathecally administered under

isoflurane anesthesia at a final volume of 10 μ L/rat. Experiments were performed blind with randomization of treatments and according to the method of equal blocks to avoid any uncontrollable environmental changes. For *ex vivo* analyses, rats were sacrificed by decapitation at day 3 (peak pain behavior) post-oxaliplatin injection (Ling *et al.*, 2007). Sacrifices were performed by a trained professional, without any anesthetic that could modify spinal metabolism. The spinal cords (L4-L6) were quickly removed, and the dorsal part of the spinal cord were isolated on an ice pack, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The total procedure lasted less than 5 min for each sample.

2.9. Statistical analysis

In behavioral tests, means and standard error of the mean (SEM) were calculated for quantitative variables. Normality of the distribution was checked with a Shapiro-Wilk test. To compare the time-course evolution of different parameters, a repeated-measure ANOVA (or a non-parametric Friedman test if necessary) was followed by a Tukey-Kramer test to compare differences between and within groups. If a significant interaction between time and group was observed, a one-way ANOVA was performed for all time points. These analyses were completed by random-effects models (REM), considered more robust to missing data [24]. The REM were able to take into account 1) fixed effects as treatment, time and interaction between time and group, and 2) random subject effects as random intercept and slope. Residual normality was checked for all models presented in this article. Results from immunoblotting were analyzed using a nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test to compare differences between groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using STATA® v.10 software (StataCorp, College Station, TX, USA).

In the metabolomic analysis, statistical comparisons between control and treated groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. To identify the most discriminating metabolites of response to oxaliplatin, PDD or the combination of both, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was applied to concentrations of the 18 identified metabolites using XLSTAT v2012.6.08 software (Addinsoft). Coefficients of PLS-DA loading scores were used to express the level of correlation between original variables and components of the PLS-DA model. Cross-validation of each model led to an evaluation of the R2Y and Q2 factors. R2Y provides an estimate of how well the model fits the Y data, and Q2 provides an estimate of how well the model predicts the Y data. Typically, a robust model will have $R2Y > 0.5$ and $Q2 > 0.4$. In PLS-DA, the variable influence on the projection (VIP), a weighted sum of squares of the PLS weights, was calculated to indicate the importance of a

metabolite in the model. A VIP value clearly above 1.2 was required to retain the discriminating power of a metabolite.

3. Results

No rat displayed any loss of weight or altered clinical condition regardless of the treatment or diet received (data not shown). The synthetic diets (normal diet and PDD) were both well-tolerated, as there was no significant difference in daily food intake between rats fed a normal diet (6.46 ± 0.33 g/day/100 g body weight) and rats fed PDD (6.32 ± 0.32 g/day/100 g body weight) ($p=0.56$). Before oxaliplatin injection, there was no statistical difference between mean thresholds of the different groups in behavioral tests.

3.1. The PDD prevents oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity

The PDD for 7 days did not modify sensitive thresholds compared to control rats fed a normal diet. While, with a normal diet, oxaliplatin treated rats showed a significant decrease in paw withdrawal thresholds from day 2 (-22%, $p<0.001$) to day 4 (-15%, $p=0.016$), compared to control rats, with a maximum reduction at day 3 (-23%, $p<0.001$) (Figure 16-A), oxaliplatin-treated rats fed a PDD exhibited no significant change in mechanical thresholds. Analysis of REM showed a significant interaction between treatments and diets ($p=0.002$). Regarding oxaliplatin-induced cold hypersensitivity, while oxaliplatin treated rats fed a normal diet showed a significant decrease in the time spent on the cold plate from day 2 (-50%, $p<0.008$) to day 4 (-45%, $p<0.002$), compared to controls (Figure 16-B), oxaliplatin treated rats fed a PDD showed no difference compared to control rats regardless of the diet received (normal diet or PDD). Analysis of REM showed a significant interaction between treatments and diets ($p=0.006$).

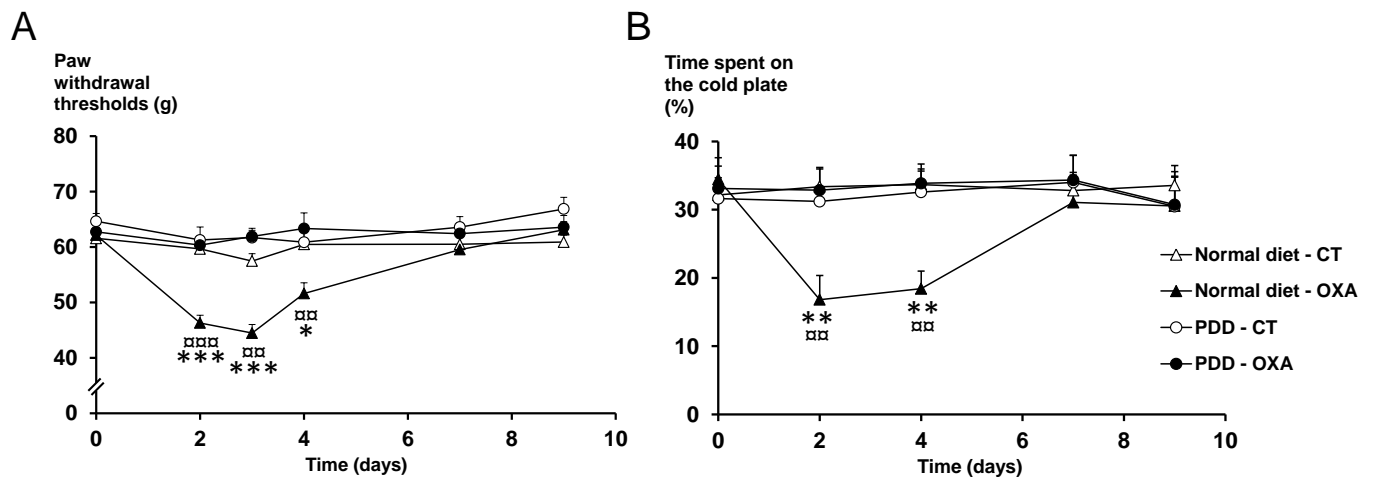


Figure 16 : Effect of a PDD on oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity. Rats were fed a normal diet (triangles) or a PDD (circles) for 7 days before the beginning of the tests and through to the end of the experiment. At day 0, after measuring baseline mechanical pain thresholds, rats were injected with oxaliplatin (6 mg/kg, i.p., OXA, black symbols) or vehicle (CT, white symbols). (A) Mechanical pain hypersensitivity expressed as paw withdrawal threshold (gram). (B) Cold hypersensitivity (12°C vs. 25°C) expressed as time spent on the cold plate (%). Two-way repeated-measures ANOVA followed by a Tukey- Kramer post hoc test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for normal diet - OXA vs. normal diet - CT; □□, $p < 0.01$; □□□□, $p < 0.001$ for normal diet - OXA vs. PDD - OXA. All data are expressed as means \pm SEM ($n = 6$ to 12 per group).

3.2. The PDD suppresses oxaliplatin-induced increase of glutamate level in spinal dorsal

Horn

3.2.1. Oxaliplatin increases spinal glutamate concentration without modifying NR2B expression or phosphorylation

Three days after oxaliplatin injection, there was a significant increase in glutamate (Glu, +85%, $p = 0.0253$) and a decrease in total creatine (tCr) (-21%, $p = 0.0339$) and adenosine phosphate (AXP) (-20%, $p = 0.0143$) concentrations in oxaliplatin treated rats compared to control rats fed a normal diet (Table 1).

Metabolite	Normal diet		Polyamine-deficient diet	
	Control	Oxaliplatin	Control	Oxaliplatin
Acetate	0,324 ± 0,063	0,206 ± 0,063	0,407 ± 0,168*	0,331 ± 0,138*
Adenosine phosphates	0,210 ± 0,015	0,168 ± 0,023*	0,163 ± 0,016*	0,142 ± 0,021
Alanine	0,346 ± 0,143	0,365 ± 0,058	0,380 ± 0,045	0,307 ± 0,036*
Aspartate	0,729 ± 0,262	1,011 ± 0,351	0,652 ± 0,116	0,651 ± 0,116 [§]
β-hydroxybutyrate	0,504 ± 0,085	0,502 ± 0,051	0,526 ± 0,056	0,492 ± 0,059
Choline	1,315 ± 0,065	1,225 ± 0,158	1,193 ± 0,070	1,077 ± 0,128
γ-aminobutyric acid	2,294 ± 0,098	2,069 ± 0,293	2,266 ± 0,112	1,838 ± 0,155*
Glutamate	0,385 ± 0,240	0,711 ± 0,242*	0,318 ± 0,019	0,292 ± 0,083 [§]
Glutamine	0,577 ± 0,196	0,578 ± 0,071	0,488 ± 0,050	0,483 ± 0,032 [§]
Glycerophosphocholine	0,345 ± 0,055	0,285 ± 0,014	0,267 ± 0,016*	0,232 ± 0,025* [§]
Lactate	6,629 ± 0,481	5,718 ± 0,881	5,606 ± 0,278*	4,787 ± 0,517*
myo-Inositol	3,011 ± 0,220	2,629 ± 0,332	2,572 ± 0,229*	2,289 ± 0,204
N-acetylaspartate	2,435 ± 0,493	2,272 ± 0,371	2,140 ± 0,190	1,721 ± 0,156* [§]
N-acetylaspartylglutamate	0,618 ± 0,174	0,568 ± 0,086	0,479 ± 0,042	0,433 ± 0,054 [§]
Phosphatidylcholine	0,730 ± 0,096	0,615 ± 0,057	0,549 ± 0,053*	0,499 ± 0,035 [§]
Phosphocholine	1,024 ± 0,116	0,958 ± 0,103	0,931 ± 0,054	0,832 ± 0,081 [§]
Succinate	0,376 ± 0,097	0,439 ± 0,091	0,351 ± 0,055	0,350 ± 0,082
Total creatine	3,337 ± 0,256	2,635 ± 0,280*	2,681 ± 0,199	2,517 ± 0,197

Table 1 : Metabolites identification and quantification from 1D ¹H-NMR spectra of rat spinal cord dorsal horn. The 18 identified metabolite concentrations of rats fed a normal diet (control and oxaliplatin-treated) and rats fed a PDD (control and oxaliplatin-treated), at day 3, are expressed in mmol/kg (means ± SEM, n=4 to 5). Non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test. *, p<0.05 vs. control rats fed a normal diet; §, p<0.05 vs. oxaliplatin-treated rats fed a normal diet.

PLS-Discriminant Analyses (PLS-DA) were performed on samples taking into account the treatment and diets received to identify relevant potential metabolites involved in oxaliplatin-induced metabolic changes. For animals fed a normal diet, PLS-DA showed a clear separation between the samples of oxaliplatin treated and control animals (R²Y=0.721, Q²=0.527, validated model, Figure 17-A), indicating that the metabolic fingerprints of these two groups are significantly distinct. The most discriminant metabolites with a VIP value above 1.2 were acetate (Ace), AXP, Glu, glycerophosphocholine (GPC), phosphatidylcholine (PtC) and tCr. At the same time after oxaliplatin injection, as shown in Figure 18, immunoblot analysis revealed no change in NR2B subunit expression compared to control rats. Furthermore, levels of p-Tyr1472, p-Tyr1336 and p-Ser1303 NR2B subunits remained unchanged after oxaliplatin injection compared to control rats, at day 3.

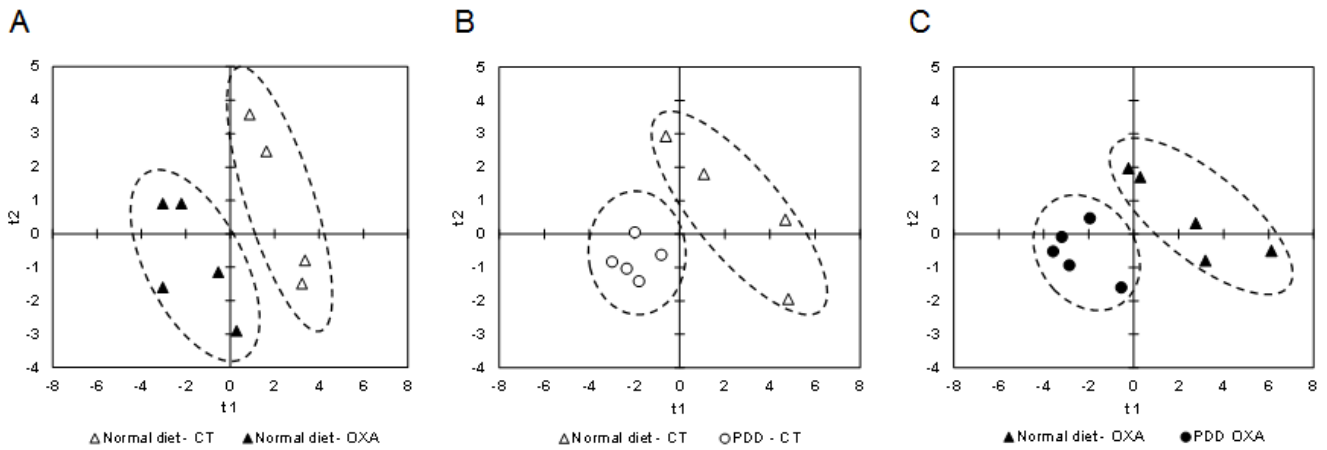


Figure 17 : Score plots of PLS-DA analysis based on the 18 metabolites of the spinal dorsal horn quantified from $^1\text{H-NMR}$ data. PLS-DA analysis revealed a clear separation of the metabolic phenotypes of spinal samples between control rats fed a normal diet (normal diet - CT) and oxaliplatin-treated rats fed a normal diet (normal diet - OXA) (A), control rats fed a normal diet (normal diet - CT) and control rats fed a PDD (PDD - CT) (B) and oxaliplatin-treated rats fed a normal diet (normal diet - OXA) and oxaliplatin-treated rats fed a PDD (PDD - OXA) (C) 3 days after oxaliplatin injection. Each point represents an individual sample. Ellipses have been drawn to encompass samples from the same treatment group ($n=4$ to 5 per group).

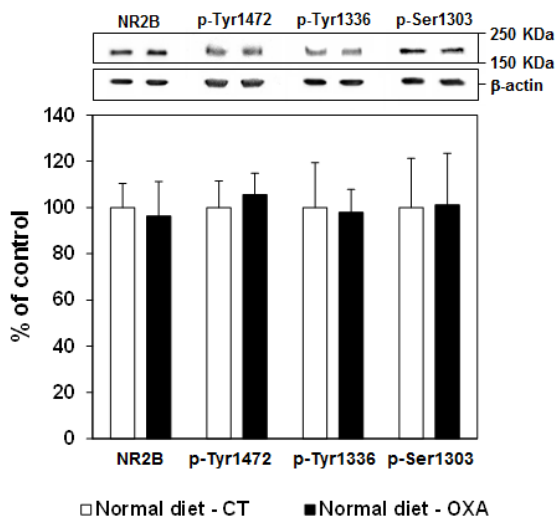


Figure 18 : Effect of an oxaliplatin injection on spinal NR2B protein expression and phosphorylation at day 3 in rats fed a normal diet. Variations (%) in total NR2B, p-Tyr1472, p-Tyr1336 and p-Ser1303 NR2B expression were measured in the spinal cord dorsal horn of control rats (normal diet - CT, white bars) and oxaliplatin-treated rats (6 mg/kg, i.p., normal diet - OXA, black bars) 3 days after oxaliplatin administration. Ratios on beta-actin are expressed as means \pm SEM. Representative western blots are shown for NR2B/phospho-NR2B (upper panel) and the corresponding beta-actin signals (lower panel). A non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to assess statistical differences between groups.

3.2.2. *The PDD suppresses oxaliplatin-induced increase of glutamate level*

The PDD, devoid of any effect by itself on glutamate level, suppressed the oxaliplatin induced increase in Glu concentration at day 3 post-oxaliplatin injection and the decrease in tCr (Table 1). For oxaliplatin-treated rats, spinal Glu concentration was significantly lower in rats fed a PDD compared to a normal diet (-59%, $p=0.0143$), as well as concentrations of glutamate precursors: glutamine (Gln) (-16% $p=0.0143$) and N-acetylaspartylglutamate (NAAG) (-24%, $p=0.0283$). A significant decrease in aspartate (Asp) (-36%, $p=0.0283$), another excitatory amino-acid, was also observed in the oxaliplatin-treated rats fed a PDD compared to a normal diet, as well as a decrease of its precursor N-acetylaspartate (NAA) (-24%, $p=0.0143$).

3.3. **The PDD induces other metabolic variations in the spinal cord**

At day 3, in control rats fed a PDD, there was a significant decrease in PtC (-25%, $p=0.0143$), GPC (-22%, $p=0.0143$), AXP (-22%, $p=0.0143$), alanine (Ala) (-19%, $p=0.0283$), lactate (Lac) (-15%, $p=0.0209$) and myo-inositol (MyI) (-15%, $p=0.0275$) concentrations compared to control rats fed a normal diet. Inversely Ace levels increased (+25%, $p=0.0339$) in response to PDD compared to control rats fed a normal diet (Table 1). Similarly, PLS-DA evidenced a marked separation of control rats according to diet ($R^2Y=0.646$, $Q^2=0.547$, validated model, Figure 17-B) and the most discriminant metabolites explaining this separation were AXP, beta-hydroxybutyrate (BHB), Lac, PtC and tCr. At the same time, in oxaliplatin-treated rats fed a PDD, the concentrations of succinate (Succ) (-59%, $p=0.0472$) and choline-derivatives metabolites phosphocholine (PC) (-13%, $p=0.0472$), PtC (-19%, $p=0.0163$) and GPC (-19%, $p=0.0163$) decreased significantly compared to oxaliplatin-treated rats fed a normal diet (Table 1). PLS-DA also showed a clear separation between the diets for oxaliplatin-treated rats ($R^2Y=0.649$, $Q^2=0.504$, validated model, Figure 17-C), indicating that the metabolic phenotype of these two groups is significantly distinct. This separation was attributed to Ala, Gln, Lac, MyI and NAA.

3.4. **Ifenprodil, a NR2B-selective antagonist, relieves oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity**

As a PDD reduced the oxaliplatin-induced increase in spinal Glu concentration, we suspected that a direct inhibition of the spinal glutamate/NR2B-containing NMDA receptors pathway would be effective to reduce oxaliplatin-induced hypersensitivity. Thus we assessed the effect of an intrathecal injection of NR2B-specific antagonist, ifenprodil, on oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity.

In the electronic von Frey test, while 2.5 µg ifenprodil/rat was inactive, 5 µg/rat induced a significant increase in paw withdrawal thresholds from 4 h to 8 h compared to controls (+16%, $p=0.006$ and +21%, $p=0.003$, respectively). Rats treated with 10 µg ifenprodil/rat showed a significant increase in paw withdrawal thresholds at 2 h (+12%, $p=0.005$), 4 h (+31%, $p<0.001$) and 8 h (+43%, $p=0.004$) compared to saline-treated rats and oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity was totally reversed, at 4 h and 8 h (mechanical thresholds were not significantly different from pre-oxaliplatin values, $p=0.90$ and $p=0.24$, respectively). At 24 h post-ifenprodil administration, paw withdrawal thresholds were not significantly different from the saline group regardless of the dose (Figure 19-A).

Similarly, in the thermal place preference test, the first active dose of ifenprodil was 5 µg/rat with a significant increase (+140%, $p=0.02$) in the time spent on the cold plate, at 4 h, compared to control rats. Rats treated with 10 µg ifenprodil/rat showed a significant increase in the time spent on the cold plate at 4 h (+120%, $p=0.001$) and 8 h (+114%, $p=0.01$) compared to control rats. Moreover, the time spent on the cold plate was significantly higher than pre-oxaliplatin values in rats treated with 10 µg/rat at 4 h (+35%, $p=0.017$) and 8 h (+28%, $p=0.045$). At 24 h post-ifenprodil administration, time spent on the cold plate was not significantly different from the saline control group regardless of the dose (Figure 19-B).

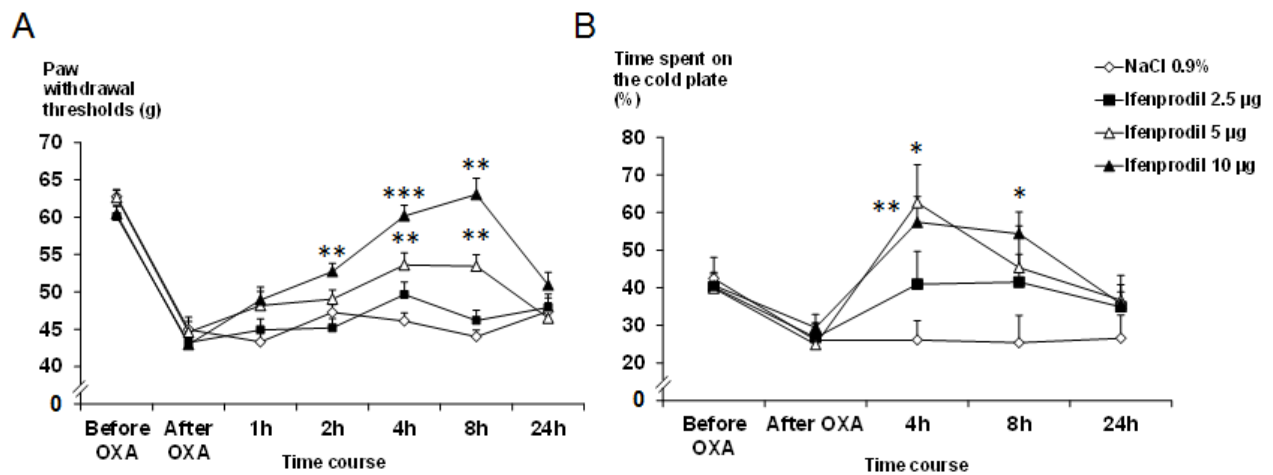


Figure 19 : Effect of ifenprodil on oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity at day 3 in rats fed a normal diet. Neuropathic pain was induced in rats fed normal diet by a single i.p. injection of oxaliplatin (OXA) at 6 mg/kg on day 0. (A) Mechanical hypersensitivity was assessed before and 3 days after oxaliplatin injection, and then at 1, 2, 8 and 24 h after an intrathecal injection of ifenprodil (2.5, 5 and 10 µg), using the electronic von Frey test. (B) Cold hypersensitivity expressed as time spent on the cold plate (%) was assessed before and 3 days after oxaliplatin injection and then at 4, 8 and 24 h after an intrathecal injection of ifenprodil (2.5, 5 and 10 µg) using the thermal place preference test (12°C vs. 25°C). All data are expressed as means \pm SEM (n= 6 to 9 per group). Two-way repeated-measures ANOVA followed by a Tukey-Kramer post hoc test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs. NaCl 0.9%.

4. Discussion

Up to 96% of patients experience acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration [20]. Even if oxaliplatin-based chemotherapy remains the reference treatment for advanced colorectal cancers [1], its neurotoxicity is often a cause for early chemotherapy discontinuation and greatly impairs patient quality of life [25].

This study reports that a 7-day PDD was able to prevent oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats and brings novel findings on the molecular mechanisms enabling PDD to prevent oxaliplatin-induced neurotoxicity.

The antinociceptive effect of the PDD might result from a decrease in spinal NMDA receptor activity as demonstrated by Rivat *et al.* [13]. Increased spinal NR2B subunit expression and/or phosphorylation has been associated with the development of pain behavior in a wide range of animal pain models, including inflammation [26], traumatic neuropathy [27], toxic neuropathy [28] and cancer pain [29]. However, in the present study, there was no variation in NR2B protein expression or tyrosine and serine phosphorylation in response to oxaliplatin injection. These results are in accordance with Mihara *et al.* (2011), who did not find any variation in NR2B expression (gene and protein) in the rat spinal dorsal horn 5 days after oxaliplatin injections (4 mg/kg i.p., day 1 and 2). An increase of NR2B expression was only found following repeated administration of oxaliplatin over 25 days (4 mg/kg i.p. twice a week, cumulative dose: 32 mg/kg) [8]. On the other hand, even though we failed to show an increase in NR2B activity, we demonstrated a hyperactivity of the glutamate pathway in the spinal dorsal horn following an acute injection of oxaliplatin. This hyperactivity, illustrated by the increased concentration of glutamate in the spinal dorsal horn, was reversed by the PDD simultaneously with the induced hyperalgesia, which suggests a causal link between the two changes. Indeed, glutamate is long known to be a major neurotransmitter of sensory input between primary afferent fibers and nociceptive ascending pathways [30]. Furthermore, numerous data from literature establish a link between increase in spinal glutamate levels and pain hypersensitivity in chronic pain models (e.g. an increase of spinal glutamate was shown in a rat model of trauma-induced painful neuropathy [31]). Moreover, antagonists of NMDA receptors are effective in patients with neuropathic pain [12,32].

The metabolic analysis performed here allows the evaluation of the biochemical impact of PDD on glutamate biosynthesis. Glutamate is synthesized in neurons from 2-oxoglutarate originating from the tricarboxylic acid cycle [33]. In oxaliplatin-treated rats fed a PDD, the spinal level of succinate (a tricarboxylic acid cycle intermediate) is significantly lower than in oxaliplatin-treated rats fed a normal diet, suggesting that the absence of increased glutamate concentration in oxaliplatin-treated rats fed a PDD could result from a decreased activity of the tricarboxylic acid

cycle in spinal neurons. This hypothesis is supported by the significant decrease in adenosine phosphate concentration in control rats fed a PDD. Interestingly, significant decreases in glutamine and NAAG (respectively the astrocyte [34] and neuron [35] storage form of glutamate) were also observed, suggesting that the PDD may interact with several metabolic pathways to prevent oxaliplatin-induced increase in spinal glutamate biosynthesis. Another potential precursor of glutamate is ornithine (through the concerted action of ornithine aminotransferase and glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase or the 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [33]), which is also a precursor of polyamines [15]. It is possible that the polyamine deficiency induces an increased *de novo* synthesis of polyamines (through activation of ODC which is dependent upon polyamine uptake [36]), thus depleting ornithine from neurons and preventing glutamate synthesis from this metabolite. The decreased lactate concentration observed in rats fed a PDD (control and oxaliplatin-treated) could indicate an alteration of aerobic glycolysis in astrocytes, which is directly dependent on glutamate uptake [37]. Finally, we observed a significant decrease of glycerophosphocholine and phosphatidylcholine in rats fed a PDD (regardless of the treatment received) compared to rats fed a normal diet (regardless of the treatment received). Neurodegenerative diseases are commonly associated with an increase of these metabolites in the nervous system [38]. Moreover, polyamines have been shown to interact with phospholipids and to stabilize membrane formation [39]. We could suspect that the PDD might play a role of neuroprotection which, in combination with the decrease in glutamate levels, could participate to the prevention of acute pain hypersensitivity induced by oxaliplatin.

Intrathecal injection of ifenprodil induced an antihyperalgesic effect in conditions of oxaliplatin-induced mechanical and cold hypersensitivity. This result, with recent previous ones obtained with ifenprodil (i.e. an antihyperalgesia in a rat model of chronic dorsal root ganglia compression [27] or in oxaliplatin-induced mechanical allodynia [8] confirms the involvement of an increased, NR2B-dependent, activity of the spinal glutamate system in the pathophysiology of oxaliplatin-induced neuropathic pain symptoms (cold and mechanical hypersensitivity). Together with the metabolic and antihyperalgesic effects of the PDD, these results show that oxaliplatin-induced hypersensitivity can be reduced by inhibiting the glutamate pathway either upstream through a decrease in glutamate level (PDD effect) or downstream by an antagonism of the glutamate target (ifenprodil action).

Whilst a PDD is able to prevent the acute oxaliplatin induced cold and mechanical hypersensitivity, we can also put forward the hypothesis that a PDD could also prevent oxaliplatin-induced chronic neuropathy, associated with repeated oxaliplatin administrations. In this chronic neuropathy, NR2B antagonists (ifenprodil and Ro25-6981) decreased mechanical allodynia [8].

Moreover, excessive release of glutamate (which could be induced by repeated cycles of oxaliplatin) in CNS is known to be responsible for the excitotoxicity associated with neuronal damage (e.g. in spinal inhibitory neurons) and death [40]. The pharmacological inhibition of the glutamate carboxypeptidase, which hydrolyses N-acetylaspartylglutamate (NAAG) into N-acetylaspartate (NAA) and glutamate, decreased glutamate level and improved nerve conduction velocity as well as morphological alterations in dorsal root ganglia of animal models of cisplatin- and bortezomib-induced neuropathy [41]. Similarly, a PDD might limit the development of the oxaliplatin-induced neuropathy, an effect which needs to be demonstrated and could be very promising for a preventive clinical management of chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain.

To our knowledge, this is the first study to report an increased glutamate concentration in the spinal dorsal horn of oxaliplatin-treated rats and to report that a PDD prevented both this increase and the mechanical and thermal hypersensitivity. Managing oxaliplatin-induced neurotoxicity is of crucial importance in oncology, as this toxicity is often a cause of dose reduction or treatment discontinuation in cancer patients. Thus, reducing polyamine dietary intake for these patients could represent a safe and effective strategy to prevent the acute sensory disturbances associated with oxaliplatin infusions and to ultimately provide neuroprotection against chronic oxaliplatin-induced neuropathy. A clinical trial (NCT01775449) is currently recruiting patients to assess this new hypothesis.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Mounir Traïkia (CNRS U6504, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France) for helpful advice on proton NMR analysis, and René Havouis and Eric Chapuy for their technical assistance.

References

1. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, et al. (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 2938-2947.
2. Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S (2002) Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 29: 21-33.
3. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S (2006) Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol* 59: 159-168.
4. Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, et al. (2011) Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. *Oncologist* 16: 708-716.
5. Tofthagen C (2010) Surviving chemotherapy for colon cancer and living with the consequences. *J Palliat Med* 13: 1389-1391.
6. Tofthagen C, Overcash J, Kip K (2012) Falls in persons with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Support Care Cancer* 20: 583-589.
7. Gent P, Massey K (2001) An overview of chemotherapy-induced peripheral sensory neuropathy, focusing on oxaliplatin. *Int J Palliat Nurs* 7: 354-359.
8. Mihara Y, Egashira N, Sada H, Kawashiri T, Ushio S, et al. (2011) Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol Pain* 7: 8.
9. Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, et al. (1999) Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* 38: 611- 623.
10. De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G (2004) Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491: 137- 148.
11. Qu XX, Cai J, Li MJ, Chi YN, Liao FF, et al. (2009) Role of the spinal cord NR2B containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol* 215: 298-307.
12. Parsons CG (2001) NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429: 71-78.
13. Rivat C, Richebe P, Laboureyras E, Laulin JP, Havouis R, et al. (2008) Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 137: 125-137.
14. Milovic V (2001) Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 1021-1025.

15. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24: 184-197.
16. Williams K (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 (Pt 2): 289-297.
17. Kergozien S, Bansard JY, Delcros JG, Havouis R, Moulinoux JP (1996) Polyamine deprivation provokes an antalgic effect. *Life Sci* 58: 2209-2215.
18. Gaboriau F, Havouis R, Moulinoux JP, Delcros JG (2003) Atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry method to improve the determination of dansylated polyamines. *Anal Biochem* 318: 212-220.
19. Ling B, Coudore-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F, et al. (2007) Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 234: 176-184.
20. Attal N, Bouhassira D, Gautron M, Vaillant JN, Mitry E, et al. (2009) Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144: 245-252.
21. Binder A, Stengel M, Maag R, Wasner G, Schoch R, et al. (2007) Pain in oxaliplatin-induced neuropathy--sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. *Eur J Cancer* 43: 2658-2663.
22. Daulhac L, Mallet C, Courteix C, Etienne M, Duroux E, et al. (2006) Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol* 70: 1246-1254.
23. Angenstein F, Hilfert L, Zuschratter W, Altmann WD, Niessen HG, et al. (2008) Morphological and metabolic changes in the cortex of mice lacking the functional presynaptic active zone protein bassoon: a combined ¹H-NMR spectroscopy and histochemical study. *Cereb Cortex* 18: 890-897.
24. Verbeke G, Molenberghs G (2009) *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. New York: Springer Verlag.
25. Balayssac D, Ferrier J, Descoeur J, Ling B, Pezet D, et al. (2011) Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf* 10: 407-417.
26. Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, et al. (2002) Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 22: 6208-6217.

27. Zhang W, Shi CX, Gu XP, Ma ZL, Zhu W (2009) Ifenprodil induced antinociception and decreased the expression of NR2B subunits in the dorsal horn after chronic dorsal root ganglia compression in rats. *Anesth Analg* 108: 1015-1020.
28. Narita M, Miyoshi K, Suzuki T (2007) Changes in function of NMDA receptor NR2B subunit in spinal cord of rats with neuropathy following chronic ethanol consumption. *Life Sci* 80: 852-859.
29. Gu X, Zhang J, Ma Z, Wang J, Zhou X, et al. (2011) The role of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B in spinal cord in cancer pain. *Eur J Pain* 14: 496-502.
30. Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164.
31. Kawamata M, Omote K (1996) Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 68: 85-96.
32. Fisher K, Coderre TJ, Hagen NA (2000) Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. *J Pain Symptom Manage* 20: 358-373.
33. Torgner I, Kvamme E (1990) Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol* 12: 11-17.
34. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417-428.
35. Fuhrman S, Palkovits M, Cassidy M, Neale JH (1994) The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. *J Neurochem* 62: 275-281.
36. Seiler N, Dezeure F (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 22: 211-218.
37. Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10625-10629.
38. Klein J (2000) Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm* 107: 1027-1063.
39. Bachrach U (2005) Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr Protein Pept Sci* 6: 559-566.
40. Rzeski W, Pruskil S, Macke A, Felderhoff-Mueser U, Reiher AK, et al. (2004) Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 56: 351-360.

41. Carozzi VA, Chiorazzi A, Canta A, Lapidus RG, Slusher BS, et al. (2010) Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotox Res* 17: 380-391.

III.2. Données complémentaires

III.2.1. Matériels et méthodes

Dosage des polyamines érythrocytaires et tissulaires

Trois jours après l'injection d'oxaliplatine ou du véhicule, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang artériel est ensuite recueilli dans des tubes contenant 2 ml de tampon citrate de sodium à 0,129 M puis centrifugé à 2500 g pendant 10 min à 4°C. Après élimination du plasma et de la couche leucoplaquettaire, le culot globulaire est lavé 3 fois à l'aide de 4 volumes de sérum physiologique (NaCl 0,9%). Les protéines sont ensuite éliminées par addition de 2 mL d'une solution d'acide perchlorique froid à 10% pour 1 ml d'érythrocytes. Après 1h d'incubation à 4°C et centrifugation à 3000 g pendant 10 min, le surnageant perchlorique est prélevé puis analysé par HPLC selon la méthode de Lughezzani et ses collaborateurs (Lughezzani et al., 2010). Les prélèvements de corne dorsale de la moelle épinière provenant des mêmes rats ont été homogénéisés dans 10 volumes d'acide perchlorique à 10% et analysés selon le même procédé.

Effet du régime sans polyamines sur la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine

Modèle de neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine chez le rat.

L'oxaliplatine (OXA) est administré par voie intraveineuse à la dose de 2 mg/kg. Les animaux du groupe contrôle (CT) ont reçu une injection de véhicule (solution de glucose à 5%). Les injections sont réalisées à J0-4-7-11-14-18-21-25, soit une dose cumulée de 16 mg/kg sur 4 semaines

Test de l'Open Field

Le test de l'*Open Field* est composé d'une arène en plastique opaque (75x75cm) divisée virtuellement en 25 carrés de 15x15cm. Un rat est introduit au milieu de l'arène sans habitude au test et laissé seul pendant 5 min, avec une luminosité de 30 lux au centre de l'arène. Chaque session est filmée afin d'enregistrer le comportement de l'animal : activité motrice, activité exploratoire et anxiété. Le temps passé au centre de l'arène (défini par les 9 carrés centraux) est caractéristique de l'anxiété de l'animal. L'activité motrice est visualisée par le nombre total de carrés franchis. L'activité exploratoire est évaluée par le nombre de redressements sur les pattes postérieures. Entre

chaque rat, l'arène doit être nettoyée pour éviter que l'animal ne soit influencé par les odeurs du rat précédent.

III.2.2. Résultats

Dosage des polyamines érythrocytaires et tissulaires

Aucune variation significative du taux de spermidine érythrocytaire n'est observée entre les animaux contrôles (CT) soumis à un régime normal et les animaux contrôles soumis à un régime sans polyamines (PDD). Chez les animaux traités par l'oxaliplatine (OXA) et soumis à un régime normal, les concentrations érythrocytaires en spermidine ne varient pas significativement par rapport aux animaux contrôles soumis à une alimentation contenant des polyamines. Les concentrations de spermidine retrouvées dans les globules rouges sont significativement diminuées chez les rats traités par l'oxaliplatine et soumis à un régime sans polyamines (PDD - OXA) comparés aux animaux des groupes contrôles, avec ou sans polyamines ($p < 0,05$). A l'inverse, aucune variation des concentrations érythrocytaires en spermine et putrescine n'a été observée entre les animaux quel que soit leur traitement, oxaliplatine ou contrôle, et leur régime, avec ou sans polyamines (Figure 20-A).

Aucune variation des concentrations tissulaires en spermidine, spermine et putrescine n'a été observée entre les animaux quel que soit leur traitement, oxaliplatine ou contrôle, et leur régime, avec ou sans polyamines (Figure 20-B).

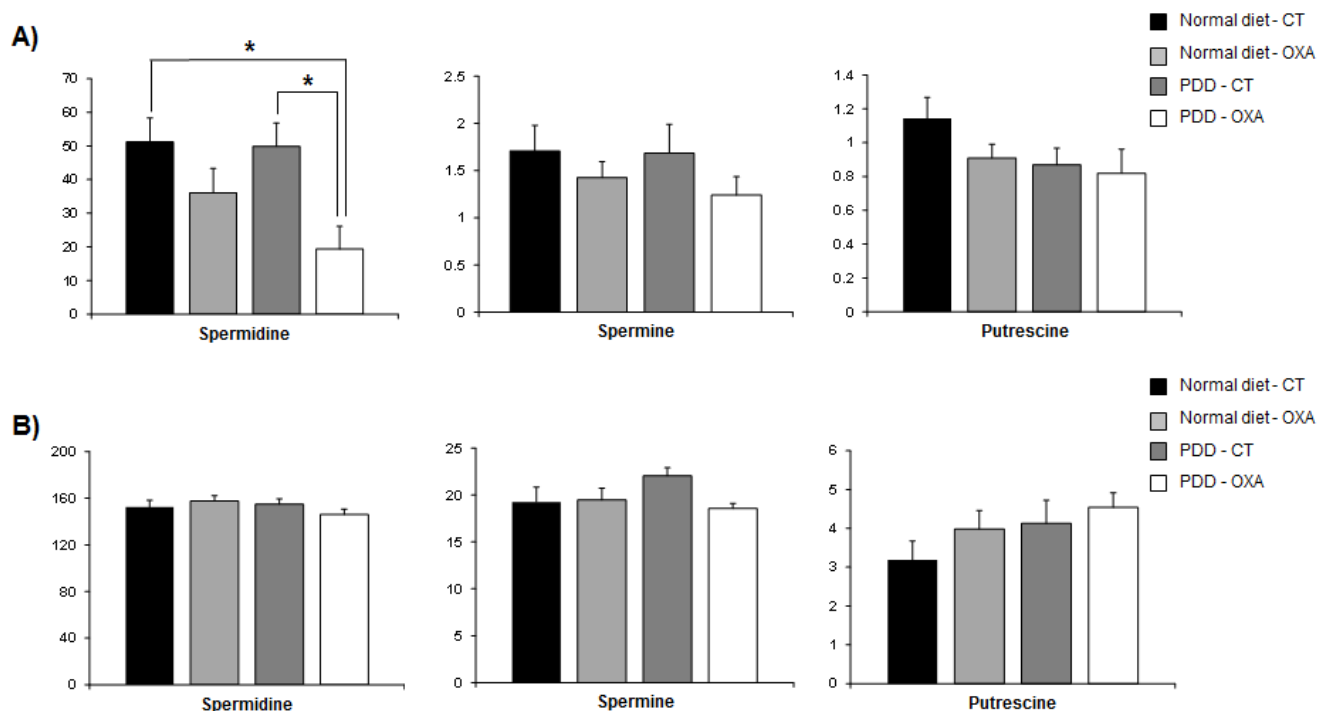


Figure 20 : Effet du régime sans polyamines et d'une injection d'oxaliplatine sur les taux de polyamines dans les érythrocytes (A) et dans la corne dorsale de la moelle épinière (B) à J3. (A) Les résultats sont exprimés en nmol/8x10⁹ érythrocytes (moyennes + ESM) et (B) en nmol/100 mg de tissu (moyennes + ESM). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis. *, p<0,05 (n=8 par groupe).

Effet du régime sans polyamines sur la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine

Evaluation de l'allodynie mécanique et thermique au froid :

L'effet du régime sans polyamines sur l'allodynie mécanique est présenté sur la Figure 21-A. Dès la 2^{ème} injection d'oxaliplatine (J4), on observe une diminution significative des seuils mécaniques chez les rats traités soumis à un régime normal par rapport aux animaux contrôles (-5% ; p<0,05). Cette diminution est maximale après la 5^{ème} injection (J18) (-30% ; p<0,001) et persiste jusqu'à deux semaines après l'arrêt des injections d'oxaliplatine. En ce qui concerne les rats traités et nourris avec une alimentation sans polyamines (PDD - OXA), on observe une diminution significative des seuils mécaniques par rapport aux animaux du groupe contrôle (PDD - CT) dès la 8^{ème} injection d'oxaliplatine (J18) (-16% ; p<0,01). Cette diminution des seuils est maximale à J25 (-17% ; p<0,01) et persiste jusqu'à J32 (-13% ; p<0,05). A J39, les seuils nociceptifs des animaux redeviennent comparables à ceux des animaux contrôles. Pour finir, on observe que l'hypersensibilité mécanique développée chez les animaux avec un régime alimentaire sans polyamines (PDD - OXA) est moins intense que celle développée chez les rongeurs avec une

alimentation normale ; cette différence apparaît dès J4 (-10% ; $p < 0,01$), atteint un maximum à J11 (-15% ; $p < 0,01$) et persiste jusqu'à la fin du traitement à J39 (-21% ; $p < 0,01$).

L'effet du régime sans polyamines sur l'allodynie au froid est présenté sur la Figure 21-B. Aucune différence du temps passé sur la plaque test n'est remarquée entre les deux groupes de rats contrôles pour une alimentation avec et sans polyamines. Dès la première injection d'oxaliplatine, on observe une chute du temps passé sur la plaque test (20°C) par rapport à la plaque de référence (30°C) pour le groupe de rats traités par oxaliplatine (OXA) par rapport au groupe de rats contrôles avec une alimentation contenant des polyamines (CT). Cette diminution du temps passé sur la plaque test devient significative à partir de la 3^{ème} injection d'oxaliplatine soit à J10. La différence est maximale à J10 (-42% ; $p < 0,001$) puis remonte à J15 et J22 (-32% ; $p < 0,001$ et -24% ; $p < 0,001$, respectivement). A J29, la diminution devient faiblement significative (-20% ; $p < 0,05$). Pour le groupe de rats traités par oxaliplatine avec une alimentation sans polyamines (PDD - OXA), aucune différence significative du temps passé sur la plaque à 20°C n'a été mise en évidence par rapport au groupe de rats contrôles avec une alimentation sans polyamines (PDD - CT).

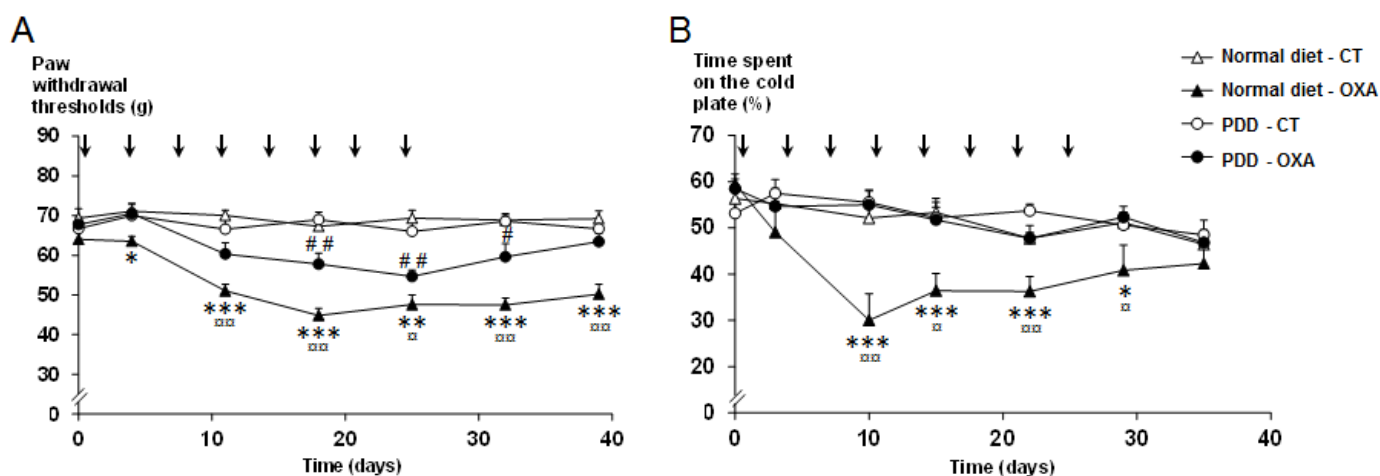


Figure 21 : Effet préventif d'un régime sans polyamines sur (A) l'allodynie mécanique statique et (B) l'hypersensibilité au froid induites par l'administration répétée d'oxaliplatine (flèches noires). Les résultats correspondent (A) aux seuils de retrait de la patte en fonction du temps (moyenne + ESM) et (B) au pourcentage de temps passé sur la plaque à 20°C en fonction du temps (moyenne + ESM). Les régimes alimentaires, normal ou sans polyamines (PDD) ont été instaurés à J-7. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de Tukey. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ Normal diet - OXA vs. Normal diet - CT; #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ PDD - OXA vs. PDD - CT; ###, $p < 0,01$ Normal diet - OXA vs. PDD - OXA ($n=8$ par groupe).

Evaluation de l'anxiété par le test de l'Open Field :

Aucune variation significative de l'activité motrice (Figure 22-A) ou du nombre de redressements (Figure 22-B) n'a été observée entre les animaux des groupes contrôles ayant reçu une alimentation avec polyamines ou sans polyamines (PDD - CT). D'autre part, aucune variation significative de l'activité motrice ou du nombre de redressements n'a été observée chez les animaux traités par oxaliplatine par rapport aux animaux contrôles quel que soit le régime, avec ou sans polyamines.

Pour les animaux contrôles ayant reçu une alimentation sans polyamines (PDD - CT), le temps passé au centre de l'arène (Figure 22-C) est significativement plus élevé par rapport aux animaux contrôles ayant reçu un régime avec polyamines (+39% ; $p < 0,001$). On observe également une augmentation significative du temps passé au centre de l'arène chez les animaux traités par oxaliplatine et soumis à un régime sans polyamines (PDD - OXA) par rapport aux animaux traités par oxaliplatine soumis à un régime normal (+44% ; $p < 0,001$).

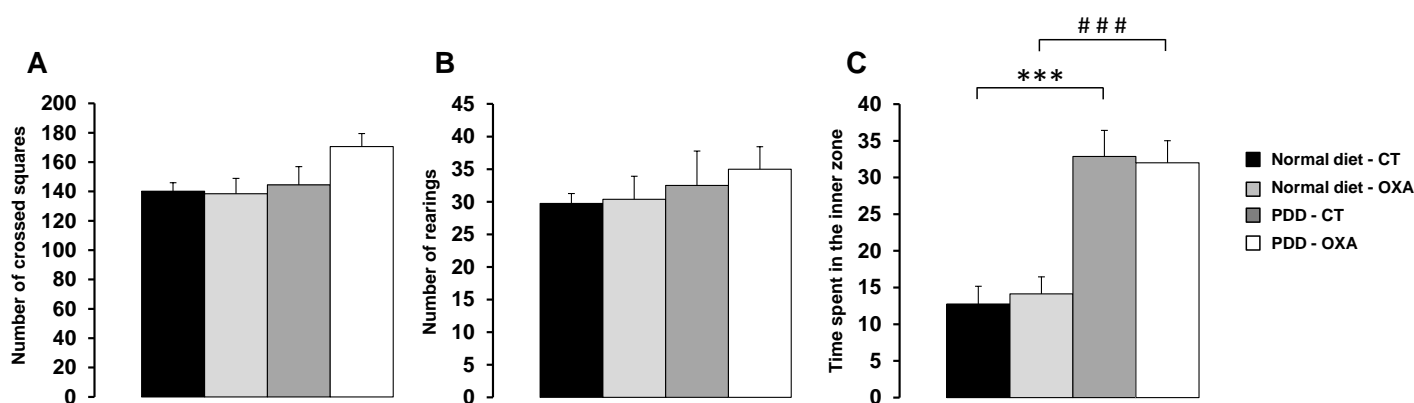


Figure 22 : Effet d'un régime sans polyamines et/ou de l'administration répétée d'oxaliplatine sur (A) la locomotion, (B) l'exploration et (C) l'anxiété des animaux évaluées par le test de l'open field. Les régimes alimentaires, normal ou sans polyamines (PDD) ont été instaurés à J-7, et le test de l'open field a été réalisé à J31. Les résultats correspondent aux moyennes + ESM. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis. ***, $p < 0,001$ ($n = 8$ par groupe).

III.3. Discussion

Un régime sans polyamines prévient l'apparition des troubles nociceptifs aigus induits par l'oxaliplatine chez le rat.

Dans un premier temps, notre étude s'est focalisée sur le modèle animal de neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine (Ling et al., 2007b). Dans ce modèle, une administration d'oxaliplatine (6 mg/kg, ip) entraîne l'apparition d'une hypersensibilité thermique évaluée par le test d'immersion de la queue ainsi qu'une allodynie mécanique au test des filaments de von Frey (Ling et al., 2007b). Ces troubles nociceptifs sont semblables aux symptômes retrouvés chez les patients traités par l'oxaliplatine tels qu'une hypersensibilité au froid (15°C) et au chaud (42°C) ainsi qu'une allodynie mécanique (Attal et al., 2009, Binder et al., 2007).

L'hypersensibilité mécanique décrite par Ling et al. (2007b) a été retrouvée sur le test du von Frey électronique dans notre étude. Une hypersensibilité mécanique est observée 2 jours après l'injection d'oxaliplatine chez les rats soumis à une alimentation normale. Cette hypersensibilité persiste jusqu'à 4 jours après l'injection d'oxaliplatine et disparaît complètement dès le 7^{ème} jour. Chez les rats traités par oxaliplatine recevant une alimentation sans polyamines, aucune hypersensibilité mécanique n'a pu être mise en évidence. La déplétion exogène en polyamines permet de prévenir l'allodynie mécanique induite par l'oxaliplatine mais n'engendre pas d'effet analgésique. En effet, aucune différence au niveau des seuils mécaniques n'apparaît entre les animaux contrôles recevant un régime sans polyamines et les animaux contrôles avec une alimentation normale. Ces résultats sont en accord avec ceux de Rivat et al. (2008) qui ont montré une diminution de l'hyperalgie mécanique sur des modèles animaux de douleur inflammatoire et de douleur neuropathique sans modification des seuils nociceptifs des animaux sains (Rivat et al., 2008).

L'hypersensibilité thermique décrite par Ling et al. (2007b) a également été retrouvée dans notre étude pour le groupe d'animaux soumis à une alimentation normale contenant des polyamines. Le test de préférence de place thermique (12°C vs 25°C) a révélé une hypersensibilité au froid 2 jours après l'injection chez les rats traités par rapport au groupe contrôle. Cette hypersensibilité thermique persiste 4 jours après l'administration d'oxaliplatine et disparaît complètement au bout de 7 jours. A l'inverse, les rats traités par oxaliplatine et soumis à une alimentation sans polyamines passent en moyenne autant de temps sur la plaque froide que les animaux contrôles, ne montrant aucune hypersensibilité au froid.

Comme décrit précédemment (Kergozien et al., 1996, Rivat et al., 2008), aucun effet indésirable n'a été observé chez les animaux ayant reçu avec une alimentation sans polyamines. La croissance pondérale de ces animaux ainsi que la prise alimentaire quotidienne étaient comparables

à celles des animaux qui ont reçu un régime alimentaire classique. Cette stratégie thérapeutique, qui est comparable à l'utilisation des antagonistes des récepteurs NMDA en termes d'efficacité, semble donc avoir l'avantage d'être bien tolérée.

Une diminution de l'apport en polyamines exogènes induit une diminution de la spermidine circulante en combinaison avec l'oxaliplatine.

Dans le but de confirmer la déplétion en polyamines *in vivo*, les concentrations en polyamines ont été quantifiées dans les érythrocytes qui possèdent un rôle majeur dans le transport des polyamines exogènes libres et leur distribution dans l'organisme (Bergeron et al., 1997, Moulinoux et al., 1981).

Chez les animaux contrôles ayant reçu une alimentation dépourvue de polyamines, les concentrations érythrocytaires en spermine, spermidine et putrescine ne varient pas significativement par rapport aux animaux contrôles soumis à une alimentation normale. Ainsi, la réduction de l'apport des polyamines par l'alimentation n'est pas suffisante pour induire une diminution significative des taux de polyamines circulantes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kergozien et al. (1996) qui ont montré qu'une inhibition de la voie endogène de la biosynthèse des polyamines (par un traitement à la DFMO, inhibiteur de l'ODC) était nécessaire pour induire une diminution significative des concentrations érythrocytaires en spermidine chez les animaux soumis à un régime sans polyamines (Kergozien et al., 1996). L'activité enzymatique de l'ODC (enzyme clé de la biosynthèse des polyamines) est très fortement régulée par le pool de polyamines intracellulaire. Toute diminution des concentrations intracellulaires en polyamines entraîne une augmentation de l'activité de l'ODC ainsi qu'une augmentation de la capture de polyamines provenant du milieu extracellulaire (Seiler et al., 1996). Dans le cas d'une diminution de l'apport alimentaire en polyamines, il est probable que la voie de production endogène soit suractivée, compensant ainsi le déficit d'apport exogène.

Trois jours après l'injection d'oxaliplatine, les concentrations érythrocytaires en spermidine diminuent significativement chez les animaux soumis à un régime sans polyamines comparés aux animaux contrôles soumis à un régime normal ou sans polyamines. Chez les animaux traités par l'oxaliplatine et soumis à un régime normal, les concentrations érythrocytaires en spermidine diminuent également comparés aux animaux contrôles, mais de manière non significative. En revanche, aucune variation des concentrations érythrocytaires en spermine et putrescine n'est observée entre les différents groupes. Ceci suggère que la diminution des concentrations érythrocytaires en spermidine est un effet concomitant du régime sans polyamines et de l'administration d'oxaliplatine.

D'après les données de la littérature (sur une lignée de cellules de carcinome ovarien humain), une exposition à l'oxaliplatine entraîne une diminution des taux intracellulaires de polyamines par plusieurs procédés (Varma et al., 2007). D'une part, l'oxaliplatine provoque une diminution de l'expression des enzymes clés de la biosynthèse des polyamines telles que l'ODC, la SAM-DC et la spermidine synthase. D'autre part, elle induit une augmentation de l'expression de la SSAT, une enzyme impliquée dans le catabolisme des polyamines (Varma et al., 2007). L'absence de modification de l'expression génique de la spermine synthase expliquerait la diminution spécifique de la spermidine observée lors du dosage érythrocytaire. La SSAT est l'enzyme limitante du métabolisme des polyamines et son gène hautement inductible par l'oxaliplatine peut-être jusqu'à 13 fois plus exprimé que la normale (Allen et al., 2007). Les métabolites formés, la N¹acétyl-spermine et surtout la N¹acétyl-spermidine, sont alors exportés hors de la cellule, et éliminés, empêchant toute reconversion. Cette régulation de l'expression génique semble commune aux sels de platine et explique en partie leur action antiproliférative. Les polyamines tiennent un rôle majeur dans la croissance et la survie de plusieurs types de tumeurs solides, y compris les tumeurs colorectales. La diminution de la synthèse de polyamines en réponse aux sels de platine entraîne une inhibition de la multiplication cellulaire (Allen et al., 2007).

La Figure 23 résume les différents effets potentiels de l'oxaliplatine sur les voies de biosynthèse des polyamines.

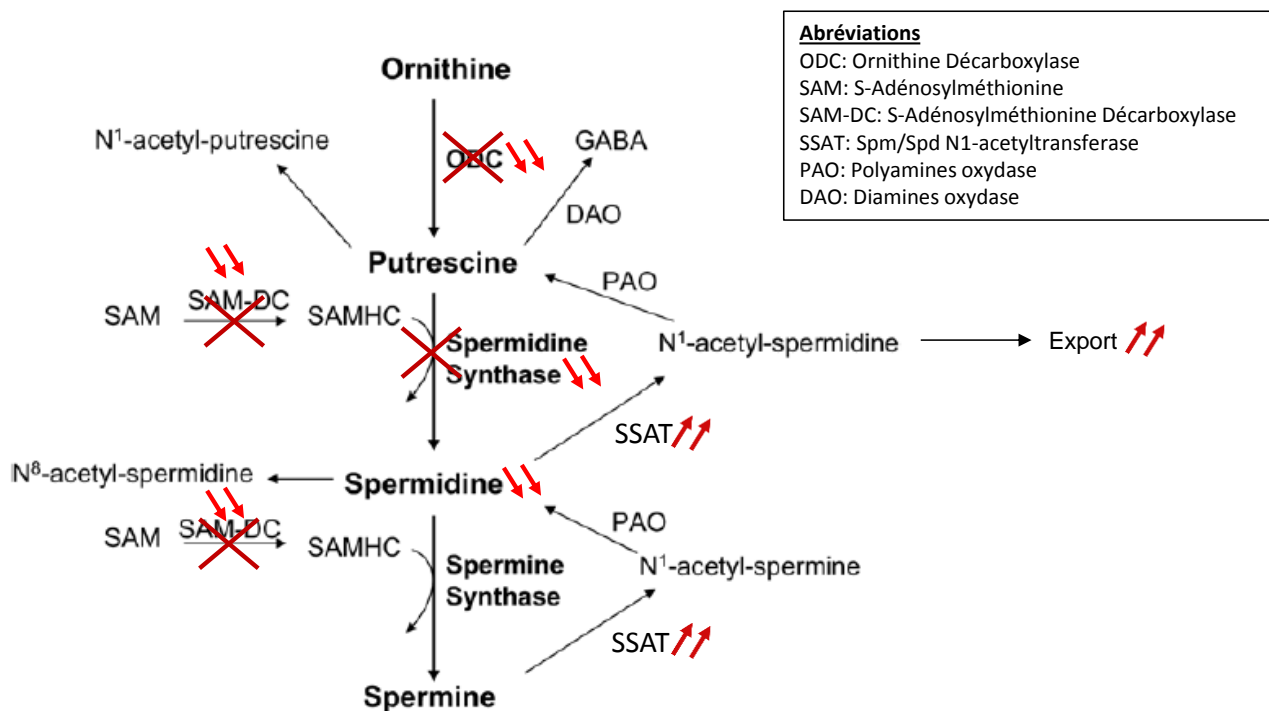


Figure 23 : Effets potentiels d'une exposition à l'oxaliplatine sur le métabolisme des polyamines

Associé à une alimentation sans polyamines, l'oxaliplatine contribuerait donc à la déplétion en polyamines en agissant comme un inhibiteur de la production endogène de polyamines (voire un activateur de leur catabolisme), avec une action ciblée sur la spermidine. Cette hypothèse expliquerait notamment l'effet antinociceptif du régime sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine. En effet, la grande majorité des études ayant évalué l'effet d'une telle alimentation sur la nociception ont montré que seule l'association du régime sans polyamines et d'un inhibiteur de l'ODC ou d'un antibiotique *per os* produisait un effet antalgique chez le rat (Kergozien et al., 1996, Kergozien et al., 1999, Rivat et al., 2008), sans doute à cause d'un phénomène de compensation entre absorption intestinale et synthèse endogène. L'effet préventif du régime sans polyamines sur la neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine serait donc en partie causé par l'oxaliplatine lui-même via son action sur la production de spermidine. Afin de confirmer cette hypothèse, l'effet d'une injection systémique d'oxaliplatine sur l'expression de la spermine synthase et la SSAT devrait être évalué *in vivo*, par exemple au niveau hépatique ainsi qu'au niveau des ganglions de la racine dorsale.

L'effet antinociceptif de la déplétion en polyamines passerait par une diminution de l'activité de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA situés au niveau spinal (Rivat et al., 2008). Nous avons donc quantifié les concentrations tissulaires en polyamines dans la corne dorsale de la moelle épinière des animaux 3 jours après l'injection d'oxaliplatine ou de véhicule. Aucune variation des taux de spermine, spermidine et putrescine n'a été observée entre les groupes, quel que soit le traitement et quel que soit le régime. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Kergozien et al. (1996). Une différence de concentration au niveau spinal ne serait également observée qu'avec l'utilisation concomitante d'un régime sans polyamines et de DFMO ou d'antibiotique *per os* (Kergozien et al., 1996). L'absence de variation des concentrations tissulaires de polyamines (et notamment des taux de spermidine) s'explique notamment par l'incapacité de l'oxaliplatine à traverser la barrière hémato-encéphalique et donc d'exercer son action sur le métabolisme neuronal des polyamines. D'autre part, il est possible que la déplétion ait lieu uniquement au niveau synaptique (où se situent les récepteurs NMDA-NR2B). Une autre méthode de dosage par microdialyse permettrait de déterminer spécifiquement les concentrations en polyamines dans le compartiment synaptique.

Implication de la neurotransmission glutamatergique au niveau spinal dans la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine.

L'effet antinociceptif du régime sans polyamines impliquerait une diminution de l'activité des récepteurs NMDA-NR2B au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, comme démontré par Rivat et ses collaborateurs sur un modèle de douleur inflammatoire (Rivat et al., 2008). Une augmentation de l'expression et/ou de la phosphorylation de la sous-unité NR2B a été associée avec le développement de la douleur dans de nombreux modèles animaux, notamment sur un modèle d'inflammation (Guo et al., 2002, Rivat et al., 2008), de neuropathie traumatique (Zhang et al., 2009), de neuropathie toxique (Narita et al., 2007) et de douleur cancéreuse (Guo et al., 2002). Cependant, aucune variation de l'expression de la sous-unité NR2B, ni de sa phosphorylation sur les résidus sérines et tyrosines n'a été observée suivant l'injection d'oxaliplatine. Cette observation s'accorde avec les résultats de Mihara et ses collaborateurs qui n'ont pas observé de surexpression de NR2B (ARNm et protéine) dans la corne dorsale de la moelle épinière dans la phase précoce du protocole d'administration d'oxaliplatine. Une surexpression de NR2B n'a été observée qu'après administrations répétées d'oxaliplatine pendant 25 jours (4 mg/kg ip, deux fois par semaine, dose cumulée de 32 mg/kg) (Mihara et al., 2011).

Cependant, bien qu'aucune augmentation de l'activité de la sous-unité NR2B n'ait été observée dans cette étude, l'analyse métabolomique de la corne dorsale de la moelle épinière a mis en évidence une hyperactivité de la neurotransmission glutamatergique 3 jours après l'administration d'oxaliplatine. Cette hyperactivité, indiquée par l'augmentation de la concentration en glutamate dans la corne dorsale, est complètement prévenue par un régime sans polyamines simultanément avec l'hypersensibilité douloureuse, ce qui suggère un lien causal entre ces deux paramètres. En effet, le glutamate est largement connu pour être un neurotransmetteur excitateur majeur au niveau du système nerveux central, impliqué dans la transmission du message nociceptif. De plus, plusieurs données de la littérature font état d'un lien entre l'augmentation des taux de glutamate au niveau spinal et le développement de la douleur chronique dans de nombreux modèles animaux (Carozzi et al., 2008, Kawamata and Omote, 1996, Kim et al., 2011).

L'analyse métabolomique a permis d'évaluer l'impact biochimique du régime sans polyamines sur la synthèse du glutamate. Dans les neurones, le glutamate est synthétisé à partir du 2-oxoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs (Torgner and Kvamme, 1990). Chez les animaux traités par l'oxaliplatine et recevant un régime normal, la concentration spinale de succinate (un autre intermédiaire du cycle de Krebs) est diminuée significativement par rapport aux animaux traités recevant un régime sans polyamines, ce qui suggère que l'absence d'augmentation du glutamate peut résulter d'une diminution de l'activité du cycle de Krebs au niveau neuronal.

Cette hypothèse est appuyée par la diminution significative de la concentration en adénosine phosphate chez les rats contrôles soumis à un régime sans polyamines. De plus, une diminution significative des concentrations en glutamine et NAAG (formes de stockage du glutamate au niveau astrocytaire (Hertz et al., 1999) et neuronal (Fuhrman et al., 1994), respectivement) a également été observée. Ces résultats suggèrent qu'une déplétion en polyamines exogènes interagit avec plusieurs voies métaboliques pour prévenir l'augmentation spinale de glutamate induite par l'oxaliplatine. L'ornithine est également un précurseur potentiel du glutamate (via l'action concertée de l'ornithine aminotransférase et de la glutamate-5-semialdéhyde déshydrogénase ou de la 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase) mais également des polyamines (Moinard et al., 2005). Il est donc possible qu'une diminution de l'apport alimentaire en polyamines induise une augmentation de la synthèse *de novo* des polyamines (via l'activation de l'ODC qui est fortement dépendante de la recapture des polyamines (Seiler et al., 1990)), entraînant ainsi une déplétion en ornithine au niveau des neurones et donc une diminution de la synthèse de glutamate à partir de ce métabolite. La diminution des concentrations en lactate observée chez les animaux contrôles et traités soumis à un régime sans polyamines peut indiquer une altération de la glycolyse aérobie au niveau astrocytaire, qui dépend directement de la recapture du glutamate dans ces cellules (Pellerin and Magistretti, 1994).

Enfin, une diminution significative de la glycérophosphocholine et de la phosphatidylcholine a été mise en évidence chez les animaux nourris avec un régime sans polyamines (quel que soit le traitement reçu) comparés aux animaux avec un régime normal. Les maladies neurodégénératives sont fréquemment associées à une augmentation de la concentration de ces métabolites dans le système nerveux (Klein, 2000). De plus, les polyamines sont connues pour interagir avec les phospholipides et stabiliser ainsi la formation des membranes biologiques (Bachrach, 2005). Ces résultats indiqueraient qu'une déplétion exogène en polyamines jouerait un rôle neuroprotecteur qui, en combinaison avec la diminution de la synthèse de glutamate, participerait à la prévention de la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine.

L'administration intrathécale d'ifenprodil induit un effet antihyperalgique sur ce modèle animal, à la fois sur la modalité mécanique (test du von Frey électronique) et sur la modalité thermique (test de préférence de place thermique). Ce résultat, en accord avec d'autres études (notamment sur un modèle de neuropathie traumatique (Zhang et al., 2009) ou sur un modèle de neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine (Mihara et al., 2011)) confirme l'implication de la sous-unité NR2B au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (et plus généralement de la neurotransmission glutamatergique) dans la physiopathologie de ces symptômes sensitifs induits par l'oxaliplatine.

Un régime sans polyamines permet également de réduire la neuropathie chronique induite par l'administration répétée d'oxaliplatine chez le rat.

Puisqu'un régime sans polyamines permet de prévenir l'hypersensibilité douloureuse aiguë induite par l'oxaliplatine, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un tel régime permet également de prévenir la neuropathie chronique et cumulative induite par l'oxaliplatine. Dans cette neuropathie chronique, l'administration d'antagonistes de la sous-unité NR2B (ifenprodil et Ro 25-6981) permet de supprimer l'allodynie mécanique (Mihara et al., 2011). De plus, la libération excessive et soutenue de glutamate dans le système nerveux central (qui pourrait être induite par l'administration répétée d'oxaliplatine) est connue pour induire une excitotoxicité associée à une dégénérescence neuronale (Rzeski et al., 2004). Sur d'autres modèles de neuropathies chimio-induites, l'inhibition pharmacologique de l'enzyme glutamate carboxypeptidase (hydrolysant le NAAG en NAA et glutamate) diminue les concentrations en glutamate au niveau spinal et améliore les vitesses de conduction nerveuse ainsi que les altérations morphologiques des neurones des ganglions de la racine dorsale (Carozzi et al., 2010). Ainsi, la deuxième partie de ce travail s'est focalisé sur l'évaluation de l'effet d'un régime sans polyamines sur le développement de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine chez le rat (Ling et al. 2007a).

Les animaux traités par l'oxaliplatine et ayant reçu une alimentation normale développent une hypersensibilité mécanique apparaissant dès la 2^{ème} injection d'oxaliplatine, devenant maximale après la 5^{ème} injection et persistant 2 semaines après les injections d'oxaliplatine. Pour les rats traités par l'oxaliplatine et soumis à un régime alimentaire sans polyamines, une hypersensibilité mécanique apparaît à partir de la 8^{ème} injection, puis revient à la normale. L'hypersensibilité mécanique développée chez les animaux avec un régime alimentaire sans polyamines est moins intense que celle développée par les animaux avec une alimentation normale. Le test de préférence de place thermique (20°C vs 30°C) a également permis de mettre en évidence une hypersensibilité au froid pour le groupe de rats traités par oxaliplatine par rapport au groupe de rats contrôles. Cette hypersensibilité au froid est maximale à J10 et disparaît à J36. Un régime sans polyamines permet de prévenir complètement l'apparition de cette hypersensibilité au froid sur le test de préférence de place thermique. Cette stratégie thérapeutique s'avère donc également efficace pour limiter voire prévenir les symptômes douloureux chroniques suite à l'administration répétée d'oxaliplatine.

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'effet de la stratégie nutritionnelle sur l'anxiété des animaux, une co-morbidité fréquemment retrouvée chez les patients douloureux chroniques (Nicholson and Verma, 2004). Le test de l'*Open Field* a permis d'évaluer l'effet de l'oxaliplatine et du régime sans polyamines sur la motricité, l'anxiété et l'activité exploratoire des animaux (Prut and Belzung, 2003). Le temps passé au centre par l'animal est un indicateur de son anxiété.

Spontanément, les rongeurs adoptent une attitude de défense, appelé thigmotaxie, qui consiste à éviter les espaces ouverts, limitant ainsi les risques de repérage et d'attaque par les prédateurs (Lamprea et al., 2008). Ce comportement est renforcé par l'absence d'habituation au test de l'*Open Field* et également par l'espace ouvert de l'arène (Prut and Belzung, 2003). Les résultats montrent que l'oxaliplatine n'entraîne aucun effet sur l'anxiété des rats soumis à un régime normal, car les rats passent autant de temps au centre de l'arène que les rats contrôles. A l'inverse, les animaux soumis à un régime sans polyamines sont moins anxieux que les animaux contrôles soumis à une alimentation normale, ils passent plus de temps au centre de l'arène. Le régime sans polyamines aurait donc un effet anxiolytique. Des données de plus en plus nombreuses indiquent que les polyamines jouent un rôle dans l'étiologie et la pathologie de divers troubles mentaux tels que l'anxiété, le stress et la dépression (Fiori and Turecki, 2008). Des dosages post-mortem chez des personnes suicidées ont révélé que les taux cérébraux de polyamines étaient significativement plus élevés chez les sujets ayant présentés des signes majeurs de dépression avant passage à l'acte par rapport aux sujets non dépressifs (Chen et al., 2010a). Enfin, quel que soit le régime, l'oxaliplatine n'induit aucune variation du nombre de carrés franchis ou du nombre de redressements. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ling et al, 2007a qui n'ont montré aucune atteinte motrice sur le modèle animal de neuropathie induite par l'oxaliplatine (Ling et al., 2007a). De même, un régime sans polyamines n'induit aucune variation de ces paramètres. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Rivat et al., 2008 qui ont montré qu'un régime sans polyamines ne modifiait pas l'activité locomotrice des animaux (Rivat et al., 2008).

III.4. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence un effet préventif d'un régime alimentaire sans polyamines sur les troubles nociceptifs thermiques et mécaniques induits par l'administration aiguë d'oxaliplatine. D'un point de vue mécanistique, l'effet préventif du régime serait lié à une modulation des concentrations tissulaires de glutamate au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. De même, cette stratégie thérapeutique permet également de limiter voire de prévenir l'apparition des symptômes de la neurotoxicité chronique chez l'animal. Un effet de type anxiolytique a également été observé chez les animaux soumis à cette alimentation. Ainsi, une déplétion exogène en polyamines représenterait une stratégie intéressante pour diminuer les effets indésirables de l'oxaliplatine et améliorer la qualité de vie des patients.

En clinique, une diminution de l'apport exogène en polyamines est possible grâce à l'existence de produits de nutrition clinique à très faible teneur en polyamines (Castase[®] et Polydol[®], Laboratoire Nutrialys) disponibles sur le marché. Il a été montré qu'un régime à base d'aliments pauvres en polyamines permettait de réduire l'apport exogène à environ 9 mg/jour, soit environ 20 fois moins que l'apport moyen journalier (180 mg/jour). Les solutés Castase[®] et Polydol[®] sont classés comme ADDFMS (Aliments Destinés à Des Fins Médicales Spéciales) et permettent un apport en polyamines de seulement 0,023 mg/jour, soit 8000 fois moins qu'une alimentation normale. La prise de ces solutés combinée à une alimentation à teneur réduite en polyamines est une stratégie thérapeutique réalisable en pratique et bien tolérée, permettant de réduire de manière substantielle l'apport en polyamines exogènes (Cipolla et al., 2009). Un essai clinique de phase II (NEUROXAPOL, NCT01775449) a donc été initié afin de valider nos résultats chez des patients atteints de cancers coliques et traités par oxaliplatine. Le résumé des caractéristiques de l'étude est présenté ci-après.

IV. Etude clinique : NEUROXAPOL

IV.1. Rationnel de l'étude

- **Dernier état des connaissances scientifiques**

La neurotoxicité des anticancéreux est essentiellement caractérisée par des neuropathies périphériques chimio-induites (NPCI) affectant le système nerveux périphérique (Balayssac et al., 2011). Ces NPCI sont des effets indésirables majeurs dose-limitants de nombreux anticancéreux (Quasthoff and Hartung, 2002). L'incidence de ces NPCI varie entre 10 et 100% selon les anticancéreux (Wilkes, 2007). Les caractéristiques de ces NPCI sont généralement fonction de l'intensité de la dose, de la dose cumulée et de l'anticancéreux (Balayssac et al., 2011). Les principaux anticancéreux responsables de ces NPCI sont rattachés aux classes pharmacologiques suivantes : poisons du fuseau (alcaloïdes de la pervenche, taxanes et épothilones), les sels de platine (cisplatine et oxaliplatine), bortezomib et thalidomide (Balayssac et al., 2011). Parmi ces agents anticancéreux, l'oxaliplatine (Eloxatine®) est un anticancéreux de référence indiqué dans le traitement des cancers colorectaux avancés (Cunningham et al., 2010). Aujourd'hui, l'oxaliplatine est utilisé en chimiothérapie adjuvante dans le traitement des cancers coliques après résection (Cunningham et al., 2010), des carcinomes œsophagiens, des adénocarcinomes gastriques et pancréatiques, dans certains hépatocarcinomes (Wasserman et al., 1999) et certains carcinomes ovariens (Muggia, 2009). L'oxaliplatine a également démontré une efficacité thérapeutique dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (Cortinovic et al., 2008).

Cependant, l'emploi d'oxaliplatine est grevé par une neurotoxicité périphérique dose-dépendante. La neurotoxicité de l'oxaliplatine est unique parmi les sels de platine avec une symptomatologie aiguë et chronique (Park et al., 2009). La neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine apparaît chez quasiment tous les patients (82-96% tous grades confondus) (Attal et al., 2009, Wilkes, 2007). Cette neurotoxicité est caractérisée par une apparition rapide de la symptomatologie dans les 48 heures, après la perfusion d'oxaliplatine. Elle est transitoire et corrélée à la vitesse de perfusion (Haller, 2000). Une étude clinique récente a montré que 96% des patients développaient **des dysesthésies réversibles induites par le froid** au niveau des mains après chaque cycle de chimiothérapie, devenant ainsi un **biomarqueur** de cette neuropathie (Attal et al., 2009). Les symptômes correspondent globalement à des paresthésies et des dysesthésies transitoires, des hypoesthésies caractérisées par un engourdissement des mains, des pieds et de la zone péri-orale après exposition à des températures ou des objets froids, et des crampes musculaires des membres

supérieurs (Haller, 2000). Un syndrome de dysesthésies laryngopharyngées a été également observé chez 1 à 2% (grade 3 à 4) des patients atteints de cancers colorectaux avancés. Il se caractérise par des sensations subjectives de dysphagie sans laryngo- ou bronchospasme (Haller, 2000).

Concernant la neurotoxicité chronique de l'oxaliplatine, elle entraîne principalement des anomalies sensibles avec des paresthésies distales évoluant vers une ataxie sensorielle et des déficits fonctionnels (Grothey, 2003). Habituellement, la neurotoxicité sensible dose-limitante et cumulative de l'oxaliplatine touche entre 10 et 15% des patients après des doses cumulées d'oxaliplatine de 780 à 850 mg/m² (Grothey et al., 2002). Dans une publication récente, Park et al. (2011) ont montré que parmi les patients (n=108) adressés pour une évaluation neurologique lors de leur cure de chimiothérapies à base d'oxaliplatine, 29,2% des patients ont développés une neurotoxicité de grade 1, 41,6% de grade 2 et 29,2% de grade 3. Enfin, 79,2% des patients survivant (n=24) ont conservé des symptômes neuropathiques 29 mois après la dernière cure d'oxaliplatine, démontrant non seulement que la prévalence de cette neuropathie chronique est largement sous-évaluée dans la pratique courante, mais également que cette neuropathie est peu ou pas réversible. Aussi, en situation adjuvante chez des patients âgés (≥ 75 ans) atteints de cancer du côlon de stade III, le taux d'événements indésirables tardifs était significativement plus élevé pour les chimiothérapies à base d'oxaliplatine comparés aux chimiothérapies sans oxaliplatine (Kahn et al., 2010). Ce taux plus élevé d'événements indésirables tardifs était étroitement associé à l'oxaliplatine et aux symptômes neuropathiques (Kahn et al., 2010). Il est important de noter que les symptômes neuropathiques aigus, notamment **l'hyperalgésie thermique**, sont des marqueurs cliniques précoces de la neurotoxicité de l'oxaliplatine puisque l'intensité de ces symptômes est corrélée positivement à la fréquence et la sévérité de la neuropathie chronique (Attal et al., 2009).

Dans les travaux récents de Attal et al. (2009), la neuropathie induite par l'oxaliplatine est décrite, au niveau des membres supérieurs, par une élévation significative du seuil de douleur déclenchée par le froid de $7,54^{\circ}\text{C} \pm 0,72^{\circ}\text{C}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; seuil de base avant traitement) à $12,61^{\circ}\text{C} \pm 1,19^{\circ}\text{C}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; 15 jours après la 3^{ème} cure d'oxaliplatine) et $15,45^{\circ}\text{C} \pm 1,34^{\circ}\text{C}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; 15 jours après la 6^{ème} cure d'oxaliplatine) ; une diminution significative du seuil de douleur déclenchée par le chaud de $43,99^{\circ}\text{C} \pm 0,65^{\circ}\text{C}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; seuil de base avant traitement) à $42,43^{\circ}\text{C} \pm 0,61^{\circ}\text{C}$ (15 jours après la 3^{ème} cure d'oxaliplatine) et $42,53^{\circ}\text{C} \pm 3,09^{\circ}\text{C}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; 15 jours après la 6^{ème} cure d'oxaliplatine) ; une élévation significative du seuil de détection des vibrations de $1,49 \text{ Hz} \pm 0,14 \text{ Hz}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; seuil de base avant traitement) à $1,88 \text{ Hz} \pm 1,15 \text{ Hz}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; 15 jours après la 3^{ème} cure d'oxaliplatine) et $2,10 \text{ Hz} \pm 0,24 \text{ Hz}$ (moyenne \pm esm ; n = 28 ; 15 jours après la 6^{ème} cure d'oxaliplatine) (Attal et al., 2009).

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique et reconnu efficace pour palier à ces neuropathies iatrogènes. Les douleurs neuropathiques sont souvent décrites comme difficiles à traiter et résistantes aux opiacés. Le traitement de ces syndromes douloureux repose sur l'utilisation empirique d'antidépresseurs et d'anticonvulsivants qui ne permettent qu'un soulagement partiel des troubles nociceptifs (Saif and Reardon, 2005). Les neuropathies induites par les sels de platine n'affectent pas seulement la qualité de vie des patients mais également leurs chances de survies puisque des pauses thérapeutiques, des réductions de doses ou l'arrêt du traitement sont parfois nécessaires (Oldenburg and Fossa, 2009). Dans ce contexte, il existe une réelle nécessité d'innovation thérapeutique pour la prise en charge des douleurs neuropathiques induites par les sels de platine.

- **Dernier état des connaissances sur l'expérimentation pré-clinique**

Les polyamines (spermine, spermidine et putrescine) sont des petites molécules chargées positivement (Figure 24) et interagissant avec des polyanions tels que l'ADN ou l'ARN. Elle peuvent ainsi moduler les mécanismes de prolifération cellulaire, d'apoptose et de synthèse protéique (Moinard et al., 2005). La principale source de polyamines pour l'organisme provient de l'alimentation et de l'absorption des métabolites bactériens de la flore intestinale (Sawada et al., 1994). Une source endogène de polyamines est également assurée par la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase.

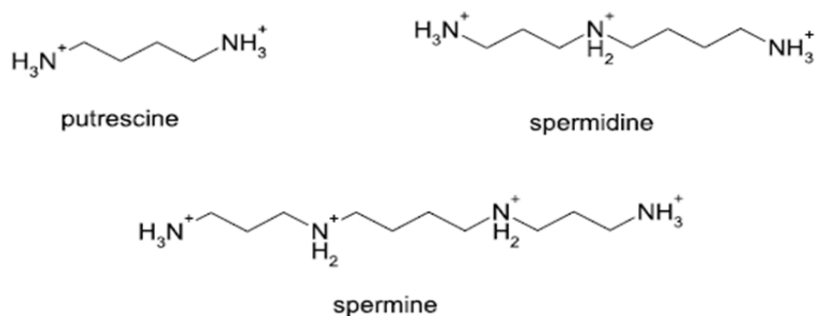


Figure 24 : Structure chimique des principales polyamines.

Les polyamines sont des modulateurs positifs des récepteurs NMDA (Ransom and Stec, 1988). Les récepteurs NMDA sont des récepteurs membranaires exprimés dans les voies nociceptives, de la périphérie au cerveau. La plasticité neuronale induite par l'activation de ces récepteurs serait responsable de l'apparition des douleurs neuropathiques (Latremoliere and Woolf,

2009). Plus spécifiquement, l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA provoque un effet anti-allodynique et anti-hyperalgique sur les modèles animaux de neuropathie par ligature du nerf sciatique (Yamamoto and Yaksh, 1992) et par ligature du nerf spinal (Chaplan et al., 1997). Cependant, l'utilisation clinique d'antagonistes des récepteurs NMDA demeure limitée par l'apparition d'effets indésirables importants d'ordre cognitif, comme une amnésie partielle, des effets psychotomimétiques et une ataxie (Parsons, 2001).

La spermine potentialise le courant NMDA en présence de concentrations saturantes en glycine (stimulation glycine-indépendante), impliquant une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal et une diminution de la désensibilisation du récepteur NMDA (Reynolds and Rothermund, 1995). La stimulation du récepteur NMDA par la spermine dépend du type de variant d'épissage de la sous-unité NR1 et du type de sous-unité NR2. Cette stimulation n'est observée que pour les récepteurs hétérodimériques recombinants NR1A/NR2B (Durand et al., 1993) et serait due à une diminution de l'inhibition tonique exercée par les protons. Un deuxième effet de la spermine sur les récepteurs NMDA implique une augmentation de l'affinité de la glycine pour son site de fixation (Reynolds et Rothermund, 1995). Cette stimulation glycine-dépendante est observée pour les récepteurs contenant les sous-unités NR2B ou NR2A et non pour ceux contenant les sous-unités NR2C ou NR2D. En revanche, cette stimulation ne dépend pas du type de variant de la sous-unité NR1 (Mony et al., 2009). Cependant la spermine extracellulaire peut également induire un blocage partiel des récepteurs NMDA probablement dû à la pénétration de la spermine dans le canal (Benveniste and Mayer, 1993). La spermine peut également interagir directement avec des résidus chargés négativement situés à proximité du canal et faire obstacle au courant ionique (Rock et MacDonald, 1992). Toutefois, ce blocage voltage-dépendant de la spermine est négligeable en conditions physiologiques, car il s'opère beaucoup plus lentement que le blocage induit par les ions Mg^{2+} (Williams, 1997).

Ainsi, en **modulant positivement les sous-unités NR1A/NR2B des récepteurs NMDA, les polyamines faciliteraient la sensibilisation douloureuse**. En 1996, Kergozien et al. (1996) ont montré qu'une déplétion en polyamines provoquait un effet antalgique chez le rat (Kergozien et al., 1996). Il a également été démontré qu'un régime alimentaire sans polyamines pendant 7 jours prévenait la phosphorylation des résidus tyrosines de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA induite par une inflammation chez le rat (Rivat et al., 2008). Ce régime a également permis de diminuer l'hypersensibilité douloureuse sur les modèles animaux de mono-arthrite (injection tibio-tarsiale d'adjuvant de Freund) et de mononeuropathie périphérique (ligature lâche du nerf sciatique) (Rivat et al., 2008).

Plus récemment au sein de l'Unité INSERM 766 (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand), l'impact préventif d'un régime alimentaire sans polyamines a été évalué chez le rat atteint de neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine, (travaux en cours de publication). Dans ce modèle animal, une administration d'oxaliplatine (6 mg/kg, ip) entraîne, dans les 24 à 48 heures après l'injection, l'apparition d'une hyperalgie (4°C) et d'une allodynie (10°C) thermique au froid évalué grâce au test d'immersion de la queue ainsi qu'une allodynie mécanique évaluée quant à elle par le test des filaments de von Frey (Ling et al., 2007b). Ces troubles neuropathiques sont semblables aux symptômes retrouvés chez les patients traités par oxaliplatine (Attal et al., 2009).

Dans ce modèle animal de neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine, un régime alimentaire sans polyamines a permis de prévenir l'apparition des troubles nociceptifs neuropathiques. L'hypersensibilité thermique décrite par Ling et al. (2007b) a également été retrouvée pour le groupe d'animaux traités par oxaliplatine et soumis à une alimentation normale (contenant des polyamines) sur le test de préférence de place thermique (12°C vs 25°C et 19°C vs 25°C). Les animaux traités par oxaliplatine et soumis à une alimentation normale contenant des polyamines passent significativement moins de temps sur la plaque froide (12°C ou 19°C) par rapport à la plaque de référence (25°C) et cela en comparaison au groupe d'animaux contrôles (non traités par oxaliplatine) recevant une alimentation normale contenant des polyamines (Figure 25 et 26). A l'inverse, les rats traités par oxaliplatine et soumis à une alimentation sans polyamines passent en moyenne autant de temps sur la plaque froide (12°C ou 19°C) que les animaux contrôles (non traités par oxaliplatine) soumis à un régime avec ou sans polyamines, ne montrant aucune hypersensibilité au froid.

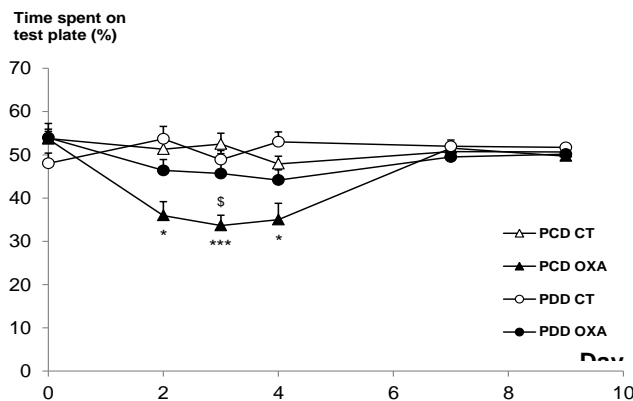


Figure 25 : Test de préférence de place thermique (19°C vs 25°C). Effets d'un régime alimentaire sans polyamines sur l'hypersensibilité thermique induite par l'oxaliplatine. Cette figure montre le pourcentage de temps passé, pendant 3 min, par l'animal sur la plaque test (19°C) comparé à la

plaque de référence (25°C) pour les animaux du groupe control recevant un régime contenant des polyamines (PCD CT ; Δ ; n=9) ; pour les animaux du groupe contrôle recevant un régime sans polyamines (PDD CT ; \circ ; n=8 à 10) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime contenant des polyamines (PCD OXA ; \blacktriangle ; n=9 à 12) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime sans polyamines (PDD OXA ; \bullet ; n=8 à 12). L'injection d'oxaliplatine a été réalisée à J0 après la mesure des seuils de sensibilité basale. Les résultats sont exprimés par la moyenne + esm (travaux en cours de publication). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$: PCD OXA vs PCD CT ; \$, $p < 0,05$: PCD OXA vs PDD OXA.

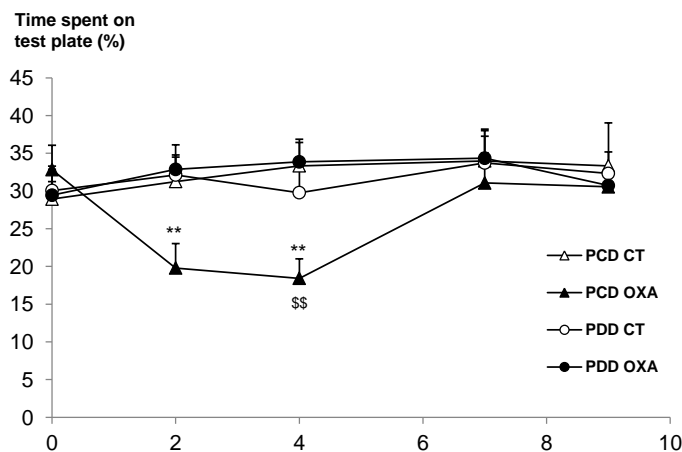


Figure 26 : Test de préférence de place thermique (12°C vs 25°C). Effets d'un régime alimentaire sans polyamines sur l'hypersensibilité thermique induite par l'oxaliplatine. Cette figure montre le pourcentage de temps passé, pendant 3 min, par l'animal sur la plaque test (12°C) comparé à la plaque de référence (25°C) pour les animaux du groupe contrôle recevant un régime contenant des polyamines (PCD CT ; Δ ; n=6 à 9) ; pour les animaux du groupe contrôle recevant un régime sans polyamines (PDD CT ; \circ ; n=5 à 9) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime contenant des polyamines (PCD OXA ; \blacktriangle ; n=6 à 10) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime sans polyamines (PDD OXA ; \bullet ; n=7 à 9). L'injection d'oxaliplatine a été réalisée à J0 après la mesure des seuils de sensibilité basale. Les résultats sont exprimés par la moyenne + esm. **, $p < 0,01$: PCD OXA vs PCD CT ; \$\$, $p < 0,01$: PCD OXA vs PDD OXA.

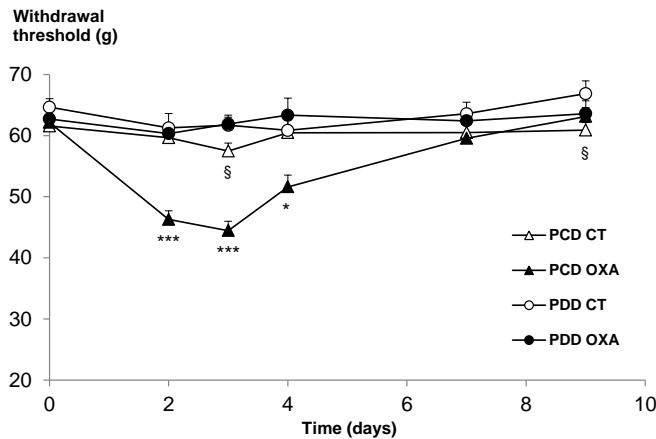


Figure 27 : Test du von Frey électronique. Effets d'un régime alimentaire sans polyamines sur l'hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine. Cette figure montre le seuil de retrait (g) de la patte postérieure de l'animal soumis au stimulus pour les animaux du groupe contrôle recevant un régime contenant des polyamines (PCD CT ; Δ ; n=8 à 12) ; pour les animaux du groupe contrôle recevant un régime sans polyamines (PDD CT ; O ; n=8 à 12) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime contenant des polyamines (PCD OXA ; \blacktriangle ; n=8 à 12) ; pour les animaux du groupe traité par oxaliplatine (6 mg/kg, ip) recevant un régime sans polyamines (PDD OXA ; \bullet ; n=8 à 12). L'injection d'oxaliplatine a été réalisée à J0 après la mesure des seuils de sensibilité basale. Les résultats sont exprimés par la moyenne + esm. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$: PCD OXA vs PCD CT ; §, $p < 0,05$: PCD CT vs PDD CT

L'hypersensibilité mécanique décrite par Ling et al. (2007b) a été retrouvée pour le groupe d'animaux traités par oxaliplatine et soumis à une alimentation normale (contenant des polyamines) sur le test du von Frey électronique (Figure 27). A l'inverse, chez les rats traités par oxaliplatine recevant une alimentation sans polyamines, aucune variation de l'hypersensibilité mécanique n'a pu être mise en évidence. La déplétion exogène en polyamines permet donc de supprimer l'allodynie/hyperalgie mécanique induite par l'oxaliplatine.

Ainsi, ces études récentes (en cours de publication) ont permis de mettre en évidence un effet préventif d'un régime alimentaire sans polyamines sur les troubles nociceptifs thermiques et mécaniques de la neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine. Ainsi la mise en application directe de ces travaux précliniques est tout à fait réalisable puisqu'une alimentation appauvrie en polyamines peut être réalisée en associant des boîtes de nutrition orale dépourvues de polyamines (Castase[®], Laboratoire Nutrialys) à un régime alimentaire à base d'aliments à faible teneur en

polyamines (Cipolla et al., 2007). Par la suite, l'impact préventif de ce régime alimentaire appauvri en polyamines pourra être aisément évalué à partir du descriptif de la symptomatologie de la neuropathie induite par l'oxaliplatine réalisé par Attal et ses collaborateurs (2009).

- **Résumé des bénéfices et des risques prévisibles et connus pour les personnes se prêtant à la recherche**

Les bénéfices attendus pour le patient sont une réduction des symptômes neuropathiques (dysesthésies et paresthésies) voire par extension, une amélioration de leur qualité de vie. Quant aux risques ils sont quasiment nuls. Le régime alimentaire appauvri en polyamines est déjà disponible sur le marché (Castase[®]). Cependant comme tous produits de nutrition orale, un inconfort digestif peut éventuellement être observé (diarrhée, douleurs abdominales...). Ces potentiels événements indésirables de la nutrition orale feront l'objet d'un suivi pendant l'étude. Le principal inconvénient pour les patients participants à cette étude est l'obligation de respecter les régimes alimentaires définis pendant toute la durée du protocole.

IV.2. Synopsis de l'étude

TITRE	Prévention des douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine par un régime alimentaire spécifique (NEUROXAPOL)
PROMOTEUR	CHU de Clermont-Ferrand
INVESTIGATEURS – CENTRES	Pr Denis Pezet - Service de Chirurgie Digestive, Unité d'Oncologie Digestive - CHU de Clermont-Ferrand
OBJECTIFS	<p>Objectif principal</p> <p>L'objectif principal de l'étude est une diminution de 5°C du seuil de douleur déclenchée par le froid deux semaines après la 3^{ème} cure de chimiothérapie à base d'oxaliplatine (Attal et al., 2009) chez le groupe de patients recevant un régime appauvri en polyamines par rapport au groupe de patients contrôle recevant un régime à teneur moyenne en polyamines.</p> <p>Objectifs secondaires</p> <p>Parmi les autres objectifs fixés, le protocole pourrait mettre en évidence, dans le groupe de patients recevant un régime appauvri en polyamines par rapport au groupe de patients contrôle recevant un régime à teneur moyenne en polyamines, une différence significative pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> Le seuil de douleur déclenchée par le froid (Attal et al., 2009) Le seuil de douleur déclenchée par le chaud (Attal et al., 2009) Le seuil de sensibilité aux vibrations (Attal et al., 2009) Le diagnostic de neuropathie par le questionnaire DN4 (Bouhassira et al., 2005) L'évaluation des douleurs neuropathiques par le questionnaire NPSI (Bouhassira et al., 2004) L'intensité des symptômes de neuropathie sensitive (guide CTCAE v4, 2009) Les effets indésirables induits par la chimiothérapie FOLFOX (guide CTCAE v4, 2009) La qualité de vie des patients mesurée par le questionnaire QLQ-C30 v3 (EORTC) Le score d'anxiété et de dépression au questionnaire HAD La réponse tumorale selon les critères de RECIST (chimiothérapie néo-adjuvante ou palliative) La dose intensité d'oxaliplatine (chimiothérapie adjuvante) <p>L'ensemble de ces objectifs sera évalué durant la période de contrôle alimentaire (J-7 à J100) et à distance de la reprise de l'alimentation normale (J154). Ainsi l'effet du régime sans polyamines sera évalué pendant la période d'application et un éventuel effet rémanent sera mis en évidence (J154).</p>
CARACTERISTIQUES DE L'ESSAI	Etude interventionnelle prospective monocentrique contrôlée avec deux groupes parallèles randomisés en simple aveugle
NOMBRE DE PATIENTS	40 patients par groupe soit 80 patients au total

<p>CRITERES D'INCLUSION</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Patients atteints de cancer digestif, naïfs de chimiothérapie cytotoxique neurotoxique, devant recevoir une chimiothérapie par FOLFOX 4 (acide folinique + 5-FU + oxaliplatine) en situation adjuvante, néo-adjuvante ou palliative avec une durée prévisible de traitement de 8 cures soit 4 mois. 2) Patients ayant donné son consentement écrit, libre et éclairé 3) Patients affiliés à un régime de la sécurité sociale 4) Patients n'ayant pas participé à un autre essai thérapeutique dans les 15 jours précédents son inclusion (possibilité d'avoir participé et/ou de participer à un essai observationnel). 5) Contraception efficace pour les patients, homme ou femme, en âge de procréer. 6) Indice de performance OMS ≤ 2 7) Polynucléaires neutrophiles $> 2.10^9/L$ et/ou plaquettes $> 100.10^9/L$ avant le premier cycle de traitement
<p>CRITERES DE NON INCLUSION</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Patient ne pouvant pas recevoir de FOLFOX 4 quelle qu'en soit la raison 2) Patient < 18 ans 3) Patient en état de dénutrition (HAS, 2003) 4) Patient amputé de tout ou partie d'un membre supérieur 5) Patient diabétique 6) Patients atteints de neuropathies 7) Alimentation orale impossible 8) Actes douloureux programmés après l'inclusion (ex : chirurgie d'exérèse) 9) Pathologies neurologiques (ex : syndrome parkinsonien, accident vasculaire cérébral...) 10) Consommation d'alcool supérieure à 3 unités d'alcool (30 g) pour l'homme et supérieure à 2 unités d'alcool (20 g) pour la femme 11) Patients ayant déjà reçu une chimiothérapie cytotoxique neurotoxique (taxanes, sels de platine ou alcaloïdes de la pervenche) 12) Patients traités pour un autre cancer dans les 5 ans, à l'exception du carcinome cutané baso-cellulaire ou d'un cancer <i>in situ</i> du col de l'utérus 13) Toute affection évolutive non équilibrée (insuffisance hépatique, insuffisance rénale (clairance de la créatinine < 30 mL/min), insuffisance respiratoire, insuffisance cardiaque congestive, infarctus du myocarde au cours des 6 derniers mois...) 14) Patients nécessitant des perfusions de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} 15) Hypersensibilité ou allergie connue à l'un des composants des produits à l'étude 16) Femme enceinte ou en cours d'allaitement 17) Incapacité légale (personne privée de liberté ou sous tutelle) 18) Patients qui pour des raisons psychologiques, sociales, familiales ou géographiques, ne pourront pas être suivis régulièrement et/ou être compliants aux exigences de l'étude 19) Patients déjà inclus dans un autre essai thérapeutique

<p>TRAITEMENTS</p>	<p>Le régime appauvri correspond à l'association d'un produit de nutrition clinique sans polyamines Castase® (Nutrialys) à des menus alimentaires à faible teneur en polyamines.</p> <p>Lors de l'initiation de l'étude et pour la 1^{ère} cure de chimiothérapie, les patients inclus dans le groupe à l'essai recevront une alimentation comprenant 4 boîtes par jour de Castase® pendant 7 jours avant la première cure de chimiothérapie (J-7 à J0 inclus). Ensuite, les patients recevront une alimentation comprenant 3 boîtes par jour de Castase® pendant 2 jours (de J1 inclus à J2 inclus), puis 2 boîtes par jour de Castase® pendant 10 jours de (J3 inclus à J12 inclus) et enfin à nouveau 3 boîtes de Castase® par jour pendant 2 jours (de J13 inclus à J14 inclus). Pour les cures suivantes de chimiothérapie (J14), les patients recevront une alimentation comprenant 3 boîtes par jour de Castase® pendant 2 jours suivant la cure de chimiothérapie, puis 2 boîtes par jour de Castase® pendant 10 jours et enfin à nouveau 3 boîtes de Castase® par jour pendant 2 jours (jusqu'à J100). A compter de J101, les patients cesseront la prise de boîte de Castase® et reviendront à une alimentation normale.</p> <p>Les patients du groupe contrôle recevront une alimentation comprenant une boîte de Castase® par jour associée à des menus alimentaires prédéfinis à teneur moyenne en polyamines</p>
<p>CRITERES D'EVALUATION</p>	<p>Critère de jugement principal</p> <p>Le critère d'évaluation principal sera le seuil de douleur, au niveau des membres supérieurs, déclenché par le froid, mesuré deux semaines après la 3^{ème} cure de chimiothérapie FOLFOX, chez le groupe de patients avec un régime appauvri en polyamines comparé au groupe contrôle.</p>
	<p>Critères d'évaluation secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mesure des seuils de douleur, au niveau des membres supérieurs, déclenchée par le froid ou le chaud (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies) - Mesure des seuils de détection, au niveau des membres supérieurs, du froid, du chaud et des vibrations (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies) - Diagnostic de neuropathie par le questionnaire DN4 (Bouhassira et al., 2005) - Evaluation des douleurs neuropathiques par le questionnaire NPSI (Bouhassira et al., 2004) - Evaluation des symptômes de neuropathie sensitive selon le guide de la CTCAE v4, 2009 - Evaluation de l'intensité des effets indésirables induits par la chimiothérapie FOLFOX selon le guide de la CTCAE v4, 2009 - Evaluation de la qualité de vie des patients par le questionnaire de qualité de vie QLQ-C30 v3 de l'EORTC - Evaluation des scores d'anxiété et de dépression par le questionnaire HAD - Réponse tumorale au traitement selon les critères RECIST 1.1 pour les patients recevant une chimiothérapie FOLFOX néo-adjuvante ou palliative - Mesure de la dose intensité d'oxaliplatine pour les patients recevant une chimiothérapie FOLFOX adjuvante

<p>CONSIDERATIONS STATISTIQUES</p>	<p>Analyse principale La comparaison du seuil de douleur déclenchée par le froid entre les groupes de randomisation sera faite au moyen d'un test de Student ou le cas échéant d'un test de Mann-Whitney. En cas d'ajustement sur certains facteurs, un modèle de régression linéaire sera élaboré. Les comparaisons entre groupes de traitement se feront systématiquement (1) sans ajustement (2) en ajustant sur d'autres facteurs dont la répartition pourrait être, malgré la randomisation, déséquilibrée entre groupes de traitement.</p> <p>Analyses secondaires L'analyse des critères de jugement secondaires (par exemple seuils de douleur déclenchée par le froid, le chaud, seuils de détection du froid, du chaud et des vibrations, diagnostic de neuropathie (DN4), douleurs et symptômes neuropathiques (NPSI et EORTC), score d'anxiété et de dépression (HAD), nature et intensité des effets indésirables chimio-induits, et qualité de vie des patients (QLQ-C30) se fera de façon identique à ce qui a été décrit précédemment pour le critère de jugement principal.</p> <p>Précisons que les comparaisons des critères qualitatifs (par exemple taux de réponse selon les critères RECIST, critères de jugement catégorisés), entre les groupes de randomisation, utiliseront le test du Chi2 ou de Fisher exact (si conditions de validité non respectées).</p> <p>Afin de mesurer l'évolution des différents paramètres recueillis au cours des différents temps de visite, nous mènerons une analyse longitudinale des données en deux temps :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Par ANOVA pour données répétées suivies d'un test post-hoc de Tukey-Kramer, - Par modèles mixtes (ou modèles à effets aléatoires) qui permettront de mesurer la corrélation intra-sujet en prenant en compte les effets sujet et temps (effets « random intercept » et « slope »). Une mesure des coefficients de corrélation intra-classe associés sera également réalisée. L'impact de covariables telles que le groupe de randomisation sera exploré afin d'évaluer l'impact des stratégies sur le score de qualité de vie. Enfin, l'adhésion au traitement sera analysée dans un premier temps sous un volet descriptif et si nécessaire intégrée dans l'analyse multivariée.
<p>DUREE DU TRAITEMENT (par patient)</p>	<p>107 jours : instauration du régime alimentaire 7 jours avant la 1^{ère} cure puis pendant 100 jours (jusqu'à 2 jours après la 8^{ème} cure)</p>
<p>CALENDRIER DE L'ETUDE</p>	<p>Durée de l'étude estimée à : 36 mois Date de début de l'étude (premier patient inclus) : Décembre 2012 Date de fin (fin de suivi du dernier patient inclus) : Juillet 2015</p>

Tableau récapitulatif des examens

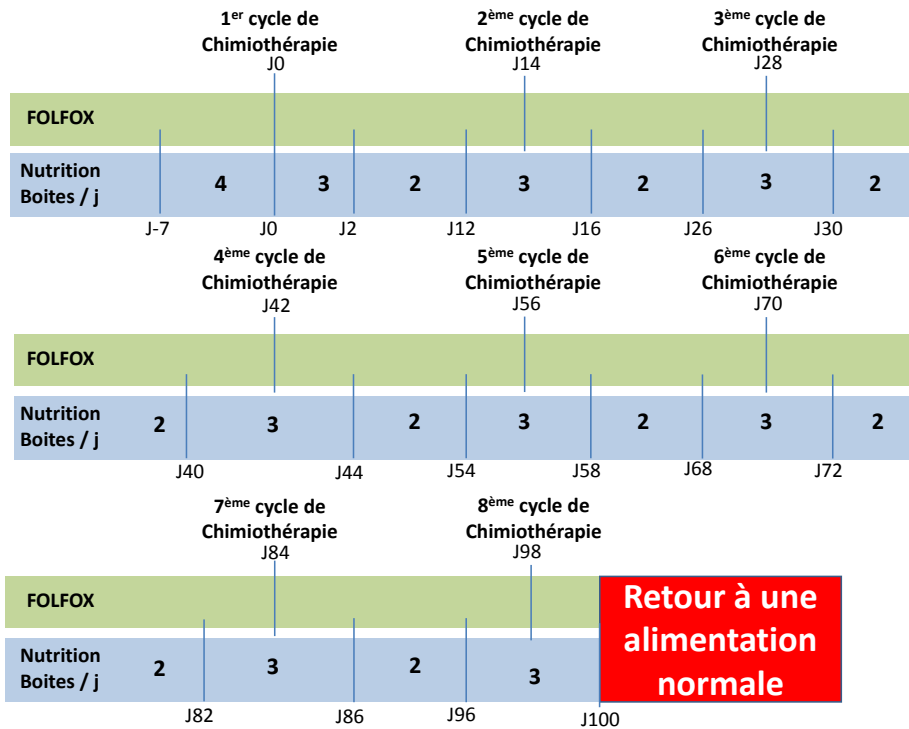
Visites	Bilan inclusion	Phase de traitement											
		Cycles 1 à 3			Cycle 4	Cycle 5	Cycle 6		Cycle 7	Cycle 8		Cycles 9 à 11	Cycle 12
Visites n° / Dates des visites	J-14	J-7 V1	J0 / V2 J14 / V4 J28 / V6	J2 / V3 J16 / V5 J30 / V7	J42 V8	J56	J70 V9	J72 V10	J86	J98 V11	J100 V12	J112 J126 J140	J154 V13
Critères d'inclusion / non inclusion (antécédents, traitements concomitants, histoire de la maladie...)	X												
Consentement éclairé signé	X												
Randomisation	X												
Examens Cliniques													
Taille, Poids, SC, ECOG	X		X		X		X			X			X
Examen clinique	X		X		X		X			X			X
Toxicité / tolérance / évènements indésirables (critères CTCAE)			X	X	X		X	X		X	X		X
Examens Paracliniques													
Scanner Thoraco-abdomino-pelvien	X (1)				X(2)					X(2)			X
ECG	X												
Bilans Biologiques													
NFS, Plaquettes	X		X*		X*	X*	X*		X*	X*		X*	X*
Ionogramme sanguin ; CRP	X		X*		X*	X*	X*		X*	X*		X*	X*
Bilan hépatique, rénal	X		X*		X*	X*	X*		X*	X*		X*	X*
Prélèvement centralisé : bilan lipidique	X		X		X		X			X			
Prélèvement centralisé : dosage polyamines intra-érythrocytaires		X	X		X		X			X			
Questionnaires + Autres													
Questionnaires DN4, NPSI et QLQ C30		X	X	X	X		X	X		X	X		X
Questionnaire HAD		X	X		X					X			X
Evaluation des seuils de détection (froid, chaud et vibrations), des seuils de douleur déclenchés par le froid et le chaud		X	X	X	X		X	X		X	X		X
Traitements													
Début du régime		X											
Fin du régime											X		
Début de chaque cycle de chimiothérapie (FOLFOX) à l'hôpital			X		X		X			X		X	X
Fin de chaque cycle de chimiothérapie à l'hôpital				X				X			X		

(1) : si précédent examen antérieur à plus de 4 semaines

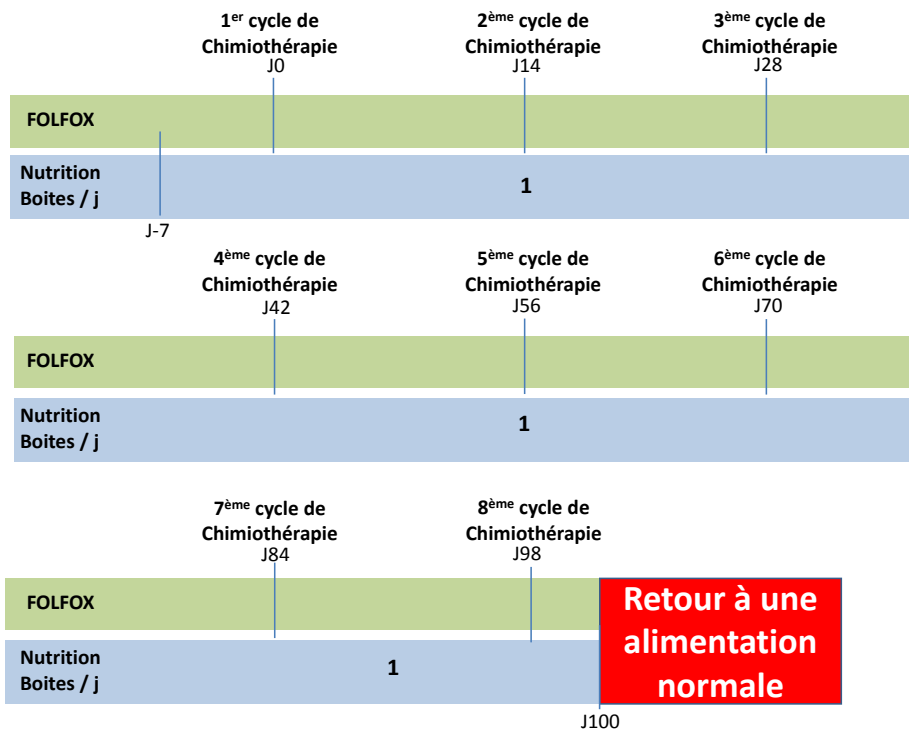
* : examens réalisés en routine la veille de chaque nouveau cycle de traitement

(2) applicable uniquement aux patients en situation néo-adjuvante ou au stade métastatique

Type d'alimentation en fonction de la période du cycle de chimiothérapie pour le groupe à l'essai et pour le groupe contrôle.



Groupe à l'essai avec un régime alimentaire appauvri en polyamines



Groupe contrôle avec un régime alimentaire à teneur moyenne en polyamines

Alimentation



Solutés Castase® (Nutrialys)

NUTRIALYS MEDICAL NUTRITION		Repas à faible teneur en polyamines associant les produits à faible teneur en polyamines au cours du protocole NEURAXOPOL					
Jour	Petit déjeuner	Déjeuner			Dîner		
		entrée	plat	dessert	entrée	plat	dessert
-7	Pain de mie froment grillé + beurre et miel + Boisson à faible teneur en polyamines Café	Salade avocat + mâche + assaisonnement huile d'olive et vinaigre balsamique	Boisson à faible teneur en polyamines Légumes	Boisson à faible teneur en polyamines Chocolat et gâteau petit beurre	Poireau vinaigrette	Quiche au thon (pâte feuilletée + œuf + crème + thon en conserve + oignon)	Gâteau breton avec une crème caramel à faible teneur en polyamines
-6	Thé vert ou de ceylan ou café + crème à faible teneur en polyamines Caramel	Soufflé au fromage + salade mâche + assaisonnement	Wok de saumon oignon gingembre sauce soja + purée de patate douce au citron	Boisson à faible teneur en polyamines vanille	Boisson à faible teneur en polyamines légumes	Crème à faible teneur en polyamines Caramel	Salade de fruits frais (kiwi + pomme + poire + ananas)
-5	Café + Boisson à faible teneur en polyamines Biscuit et pétales de maïs nature	Betterave rouge + assaisonnement (crème + vinaigre de vin)	Boisson à faible teneur en polyamines Vanille	Boisson à faible teneur en polyamines Fraise	Artichaud + vinaigrette	Chou braisé avec lardon et crème fraîche	Crème à faible teneur en polyamines Caramel
-4	Boisson à faible teneur en polyamines Chocolat + galette de riz blanc + beurre et confiture de fraise + Jus de pomme	Boisson à faible teneur en polyamines légumes + croustons et emmental	Boisson à faible teneur en polyamines Café	Poire avec un carré de chocolat	Salade de pâtes + thon + avocat + feta + oignon + olive noire + vinaigrette ou mayonnaise		Crème à faible teneur en polyamines Caramel
-3	Boisson à faible teneur en polyamines Vanille et compote de pêche	Salade carotte + céleri + raisins secs + feta	Boisson à faible teneur en polyamines Vanille	Crème caramel à faible teneur en polyamines	Soupe potiron poireaux	Assiette de fromage (brie, camembert, fromage de chèvre) et pain blanc grillé	Boisson à faible teneur en polyamines Biscuit
-2	Boisson à faible teneur en polyamines Café + biscotte froment + confiture à la fraise + jus de raisin	Salade de fenouil et pomme crus	Boisson à faible teneur en polyamines Légumes	Boisson à faible teneur en polyamines Chocolat	Croque monsieur (pain blanc ou pain de mie + beurre ou crème + emmental + jambon blanc ou poitrine de lard) et salade de mache + carotte + avocat		Crème à faible teneur en polyamines Caramel
-1	Thé vert ou de ceylan + Brioche grillée et miel + Boisson à faible teneur en polyamine Chocolat	Boisson à faible teneur en polyamines légumes + croustons et emmental	Crème caramel à faible teneur en polyamines	Salade de fruits (fraise + mangue + melon)	Boisson à faible teneur en polyamines légumes	Œuf au plat + lard et pain blanc grillé	Petit suisse et confiture de rhubarbe

Exemple de menu pour une alimentation pauvre en polyamines (<http://nutrialys.fr/>)

CHAPITRE 3 : MECANISMES
SUPRASPINAUX IMPLIQUES DANS LA
NEUROPATHIE CHRONIQUE INDUITE
PAR L'OXALIPLATINE

CHAPITRE 3 : MECANISMES SUPRASPINAUX IMPLIQUES DANS LA NEUROPATHIE INDUITE PAR L'OXALIPLATINE

I. Réponses cérébrales à la douleur

I.1. De la définition de la douleur

La nociception est définie comme l'activité neuronale afférente véhiculant l'information sensorielle initiée par des stimuli nocifs (Treede, 2006). Bien que la douleur soit souvent la conséquence de la nociception, elle peut être générée en l'absence de cette dernière. De la même manière, l'activation des nocicepteurs peut provoquer une réponse motrice réflexe voire une réponse autonome (élévation de la pression artérielle, etc.) sans nécessairement entraîner une perception consciente de la douleur.

La douleur a longtemps été considérée comme une sous-modalité du sens du toucher. Dans ses *Méditations Métaphysiques* (1641), René Descartes livre sa conception philosophique de la perception douloureuse, posant ainsi les bases neurophysiologiques des voies de transduction du message nociceptif (Figure 28) :



Fig. 5. — René Descartes, *L'Homme*, Paris, 1664 (p. 27).
Action des objets extérieurs sur les organes des sens, (action de la chaleur sur la main).

Figure 28 : Théorie cartésienne des processus algiques. « Et en même façon, quand je ressens de la douleur au pied, la physique m'apprend que ce sentiment se communique par le moyen des nerfs dispersés dans le pied, qui se trouvant étendus comme des cordes depuis là jusqu'au cerveau, lorsqu'ils sont tirés dans le pied, tirent aussi en même temps l'endroit du cerveau d'où ils viennent et auquel ils aboutissent, et y excitent un certain mouvement, que la nature a institué pour faire sentir de la douleur à l'esprit, comme si cette douleur était dans le pied. » (Descartes, 1992).

Ainsi, selon la conception dualiste cartésienne, la douleur d'un pied ou d'une main n'est ni ressentie dans le pied ni dans la main ; elle est ressentie dans le cerveau, là où convergent tous les filets nerveux de la périphérie. Descartes imaginait alors que la perception douloureuse prenait place dans la glande pinéale qu'il considérait comme « *le siège de l'âme* ». Bien que cette théorie soit très éloignée des connaissances neurophysiologiques actuelles, la métaphysique cartésienne établissait déjà une distinction entre nociception et douleur, et constitue l'une des premières tentatives de description des mécanismes intégrés de la perception douloureuse au niveau cérébral.

Dès le début du XX^{ème} siècle, le thalamus a été considéré comme le principal centre de la douleur. Head et Holmes (1911) ont en effet observé que des patients atteints de lésions cérébrales, et plus précisément localisées au niveau du cortex somatosensoriel primaire (S1) dans le lobe pariétal, étaient toujours capables de ressentir la douleur (Head and Holmes, 1911). Les auteurs ont alors conclu que le cortex cérébral jouait un rôle minime dans la perception douloureuse. Penfield et Boldrey (1937) sont également arrivés à la même conclusion, en observant que la stimulation électrique du cortex cérébral ne provoquait presque jamais de sensation douloureuse chez l'Homme (Penfield and Boldrey, 1937). Ces *a priori* étaient cependant uniquement basés sur des observations somato-sensorielles. Ce n'est que bien plus tard que le rôle prépondérant du cortex dans la représentation de la douleur a été mis en évidence (Treede et al., 1999).

Les données physiologiques et anatomiques ont montré que l'information nociceptive atteint de nombreuses structures corticales, ce qui reflète probablement la nature multidimensionnelle de la douleur. La douleur est définie par l'IASP¹² comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage » (Merskey, 1986). Elle possède donc une composante somesthésique mais également émotionnelle, cognitive et comportementale. Il est ainsi logique que le substratum anatomique de la représentation de l'expérience douloureuse au niveau cérébral corresponde à l'activation coordonnée de plusieurs structures discrètes aux fonctions bien distinctes (Melzack and Casey, 1968). La composante sensori-discriminative de la douleur a été attribuée au système latéral, qui projette via des noyaux thalamiques latéraux spécifiques (complexe ventro-postéro-latéral) sur les cortex sensitifs. A l'inverse, la composante motivo-affective de la douleur est associée au système médian, dénommé ainsi d'après ses projections sur les noyaux médians du thalamus (Basbaum et al., 2009). Ce système médian comprend également une partie du cortex cérébral. En conséquence, la participation du cortex dans la perception de la douleur n'est plus à remettre en cause. En

¹² IASP : *International Association for the Study of Pain*

revanche, les fonctions de ces aires corticales ainsi que leur contribution précise à l'expérience douloureuse restent encore à être déterminées.

I.2. Concept de matrice de la douleur

Avec l'émergence des techniques d'imagerie fonctionnelles non invasives, de nombreuses études ont cherché à déterminer les bases neurales de la perception douloureuse au niveau cérébral. Il a ainsi été montré que des stimuli nociceptifs élicitent l'activation d'un vaste réseau de structures corticales de manière plus ou moins constante selon les modalités (Apkarian et al., 2005, Craig et al., 2000, Peyron et al., 2000, Price, 2000, Tracey et al., 2000). Cet ensemble de structures cérébrales est appelé matrice de la douleur (« *Pain matrix* ») et comprend notamment les cortex somatosensoriels primaire (SI) et secondaire (SII), l'insula, le cortex préfrontal et le cortex cingulaire antérieur. Les cortex sensitifs SI et SII ainsi que la partie postérieure de l'insula sont associés au système latéral impliqué dans la composante sensori-discriminative de la douleur (discrimination de la localisation, la nature et l'intensité de la stimulation nociceptive) (Bushnell et al., 1999, Craig et al., 2000, Kanda et al., 2000, Peyron et al., 2002), alors que le cortex cingulaire antérieur, le cortex préfrontal et la partie antérieure de l'insula sont davantage dévolus à la composante affectivo-émotionnelle de la douleur, et sont donc associés au système médian (Craig, 2003a, Vogt et al., 2003). Une représentation schématique des structures cérébrales potentiellement impliquées dans la représentation cérébrale de la douleur est présentée sur la Figure 29.

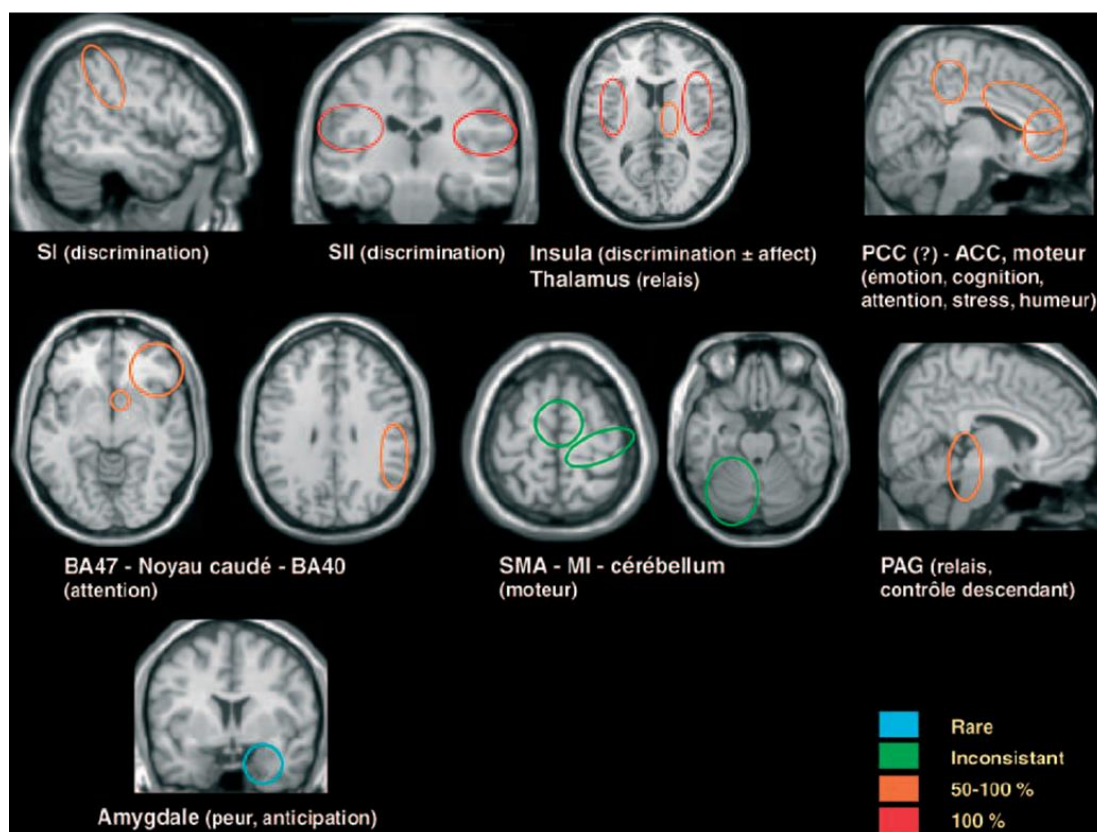


Figure 29 : Réponses cérébrales à la douleur chez le volontaire sain (Peyron, 2007).

Ce réseau de structures cérébrales a été dénommé matrice de la douleur en référence au concept de Neuromatrice (« *Neuromatrix* ») proposé par Ronald Melzack en 1989 afin d'expliquer les douleurs du membre fantôme¹³, *a priori* sans substratum anatomique (Melzack, 1989). A l'origine, le concept de neuromatrice a été avancé afin d'expliquer l'absence de structures corticales spatialement distinctes et spécifiquement dévolues à la perception de la douleur (Iannetti and Mouraux, 2010). La neuromatrice était considérée comme un vaste ensemble de neurones intégrant différentes sortes de stimuli (à la fois nociceptifs et non nociceptifs) suivant un paradigme Hebbien. En ce sens, elle n'était pas spécifique de la douleur. Plus tard, le terme de *matrice de la douleur* a été introduit (Ingvar, 1999), sous-tendant l'idée que les réponses cérébrales observées suite à une stimulation nociceptive constituent une représentation (Treede et al., 1999) voire une signature (Tracey and Mantyh, 2007) des processus neuronaux impliqués dans la perception de la douleur. Le concept de matrice de la douleur dévie donc fondamentalement du concept de neuromatrice et sa définition initiale. Son existence ainsi que sa spécificité vis-à-vis de l'expérience douloureuse sont l'objet de nombreuses controverses et demeurent encore très largement débattues dans la littérature (Garcia-Larrea, 2012, Iannetti and Mouraux, 2010). En effet, les stimuli sensoriels, visuels et

¹³ En cas d'amputation d'un membre, des douleurs peuvent survenir et être ressenties comme provenant du membre amputé. Melzack proposait alors qu'un conflit entre la rétroaction visuelle et les représentations proprioceptives soit à l'origine d'une activité anormale dans un réseau de structures cérébrales (neuromatrice), provoquant ainsi une douleur en l'absence de stimulus somatique initiateur.

auditifs pourraient partager un schéma d'activation cérébral commun avec la douleur (Mouraux et al., 2011, Mouraux and Iannetti, 2009), relatif à la « saillance »¹⁴ des stimuli (Legrain et al., 2011).

I.3. Le cortex operculo-insulaire : un cortex primaire de la douleur ?

I.3.1. Rappels anatomiques

- L'aire somatosensorielle secondaire

Le concept de cortex somatosensoriel secondaire (SII) localisé en position ventrale par rapport au cortex somatosensoriel primaire (SI) a été introduit il y a plus de 70 ans par Adrian suite à la description d'une seconde représentation corticale de la patte postérieure chez le chat (Adrian, 1940). Une aire corticale similaire a ensuite été décrite chez (virtuellement) tous les mammifères, y compris les primates non humains (Burton, 1986). Chez les primates anthropoïdes, la région SII est localisée au niveau de la berge supérieure du sillon Sylvien, dans l'opercule pariétal. Des études électrophysiologiques et histologiques ont permis de démontrer que la région SII peut être subdivisée en plusieurs parties (Burton et al., 1995, Cusick et al., 1989, Krubitzer et al., 1995, Slutsky et al., 2000). Jusqu'à présent, la nomenclature la plus couramment employée (Kaas and Collins, 2003) permet de décrire 3 aires corticales bien distinctes (Figure 30): l'aire adjacente à la partie ventrale de SI est l'aire pariétale ventrale (PV). L'aire PV est suivie de l'aire SII dans sa partie caudale, qu'il convient alors de différencier du terme « région SII » englobant la totalité de ces aires corticales. Les aires SII et PV contiennent chacune une représentation somatotopique complète du corps, organisées en miroir l'une de l'autre. Une troisième sous-région de SII située dans les profondeurs du sillon Sylvien, en position médiane des aires SII et PV, est appelée aire ventrale somatosensorielle (VS). L'aire VS contient une représentation somatotopique grossière du corps, où la tête est représentée du côté rostral (Burton et al., 1995, Krubitzer et al., 1995). De plus, il a été démontré que le sillon latéral des primates contenait également d'autres aires, dont notamment l'aire rétro-insulaire en arrière de l'insula et l'aire 7b en arrière de SII (Robinson and Burton, 1980b, Robinson and Burton, 1980a).

¹⁴ De l'anglais *saliency*, défini communément comme la capacité d'un stimulus à se démarquer du bruit de fond. La saillance d'un stimulus n'est pas définie par une dimension physique particulière mais par l'intensité du contraste de ce dernier avec son environnement.

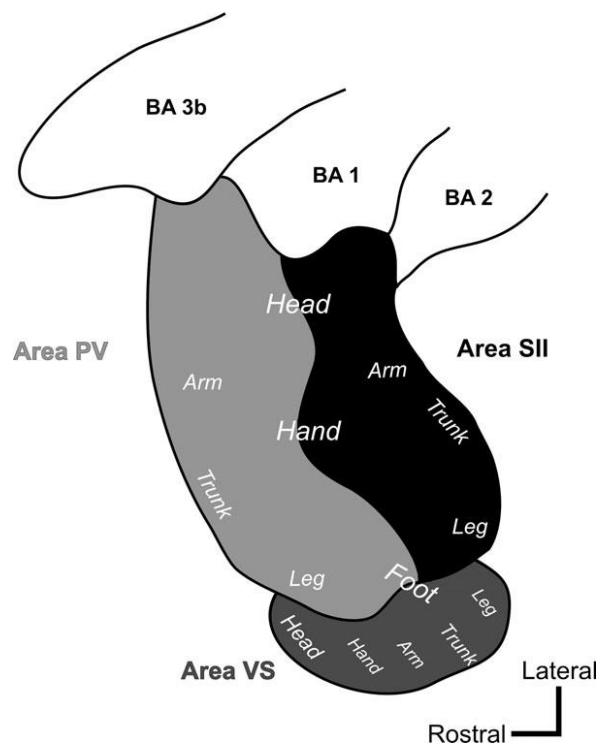


Figure 30 : Organisation somatotopique des aires SII et PV chez le primate (Eickhoff et al., 2007).

Chez l'Homme, l'équipe de Penfield fut la première à décrire l'existence d'une région SII grâce à des stimulations électriques directes de l'opercule pariétal (Penfield and Jasper, 1954). Cependant, la description qu'ils en ont faite est longtemps restée limitée due à la technique utilisée ainsi qu'à l'accessibilité difficile de cette aire dans les profondeurs du sillon Sylvien. Les cartographies classiques de Brodmann (1909), Vogt et Vogt (1919) et von Economo et Koskinas (1925), toutes basées sur des études histologiques, diffèrent grandement l'une de l'autre dans leur nomenclature ainsi que dans le nombre et la localisation des aires qui pourraient correspondre à SII (Figure 31).

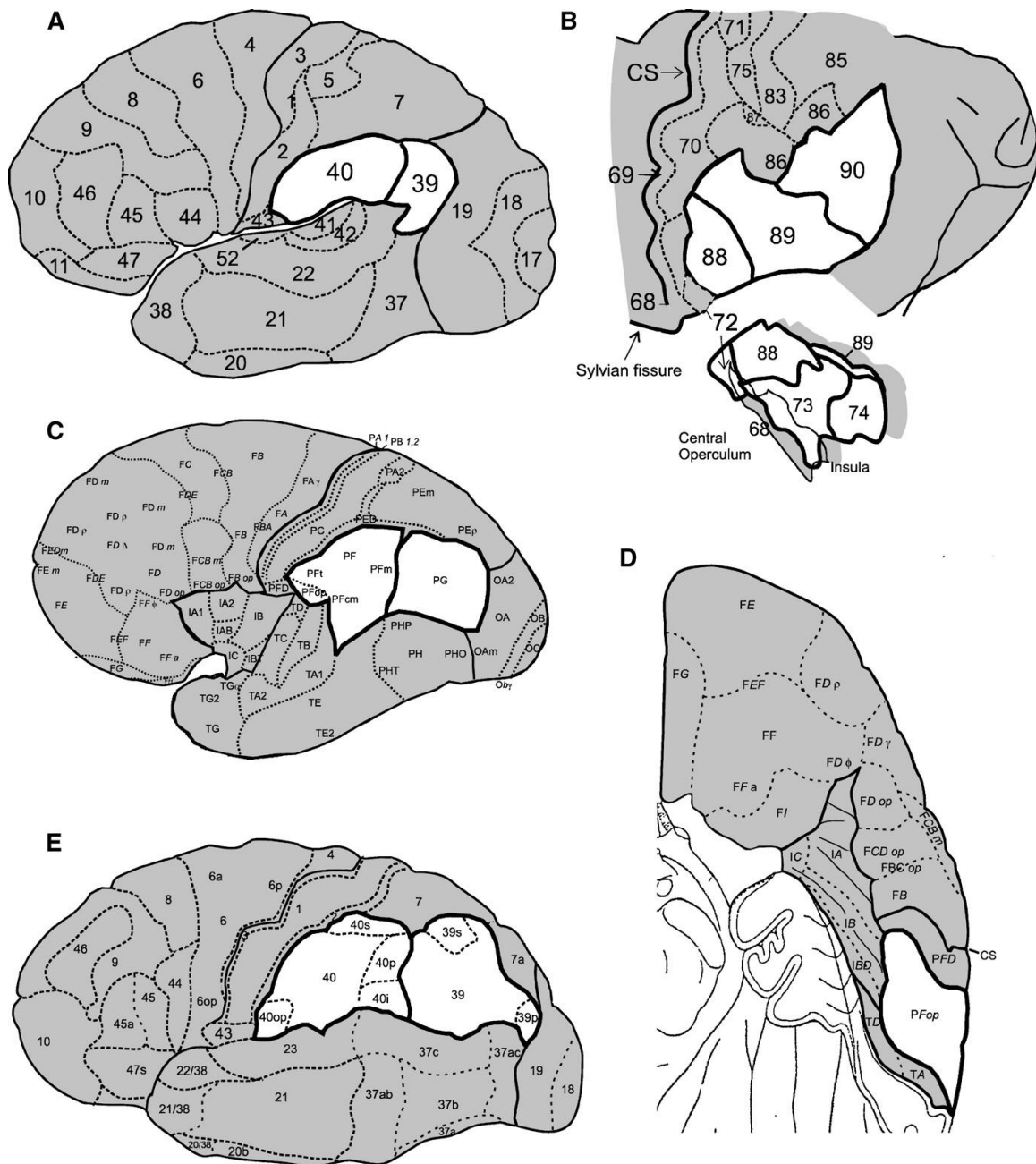


Figure 31 : Cartes cytoarchitectoniques adaptées de (A) Brodmann (1909), (B) Vogt et Vogt (1919) et (C) Sarkissov (1949). Cartes de von Economo et Koskinas (1925) en vue latérale (D) ou ventrale de l'opercule pariétal (E). La ligne en gras délimite la région supposée contenir SII (Eickhoff et al., 2006b).

Une étude cytoarchitectonique récente basée sur l'analyse histologique de cerveaux humains *post mortem* a permis de définir 4 aires distinctes dans l'opercule pariétal : OP 1 à OP 4 (Eickhoff et al., 2006a, Eickhoff et al., 2006b). D'un point de vue topographique, l'aire OP 4 semble correspondre à l'aire PV déterminée chez les primates anthropoïdes car celle-ci est localisée de manière superficielle dans le sillon Sylvien, proche du sillon central et adjacente à SI. L'aire OP 1,

localisée de manière caudale par rapport à OP 4, est située à côté du cortex pariétal inférieur, ce qui suggère qu'elle correspond à l'aire SII. Enfin, l'aire OP 3 est une bonne candidate pour être l'analogue humanoïde de l'aire VS. En revanche, l'aire OP 2 ne semble pas faire partie de la région SII et serait vraisemblablement la région analogue au cortex vestibulaire pariéto-insulaire (Eickhoff et al., 2006c) (Figure 32). Sur les 20 hémisphères analysés dans cette étude, les auteurs ont observé que les aires OP 2 et OP 3 s'étendent partiellement sur le lobe insulaire et peuvent recouvrir au maximum son tiers supérieur. Grâce à l'imagerie fonctionnelle, la correspondance entre cette subdivision et celle établie chez le singe a pu être confirmée (Disbrow et al., 2000, Eickhoff et al., 2007).

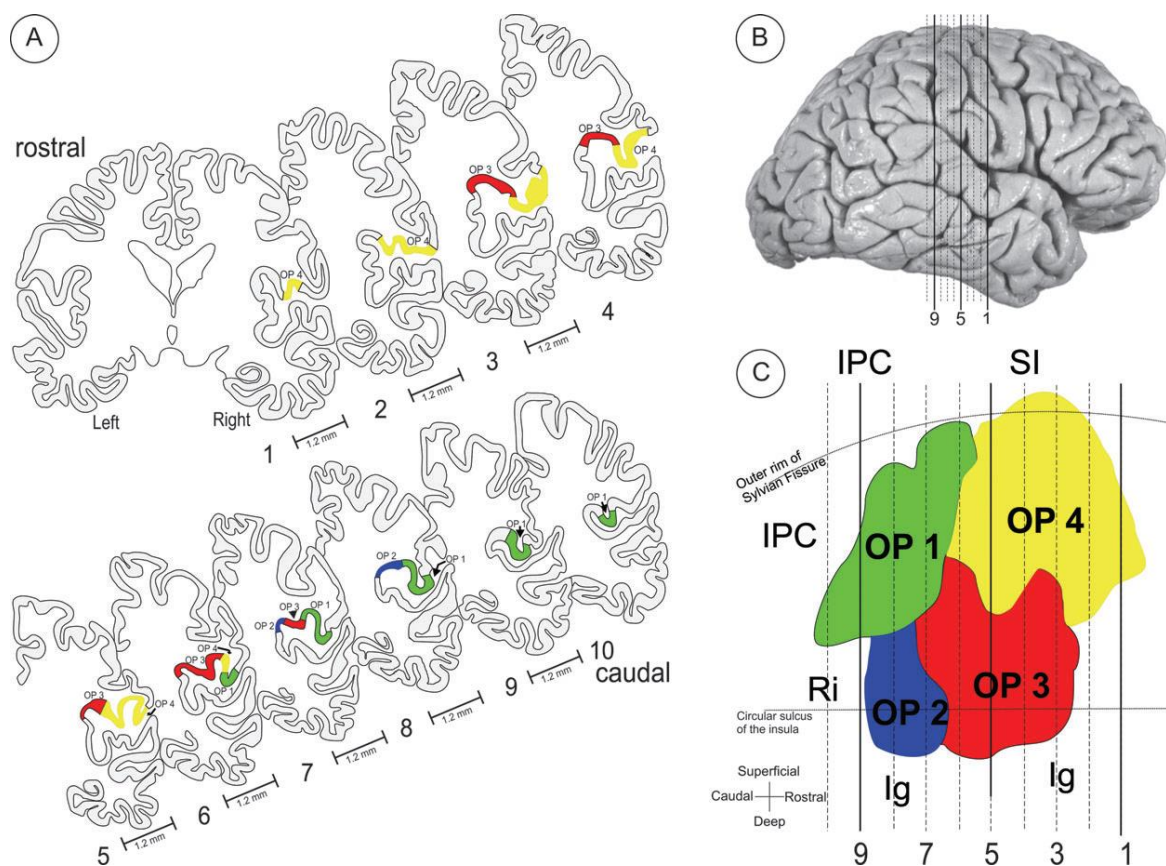


Figure 32 : Localisation des aires OP1 à OP4 dans l'hémisphère droit. Les chiffres sous les coupes coronales en (A) correspondent aux plans de coupes figurés en (B) par des lignes verticales. (C) est une représentation plane de OP1 à OP4 (Eickhoff et al., 2006b).

- L'insula

Décrite pour la première fois par Johann Christian Reil en 1809, l'insula (ou île de Reil) constitue le 5^{ème} lobe du cerveau humain (Nieuwenhuys, 2012). Elle est complètement recouverte par les structures corticales adjacentes : l'opercule frontal, pariétal et temporal. Dans la littérature, l'insula est décrite sous la forme d'un trapèze démarqué par quatre sillons péri-insulaires : inférieur, supérieur, antérieur et postérieur (Afif and Mertens, 2010). Ces sillons forment un sillon semi-circulaire autour de l'insula, avec une seule disjonction à sa base qui forme le *limen insulae*. Classiquement, le sillon central insulaire divise l'insula en partie antérieure et postérieure. L'insula antérieure comporte 3 gyri courts : antérieur, médian et pré-central. La partie postérieure contient 2 gyri longs : post-central et postérieur (Figure 33).

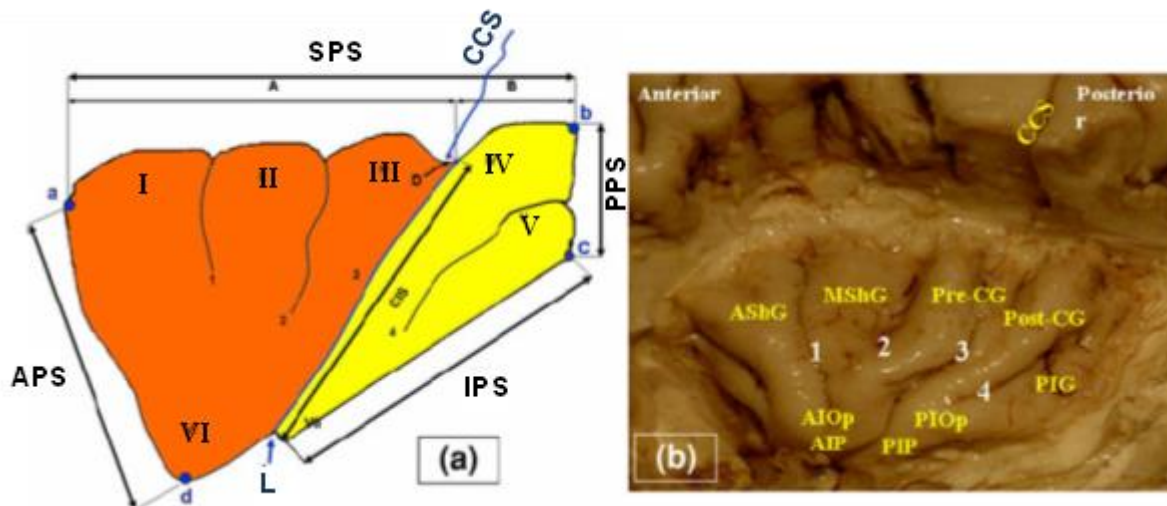


Figure 33 : Représentation schématique (gauche) et photographique (droite) d'une insula gauche, incluant sillons et gyri (Afif and Mertens, 2010). SPS = sillon péri-insulaire supérieur, APS = sillon péri-insulaire antérieur, IPS = sillon péri-insulaire inférieur, PPS = sillon péri-insulaire postérieur. I = gyrus court antérieur, II = gyrus court moyen, III = gyrus précentral, IV = gyrus post-central, V = insula postérieure, VI = pôle de l'insula antérieure, VII = pôle de l'insula postérieure. 1 = sillon insulaire antérieur, 2 = sillon pré-central, 3 = sillon central (CIS), 4 = sillon post-central, CCS = sillon central, L = limen insulae.

L'insula fait partie d'un large domaine mésocortical (paralimbique) avec des caractéristiques architectoniques transitoires entre allo- et isocortex et une division tripartite en partie agrulaire (périallocorticale), dysgranulaire (proisocortical) et granulaire (isocorticale) (Mesulam and Mufson, 1982). Suivant la même démarche que pour l'opercule pariétal, Kurth et ses collaborateurs (2010)

ont analysé la structure architectonique de l'insula, mais uniquement dans sa partie postérieure (Kurth et al., 2010b). Les auteurs ont ainsi identifié 3 zones bien distinctes : une partie granulaire (Ig1) avec une couche IV bien développée, une large couche II et une couche V moins distincte ; une deuxième partie granulaire (Ig2) avec une couche IV bien développée, une couche II et une couche III plus fines et une couche V plus dense que Ig1 ; et une partie dysgranulaire (Id1) comprenant une couche IV riche en cellules pyramidales provenant des couches III et V (Figure 34).

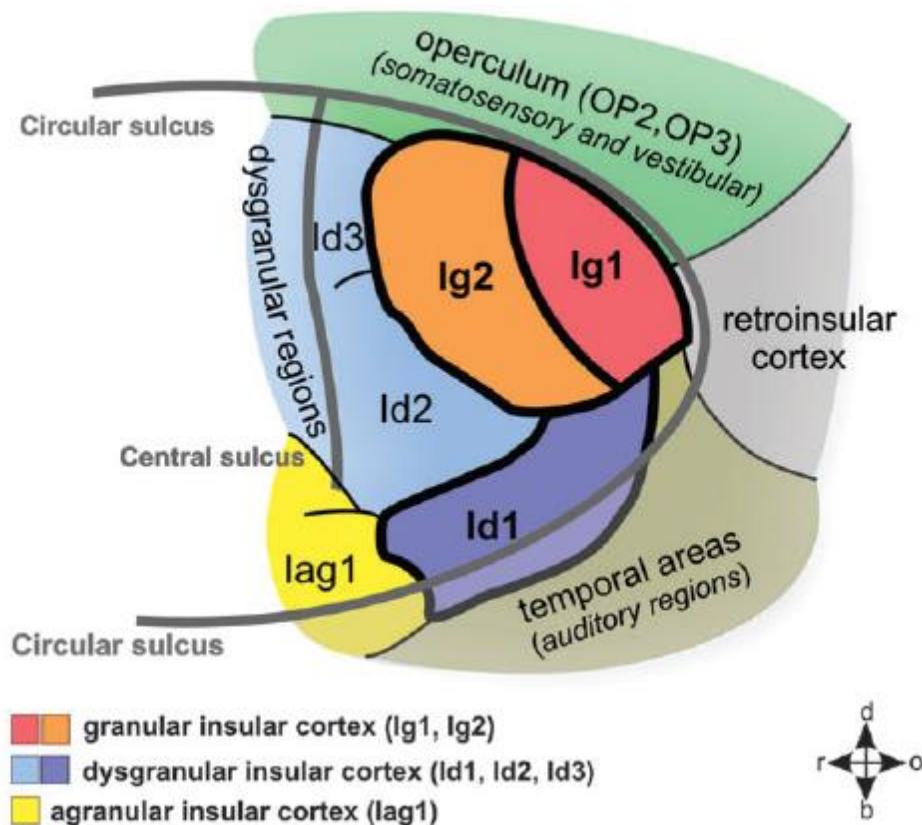


Figure 34: Carte cytoarchitectonique en deux dimensions de l'insula postérieure humaine (Kurth et al., 2010a).

Chez le primate, l'organisation architectonique de l'insula (dans sa totalité) a récemment été reprécisée par marquage immunohistochimique (Gallay et al., 2012). Huit subdivisions ont ainsi été décrites : deux régions agranulaires (Ia1 et Ia2), 3 régions dysgranulaires (Id1, Id2 et Id3), 2 régions granulaires (Ig1 et Ig2) et une région hypergranulaire (G) qui s'étend également à l'opercule pariétofrontal et temporal. En cohérence avec les études précédentes sur la région SII, les auteurs définissent « l'insula propre » comme restreinte aux deux tiers de l'insula morphologique ; le tiers supérieur correspondant à la continuité des aires de l'opercule suprasylvien adjacent (Gallay et al.,

2012). Cette approche a également été conduite chez l'Homme, conduisant à une parcellisation cytoarchitectonique relativement similaire à celle établie chez le primate, excepté pour la région granulaire pour laquelle aucune subdivision n'a pu être identifiée (Morel et al., 2013). La différence majeure vis-à-vis des primates concerne la surface de la région dysgranulaire (Id), occupant près de la moitié du territoire anatomique de l'insula chez l'Homme contre seulement un tiers chez le grand singe. La surface de la région granulaire (Ig et G) est moindre chez l'Homme, et celle de la région agranulaire est approximativement deux fois plus importante que chez le primate. Cette caractéristique est probablement due à l'expansion importante du cortex associatif (multimodal) et de ses interrelations avec l'insula (Morel et al., 2013).

Il existe également une représentation somatotopique dans l'insula, cependant moins précise que celle observée dans les cortex somesthésiques. La face trouve sa représentation dans la partie antérieure de l'insula postérieure tandis que les membres supérieurs et inférieurs sont localisés dans la partie postérieure de l'insula postérieure (Baumgartner et al., 2010, Brooks et al., 2005, Mazzola et al., 2009).

I.3.2. Implication dans la thermo-sensation et la nociception

De nombreuses données physiologiques et pathologiques suggèrent que la région operculo-insulaire postérieure contribue de manière très importante au traitement cortical des informations somesthésiques (notamment thermo-sensorielles) et nociceptives (Garcia-Larrea, 2012).

- Afférences thalamiques

Il a été montré que l'aire SII reçoit les afférences de plusieurs noyaux de la partie postérieure du thalamus : le noyau ventro-postéro-inférieur (VPI), ventro-postéro-latéral (VPL), centro-latéral (CL) et postérieur (PO). Les projections proviennent majoritairement du VPI (Burton and Jones, 1976, Friedman and Murray, 1986, Mufson and Mesulam, 1984). L'insula reçoit également des projections de plusieurs noyaux thalamiques. Les afférences du complexe supragéniculé postérieur (Po-SG) et du VPI atteignent la partie postérieure (granulaire) de l'insula, alors que la partie parvocellulaire du noyau ventro-postero-médian (VPMpc) se projetterait vers des régions plus antérieures de l'insula (agranulaire) (Burton and Jones, 1976, Friedman and Murray, 1986, Mufson and Mesulam, 1984). Le complexe Po-SG contient une subdivision appelée partie postérieure du noyau thalamique ventro-médian (VMpo) qui projetterait sur la partie dorsale de l'insula postérieure selon une organisation topographique rostro-caudale (Craig, 2003b, Craig et al., 1994). Ces travaux

ont donné lieu à une redéfinition de la douleur en tant qu'émotion homéostatique appartenant aux processus intéroceptifs (représentation de la condition physiologique du corps), au même titre que la faim ou la soif (Craig, 2003a). Cependant, l'existence du VMpo est remise en cause dans la littérature (Graziano and Jones, 2004, Willis et al., 2002), et ses projections potentielles sur la partie dorsale de l'insula postérieure n'ont pas encore été clairement documentées, excepté dans un ouvrage n'ayant pas fait l'objet d'une revue scientifique (Craig, 1995). Chez le rat, une voie potentiellement similaire a été mise en évidence, impliquant le noyau triangulaire postérieur du thalamus (PoT) qui projetterait à la fois sur le cortex insulaire et le cortex SII (Gauriau and Bernard, 2004).

Une étude récente a permis de marquer les cibles corticales des projections du faisceau spinothalamique chez le primate. La grande majorité (93%) de ces projections était restreinte à trois régions corticales : le cortex insulaire postérieur (granulaire, 41%), la région SII (29%) et le cortex cingulaire médian (moteur, 24%). La région operculo-insulaire est donc la cible majoritaire et directe du faisceau spinothalamique (Dum et al., 2009).

- Activations

L'insula postérieure et l'opercule suprasylvien médian (SII) sont les deux structures les plus souvent retrouvées activées par imagerie fonctionnelle suite à une stimulation nociceptive (Garcia-Larrea, 2012, Peyron et al., 2002, Peyron et al., 2000, Tracey, 2008). Dans un contexte thermique, l'activation retrouvée est souvent bilatérale et augmente avec l'intensité de la stimulation. Dans leurs études chez le volontaire sain, Casey et ses collaborateurs (2004) ont observé que ces 2 régions n'étaient pas particulièrement actives lors de la discrimination de deux stimuli non nocifs (Casey et al., 1994, Casey et al., 1996). En revanche, une augmentation de leur activité est retrouvée pendant la discrimination de stimuli thermiques douloureux (froids et chauds pour l'insula mais uniquement chauds pour SII). Une corrélation significative entre l'intensité d'une stimulation thermique et l'activité de l'insula postérieure a également été retrouvée par Craig et ses collaborateurs (2000). Dans une étude visant à séparer les réponses cérébrales liées au codage de l'intensité douloureuse de celles liées aux processus attentionnels, Peyron et ses collaborateurs ont également observé une activation bilatérale de la région insulaire/SII (Peyron et al., 1999). Ainsi, l'ensemble des données d'imagerie fonctionnelle converge vers l'implication de ces deux aires cérébrales dans la composante sensori-discriminative de la douleur, et particulièrement en contexte thermo-algique. Il a également été montré que l'amplitude des réponses insulaire et SII varie en fonction de la nature de la stimulation. L'aire SII serait capable de coder graduellement l'intensité

d'une stimulation sensorielle thermique infraliminaire, alors que l'insula postérieure serait plus impliquée dans le codage de l'intensité des stimulations dépassant ce seuil (Frot et al., 2007).

Chez le rat, une étude par Tomographie par Emission de Positons (TEP) a montré une augmentation de l'activation de SII et du cortex insulaire agrulaire suite à un stimulus thermique nociceptif (froid et chaud). En revanche, seul le cortex insulaire semble capable d'encoder l'intensité d'un stimulus thermique infraliminaire (Chen et al., 2010c).

- Stimulations

Lors des travaux de Penfield et ses collaborateurs, aucune sensation douloureuse n'a été rapportée par les patients suite à une stimulation de SI, SII ou de l'insula. Seules des sensations de picotements « désagréables » furent décrites après stimulation des cortex somesthésiques et insulaire (Penfield and Jasper, 1954). Cependant, l'exploration réalisée par les auteurs était limitée à la partie inférieure et au quadrant antéro-supérieur de l'insula du fait de l'accessibilité difficile de cette structure et de la proximité des vaisseaux sylviens. Ostrowsky et ses collaborateurs furent les premiers à rapporter des sensations douloureuses subjectives suite à la stimulation électrique de la partie postéro-supérieure de l'insula (Ostrowsky et al., 2000, Ostrowsky et al., 2002). Récemment, l'analyse de plus de 4000 stimulations corticales réalisées chez 164 patients a permis de confirmer ces résultats (Mazzola et al., 2012). Seules les stimulations localisées dans la partie médiane de l'opercule pariétal et de l'insula postérieure adjacente sont capables de provoquer une douleur subjective, avec une incidence relativement identique dans ces deux régions (environ 10%). La douleur rapportée suite à ces stimulations operculo-insulaires est rarement de type thermique, décrite comme une décharge électrique, des picotements intenses ou une sensation d'étouffement ou de crampe dans plus de 30% des cas (Mazzola et al., 2006).

- Pathologie

L'étude de la symptomatologie consécutive à une lésion cérébrale (vasculaire, tumorale ou traumatique) permet également de mieux définir la fonction des aires incriminées. Cependant, la comparabilité des études est souvent biaisée par la variabilité de la forme, de l'étendue et de la localisation des lésions. Au niveau cortical, la région operculo-insulaire est la seule zone où une lésion est capable d'engendrer des douleurs centrales ainsi que des déficits de la perception douloureuse ou thermique (Bowsher, 2006, Greenspan et al., 1999). Les lésions concernant exclusivement l'insula antérieure ne semblent pas entraîner de déficit thermoalgique, tandis que les

lésions de l'opercule pariétal (étendues à l'insula postérieure adjacente ou non) sont accompagnées d'une augmentation des seuils de sensibilité à la douleur dans l'hémicorps controlatéral (Greenspan et al., 1999). Les douleurs spontanées associées à une atteinte du cortex operculo-insulaire sont souvent décrites comme « pseudo-thalamiques ». Récemment, Garcia-Larrea et ses collaborateurs ont proposé le concept de « douleur operculo-insulaire » (ou « douleur parasylyvienne ») comme un syndrome douloureux à part entière (Garcia-Larrea et al., 2010). Contrairement aux douleurs thalamiques, les patients présentaient une douleur centrale et des déficits thermo-algiques dissociés. Comme décrit précédemment, parmi les patients atteints d'une lésion operculo-insulaire, les patients douloureux présentent des déficits de sensibilité à la douleur (piqûre, mécanique ou thermique) plus importants que les patients non douloureux (Bowsher, 2006, Bowsher et al., 2004). Thomas-Anterion et ses collaborateurs ont également rapporté le cas d'une patiente présentant des douleurs neuropathiques suite à une lésion de l'aire SII et de l'insula postérieure gauche. Peu après son accident vasculaire cérébral, la patiente a développé des déficits de la perception thermique ainsi qu'une allodynie au froid dans l'hémicorps controlatéral à la lésion, associés à des troubles émotionnels et un besoin compulsif de peindre (Thomas-Anterion et al., 2010). Les auteurs décrivent également la présence de synesthésies thermo-sensorielles sous la forme d'une exacerbation de la douleur lorsque la patiente peignait des couleurs froides (bleu, vert ou gris).

Chez le rat, la lésion du cortex insulaire granulaire caudal permet de diminuer l'allodynie mécanique consécutive à la ligature du nerf sciatique (CCI) (Benison et al., 2011). Coffeen et ses collaborateurs ont également observé une diminution de l'allodynie thermique et mécanique suite à une lésion du cortex insulaire agranulaire rostral dans 3 modèles de douleur chronique chez le rat (Coffeen et al., 2011). En revanche, aucune modification des seuils nociceptifs aigus n'a été observée dans ces deux études. Ces résultats suggèrent donc que le cortex insulaire est également impliqué dans la nociception en contexte pathologique chez le rongeur.

Enfin, plusieurs cas de crises d'épilepsie associées à une sensation douloureuse ont été rapportés, montrant toujours une implication des régions operculo-insulaires (Isnard et al., 2011, Siegel et al., 1999). Les crises à point de départ insulaire peuvent s'inscrire dans un réseau épileptique insulo-temporal (Isnard et al., 2000, Isnard et al., 2004), insulo-pariétal (Isnard et al., 2004, Isnard et al., 2011) voire insulo-frontal (Ryvlin et al., 2006). Récemment, Isnard et ses collaborateurs ont rapporté le cas d'un patient présentant une dysplasie corticale de l'insula postérieure associée à des crises épileptiques spontanées dont le principal symptôme était une douleur intense (Isnard et al., 2011). Durant les crises douloureuses, seule l'insula postérieure (site de la lésion), l'opercule pariétal (aire SII) et le gyrus cingulaire moyen présentaient une augmentation de l'activité à haute-fréquence (> 40 Hz). De plus, les pointes enregistrées dans

l'insula postérieure précédaient de 80 ms celles enregistrées dans ces deux autres structures. Cette observation suggère que la douleur peut être initiée dans l'insula postérieure mais qu'elle dépend de l'activation séquentielle d'autres structures cérébrales (dont SII et le gyrus cingulaire) que l'on retrouve également fréquemment activées en imagerie fonctionnelle.

II. Altérations cérébrales dans les douleurs neuropathiques

La douleur neuropathique est une douleur très invalidante qui peut perdurer longtemps, même en l'absence de signe évident d'atteinte du système nerveux. Les techniques d'imagerie cérébrale modernes et non invasives telles que la TEP, l'IRM fonctionnelle, la morphométrie voxel-à-voxel ou la spectroscopie par résonance magnétique du proton ont permis d'explorer les mécanismes supraspinaux associés à la douleur neuropathique chronique. Ainsi, de nombreuses variations fonctionnelles, anatomiques et neurochimiques ont été mises en évidence au niveau cérébral (Seifert and Maihofner, 2011). Ces modifications peuvent traduire une altération physiopathologique des systèmes de modulation de la douleur (Price et al., 2006) ainsi qu'une sensibilisation des neurones centraux impliqués dans la transmission et l'intégration des signaux nociceptifs (Latremliere and Woolf, 2009, Sandkuhler, 2000). Dans ce contexte, la chronicisation et le maintien des douleurs neuropathiques pourraient être causés directement par une activité cérébrale anormale dans une ou plusieurs structures définies, jouant un rôle de « générateur central » de la douleur (Henderson et al., 2013, von Hehn et al., 2012).

II.1. Modifications fonctionnelles

L'imagerie cérébrale de la douleur spontanée a été très peu étudiée à cause de la difficulté à comparer, pour un même sujet, l'activité cérébrale en condition douloureuse et non douloureuse (Peyron et al., 2000). Les résultats de ces études sont souvent hétérogènes du fait de la diversité des étiologies douloureuses évaluées, des symptômes et des protocoles utilisés. Dans le cas des douleurs neuropathiques, une réduction du débit sanguin local est retrouvée de manière récurrente au niveau du thalamus controlatéral à la zone douloureuse (Hsieh et al., 1995, Iadarola et al., 1995, Kupers et al., 2000). La modification de l'activité du thalamus par différentes procédures antalgiques confirme également le lien entre la douleur spontanée et l'hypoperfusion du thalamus (Di Piero et al., 1991, Hsieh et al., 1995). Cette observation est contradictoire avec la plupart des études sur la douleur aiguë ayant démontré une hyperactivité des neurones thalamiques. Il a été suggéré que la

diminution de la perfusion du thalamus correspond à un mécanisme compensatoire visant à limiter le flot excessif d'informations nociceptives au niveau cérébral (Iadarola et al., 1995). L'activité d'autres structures de la matrice de la douleur sont également modifiées dans les douleurs neuropathiques chroniques. Une méta-analyse récente a mis en évidence une augmentation de l'activité de l'aire SII, du gyrus cingulaire médian et antérieur, de l'insula antérieure droite et du gyrus frontal inférieur (Friebel et al., 2011). Une analyse statistique de contraste avec les schémas d'activation cérébrale observés dans les études de douleur aiguë a révélé une différence au niveau de l'activité de l'insula antérieure et du cortex cingulaire antérieur, traduisant l'importance de la composante émotionnelle dans les états de douleur chronique (Friebel et al., 2011).

En revanche, le profil d'activité cérébrale de l'allodynie en contexte pathologique semble davantage concerner le système latéral (Moisset and Bouhassira, 2007). La plupart des études rapportent une augmentation de l'activité de SI, SII, du thalamus et du cortex préfrontal du côté controlatéral à la stimulation (Becerra et al., 2006, Petrovic et al., 1999, Peyron et al., 2004, Schweinhardt et al., 2006a, Schweinhardt et al., 2006b). Cependant, l'absence apparente d'activation du système médian peut être due à la présence de douleurs spontanées durant la phase de repos (sans stimulation) (Moisset and Bouhassira, 2007). Une activation ipsilatérale a également été rapportée dans plusieurs de ces études, notamment au niveau de SI et de l'insula antérieure (Peyron et al., 2004). Ainsi, l'allodynie serait caractérisée par une « bilatéralisation » du schéma d'activation cérébrale qui pourrait refléter une forme de neuroplasticité ou de réorganisation des voies sensorielles au niveau supraspinal (Moisset and Bouhassira, 2007).

II.2. Modifications morphologiques

La morphométrie voxel-à-voxel est une approche computationnelle relativement récente (Ashburner and Friston, 2000) permettant de comparer les différences volumétriques de certains tissus (matière grise, matière blanche, etc.) entre deux populations de sujets. Contrairement à une approche en région d'intérêt où chaque zone est délimitée manuellement sur les différentes coupes, cette méthode n'est pas opérateur-dépendante. La morphométrie voxel-à-voxel permet d'identifier des anomalies neuroanatomiques fines que la simple inspection de chaque IRM individuelle ne permettrait pas de détecter. Le principe de la morphométrie voxel-à-voxel est présenté sur la Figure 35.

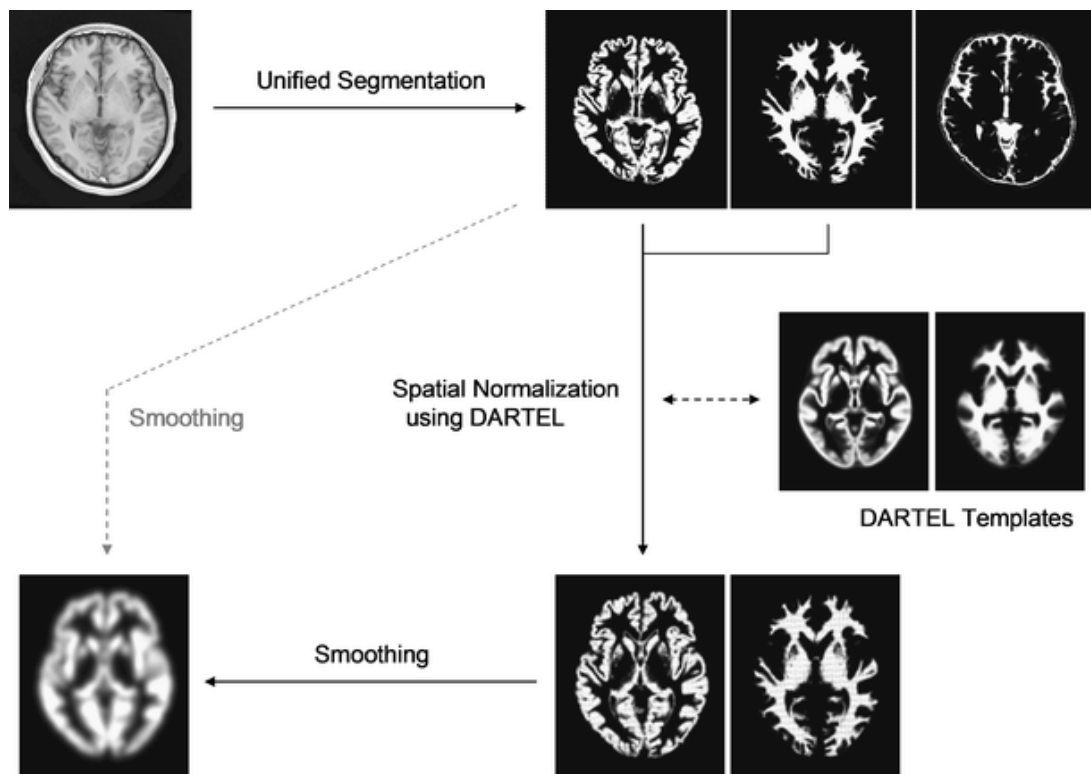


Figure 35: Principe de la morphométrie voxel-à-voxel. Les grandes étapes consistent en (1) la segmentation des images pondérées T1 permettant de séparer la substance grise, la substance blanche et le liquide céphalo-rachidien, (2) la normalisation dans un référentiel commun (template) et (3) le lissage (smoothing) des images segmentées et normalisées. L'analyse statistique permet de comparer la densité de ces 3 types de substances, voxel à voxel, sur l'ensemble du volume cérébral entre plusieurs groupes de sujets (Takao et al., 2010).

En 2004, Apkarian et ses collaborateurs ont rapporté pour la première fois des altérations de la matière grise au niveau cérébral chez des patients souffrant de lombalgie chronique (Apkarian et al., 2004). Dans cette étude, une réduction de 5 à 11% de la densité de la matière grise corticale totale a été observée chez les patients comparés aux contrôles ; une réduction directement corrélée à la durée des symptômes douloureux. Depuis lors, de nombreuses études ont mis en évidence des modifications morphologiques au niveau cérébral dans diverses pathologies douloureuses chroniques (Apkarian et al., 2011, May, 2008), qui varient en termes de nature et de localisation en fonction des étiologies (Baliki et al., 2011). Indépendamment de ces conditions, les principales structures présentant une réduction de la densité de la matière grise sont le cortex cingulaire antérieur, le cortex préfrontal, le thalamus, l'insula et le cortex somatosensoriel SI, suggérant un mécanisme physiopathologique commun (May, 2008). Peu d'études ont cherché à évaluer ces modifications cérébrales dans les douleurs neuropathiques. Seules 3 études portant sur des patients

atteints de douleur neuropathique trigéminal ont décrit certaines anomalies morphologiques bien localisées, notamment une réduction la matière grise au niveau de SI, de l'insula antérieure et du thalamus (DaSilva et al., 2008, Gustin et al., 2011, Henderson et al., 2013). Des anomalies similaires ont également été retrouvées dans certains modèles animaux de douleur neuropathique post-traumatique (Metz et al., 2009, Seminowicz et al., 2009). Le fondement neurobiologique de ces altérations n'est pas encore bien défini. Une réduction de la densité de la matière grise pourrait refléter une simple diminution locale de la taille des cellules, une apoptose neuronale ou gliale, une diminution des épines dendritiques voire même une réduction du débit sanguin ou du liquide interstitiel (May, 2008). Cependant, certaines études ont démontré la réversibilité de ces altérations anatomiques avec le soulagement de la douleur (Gwilym et al., 2010, Obermann et al., 2009, Rodriguez-Raecke et al., 2009), indiquant que ces changements ne reflètent probablement pas une neurodégénération qui est, par définition, irréversible.

II.3. Modifications neurochimiques

La spectroscopie par résonance magnétique du proton ($^1\text{H-SRM}$) est une approche similaire à l'IRM classique permettant de mesurer les concentrations de certains métabolites de manière non invasive, fournissant ainsi une image de l'environnement chimique des tissus sous la forme d'un spectre à une dimension. Un métabolite s'exprime sur le spectre RMN sous la forme d'une signature spectrale (ou raie) dont l'aire est proportionnelle à la concentration de la molécule. Les principales raies détectées en $^1\text{H-SRM}$ sont celles du N-acétylaspartate (NAA), de la choline (Cho), de la créatine + phosphocréatine (tCr), du myo-inositol, du glutamate, de la glutamine, du lactate et des lipides. Ces métabolites, selon leur prédominance dans certains sous-types cellulaires, peuvent servir de biomarqueurs et permettre ainsi de formuler, selon leur variation, des hypothèses mécanistiques en lien avec le phénotype observé (Figure 36). La SRM est un outil complémentaire aux techniques d'examen morphologique qui est de plus en plus utilisé en pratique clinique pour le diagnostic de certaines pathologies ou l'évaluation de la réponse thérapeutique.

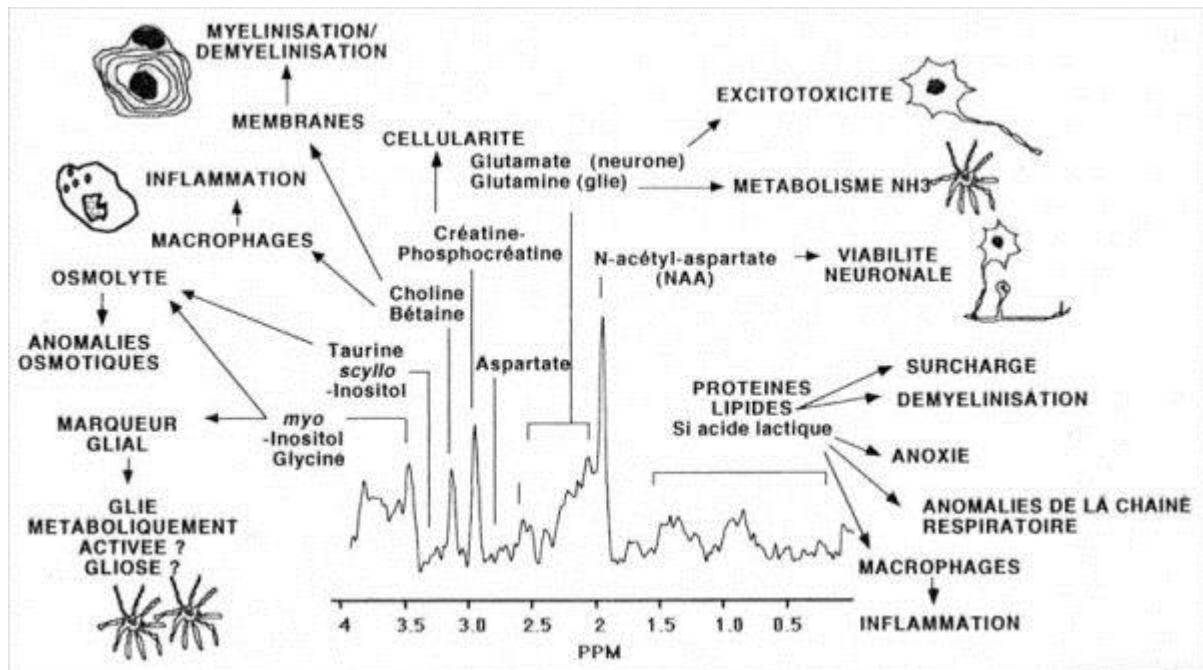


Figure 36 : Exemple d'un spectre RMN obtenu à l'aide d'une séquence STEAM à temps d'écho court (20 ms). Les métabolites identifiables annotés sur le spectre peuvent servir de biomarqueurs pour certaines pathologies (Vion-dury et al., 1999).

Des altérations neurochimiques cérébrales ont été rapportées pour la première fois chez des patients atteints de lombalgie chronique (Grachev et al., 2001, Grachev et al., 2000, Grachev et al., 2002). Les études préliminaires dans ce domaine se sont concentrées sur les altérations métaboliques dans le thalamus chez des patients neuropathiques, et ont rapporté une diminution des concentrations en NAA (marqueur neuronal) et une augmentation en myo-inositol (marqueur glial) corrélées à l'intensité de la douleur (Pattany et al., 2002). Ces données suggèrent qu'une dysfonction des interneurons inhibiteurs dans le thalamus (diminution du NAA), potentiellement due à une activation gliale (augmentation du myo-inositol) joue un rôle dans le maintien de la douleur neuropathique d'origine traumatique. Une diminution du taux de NAA dans le thalamus a également été rapportée chez des patients atteints d'algodystrophie (Fukui et al., 2006) ainsi que chez des patients diabétiques présentant des douleurs neuropathiques (Sorensen et al., 2008). Une diminution des ratios NAA/Cho et NAA/tCr a également été observée chez des patients migraineux et des patients atteints de névralgie trigéminal (Gu et al., 2008).

Les études plus récentes se sont focalisées sur d'autres structures corticales telles que le cortex cingulaire antérieur ou l'insula. Une augmentation du myo-inositol, de tCr et de Cho ainsi qu'une diminution du NAA et du pool glutamine/glutamate ont été rapportées dans le cortex cingulaire antérieur de patients neuropathiques suite à un traumatisme de la moelle épinière, et

notamment ceux présentant un fort impact psychosocial (Widerstrom-Noga et al., 2013). Ces variations suggèrent la présence d'une activation gliale associée à une diminution du métabolisme glutamatergique dans cette structure. Harris et ses collaborateurs ont également mis en évidence une augmentation de la concentration en glutamate dans l'insula postérieure de patients atteints de fibromyalgie (Harris et al., 2009) ainsi qu'une diminution du GABA (Foerster et al., 2012) dans l'insula antérieure. Le taux de glutamate dans l'insula postérieure a également été corrélé à la réponse thérapeutique chez les patients traités par acupuncture (Harris et al., 2008) ou la prégabaline (Harris and Clauw, 2012).

III. Travail expérimental

III.1. Introduction et résumé des travaux

Malgré de nombreuses études sur les effets de l'oxaliplatine sur le système nerveux périphérique, les processus physiopathologiques conduisant au développement de la douleur sont encore mal connus. Des études précliniques ont mis en évidence une composante supraspinale dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine. Cependant, l'étude des mécanismes supraspinaux intervenant dans les douleurs chroniques reste un domaine très largement inexploré. Norcini et ses collaborateurs (2009) ont montré que l'administration intracérébroventriculaire de calphostine C, un inhibiteur de la PKC, permettait de supprimer l'hyperalgie mécanique induite par l'oxaliplatine (Norcini et al., 2009). L'analyse de certaines structures cérébrales a révélé une surexpression de l'isoforme γ de la PKC ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation des isoformes γ/ϵ chez les animaux neuropathiques au niveau du thalamus et de la substance grise périaqueducule (Norcini et al., 2009). Plus récemment, une étude génomique a mis en évidence une sous-expression de plusieurs canaux potassiques au niveau du cortex SI chez le rat suite à un traitement chronique par l'oxaliplatine (Thibault et al., 2012). Par extension, une augmentation de l'excitabilité neuronale a également été retrouvée dans cette structure, évaluée par l'expression du marqueur ERK. De plus, la sous-expression du canal Kv2.2 au niveau de SI chez l'animal sain provoque une symptomatologie sensitive similaire à celle observée chez les animaux traités par l'oxaliplatine (Thibault et al., 2012).

Ainsi, la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine semble être associée à des modifications supraspinales au niveau de certaines structures cérébrales, conduisant au maintien de l'hypersensibilité douloureuse. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de ces douleurs. Dans ce contexte, nous avons cherché à évaluer les modifications métaboliques locales au niveau cérébral dans un modèle animal de neuropathie douloureuse induite par l'oxaliplatine chez le rat. Pour cela, nous avons utilisé une approche métabolomique basée sur la spectroscopie ^1H -RMN à haute résolution par rotation de l'échantillon à l'angle magique (HRMAS) qui permet d'évaluer les phénotypes métaboliques (métabotype) directement dans des tissus, sans étape de prétraitement de l'échantillon et sans *a priori*. Huit structures cérébrales connues pour leur implication dans la douleur ont ainsi été évaluées. Parmi les variations métaboliques retrouvées, cette étude a mis en évidence une augmentation des concentrations en choline dans le cortex insulaire postérieur (pIC) des rats traités par oxaliplatine, corrélée de manière significative aux seuils nociceptifs des animaux. La choline est un constituant essentiel des membranes biologiques mais ce métabolite est également nécessaire à

la synthèse d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine. Une analyse par qPCR de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et la neurotransmission de l'acétylcholine a révélé une surexpression du transporteur membranaire de la choline CHT et du récepteur muscarinique M2, une cible de l'acétylcholine, chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux sains. De plus, l'administration d'oxotrémorine (agoniste des récepteurs muscariniques) directement dans le pIC a permis de supprimer l'hypersensibilité mécanique des animaux. Cette étude a donc permis de mettre en évidence des modifications neurochimiques au niveau cérébral qui seraient impliquées dans la physiopathologie des douleurs chimio-induites. Ainsi, la neurotransmission cholinergique corticale jouerait un rôle dans la modulation de l'excitabilité neuronale au niveau du pIC et pourrait donc représenter une cible pharmacologique intéressante pour le développement de nouveaux traitements antalgiques.

Ces premiers résultats font l'objet d'une publication en cours de préparation, présentée ci-après. Enfin, dans le but de confirmer l'intérêt thérapeutique du ciblage de la neurotransmission cholinergique centrale, l'évaluation comportementale de l'effet anti-allodynique du donépézil (Aricept[®], Pfizer), un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, est présentée en résultats complémentaires.

ARTICLE 3: "METABOLOMIC ANALYSIS REVEALS
THE ROLE OF INSULAR CHOLINERGIC SYSTEM IN
THE MODULATION OF CHEMOTHERAPY-INDUCED
NEUROPATHIC PAIN IN RATS."

(EN PRÉPARATION)

Metabolomic analysis reveals the role of insular cholinergic system in the modulation of chemotherapy-induced neuropathic pain in rats.

Jérémy Ferrier^{1,2}, Mathilde Bayet-Robert³, Abderrahim El Guerrab^{1,2}, Danielle Graveron-Demilly⁴, Maryse Chalus^{1,2}, Bénédicte Elena-Herrmann³, Alain Eschalier^{1,2,5}, Laurence Daulhac^{1,2}, Fabien Marchand^{1,2}, David Balayssac^{1,2,5}.

Affiliations:

1. Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
2. Inserm U1107 NEURO-DOL, F-63001 Clermont-Ferrand, France.
3. Univ Lyon, CNRS, ENS Lyon, UCB Lyon 1, Ctr RMN Très Hauts Champs, F-69100 Villeurbanne, France
4. Univ Lyon 1, Inserm U1044, CNRS UMR 5220, Lab Creatis, F-69616 Villeurbanne, France
5. CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author: Jérémy Ferrier, INSERM U1107 NEURO-DOL, Faculty of Pharmacy, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

Tel: +33 473178230; Fax: +33 473274621. Email address: jeremy.ferrier@udamail.fr

Running title: Insular choline and oxaliplatin-induced neuropathy

Keywords: oxaliplatin, neuropathy, metabolomic, NMR, choline, insular cortex.

Abbreviations: 1D, one dimension; ¹H-NMR HRMAS, Proton Nuclear Magnetic Resonance High-Resolution Magic Angle Spinning; Ace, acetate; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; CHT, high affinity choline transporter; CRB, Cràmer-Rao Lower Bounds; FC, Fold change; GABA, γ -aminobutyrate; GPC, glycerophosphocholine; pIC; posterior insular cortex; PC, phosphocholine; RQ, relative quantities; tCr, total creatine; TLDA, Taqman Low Density Array; VP, thalamic ventroposterior nucleus.

Abstract

Oxaliplatin-induced painful neuropathy is the main dose-limiting side effect of colorectal cancer chemotherapy. To date, no therapeutic strategy has been shown effective for the prevention or the symptomatic treatment of oxaliplatin-induced neuropathy. Hence, a better understanding of the pathophysiological mechanisms underlying this painful neuropathy is necessary to identify new pharmacological targets. As sustained neuropathic pain may involve plastic changes at the supraspinal level, the aim of this study was to investigate the neurochemical alterations in brain areas involved in pain processing using an animal model of oxaliplatin-induced neuropathy. Proton NMR HRMAS spectroscopy-based metabolomic analysis revealed important metabolic variations in oxaliplatin-treated animals, including an increased concentration of choline in the posterior insular cortex which was significantly correlated with the animals' pain thresholds. As choline is a precursor for acetylcholine synthesis in cholinergic neurons, we assessed the expression of several genes involved in acetylcholine metabolism and effect. The high-affinity choline transporter as well as the muscarinic M2 receptors were found overexpressed in the posterior insular cortex of oxaliplatin-treated animals. Finally, stereotaxic administration of oxotremorine, a muscarinic receptor agonist into the posterior insular cortex totally reversed oxaliplatin-induced mechanical allodynia. We propose that cortical cholinergic neurotransmission in the posterior insular cortex may be involved in the modulation of chronic pain associated with oxaliplatin-induced neuropathy.

Introduction

Oxaliplatin is an anticancer drug which is widely used for the adjuvant treatment of advanced colorectal cancer [1]. However, oxaliplatin is responsible for a debilitating and dose-limiting neurotoxicity with two components: an acute nerve hyperexcitability and a chronic cumulative peripheral neuropathy. In more than 90% of treated patients, oxaliplatin is responsible for sensory symptoms including cold-induced allodynia [2,3]. These symptoms develop shortly after oxaliplatin infusion and are self-limiting, resolving in a few days but reoccur following subsequent administration. With the repetition of chemotherapy cycles, some patients may develop a chronic cumulative neuropathy [4,5] with a symmetric, distal, primarily sensory polyneuropathy characterized by the persistence of paresthesias between the chemotherapy cycles, numbness in the hands and feet and neuropathic pain. In the most severe cases, patients may suffer from sensory ataxia as well as a deep and superficial sensory loss, eventually leading to functional impairment [6]. To date, no therapeutic strategy has shown substantial beneficial effect to be used routinely [7].

Despite numerous studies on the peripheral nervous system, the pathophysiological mechanisms leading to sustained neuropathic pain remain poorly understood. Over the past two decades, neuroimaging studies have evidenced that the sensitization of the central nervous system may contribute to the chronicization of pain. A discrete number of cortical and subcortical brain regions, often referred as to the “pain matrix” have been shown to be activated, more or less consistently, in painful conditions [8-10]. Although oxaliplatin-induced neuropathic pain results from peripheral nerve neurotoxicity, we can suspect that higher brain centers may be involved in the development or the maintenance of chronic pain conditions. For instance, many chronic painful states have been associated to gray matter losses in various brain areas involved in pain process including the somatosensory cortices, insula, amygdala, cingulate gyrus and thalamus [11-15].

The aim of this study was to investigate the metabolic changes at the supraspinal level in an animal model of oxaliplatin-induced painful neuropathy [16]. We used the solid-state high resolution magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance (HRMAS ¹H-NMR) technique to assess neurochemical alterations between controls and oxaliplatin-treated animals in several brain structures involved in pain processing. Several metabolic variations have been evidences, especially an increased concentration of choline in the posterior insular cortex correlated with mechanical allodynia. This variation was associated with an increased expression of presynaptic muscarinic M2 receptors mRNA known to inhibit neurotransmitter

release [17]. Accordingly, we demonstrated an anti-allodynic effect of oxotremorine injection, an M2 agonist, in the posterior insular cortex which may provide new opportunities of therapeutic strategy.

Materials and Methods

Chronic neuropathic pain model

Oxaliplatin-induced neuropathy

Experiments were led on 90 adult male Sprague-Dawley rats (6 weeks old, weighing 150-175g upon arrival, Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) according to the European Communities Council directive (86/609/EEC of 24 November 1986). The procedures were approved by the local ethic committee at the University of Auvergne (CEMEA-Auvergne) and received the following agreement numbers: CE27-10, CE16-11 and CE22-11. Oxaliplatin was intravenously administered at 2 mg/kg twice a week during 4.5 weeks (on Mondays and Fridays, cumulative dose received: 18 mg/kg), as described by Ling et al. [16]. Animals from the control group have received similar injections of oxaliplatin vehicle: 5% glucose. Treatments (oxaliplatin or 5% glucose) were randomized within each cage and the experimenter was blinded to treatment administered.

Assessment of mechanical allodynia

Mechanical pain thresholds were assessed using an electronic von Frey test (Bioseb, Chaville, France). Rats were placed in a Plexiglas floor on an elevated wire floor and left for habituation during 30 min before each experiment. The apparatus, consisting of a plastic tip fitted in a hand held force transducer, was applied perpendicularly to the animal hind paw from below and the force applied was gradually increased until paw withdrawal. The maximum force applied was automatically registered by the electronic device. The experimental outcomes were defined as the maximum force (expressed in grams) needed to induce paw withdrawal.

¹H HRMAS NMR spectroscopy-based metabolomic analysis

Sample preparation

Thirty one days after the first oxaliplatin administration (namely 3 days after the last injection) rats were sacrificed by decapitation and brains were quickly dissected out. Coronal sections were obtained using a 1.0 mm rat brain slicer (Phymep, France). The following brain structures were removed from the right hemisphere (coordinates of the coronal slices are indicated in buckets in mm relative to bregma [18]): primary and secondary somatosensory cortices [-2;0], posterior insular cortex [-2;0], anterior cingulate cortex [2;1], prefrontal cortex [5;4], thalamus [-2;-4], amygdala [-2;-4] and periaqueductal gray matter [-6;-8]. The sampling

process lasted less than 5 min and samples were rapidly frozen in liquid nitrogen and stocked at -80°C to avoid biochemical degradation. Prior to metabolomic analysis, about 20 mg of frozen tissue were rapidly introduced in disposable Bruker 4 mm inserts (B4496, Cortecnet, France) and filled with D_2O (Eurisotop, France).

HRMAS ^1H -NMR-spectroscopy

NMR spectra of metabolites were acquired on a Bruker Avance 700 spectrometer (proton frequency 700.09 MHz) equipped with a standard double resonance (^1H - ^{13}C) 4 mm HRMAS probe head with z gradient. Samples were spun at 3500 Hz. A Bruker Cooling Unit was used to maintain the samples at 283 K during the entire processing. One dimension (1D) NMR spectra were all acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence with a presaturation presaturated during the 2 s relaxation delay, a 1 ms echo time and an acquisition time of 1.36 s. A total of 32K data points with 512 scans were acquired using a spectral width of 8403 Hz, for a total acquisition time of approximately 30 min. All free induction decays were multiplied by an exponential function equivalent to a 0.3 Hz line-broadening factor before Fourier transformation.

Metabolites quantification

Quantifications were performed with the jMRUI v5.0 package software (<http://www.mrui.uab.es/mrui/>) using the QUEST quantitation algorithm [19]. This procedure uses a metabolite database set simulated by quantum mechanics with NMR-SCOPE using spin parameters from [20]. The metabolites set included: acetate (Ace), alanine (Ala), aspartate (Asp), creatine and phosphocreatine (Cr), choline (Cho), γ -aminobutyrate (GABA), glutamate (Glu), glutamine (Gln), glutathion (Gsh), glycerophosphocholine (GPC), glycine (Gly), lactate (Lac), myo-inositol (m-Ins), N-acetyl-aspartate (NAA), phosphocholine (PC), taurine (Tau) and scyllo-inositol (s-Ins). The amplitude of metabolites was normalized to the total spectrum signal, as described by Fauvelle *et al.* [21]. Seventeen metabolites have been quantified from NMR spectra of brain samples. Reliability of the quantification was indicated by the Cràmer-Rao lower bounds (CRB) calculated by the jMRUI algorithm, which correspond to the estimate standard deviation of the fit of each metabolite. For most metabolites, we obtained $\text{CRB} \leq 10\%$, except for Ace and s-Ins for which we obtained $\text{CRB} \geq 30\%$.

Differential gene expression*mRNA extraction and reverse transcription*

Sixteen rats were used for this part of the study. Eight rats were treated with oxaliplatin and 8 rats were injected with 5% glucose. At day 31, rats were sacrificed and the posterior insular cortices were dissected out from the left hemisphere and stored at -80°C until analysis (as presented in the “Sample preparation” section). Total RNA was extracted from these brain samples using the RNeasy Mini-Kit (Qiagen, France). RNA was then stored at -80°C until cDNA synthesis and amplification reaction. The RNA quality was checked by electrophoresis using a Bioanalyzer 2100 with RNA 6000 Nano LabChip® and BioSizing A.02.11 software (Agilent Technologies, France). Forty nanograms of total RNA were reverse transcribed in a total volume of 20 µl using a High Capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, France).

TaqMan® Low Density Array

Quantitative real-time PCR analysis was performed with custom designed arrays in 384-well microfluidic cards TaqMan® Low Density Array (TLDA; Applied Biosystems, France). Each well contains specific, user-defined primers and 6-FAM labelled TaqMan MGB probes (6-carboxyfluorescein as FAM and dihydrocyclopyrroloindole tripeptide minor groove binder as MGB), capable of detecting a single gene. The card was configured into 4 identical 34-gene sets (8 samples per card in duplicate) including two housekeeping genes, *rplp2* and *18S*. Thirty-four genes coding for proteins involved in acetylcholine metabolism were selected based on KEGG metabolic pathways (<http://www.genome.jp/kegg/>) and literature reviews (Table 2). A total of 100 µl reaction mixtures with 50 µl cDNA templates (100 ng) and an equal volume of TaqMan® universal master mix (Applied Biosystems, France) was added to each line of TLDA after gentle vortex mixing. The array was centrifuged twice at 331g for 1 min to distribute the samples from the loading port into each well. The card was then sealed and PCR amplification was performed using an Applied Biosystems Prism 7900HT sequence detection system. Thermal cycler conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 94.5°C and 30 s at 97°C, and 1 min at 59.7°C for 40 cycles. The threshold cycle (Ct) was automatically given by SDS v2.2 software package. Relative quantities (RQ) were determined using the equation: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [22]. All data are presented as log base 2 (Log2) of normalized fold change (FC) relative to the vehicle injected samples. We used the Log2 to allow visualization of the fold change in the positive (upregulated) and negative

(downregulated) way where Log₂ of 0 equals no change in gene expression and 1 and -1 equal two fold up- and down-regulation, respectively.

Intranuclear microinjections of cholinergic agents

Surgery

Surgery was performed between days 21 and 23 after the first oxaliplatin (or 5% glucose) injection. Rats were deeply anesthetized with mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a small animal stereotaxic frame (David Kopf instruments 940). Eleven mm guide cannulas were then bilaterally implanted in the agranular insular cortex (pIC) using coordinates from Paxinos and Watson [18]: -2.30 mm posterior and 6 mm lateral to bregma, and 5.5 mm ventral to the surface of the brain. The guides were fixed on the skull using dental cement (Henry Schein, France) and 3 anchoring surgical screws. After the surgery, 11 mm cap mandrels were inserted into the cannulas to avoid obstruction. Animals were then monitored until recovery from anesthesia and daily after the surgery. Local antibiotic treatment (triamphenicol, Negerol[®], CEVA SANTE ANIMALE SA) was administered if post-operative infection occurred.

Drug infusion

Rats were anesthetized with 4% isoflurane and drug solutions (0.2 µl/side) were infused into the pIC, just after the measurement of baseline mechanical thresholds, at a constant rate over 90s using 1 µl Hamilton syringes. The injection cannulas were left in place for an additional 30s to allow diffusion of the drug solution. Control animals received infusion of the vehicle solution (0.9% NaCl). The other animals received either the non-selective muscarinic agonist oxotremorine (sesquifumarate salt, 0.1 nmol), the selective M₂ receptors antagonist methoctramine (30 nmol), or oxotremorine (0.1 nmol) together with methoctramine (30 nmol). The doses of oxotremorine and methoctramine used were chosen from Power et al. [23]. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France).

At the end of the experiment rats were euthanized with an overdose of pentobarbital (100 mg/kg). Brains were freshly collected in Prussian blue solution (potassium ferrocyanide) to stain the needles tracks and to confirm the infusion site. Thirty µm thick sections were obtained with a freezing microtome and mounted on glass slides to visualize the needle tracks.

Experimental design

Pharmacological evaluation was also performed on day 31, namely one week after the surgery. Fifty one rats were used for this study. Behavioral test using the electronic von Frey was performed before drug administration (baseline values) and 15 min after. All the experiments were performed a randomized block design to control variability and avoid any unspecific effects across the experiment. The experimenters were blind regarding the treatment administered. After histological examinations, seven rats were found to have at least one infusion needle terminating outside the pIC and were therefore excluded from analysis.

Statistical analysis

In behavioral tests, mean and standard deviation (SD) were calculated for each group of treatment. Normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. To compare the time-course evolution of different parameters, a repeated-measure ANOVA using mixed models was used to determine the effect of time and treatment. Mixed models are considered more robust regarding missing data and control for non-independence of repeated observations. If a significant interaction between time and group was observed, a one-way ANOVA was performed for all time points using an appropriate *post hoc* test. In the metabolomic analysis and TLDA experiment, statistical comparisons between control and treated groups were performed using the non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. A p value inferior to 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using XLSTAT software v.2013.3.03 (AddinsoftTM, France).

Results

Animal model of oxaliplatin-induced allodynia

Static mechanical allodynia was assessed using the electronic von Frey test. Mixed models revealed a significant effect of time [$F(5,84)=2.766$, $p=0.023$], treatments [$F(1,84)=31.871$, $p<0.001$] as well as a significant interaction between time and treatment [$F(5,84)=9.517$, $p<0.001$]. Oxaliplatin-treated rats displayed a significant decrease of mechanical paw withdrawal thresholds from day 14 ($p=0.022$), compared to control animals, namely after the 4th oxaliplatin administration. This mechanical allodynia persisted until the end of the experiment, becoming more significant between day 28 ($p<0.001$) and day 31 ($p<0.001$) (Figure 37).

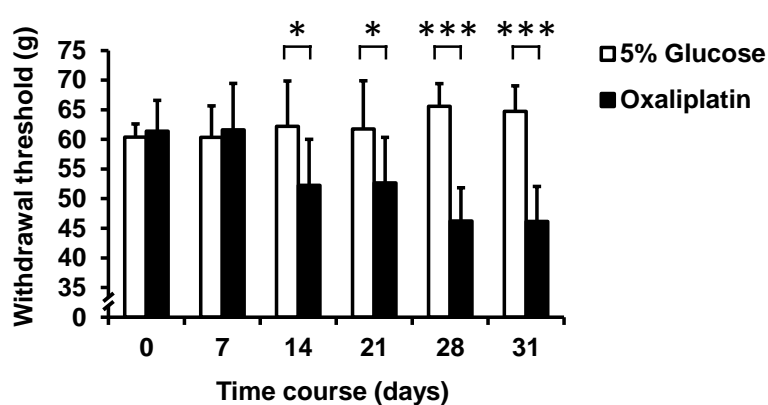


Figure 37 : Time course of static mechanical allodynia on the electronic von Frey test. Data are expressed as mean \pm SD. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Dunnett post hoc test. *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$ ($n=8/\text{group}$).

Metabolic variations in the pain matrix

Proton HRMAS NMR-based spectroscopy was used to investigate the metabolic profiles following induction of neuropathic pain in 8 brain structures involved in pain processing. High resolution 1D representative spectra from a sample of pIC of a control and an oxaliplatin-treated rat are shown in Figure 38. The metabolites concentrations in the 8 brain areas investigated are presented in supplementary data (Supplementary Table 1).

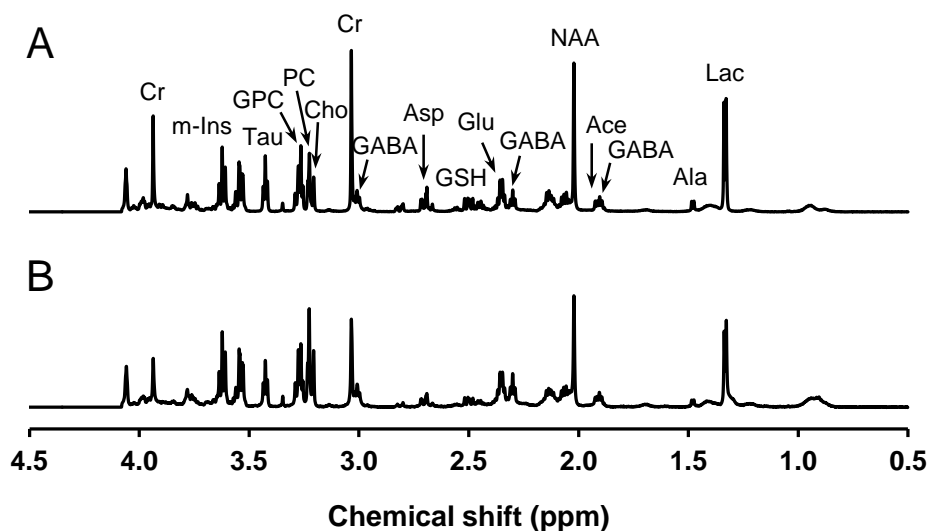


Figure 38 : Representative high-resolution 1D ^1H -NMR spectra from a posterior insular cortex sample of a control (A) and an oxaliplatin-treated rat (B).

Among brain areas analyzed in this study, significant metabolic variations were only observed in thalamus and pIC. In the thalamus, a significant increase in GPC (+31%, $p=0.0357$) was observed in oxaliplatin-treated animals as well as a decrease in GABA (-14%, $p=0.0357$) compared to controls (Figure 39).

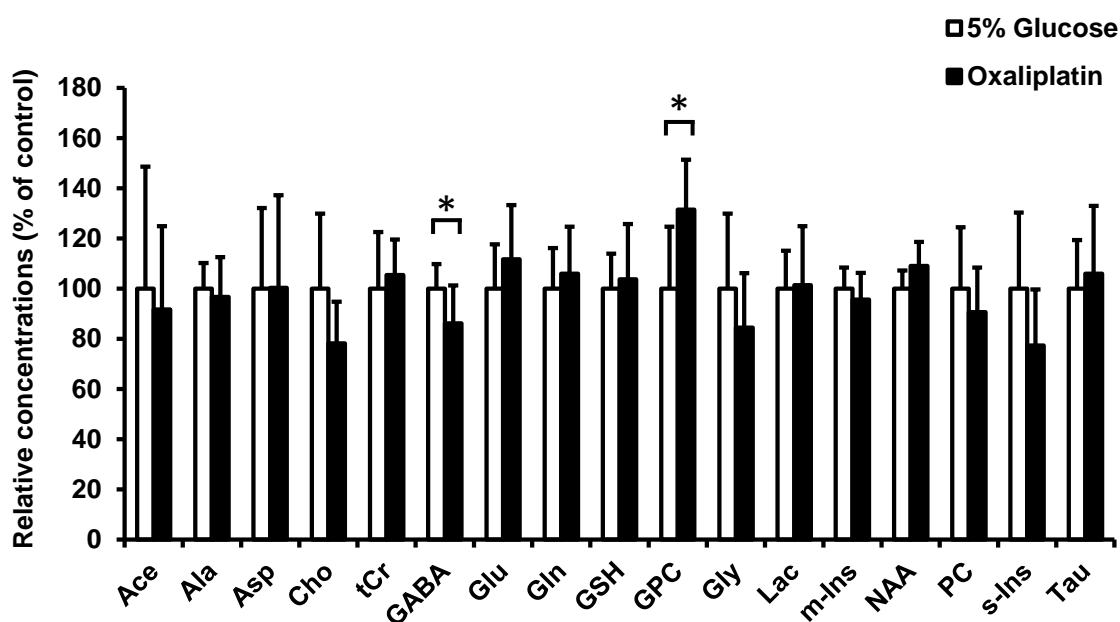


Figure 39 : Relative concentrations of 17 metabolites in the thalamus of oxaliplatin-treated rats (black bars) and controls (white bars). Data are expressed as percentage of controls (mean \pm SD). Non parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. *, $p<0.05$ ($n=8/\text{group}$).

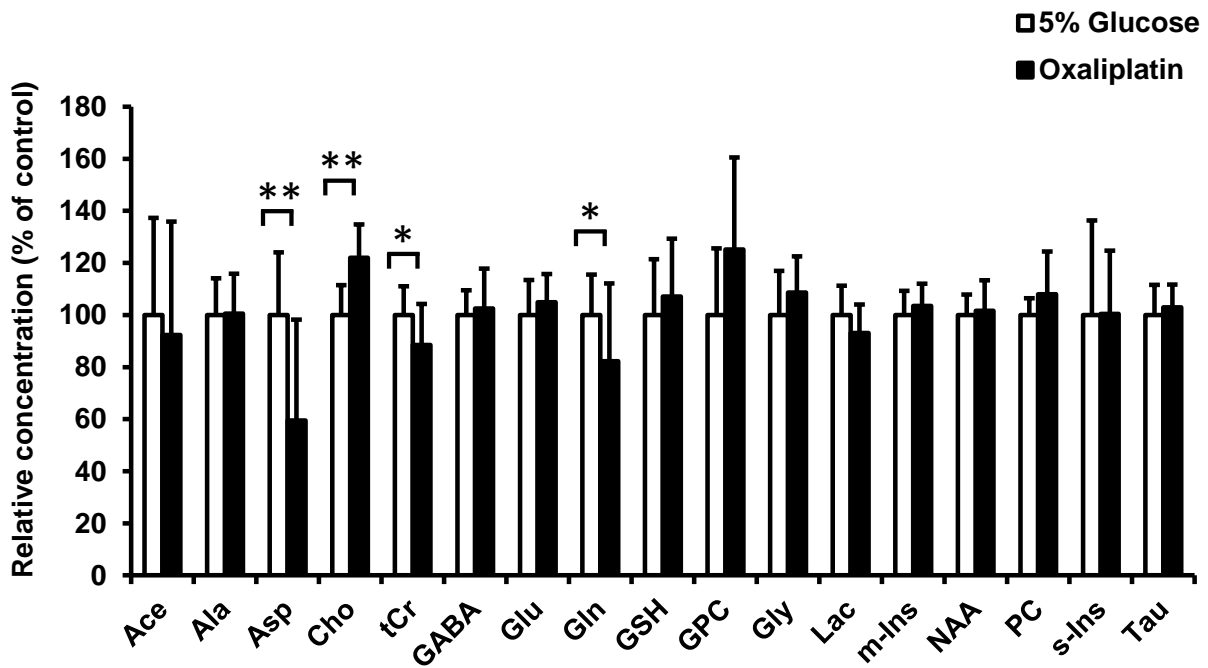


Figure 40 : Relative concentrations of 17 metabolites in the posterior insular cortex of oxaliplatin-treated rats (black bars) and controls (white bars). Data are expressed as percentage of controls (mean \pm SD). Non parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. *, $p < 0.05$ ($n = 8/\text{group}$).

In the pIC, a significant decrease in Asp (-41%, $p = 0.0063$), Cr (-11%, $p = 0.046$) and Gln (-18%, $p = 0.0209$) was observed in oxaliplatin-treated animals compared to controls, as well as a significant increase in Cho (+22%, $p = 0.0046$) (Figure 40).

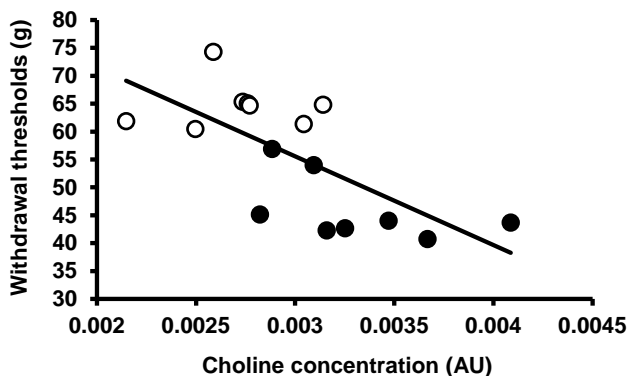


Figure 41 : Pearson linear regression showing significant correlation between mechanical withdrawal thresholds (g) and choline concentration in the posterior insular cortex in arbitrary units (AU). $R = -0.6931$, $p < 0.01$.

To determine the relationship between these neurochemical changes and the development of allodynia, linear regressions were performed for all significant metabolic variations and mechanical withdrawal thresholds at day 31. Only concentrations of Cho in the

pIC were significantly and negatively correlated with mechanical paw withdrawal thresholds assessed just before sacrifice ($R=-0.6931$, $p=0.0029$, Figure 41).

Differentially gene expression in the posterior insular cortex

The expression of 34 independent genes involved in the metabolism and neurotransmission of acetylcholine was then explored using TLDA. The different gene expression investigated and the results are summarized in Table 1. In oxaliplatin-treated rats, an increased expression of cholinergic receptors (*Chrm2*, *Chrn4* and *Chrna7*) was observed in the pIC compared to controls. The muscarinic receptor M2 (*Chrm2*) displayed the most important variation after oxaliplatin (FC=1.21). The high-affinity choline transporter CHT1 (*Slc5a7*) was also significantly up-regulated in the pIC of oxaliplatin-treated rats compared to controls. The catalytic subunit of calcineurin A (*Ppp3cb*) was also up-regulated in oxaliplatin-treated animals. On the other hand, the transcription factor AP2- μ 1 (*Ap2m1*) was slightly down-regulated compared to controls. The relative values of gene expression in oxaliplatin-treated animals compared to controls are shown in Figure 42

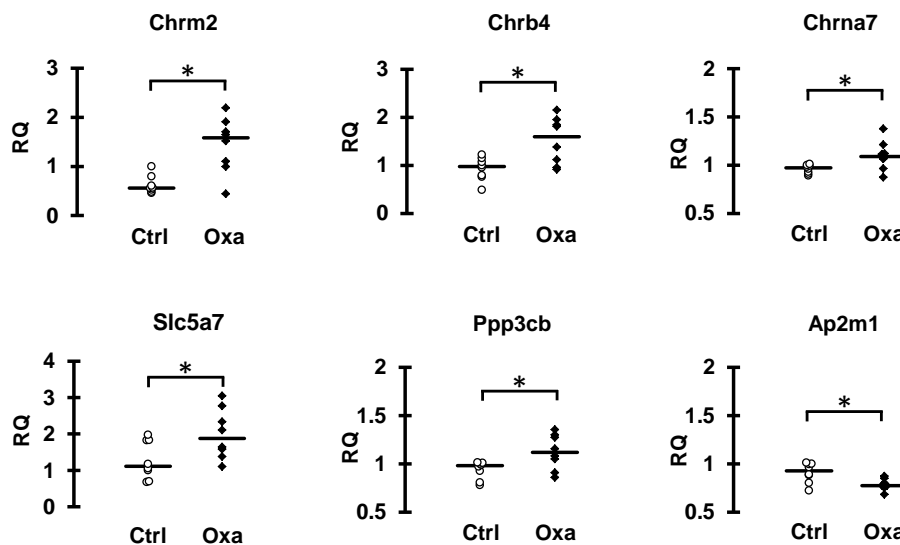


Figure 42 : Relative quantities (RQ) scatter plots of the 6 transcripts differentially expressed in the posterior insular cortex between oxaliplatin-treated animals (Oxa) and control rats (Ctrl) assessed using TLDA. The median is represented by the horizontal bar. Non parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. *, $p < 0.05$ ($n=8$ /group, in duplicate). For abbreviations, see Table 2.

Assay ID	Gene name	LocusLink Gene Name	Fold change (Log2 RQ ratios)	p value
Rn02532311_s1	<i>Chrm2</i>	cholinergic receptor, muscarinic 2	1.21	0.016
Rn00591542_m1	<i>Chrna2</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 2 (neuronal)	1.12	0.059
Rn00592317_m1	<i>Chrn3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3	0.96	0.208
Rn00583822_m1	<i>Chrn4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4	0.7	0.027
Rn00569370_m1	<i>Chrm5</i>	cholinergic receptor, muscarinic 5	0.67	0.059
Rn00585367_m1	<i>Slc5a7</i>	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7	0.64	0.046
Rn01453446_m1	<i>Chat</i>	choline O-acetyltransferase	0.56	0.294
Rn01512482_m1	<i>Nkx2-1</i>	NK2 homeobox 1	0.5	0.172
Rn00581454_s1	<i>Slc18a3</i>	solute carrier family 18 (vesicular acetylcholine), member 3	0.38	0.401
Rn00566864_m1	<i>Ppp3cb</i>	protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isozyme	0.26	0.036
Rn00596883_m1	<i>Ache</i>	acetylcholinesterase	0.23	0.115
Rn00567492_m1	<i>Chka</i>	choline kinase alpha	0.23	0.074
Rn01512605_s1	<i>Chrm4</i>	cholinergic receptor, muscarinic 4	0.22	0.172
Rn00560986_s1	<i>Chrm3</i>	cholinergic receptor, muscarinic 3	0.21	0.059
Rn00487426_g1	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	0.2	0.462
Rn00563223_m1	<i>Chrna7</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7	0.19	0.036
Rn00440861_m1	<i>Prkcg</i>	protein kinase C, gamma	0.15	0.753
Rn00567155_m1	<i>Chrna5</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5	0.13	0.401
Rn00572991_s1	<i>Jun</i>	Jun jun proto-oncogene	0.09	0.6
Rn00690508_m1	<i>Ppp3ca</i>	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	0.08	0.529
Rn00583820_m1	<i>Chrna3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3	0.07	0.753
Hs99999901_s1	<i>18S</i>	eukaryotic 18S rRNA	0.05	0.401
Rn02115682_s1	<i>Adcy1</i>	adenylate cyclase 1 (brain)	0.03	0.916
Rn01413148_m1	<i>REST</i>	RE1-silencing transcription factor (NRSF)	0.03	0.6
Rn00566216_m1	<i>Dnm2</i>	dynamamin 2	0.03	1
Rn00570733_m1	<i>Chrn2</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal)	0.002	0.916
Rn00570754_m1	<i>Cltc</i>	clathrin, heavy chain (Hc)	-0.04	0.674
Rn00820748_g1	<i>Rplp2</i>	ribosomal protein, large P2	-0.05	0.401
Rn01533872_m1	<i>Ngf</i>	nerve growth factor (beta polypeptide)	-0.11	0.282
Rn00577436_m1	<i>Chrna4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4	-0.13	0.674
Rn00589936_s1	<i>Chrm1</i>	cholinergic receptor, muscarinic 1	-0.14	0.074
Rn01514511_m1	<i>Plcb1</i>	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-0.21	0.248
Rn00587681_m1	<i>Ap2m1</i>	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	-0.21	0.016
Rn00569203_m1	<i>Isl1</i>	ISL LIM homeobox 1	-1.12	0.153
Rn01748593_m1	<i>Lhx8</i>	LIM homeobox 8	-1.39	0.462
Rn00589325_m1	<i>Chrna6</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6	nd	nd

Table 2 : Differentially expressed genes in the posterior insular cortex of oxaliplatin-treated rats compared to controls using TLDA. Data are expressed as fold changes where 0 equals no change in gene expression and 1 and -1 equal two fold up- and downregulation, respectively. Non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Pharmacological effect of muscarinic agents in the pIC on mechanical allodynia

As presynaptic muscarinic M2 receptors were overexpressed in the pIC of oxaliplatin-treated animals, effects of activation of these receptors on pain thresholds were investigated using oxotremorine (muscarinic agonist). The specific involvement of M2 receptors in the effect of oxotremorine was confirmed by using methoctramine (specific M2 antagonist). Forty four rats were confirmed to have both infusion needle track terminating within the pIC and were included in the behavioral analysis. A representative example of infusion sites locations of 20 randomly selected rats and a photomicrograph example are shown in Figure 43.

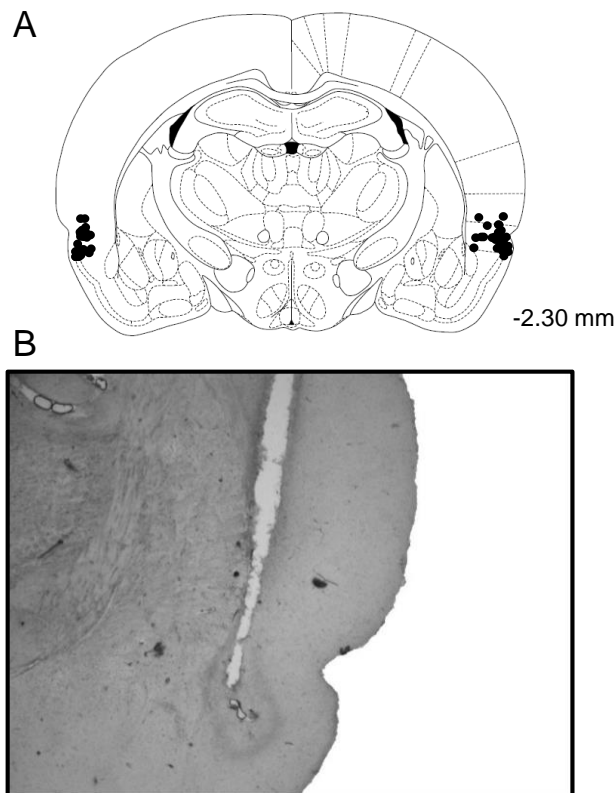


Figure 43 : Confirmation of the implantation sites. (A) Location of injection site from a random sample of 20 rats whose behavioral data were included in the statistical analysis. Coordinate is posterior to bregma. (B) Photomicrograph of a representative infusion needle track terminating in the agranular insular cortex.

Mixed models revealed a significant effect of treatment [$F(6,61)=28.73$, $p<0.001$], a significant effect of time [$F(1,61)=11.47$, $p<0.001$] and a significant interaction between time and treatment [$F(6,61)=4.715$, $p<0.001$]. Before drug (baseline values) administration in the pIC, mechanical withdrawal thresholds were significantly decreased in all groups of

oxaliplatin-treated rats ($p < 0.001$) compared to control rats. At T15 min, while oxotremorine infusion did not modify mechanical withdrawal thresholds in the control group (5% glucose), it significantly increased these thresholds in oxaliplatin-treated animals compared to vehicle-infused group ($p < 0.001$) and to baseline values ($p < 0.001$). Co-administration of methoctramine significantly prevented oxotremorine-induced antinociceptive effect in oxaliplatin-treated rats. Methoctramine alone did not modify the paw withdrawal thresholds of oxaliplatin-treated rats compared to saline-infused animals or compared to baseline values. (Figure 44)

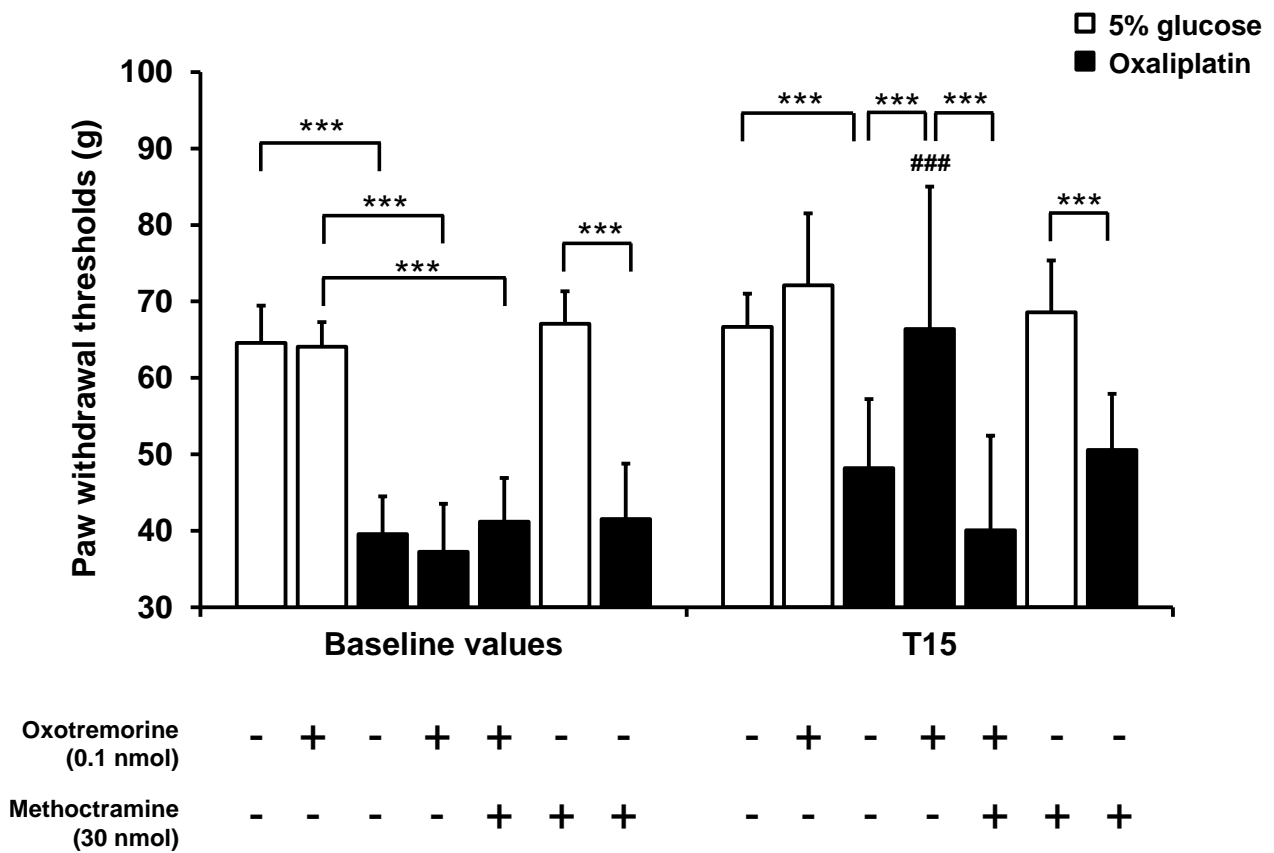


Figure 44 : Effect of oxotremorine (0.1 nmol, 0.2 μ L/side) and/or methoctramine (30 nmol, 0.2 μ L/side) infusion in the posterior insular cortex on mechanical withdrawal thresholds 15 min after the administration (T15) at day 31. Data are presented as mean \pm SD. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tuckey post hoc test. ***, $p < 0.001$; ###, $p < 0.001$ T15 vs. baseline values ($n = 3$ to 7 per group).

Discussion

The aim of this study was to investigate the neurochemical alterations that occur at the supraspinal level in an animal model of neuropathic pain induced by the chemotherapeutic agent oxaliplatin. The main result obtained in this study is the involvement of the cholinergic system of the pIC in the pathophysiology of mechanical allodynia and the ability of an M2 muscarinic receptor agonist to reverse this trouble.

Metabolic variations have been evidenced in the posterior (caudal) insular cortex which was the only cortical areas that displayed significant neurochemical changes in neuropathic rats. The insular cortex is more and more considered as a major somatosensory area for pain processing in humans [24,25]. This brain structure has also been incriminated in animal models of peripheral painful neuropathy [26,27]. Recently, a form of synaptic plasticity involving N-methyl-D-aspartate receptors has been shown in the pIC in a mouse model of neuropathic pain following peripheral nerve injury [28]. As a parallel, the metabolic variations observed in the pIC of oxaliplatin-treated animals could reflect long-lasting plastic changes involved in pain sensitization. Among the neurochemical variation in the posterior insular cortex, an increased concentration of choline was observed in oxaliplatin-treated rats compared to controls. Choline was the only metabolite that was correlated with the mechanical pain thresholds, suggesting a causal link between choline levels in the pIC and oxaliplatin-induced mechanical allodynia. Choline is a key precursor for glycerophospholipid metabolism and is therefore considered as an indicator of membrane integrity [29]. However, increased membrane breakdown would be inconsistent with the lack of variation of GPC and PC which are also increased during phospholipid catabolism [30]. On the other hand, choline is also a precursor for acetylcholine synthesis, a major neurotransmitter in the nervous system. Indeed, an increased free choline may reflect an increased synthesis of acetylcholine [31]. The neocortex receives a dense cholinergic innervation from the basal forebrain [32] that plays crucial roles in several physiological functions, ranging from attention [33] to memory [34]. Our results indicate that cortical pain processing may also be modulated by cholinergic projections. To investigate any potential alteration in acetylcholine metabolism and neurotransmission, the expression of 34 genes involved in acetylcholine synthesis was assessed. An increase expression of the high-affinity choline transporter (CHT) has been observed in the pIC of oxaliplatin-treated rats compared to controls. CHT is expressed exclusively in cholinergic neurons and is therefore used as an anatomical marker for labeling the cholinergic system [35]. CHT is essential for choline recycling which is believed to be the

rate-limiting step for acetylcholine synthesis [35,36]. As a consequence, CHT activity is considered to be a marker for cholinergic neurotransmission status [37,36]. The overexpression of CHT in the pIC of oxaliplatin-treated rats could then indicate a hyperactivity of the cholinergic system. This hypothesis is supported by the increased mRNA levels of the nicotinic receptors subunits $\alpha 7$ and $\beta 4$ and especially the muscarinic M2 receptor for which we observed the greater fold change. These receptors are predominantly presynaptic acetylcholine receptors that decrease neurotransmitter release by inhibiting adenylyl cyclase. M2 receptors activation also results in liberation of β/γ subunits which directly inhibit high-voltage calcium channels and decrease calcium influx into nerve terminals [17]. They have been shown to be expressed in excitatory neurons in the cerebral cortex, either pre- or postsynaptically [38]. Numerous studies have demonstrated the role of acetylcholine in the modulation of excitatory postsynaptic potentials in pyramidal neurons of the neocortex [39,40]. These inhibitory effects are likely to involve presynaptic M2 muscarinic receptors [40,41]. Hence, on the basis of these observations, a mechanistic hypothesis is proposed in Figure 45. We can speculate that chronic oxaliplatin neuropathy is associated with an increase of excitatory inputs in the pIC of neuropathic rats. This hypothesis is supported by the local decrease of glutamine level, the astrocyte storage form of glutamate, which could indicate an increased consumption due to excessive glutamate release. This hyperactivity of the cholinergic system (indicated by both the increased choline concentration and the increased CHT1 and M2 mRNA level) could be interpreted as a physiological feedback aiming at limiting excitatory transmission through the activation of M2 receptors located on presynaptic glutamatergic terminals. A similar mechanism has been evidenced at the spinal level in animal models of peripheral injury. In rats with diabetic neuropathy, mechanical allodynia is associated with an upregulation of muscarinic M2 receptors in the spinal cord dorsal horn and an increased antinociceptive effect of intrathecal muscarinic agonist administration [42]. Similarly, an increased expression of M2 receptors has also been evidenced in the dorsal root ganglia neurons and presumably in their central terminals in a rat model of peripheral nerve injury [43]. This upregulation could be responsible for the increased efficacy of cholinesterase inhibitors in relieving mechanical allodynia [44].

In order to determine the potential efficacy of M2 muscarinic activation in relieving pain hypersensitivity, we evaluated the effect of injection of the non-selective muscarinic agonist oxotremorine in the pIC on mechanical pain thresholds. We observed that oxotremorine, even at very low dose, completely reversed oxaliplatin-induced mechanical allodynia when evaluated 15 min after administration. To confirm the specific implication of

M2 receptors in this antinociceptive effect, oxotremorine was co-administered with methoctramine, a specific M2 antagonist. In accordance with the observed variations in M2 receptors mRNA level, methoctramine completely prevented oxotremorine-induced antiallodynic effect. However, we could not determine if this effect was long-lasting in duration due to the apparition of seizures from approximately 30 min after administration in animals receiving oxotremorine, as previously described [45]. Consistent with the involvement of M1 receptors [46], these seizures were not prevented by co-administration with methoctramine. Intracerebroventricular injection of oxotremorine has been shown to produce antinociception in mice [47]. However, in our experiment, we did not observe any analgesic effect in control rats receiving oxotremorine, suggesting a specific role of the pIC in pathological pain processing. This result is consistent with others studies which have shown that discrete lesion of the insular cortex reverse mechanical allodynia associated with peripheral nerve injury, either of the agranular or granular part, caudal or rostral [26,27]. In these studies, lesions of the insular cortex did not affect the nociceptive thresholds of normal rats.

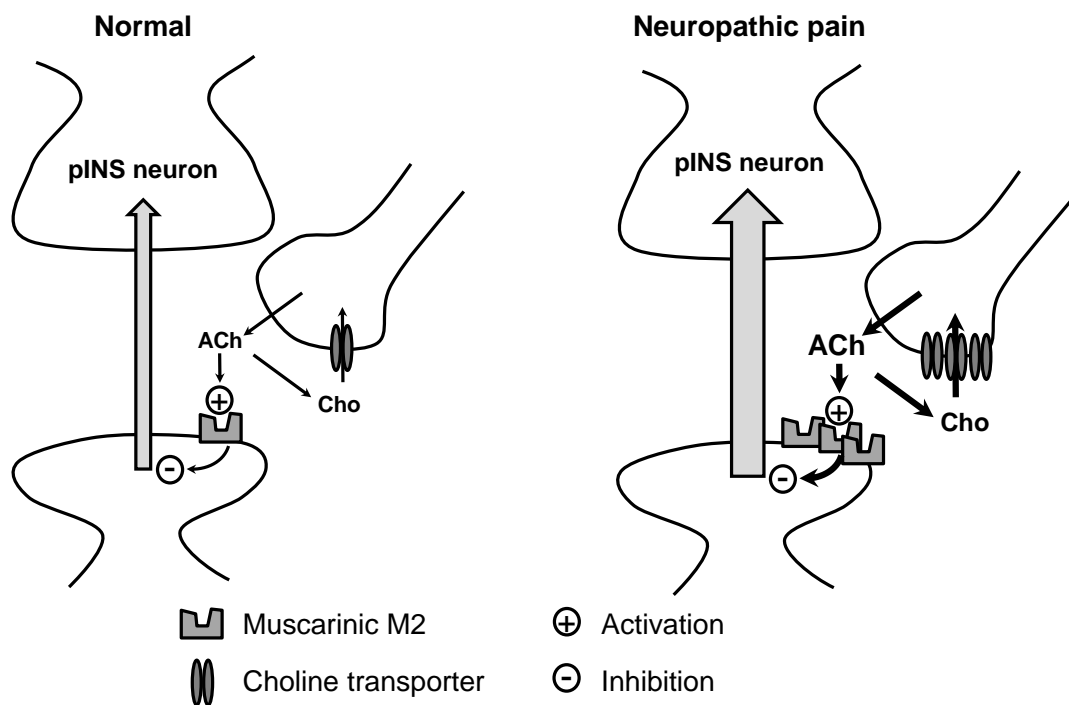


Figure 45 : Proposed mechanism regarding cholinergic regulation of pain processing in the pIC. Excitatory inputs (grey arrow) are modulated by activation of presynaptic muscarinic M2 receptors. In oxaliplatin-induced neuropathy, the cholinergic system is hyperactivated, as evidenced by the overexpression of choline transporter and M2 receptors, in order to limit nociceptive inputs.

Although our study focused on the cortical cholinergic system, some other changes were observed in the thalamus that could be potentially linked to increased pain sensitivity. An increase of GPC and a decrease of GABA concentrations were observed in the thalamus of neuropathic rats compared to controls. GABA is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system that plays crucial roles in regulating neuronal activity and plasticity [48]. A decreased concentration of GABA could underlie a reduction of the GABAergic inhibition at the thalamic level and could represent a pathological mechanism for the maintenance of pain hypersensitivity. Several lines of evidences suggest that neuropathic pain is maintained by impaired activity in the thalamus [49]. Indeed, direct electrical stimulation of the thalamus in humans can evoke painful sensations [50,51] and bursting activity in the thalamus has been evidenced in patients with neuropathic pain [52,53] as well as in rodents following peripheral nerve injury [54,55]. Furthermore, lesions that involve the thalamic ventroposterior (VP) nucleus can produce neuropathic pain [56]. In rats, chronic inflammatory pain results in a downregulation of GABA_{B(1b)} receptors in the contralateral ventrobasal nucleus and a transient upregulation in the posterior thalamic nucleus [57]. These transcriptional changes may participate to the plastic changes in the thalamus leading to increased pain processing [57]. Henderson *et al.* have shown that patients suffering from painful trigeminal neuropathy display a significant reduction of thalamic volume associated with a decreased GABA content [49]. The authors hypothesized that initial loss of neurons in the VP nucleus lead to decreased excitatory input in the thalamic reticular nucleus which in turns results in altered inhibitory GABA input in the VP. This altered activity could lead to persistent perception of pain [49]. The increased level of GPC observed in the thalamus of oxaliplatin-treated rats could be consistent with these observations. GPC is exclusively produced during phospholipid catabolism and is therefore considered as a marker of cellular membrane breakdown [30]. Consistently, increased GPC is a characteristic feature of neurodegeneration [30]. However, other experiments such as immunohistological labeling would be necessary to precise the thalamic nuclei concerned by these cellular processes, as the whole thalamus was considered in this metabolomic analysis.

In conclusion, our study describe for the first time the presence of discrete metabolic variations in the pain matrix brain areas in an animal model of chemotherapy-induced neuropathy, especially an increased choline concentration directly correlated with mechanical allodynia. We hypothesized that neuropathic pain is associated with a hyperactivation of the cholinergic system at the cortical level. As such, antinociception could be reached using local administration of an activator of inhibitory muscarinic M2 receptors which were found to be

upregulated in neuropathic rats. Hence, targeting the cholinergic system and especially M2 receptors at the supraspinal level could represent a promising and innovative strategy for the therapeutic management of oxaliplatin-induced neuropathic pain.

Acknowledgements

The authors wish to thank the jMRUI project. This work was supported by the University of Auvergne, INSERM and the local branch of the Ligue contre le Cancer [French league against cancer]. Jérémy Ferrier has received a PhD grant from the regional council of Auvergne and the European Community. The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350 (23):2343-2351
2. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E (1998) Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9 (10):1053-1071
3. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG (1998) Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 25 (2 Suppl 5):4-12
4. Tofthagen C (2010) Surviving chemotherapy for colon cancer and living with the consequences. *J Palliat Med* 13 (11):1389-1391
5. Tofthagen C, McAllister RD, McMillan SC (2011) Peripheral neuropathy in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin. *Clin J Oncol Nurs* 15 (2):182-188
6. Grothey A (2003) Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 30 (4 Suppl 15):5-13
7. Weickhardt A, Wells K, Messersmith W (2011) Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer. *Journal of oncology* 2011:201593
8. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9 (4):463-484
9. Iannetti GD, Mouraux A (2010) From the neuromatrix to the pain matrix (and back). *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 205 (1):1-12
10. Peyron R, Laurent B, Garcia-Larrea L (2000) Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology* 30 (5):263-288
11. Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR (2004) Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci* 24 (46):10410-10415
12. Burgmer M, Gaubitz M, Konrad C, Wrenger M, Hilgart S, Heuft G, Pflleiderer B (2009) Decreased gray matter volumes in the cingulo-frontal cortex and the amygdala in patients with fibromyalgia. *Psychosomatic medicine* 71 (5):566-573
13. DaSilva AF, Becerra L, Pendse G, Chizh B, Tully S, Borsook D (2008) Colocalized structural and functional changes in the cortex of patients with trigeminal neuropathic pain. *PloS one* 3 (10):e3396
14. Gustin SM, Wrigley PJ, Siddall PJ, Henderson LA (2010) Brain anatomy changes associated with persistent neuropathic pain following spinal cord injury. *Cerebral cortex* 20 (6):1409-1419
15. Kuchinad A, Schweinhardt P, Seminowicz DA, Wood PB, Chizh BA, Bushnell MC (2007) Accelerated brain gray matter loss in fibromyalgia patients: premature aging of the brain? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (15):4004-4007
16. Ling B, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F (2007) Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 128 (3):225-234
17. Krejci A, Michal P, Jakubik J, Ricny J, Dolezal V (2004) Regulation of signal transduction at M2 muscarinic receptor. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 53 Suppl 1:S131-140
18. Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition. New York: Academic Press, Spiral Bound edn.,

19. Ratiney H, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2004) Time-domain quantitation of ¹H short echo-time signals: background accommodation. *Magma* 16 (6):284-296
20. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in biomedicine* 13 (3):129-153
21. Fauvelle F, Dorandeu F, Carpentier P, Foquin A, Rabeson H, Graveron-Demilly D, Arvers P, Testylier G (2010) Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: a proton HRMAS NMR study. *Toxicology* 267 (1-3):99-111
22. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25 (4):402-408
23. Power AE, McIntyre CK, Litmanovich A, McGaugh JL (2003) Cholinergic modulation of memory in the basolateral amygdala involves activation of both m1 and m2 receptors. *Behavioural pharmacology* 14 (3):207-213
24. Garcia-Larrea L, Perchet C, Creac'h C, Convers P, Peyron R, Laurent B, Mauguiere F, Magnin M (2010) Operculo-insular pain (parasyllian pain): a distinct central pain syndrome. *Brain* 133 (9):2528-2539
25. Isnard J, Magnin M, Jung J, Mauguiere F, Garcia-Larrea L (2011) Does the insula tell our brain that we are in pain? *Pain* 152 (4):946-951
26. Benison AM, Chumachenko S, Harrison JA, Maier SF, Falci SP, Watkins LR, Barth DS (2011) Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy. *J Neurosci* 31 (17):6317-6328
27. Coffeen U, Manuel Ortega-Legaspi J, Lopez-Munoz FJ, Simon-Arceo K, Jaimes O, Pellicer F (2011) Insular cortex lesion diminishes neuropathic and inflammatory pain-like behaviours. *Eur J Pain* 15 (2):132-138
28. Qiu S, Chen T, Koga K, Guo YY, Xu H, Song Q, Wang JJ, Descalzi G, Kaang BK, Luo JH, Zhuo M, Zhao MG (2013) An increase in synaptic NMDA receptors in the insular cortex contributes to neuropathic pain. *Science signaling* 6 (275):ra34
29. Rudkin TM, Arnold DL (1999) Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. *Archives of neurology* 56 (8):919-926
30. Klein J (2000) Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *Journal of neural transmission* 107 (8-9):1027-1063
31. Wang XC, Du XX, Tian Q, Wang JZ (2008) Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat. *Neurochemical research* 33 (5):814-819
32. Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J (1988) An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25 (2):457-474
33. Yu AJ, Dayan P (2005) Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron* 46 (4):681-692
34. Banks PJ, Bashir ZI, Brown MW (2012) Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. *Hippocampus* 22 (10):2012-2031
35. Misawa H, Nakata K, Matsuura J, Nagao M, Okuda T, Haga T (2001) Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 105 (1):87-98
36. Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature reviews Neuroscience* 6 (1):48-56
37. Atweh S, Simon JR, Kuhar MJ (1975) Utilization of sodium-dependent high affinity choline uptake in vitro as a measure of the activity of cholinergic neurons in vivo. *Life sciences* 17 (10):1535-1544

38. Mrzljak L, Levey AI, Goldman-Rakic PS (1993) Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (11):5194-5198
39. Kimura F, Baughman RW (1997) Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *Journal of neurophysiology* 77 (2):709-716
40. Levy RB, Reyes AD, Aoki C (2006) Nicotinic and muscarinic reduction of unitary excitatory postsynaptic potentials in sensory cortex; dual intracellular recording in vitro. *Journal of neurophysiology* 95 (4):2155-2166
41. Xiao Z, Deng PY, Yang C, Lei S (2009) Modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in the entorhinal cortex of juvenile rats. *Journal of neurophysiology* 102 (2):659-669
42. Chen SR, Pan HL (2003) Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307 (2):676-681
43. Hayashida KI, Bynum T, Vincler M, Eisenach JC (2006) Inhibitory M2 muscarinic receptors are upregulated in both axotomized and intact small diameter dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 140 (1):259-268
44. Hwang JH, Hwang KS, Leem JK, Park PH, Han SM, Lee DM (1999) The antiallodynic effects of intrathecal cholinesterase inhibitors in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 90 (2):492-499
45. Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3 (2):154-171
46. Whalley BJ, Postlethwaite M, Constanti A (2005) Further characterization of muscarinic agonist-induced epileptiform bursting activity in immature rat piriform cortex, in vitro. *Neuroscience* 134 (2):549-566
47. Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J (2002) Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Molecular pharmacology* 62 (5):1084-1093
48. Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC, 3rd (2003) GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of neurology* 54 Suppl 6:S3-12
49. Henderson LA, Peck CC, Petersen ET, Rae CD, Youssef AM, Reeves JM, Wilcox SL, Akhter R, Murray GM, Gustin SM (2013) Chronic pain: lost inhibition? *J Neurosci* 33 (17):7574-7582
50. Davis KD, Kiss ZH, Tasker RR, Dostrovsky JO (1996) Thalamic stimulation-evoked sensations in chronic pain patients and in nonpain (movement disorder) patients. *Journal of neurophysiology* 75 (3):1026-1037
51. Lenz FA, Seike M, Richardson RT, Lin YC, Baker FH, Khoja I, Jaeger CJ, Gracely RH (1993) Thermal and pain sensations evoked by microstimulation in the area of human ventrocaudal nucleus. *Journal of neurophysiology* 70 (1):200-212
52. Hirayama T, Dostrovsky JO, Gorecki J, Tasker RR, Lenz FA (1989) Recordings of abnormal activity in patients with deafferentation and central pain. *Stereotactic and functional neurosurgery* 52 (2-4):120-126
53. Lenz FA, Kwan HC, Dostrovsky JO, Tasker RR (1989) Characteristics of the bursting pattern of action potentials that occurs in the thalamus of patients with central pain. *Brain research* 496 (1-2):357-360
54. Gerke MB, Duggan AW, Xu L, Siddall PJ (2003) Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience* 117 (3):715-722

55. Jaggi AS, Singh N (2011) Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain research* 1381:187-201
56. Kim JH, Greenspan JD, Coghill RC, Ohara S, Lenz FA (2007) Lesions limited to the human thalamic principal somatosensory nucleus (ventral caudal) are associated with loss of cold sensations and central pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (18):4995-5004
57. Ferreira-Gomes J, Neto FL, Castro-Lopes JM (2004) Differential expression of GABA(B(1b)) receptor mRNA in the thalamus of normal and monoarthritic animals. *Biochemical pharmacology* 68 (8):1603-1611

Metabolites	AMYGDALÉ			ANTÉRIEUR CINGULATE			PÉRIQUÉDUCTAL GRAY			POSTÉRIEUR INSULAIRE		
	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p
Ace	0.0014 ± 0.001	0.0017 ± 0.001	0.248	0.002 ± 0.001	0.0018 ± 0.001	0.5286	0.0021 ± 0.001	0.0026 ± 0.001	0.203	0.0014 ± 0.001	0.0013 ± 0.001	0.9164
Ala	0.004 ± 0.001	0.0040 ± 0.001	0.6744	0.0037 ± 0.001	0.004 ± 0.0005	0.1152	0.0033 ± 0.001	0.0032 ± 0.001	0.4875	0.0041 ± 0.001	0.0041 ± 0.001	0.8336
Asp	0.0054 ± 0.003	0.0049 ± 0.002	0.4622	0.0052 ± 0.003	0.0048 ± 0.001	0.5286	0.0068 ± 0.002	0.0070 ± 0.003	0.9079	0.0057 ± 0.001	0.0034 ± 0.001	0.0063
Cho	0.0022 ± 0.001	0.0025 ± 0.001	0.1415	0.0042 ± 0.001	0.0046 ± 0.001	0.1415	0.0047 ± 0.001	0.0047 ± 0.001	0.817	0.0027 ± 0.0003	0.0033 ± 0.0004	0.0046
tCr	0.0299 ± 0.006	0.0298 ± 0.004	1	0.0297 ± 0.008	0.0301 ± 0.005	1	0.0292 ± 0.003	0.0320 ± 0.005	0.2976	0.0312 ± 0.003	0.0276 ± 0.004	0.046
GABA	0.0144 ± 0.002	0.0161 ± 0.004	0.4008	0.0141 ± 0.002	0.0159 ± 0.002	0.0929	0.0254 ± 0.002	0.0246 ± 0.001	0.2472	0.0147 ± 0.001	0.0151 ± 0.002	0.7527
Glu	0.0387 ± 0.003	0.0354 ± 0.005	0.1722	0.0390 ± 0.004	0.0392 ± 0.004	0.7527	0.0246 ± 0.004	0.0253 ± 0.002	0.7285	0.0369 ± 0.005	0.0387 ± 0.004	0.3446
Gln	0.0150 ± 0.002	0.0158 ± 0.002	0.5286	0.0120 ± 0.003	0.0107 ± 0.002	0.4622	0.0091 ± 0.001	0.0102 ± 0.002	0.3545	0.0128 ± 0.002	0.0105 ± 0.003	0.0209
GSH	0.0064 ± 0.001	0.0061 ± 0.002	0.3446	0.0056 ± 0.001	0.0053 ± 0.001	0.4622	0.0045 ± 0.001	0.0045 ± 0.001	0.817	0.0053 ± 0.001	0.0057 ± 0.001	0.5286
GPC	0.0021 ± 0.000	0.0025 ± 0.001	0.248	0.0015 ± 0.001	0.0014 ± 0.001	0.5995	0.0043 ± 0.001	0.0041 ± 0.001	0.3545	0.002 ± 0.001	0.0024 ± 0.001	0.1722
Gly	0.0042 ± 0.001	0.0046 ± 0.002	0.6744	0.0073 ± 0.002	0.0081 ± 0.002	0.7527	0.0100 ± 0.001	0.0099 ± 0.001	0.9079	0.0056 ± 0.001	0.0061 ± 0.001	0.3446
Lac	0.0471 ± 0.006	0.0468 ± 0.006	0.9164	0.0422 ± 0.008	0.0401 ± 0.007	0.5995	0.0473 ± 0.005	0.0455 ± 0.009	0.2472	0.0426 ± 0.005	0.0396 ± 0.004	0.248
m-Ins	0.0415 ± 0.004	0.0428 ± 0.004	0.5286	0.0348 ± 0.005	0.0346 ± 0.003	1	0.0476 ± 0.004	0.0457 ± 0.006	0.5628	0.0383 ± 0.004	0.0396 ± 0.003	0.5286
NAA	0.0313 ± 0.002	0.0319 ± 0.003	0.5995	0.0401 ± 0.004	0.0388 ± 0.005	0.4008	0.0317 ± 0.003	0.0325 ± 0.003	0.5628	0.0359 ± 0.003	0.0365 ± 0.004	0.4622
PC	0.0048 ± 0.001	0.0044 ± 0.001	0.4622	0.0044 ± 0.001	0.0050 ± 0.001	0.248	0.0045 ± 0.001	0.0041 ± 0.001	0.2976	0.0051 ± 0.001	0.0055 ± 0.001	0.4008
s-Ins	0.0032 ± 0.001	0.0030 ± 0.001	0.8336	0.0021 ± 0.001	0.0019 ± 0.001	0.6744	0.0035 ± 0.001	0.0031 ± 0.001	0.203	0.003 ± 0.0003	0.0030 ± 0.001	0.8336
Tau	0.0230 ± 0.004	0.0207 ± 0.004	0.4008	0.0256 ± 0.003	0.0251 ± 0.005	1	0.0059 ± 0.002	0.0067 ± 0.001	0.2976	0.0267 ± 0.003	0.0275 ± 0.002	0.5995

Metabolites	PREFRONTAL			SOMATOSENSORY 1			SOMATOSENSORY 2			THALAMUS		
	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p	Control	Oxaliplatin	p
Ace	0.0016 ± 0.0003	0.0014 ± 0.001	0.5186	0.0024 ± 0.002	0.0020 ± 0.001	0.5286	0.0016 ± 0.001	0.0021 ± 0.001	0.248	0.0024 ± 0.002	0.0020 ± 0.001	0.8336
Ala	0.0048 ± 0.001	0.0046 ± 0.001	0.5186	0.0044 ± 0.0004	0.0046 ± 0.001	0.7527	0.0048 ± 0.001	0.0042 ± 0.001	0.0587	0.0044 ± 0.0004	0.0046 ± 0.001	0.4622
Asp	0.0056 ± 0.002	0.0063 ± 0.002	0.3662	0.0068 ± 0.003	0.0053 ± 0.002	0.248	0.0067 ± 0.002	0.0067 ± 0.002	0.6744	0.0068 ± 0.003	0.0053 ± 0.002	1
Cho	0.0028 ± 0.001	0.0030 ± 0.001	0.5186	0.0046 ± 0.002	0.0037 ± 0.002	0.2076	0.0039 ± 0.002	0.0041 ± 0.001	0.6744	0.0046 ± 0.002	0.0037 ± 0.002	0.1722
tCr	0.0314 ± 0.004	0.0348 ± 0.003	0.0528	0.0307 ± 0.008	0.0333 ± 0.006	0.4622	0.0336 ± 0.006	0.0317 ± 0.006	0.4008	0.0307 ± 0.008	0.0333 ± 0.006	0.9164
GABA	0.0157 ± 0.002	0.0150 ± 0.002	0.6056	0.0179 ± 0.005	0.0152 ± 0.001	0.1722	0.0168 ± 0.001	0.0168 ± 0.003	0.9164	0.0179 ± 0.005	0.0152 ± 0.001	0.0357
Glu	0.0412 ± 0.005	0.0424 ± 0.003	0.5186	0.0364 ± 0.008	0.0388 ± 0.005	0.6744	0.0364 ± 0.006	0.0333 ± 0.003	0.4622	0.0364 ± 0.008	0.0388 ± 0.005	0.4622
Gln	0.0132 ± 0.002	0.0150 ± 0.003	0.2453	0.0133 ± 0.003	0.0139 ± 0.001	0.4008	0.0121 ± 0.001	0.0125 ± 0.002	0.6744	0.0133 ± 0.003	0.0139 ± 0.001	0.5286
GSH	0.0060 ± 0.002	0.0058 ± 0.001	0.8973	0.0054 ± 0.002	0.0061 ± 0.001	0.5286	0.0050 ± 0.001	0.0046 ± 0.001	0.4622	0.0054 ± 0.002	0.0061 ± 0.001	0.4008
GPC	0.0012 ± 0.0003	0.0015 ± 0.0004	0.1967	0.0010 ± 0.0004	0.0013 ± 0.001	0.2936	0.0010 ± 0.0004	0.0012 ± 0.001	0.5995	0.0010 ± 0.0004	0.0013 ± 0.001	0.0357
Gly	0.0061 ± 0.001	0.0066 ± 0.001	0.5186	0.0081 ± 0.006	0.0067 ± 0.003	0.6744	0.0060 ± 0.002	0.0072 ± 0.002	0.3446	0.0081 ± 0.006	0.0067 ± 0.003	0.248
Lac	0.0460 ± 0.008	0.0446 ± 0.007	0.8973	0.0429 ± 0.005	0.0447 ± 0.009	0.6744	0.0432 ± 0.006	0.0444 ± 0.013	0.6744	0.0429 ± 0.005	0.0447 ± 0.009	0.6744
m-Ins	0.0284 ± 0.004	0.0281 ± 0.003	0.8973	0.0322 ± 0.007	0.0287 ± 0.006	0.4008	0.0301 ± 0.004	0.0313 ± 0.005	0.5995	0.0322 ± 0.007	0.0287 ± 0.006	0.7527
NAA	0.0403 ± 0.005	0.0367 ± 0.002	0.0933	0.0417 ± 0.008	0.0457 ± 0.003	0.2936	0.0471 ± 0.005	0.0471 ± 0.003	0.5995	0.0417 ± 0.008	0.0457 ± 0.003	0.0587
PC	0.0045 ± 0.001	0.0044 ± 0.001	0.7963	0.0042 ± 0.001	0.0035 ± 0.001	0.3446	0.0036 ± 0.001	0.0042 ± 0.001	0.4622	0.0042 ± 0.001	0.0035 ± 0.001	0.4622
s-Ins	0.0018 ± 0.001	0.0016 ± 0.001	0.6985	0.0018 ± 0.001	0.0013 ± 0.001	0.4622	0.0015 ± 0.001	0.0017 ± 0.001	0.8336	0.0018 ± 0.001	0.0013 ± 0.001	0.0929
Tau	0.0266 ± 0.001	0.0254 ± 0.003	0.5186	0.0193 ± 0.006	0.0196 ± 0.003	0.4622	0.0197 ± 0.003	0.0194 ± 0.002	0.6744	0.0193 ± 0.006	0.0196 ± 0.003	0.9164

Supplementary Table 1 : Metabolites composition of various brain areas in oxaliplatin-treated animals and controls (in normalized arbitrary units).

Data are expressed as mean ± SD. Abbreviations: Ace, acetate; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; GABA, γ -aminobutyric acid; Glu, glutamate; Gln, glutamine; GSH, glutathione; GPC, glycerophosphocholine; Gly, glycine; Lac, lactate; m-Ins, myo-inositol; NAA, N-acetylaspartate; PC, phosphocholine; s-Ins, scyllo-inositol; Tau, taurine; tCr, total creatine. Statistical differences between groups were assessed using the non parametric Mann-Whitney Wilcoxon test (n=8/group).

III.2. Données complémentaires

III.2.1. Matériels et méthodes

Animaux

Les expérimentations ont été menées sur des rats mâles Sprague-Dawley pesant 150 à 175 grammes en début d'étude (Charles River, Saint-Aubin-lès-Elbeuf, France). Les rats ont été répartis dans des cages en plastique à raison de 3 rats par cage. Les cages ont été entreposées dans une salle climatisée à $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une hygrométrie contrôlée (50%), un éclairage cyclique jour/nuit de 12 heures et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les rats ont bénéficié d'une semaine d'acclimatation avant le début des expérimentations. Durant cette période, ils sont habitués aux conditions d'hébergement et à la préhension par le manipulateur effectuant les tests. L'expérimentation animale est pratiquée dans le respect de la législation européenne (directive du Conseil de l'Europe 86/669/EEC du 24 novembre 1986) et les procédures utilisées ont été validées par le comité d'éthique local (CEMEAA- Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale – Auvergne).

Produits

L'oxaliplatine (Leancare, Royaume-Uni) a été dissout dans une solution de glucose 5% (Freeflex[®], Fresenius Kabi, France) à la concentration de 2 mg/mL afin d'obtenir un volume injectable de 1 mL/kg. L'oxaliplatine a été administré par voie intraveineuse à la dose de 2 mg/kg, deux fois par semaine (lundi et vendredi) pendant 4,5 semaines (9 administrations, dose cumulée : 18 mg/kg) (Ling et al., 2007a). Les animaux du groupe contrôle ont reçu l'administration de glucose 5% par la même voie.

Le donépézil (Chlorhydrate de donépézil, Aricept[®] cp 10 mg, Pfizer) a été réduit en fine poudre à l'aide d'un pilon et d'un mortier puis suspendu dans de l'eau contenant 0,5% de carboxyméthylcellulose (Sigma-Aldrich, France) afin d'obtenir une solution à 4 mg/mL (volume d'administration : 2,5 ml/kg). Le donépézil a été administré par voie orale (po) à la dose de 5 ou 10 mg/kg. Les animaux du groupe contrôle ont reçu l'administration de carboxyméthylcellulose à 0,5% par la même voie.

Test comportementaux

Test du Rotarod

Le Rotarod (Bioseb[®], Chaville, France) permet l'évaluation de la coordination motrice des rats et de mettre en évidence l'effet sédatif d'un composé pharmacologique. Il est constitué d'une barre horizontale tournant autour de son axe longitudinal. La vitesse de rotation accélère de 4 à 40 tours par minutes sur une durée de 5 minutes. On mesure alors la latence de chute de l'animal sur la barre en 3 sessions consécutives. Les animaux doivent être habitués aux tests en respectant le protocole d'entraînement suivant. Les animaux sont maintenus sur la barre immobile pendant une durée de 5 minutes. Puis les animaux sont habitués à rester sur la barre tournant à une vitesse constante de 4 tours par minutes pendant 5 minutes. Ce protocole d'habituation est réalisé plusieurs fois par jour avant le début du test. L'évaluation de la coordination motrice a été évaluée sur des rats sains, 30 min après l'administration de donépézil (10 mg/kg ou 5 mg/kg) ou de véhicule.

Test du Von Frey électronique

L'appareil du Von Frey électronique (Bioseb[®], Chaville, France) comporte un manche portatif constitué d'une pointe en plastique reliée à un capteur de force. Les rats sont placés dans des boîtes en plexiglas (30cm x 30cm x 25cm) sans fond, disposées sur un support grillagé surélevé. Après une période d'habituation des rats pendant 15 minutes, on applique la pointe perpendiculairement au centre des 5 coussinets plantaires de chaque patte postérieure. La pression appliquée est augmentée graduellement jusqu'à provoquer un réflexe de flexion de la patte. L'intensité du stimulus, pression maximale appliquée (exprimée en grammes), est automatiquement enregistrée par l'appareil lors du retrait de la patte. La valeur correspond au seuil nociceptif mécanique (allodynie/hyperalgie) de l'animal.

Test d'immersion de la queue

La queue des rats est immergée dans un bain d'eau froide (10°C). L'immersion est maintenue jusqu'à ce que l'animal retire sa queue. La latence du retrait est mesurée à l'aide d'un chronomètre à pied, le cut-off étant fixé à 15 secondes. Trois mesures sont réalisées à 15 minutes d'intervalle minimum. Le calcul de la moyenne et de l'écart-type des 3 mesures est ensuite réalisé. Avant le début du test, chaque rat est habitué à la préhension afin qu'il ne manifeste aucune réaction d'aversion, de lutte ou de mouvement de la queue pendant 15 secondes, dans des conditions où aucune stimulation n'est appliquée.

Test de préférence de place conditionnée

L'appareil du test (Imetronic, Pessac, France) se présente sous la forme d'un chariot de 3 boîtes identiques formées par 2 compartiments latéraux (15x15x20 cm) reliés par une allée centrale (5x15x20cm). Deux portes coulissantes séparent l'allée des chambres. Chaque compartiment latéral présente un environnement différent matérialisé par une géométrie (2 prismes en plexiglas de bases triangulaires (5x7x19cm)) et une texture du sol différentes (grilles métalliques avec des cercles pour l'un et un sol en plexiglas lisse pour l'autre compartiment). Deux cellules photo infrarouges sont présentes dans chaque compartiment et détectent la présence et les mouvements de l'animal. Les données (temps passé dans chaque compartiment) sont récupérées et traitées par le logiciel fourni (Imetronic, Pessac, France).

La procédure du test de préférence de place conditionnée se présente en 3 étapes. L'étape du **pré-test** consiste à placer l'animal dans l'allée centrale de l'appareil avec un accès libre aux 2 compartiments. Le temps passé dans chaque compartiment est mesuré pendant 15 minutes. Suite à cette étape, un des deux compartiments sera associé de manière aléatoire à la prise de donépézil ou de véhicule. Durant la **phase de conditionnement**, les animaux sont confinés dans un compartiment après administration de donépézil (5 mg/kg, po). Le lendemain, ils sont confinés dans l'autre compartiment après administration du véhicule. Cette opération dure 6 jours et a pour but l'association des effets intéroceptifs de l'antalgique avec un environnement particulier. Le jour du **test**, l'animal est placé dans la zone intermédiaire avec libre accès aux deux compartiments. Durant cette phase de test, l'animal ne reçoit aucune injection. Une augmentation du temps passé dans le compartiment associé à l'antalgique est révélateur de la valeur renforçante de cette molécule, à savoir un soulagement de la douleur tonique.

Test d'interaction sociale

Ce test se déroule dans une arène en plastique opaque (75 x 75 x 45 cm) éclairée par une source lumineuse de 30 lux. La variable étudiée correspond au temps passé par deux rats en interaction sociale (reniflage, poursuite, toilettage,...). Une augmentation de ces interactions indique un effet anxiolytique, alors qu'une diminution indique un effet anxiogène. Le comportement d'un rat influençant celui de l'autre, le couple d'animaux testés est composé de deux rats semblables en termes de statut douloureux et pharmacologique. Au début de l'expérimentation, les deux animaux sont placés à deux coins opposés de l'arène, puis l'expérimentateur quitte la salle. Le comportement des animaux est enregistré à l'aide d'une caméra et le temps passé en interactions sociales est comptabilisé pendant 10 minutes. Entre deux tests, l'arène est rapidement nettoyée avec un chiffon humide afin de répartir les odeurs des rats précédents.

Méthodologie et statistiques

Les expérimentations ont été réalisées en aveugle vis-à-vis des traitements. Les traitements ont été randomisés entre les animaux d'une même cage à l'aide de table de permutation à 4 éléments pour l'attribution des traitements : oxaliplatine ou glucose 5%, donépézil ou véhicule.

Evaluation de l'effet du donépézil sur la coordination motrice :

Un lot de 24 rats a été utilisé pour cette étude. Une semaine après leur arrivée, les animaux ont été habitués à la préhension ainsi qu'au dispositif du rotarod selon le protocole d'entraînement explicité dans la méthode. Le jour du test, les traitements (donépézil 10 mg/kg, 5 mg/kg ou véhicule, po) ont été randomisés dans chaque cage. Le test a ensuite été réalisé 1 h après l'administration.

Evaluation de l'effet aigu du donépézil sur les troubles nociceptifs chroniques induits par l'oxaliplatine :

Un lot de 32 rats a été utilisé dans cette étude. Quelques jours avant le début des tests, les animaux ont été habitués à la salle d'expérimentation, aux différents appareils ainsi qu'à la préhension. Les troubles neuropathiques ont été induits par 9 administrations d'oxaliplatine à 2 mg/kg à J0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 pour la moitié des rats. Les différents tests de nociception (von Frey électronique et immersion de la queue à 10°C) ont été réalisés à J0 (avant l'administration d'oxaliplatine ou de glucose 5%) puis à J31, à la fin du protocole d'induction. Les traitements ont ensuite été randomisés dans chaque cage. Le von Frey électronique et l'immersion de la queue ont ensuite été réalisés à 30 min, 1 h et 2 h après l'administration de donépézil ou du véhicule.

Evaluation de l'effet préventif du donépézil sur les troubles nociceptifs induits par l'oxaliplatine :

Un troisième lot de 32 rats a été utilisé dans cette étude. Après habituation aux tests, les troubles neuropathiques ont été induits par 9 administrations d'oxaliplatine à 2 mg/kg à J0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 pour la moitié des rats. Les traitements (donépézil ou véhicule) ont été randomisés dans chaque cage, et instaurés à J15, c'est-à-dire à l'apparition des symptômes neuropathiques. Les animaux ont reçu 2 administrations (matin et soir) de donépézil (5 mg/kg, po) ou de véhicule pendant deux semaines. Le test du von Frey électronique a été réalisé à J0, 4, 10, 13, 20, 24 et 27. Le test d'immersion de la queue à 10°C a été réalisé à J0, J7, J14, J21, J25 et J28.

Evaluation de l'effet du donépézil sur la douleur spontanée :

Un quatrième lot de 20 rats a été utilisé pour cette étude. Le test de préférence de place conditionnée a été réalisé pendant le protocole d'administration de l'oxaliplatine ou du véhicule de l'oxaliplatine, en aveugle vis-à-vis des traitements. L'étape du pré-test a été réalisée à J21, le conditionnement de J22 à J27 et le test à J28.

Evaluation de l'effet du donépézil sur l'anxiété associée à la neurotoxicité de l'oxaliplatine :

Un cinquième lot de 62 rats a été utilisé pour cette étude. Le test d'interaction sociale a été réalisé à J31, à la fin du protocole d'administration de l'oxaliplatine ou de son véhicule. Le donépézil (5 mg/kg, po) ou le véhicule ont été administrés 30 min avant le test.

Analyse statistique :

Pour les tests de nociception, afin de comparer l'évolution de chaque paramètre dans le temps en fonction des traitements, une ANOVA à mesures répétées (2 facteurs) utilisant les modèles mixtes a été réalisée afin de déterminer les effets du temps et du traitement. Les modèles mixtes sont considérés comme plus robustes vis-à-vis des données manquantes et du contrôle de la non-indépendance des données répétées (variabilité intra-sujet). Si une interaction significative entre le facteur temps et le facteur groupe est observée, une ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc de Tukey est réalisée à chaque temps pour mettre en évidence les différences entre les groupes. La normalité de la distribution a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk et la sphéricité par le test de Mauchly. La moyenne et les écart-types ont été calculés pour chaque groupe de traitement.

Pour les tests du rotarod, d'interaction sociale et de préférence de place conditionnée, l'analyse des données a été réalisée en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le seuil de significativité α est fixé à 5%. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT software (AddinsoftTM) v.2013.3.03.

III.2.2. Résultats

Effet du donépézil sur la coordination motrice :

Les résultats du test du rotarod sont présentés sur la Figure 46. Une différence significative du temps de latence de chute de la barre en rotation a été mise en évidence entre les différents groupes ($p=0,031$). Une diminution de la latence de chute (-36%, $p=0,010$) a été observée chez les rats ayant reçu la plus forte dose de donépézil (10 mg/kg) par rapport aux animaux traités par le véhicule 1 h après l'administration. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les rats ayant reçu le donépézil à 5 mg/kg et les animaux ayant reçu le véhicule.

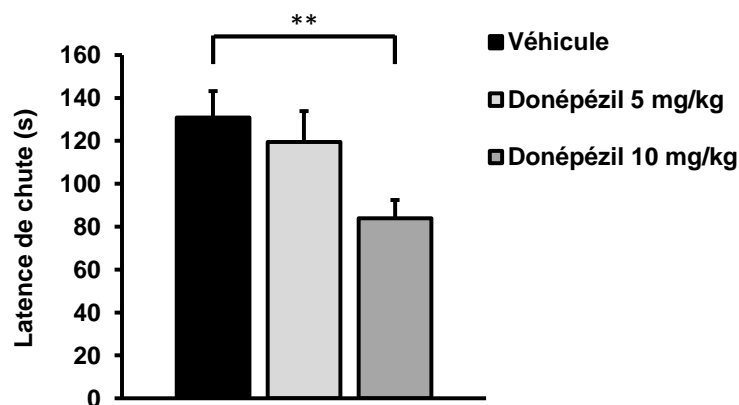


Figure 46 : Effet d'une administration de donépézil sur la coordination motrice 1 h après l'administration. Les résultats correspondent aux latences de chute de la barre en rotation (s) pour chaque groupe (moyennes + ESM). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis. **, $p < 0,01$ ($n=8$ par groupe).

La dose de 5 mg/kg ne semble donc pas induire de troubles de la coordination motrice ou de sédation, contrairement à la dose de 10 mg/kg. La dose de 5 mg/kg a donc été préférée pour la suite des expérimentations.

Evaluation de l'effet aigu du donépézil sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine :

L'effet d'une administration de donépézil (5mg/kg, po) sur l'allodynie mécanique statique évaluée à J31 par le test du von Frey électronique est présenté sur la Figure 47-A. L'analyse des modèles mixtes a révélé un effet significatif du temps ($F[85,4]=4,898$; $p=0,0013$), du traitement ($F[85,3]=65,140$; $p < 0,001$) ainsi qu'une interaction significative entre le temps et le traitement ($F[85,12]=6,205$; $p < 0,001$). Les animaux traités par l'oxaliplatine ont montré une diminution significative du seuil de retrait de la patte ($p < 0,001$) à J31 (T0) comparés aux animaux contrôles.

Cette allodynie est également retrouvée 30 min ($p<0,01$), 1 h ($p<0,001$) et 2 h ($p<0,01$) pour les animaux ayant reçu le véhicule du donépézil. A l'inverse, les animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu une administration de donépézil présentent une augmentation du seuil de retrait de la patte à 30 min (+40%, $p<0,001$) et à 1h (+43%, $p<0,001$) après l'administration par rapport aux animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu une administration du véhicule. Les seuils de retrait de la patte de ces animaux redeviennent significativement différents des animaux contrôles traités par le donépézil ($p<0,01$) 2 h après l'administration de donépézil,

L'effet du donépézil sur l'allodynie au froid évaluée à J31 par le test d'immersion de la queue est présenté sur la Figure 47-B. L'analyse des modèles mixtes a révélé un effet significatif du temps ($F[85,4]=9,067$; $p<0,001$), du traitement ($F[85,3]=11,012$; $p<0,001$) ainsi qu'une interaction significative entre le temps et le traitement ($F[85,12]=5,249$; $p<0,001$). Les animaux traités par l'oxaliplatine ont montré une diminution significative de la latence de retrait de la queue ($p<0,05$) à J31 (T0) comparés aux animaux contrôles. Cette allodynie est également retrouvée 30 min ($p<0,01$), 1 h ($p<0,001$) et 2 h ($p<0,01$) pour les animaux ayant reçu le véhicule du donépézil. A l'inverse, les animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu une administration de donépézil présentent une augmentation de la latence de retrait de la queue à 30 min (+65%, $p<0,05$) et à 1 h (+71%, $p<0,01$) après l'administration par rapport aux animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu une administration du véhicule.

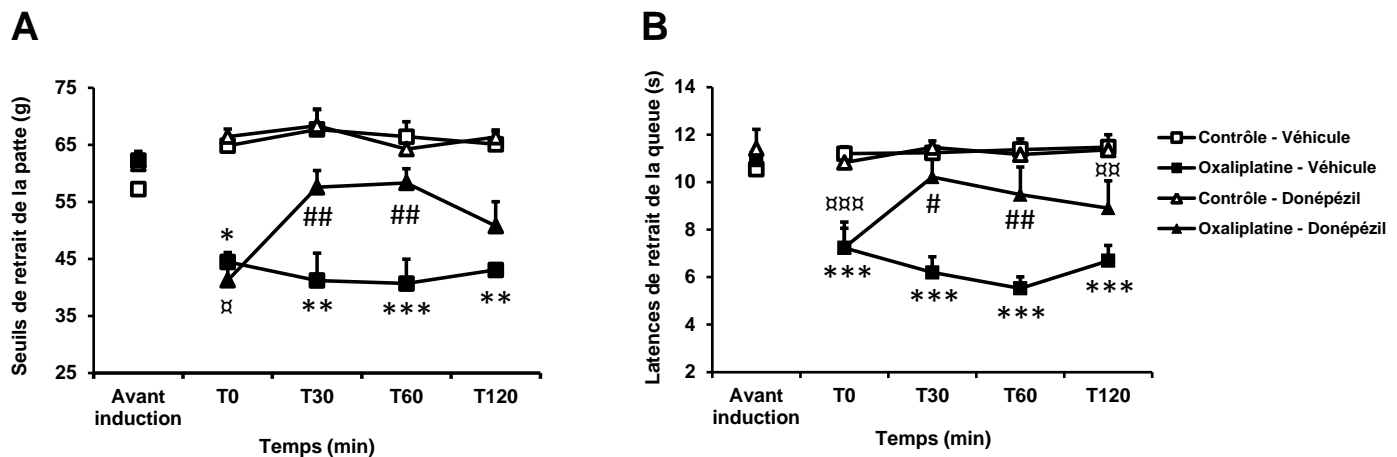


Figure 47 : Effet d'une administration de donépézil (5 mg/kg, po) sur (A) l'allodynie mécanique statique et (B) l'allodynie au froid induite par l'administration répétée d'oxaliplatine (moyennes + ESM). L'administration de donépézil (ou de véhicule) a été réalisée à J31 après la 1^{ère} injection d'oxaliplatine. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de Tuckey. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ Oxaliplatine/Véhicule vs. Contrôle/Véhicule. ▫, $p<0,05$; ▫▫, $p<0,01$; ▫▫▫, $p<0,001$ Oxaliplatine/Donépézil vs. Contrôle/Donépézil. #, $p<0,05$; ##, $p<0,01$ Oxaliplatine/Donépézil vs. Oxaliplatine/Véhicule ($n=8$ par groupe).

Evaluation de l'effet préventif d'un traitement chronique au donépézil sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine :

L'effet d'un traitement chronique au donépézil (5 mg/kg po, deux fois par jours pendant deux semaines) sur l'évolution de l'allodynie mécanique statique évaluée par le test du von Frey électronique est présenté sur la Figure 48-A. L'analyse des modèles mixtes a révélé un effet significatif du temps ($F[224,6]=13,895$; $p<0,001$), du traitement ($F[224,3]=29,015$; $p<0,001$) ainsi qu'une interaction significative entre le temps et le traitement ($F[224,18]=8,325$; $p<0,001$). A J13 (avant l'administration de donépézil), les animaux traités par l'oxaliplatine présentent une diminution significative des seuils de retrait de la patte comparés aux animaux contrôles ($p<0,05$). Cette allodynie s'intensifie chez les animaux ayant reçu le véhicule du donépézil, devenant plus significative à partir de J20 (-24%, $p<0,01$) et persistant jusqu'à J27 (-47%, $p<0,001$). A l'inverse, les animaux traités par l'oxaliplatine et ayant reçu le donépézil présentent des seuils de retrait de la patte comparables aux animaux contrôles, jusqu'à la fin de l'étude. Les seuils de ces animaux sont significativement différents des animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu le véhicule à partir de J21 ($p<0,01$) et jusqu'à J27 ($p<0,001$).

L'effet d'un traitement chronique au donépézil sur l'allodynie au froid évaluée par le test d'immersion de la queue à 10°C est présenté sur la Figure 48-B. L'analyse des modèles mixtes a révélé un effet significatif du temps ($F[192,3]=5,178$; $p<0,001$), du traitement ($F[192,3]=27,072$; $p<0,001$) ainsi qu'une interaction significative entre le temps et le traitement ($F[224,15]=6,585$; $p<0,001$). A J21, une diminution significative de la latence de retrait de la queue a été mise en évidence chez les animaux traités par l'oxaliplatine et recevant le véhicule du donépézil ($p<0,01$). Cette allodynie s'intensifie à J25, devenant plus significative ($p<0,001$) et persiste jusqu'à J28 ($p<0,001$). A l'inverse, les animaux traités par l'oxaliplatine et ayant reçu le donépézil présentent des latences de retrait de la queue comparables aux animaux contrôles, jusqu'à la fin de l'étude. Les seuils de ces animaux sont significativement différents des animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu le véhicule à partir de J25 ($p<0,05$) et jusqu'à J28 ($p<0,001$).

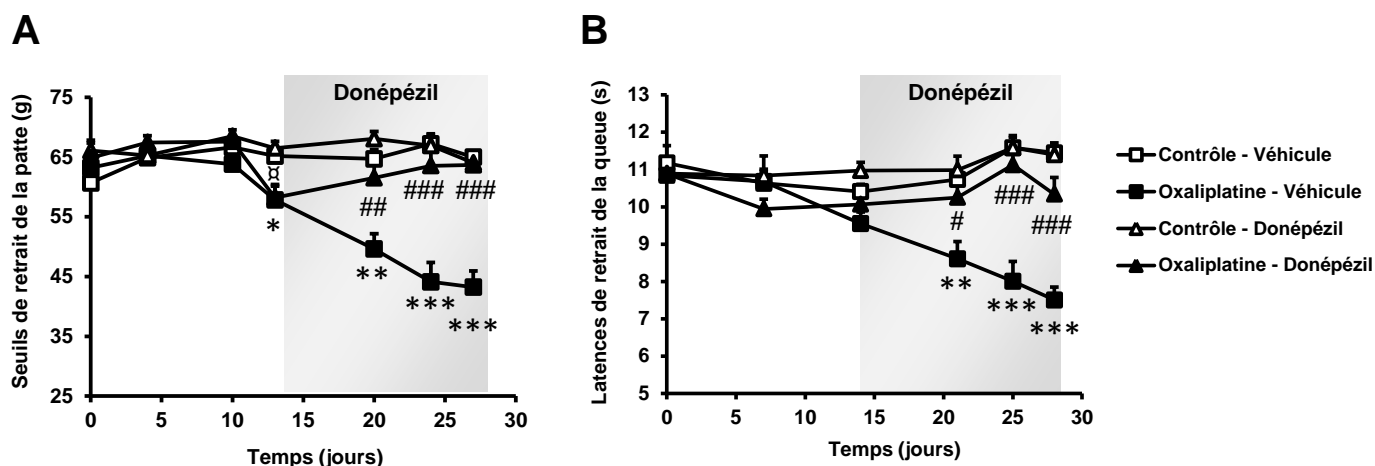


Figure 48 : Effet préventif d'un traitement chronique au donépézil (5 mg/kg, 2 fois par jour) sur (A) l'allodynie mécanique statique et (B) l'allodynie au froid induites par l'administration répétée d'oxaliplatine (moyennes + ESM). La zone grisée correspond à la période de traitement par le donépézil ou son véhicule. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de Tuckey. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ Oxaliplatine/Véhicule vs. Contrôle/Véhicule. ⚡, $p < 0,05$ Oxaliplatine/Donépézil vs. Contrôle/Donépézil. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ Oxaliplatine/Donépézil vs. Oxaliplatine/Véhicule ($n=8$ par groupe).

Evaluation de l'effet du donépézil sur la douleur spontanée :

Les résultats du test de préférence de place conditionnée par l'administration de donépézil (5 mg/kg po) sont présentés sur la Figure 49. Les animaux n'ont pas développé de préférence pour le compartiment associé au donépézil quel que soit le traitement reçu (oxaliplatine ou glucose 5%). Aucune variation du temps passé dans le compartiment associé au donépézil n'a été mise en évidence entre le test et le pré-test (avant et après conditionnement), que ce soit pour les animaux contrôles ou les animaux traités par l'oxaliplatine.

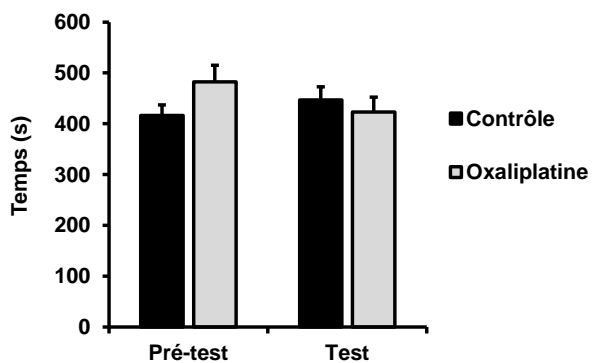


Figure 49 : Effet du donépézil (5 mg/kg, po) sur la douleur spontanée. Les résultats correspondent au temps passé dans le compartiment associé au donépézil le jour du pré-test (avant conditionnement) et le jour du test (après conditionnement) (moyennes + ESM). ANOVA à mesures répétées ($n=10$ par groupe).

Evaluation de l'effet du donépézil sur l'anxiété :

L'effet d'une administration de donépézil (5mg/kg po) sur l'anxiété associée à la neuropathie induite par l'oxaliplatine et évaluée par le test d'interaction sociale est présenté sur la Figure 50. Une différence significative du temps passé en interaction a été mise en évidence entre les différents groupes ($p=0,0015$). Une diminution significative du temps d'interaction sociale a été observée chez les animaux traités par oxaliplatine ayant reçu le véhicule du donépézil comparés aux animaux contrôles ayant également reçu le véhicule (-27%, $p<0,01$). Aucune variation de ce paramètre n'a été observée chez les animaux contrôles ayant reçu le donépézil ou son véhicule. En revanche, aucune diminution du temps d'interaction sociale n'a été mise en évidence chez les animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu le donépézil par rapport aux animaux contrôles. Le temps passé en interaction était significativement plus élevé que les animaux traités par l'oxaliplatine ayant reçu le véhicule du donépézil (+24%, $p<0,01$).

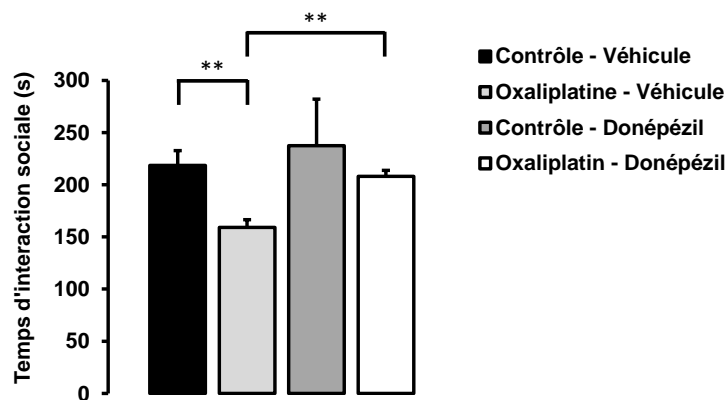


Figure 50 : Effet d'une administration de donépézil (5 mg/kg, po) sur l'anxiété induite par l'administration répétée d'oxaliplatine. Les résultats correspondent au temps passé en interaction sociale à J31 après la première injection d'oxaliplatine (moyennes + ESM). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis. **, $p<0,01$ ($n=4$ à 14 par groupe).

III.3. Discussion

L'analyse métabolomique des structures cérébrales impliquées dans la douleur a permis de mettre en évidence des altérations neurochimiques dans un modèle animal de neuropathie périphérique induite par l'administration répétée d'oxaliplatine. Ces variations métaboliques permettent de préciser les mécanismes physiopathologiques au niveau supraspinal impliqués dans le maintien de la douleur neuropathique, et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les variations métaboliques au niveau du thalamus indiquent une altération potentielle des interneurons GABAergiques.

Parmi les huit structures cérébrales évaluées dans cette étude, les variations métaboliques observées étaient restreintes à deux structures : le thalamus et le cortex insulaire postérieur (caudal). Une augmentation des concentrations en glycérophosphocholine (GPC) et une diminution des concentrations en GABA ont été mises en évidence chez les animaux neuropathiques par rapport aux animaux sains. Le GABA est un neurotransmetteur majeur du système nerveux central qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité neuronale et la plasticité synaptique (Wong et al., 2003). Une diminution des taux de GABA peut indiquer une réduction de l'inhibition GABAergique au niveau thalamique. Ce mécanisme physiopathologique pourrait être potentiellement lié au maintien de l'hypersensibilité douloureuse dans ce modèle. Plusieurs données de la littérature convergent vers l'implication d'une altération de l'activité des neurones thalamiques dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques (Henderson et al., 2013). En effet, la stimulation directe du thalamus peut éliciter des sensations douloureuses chez l'Homme (Davis et al., 1996, Lenz et al., 1993) et une augmentation des décharges de potentiels d'action en rafale a été mise en évidence chez les patients souffrant de douleur neuropathique (Hirayama et al., 1989, Lenz et al., 1989) ainsi que dans des modèles animaux de neuropathie traumatique (Gerke et al., 2003, Jaggi and Singh, 2011). En outre, des lésions impliquant le noyau ventro-postérieur thalamique (VP) peuvent provoquer des douleurs neuropathiques (Kim et al., 2007). Chez le rat, l'induction d'une douleur inflammatoire chronique est associée à une sous-expression des récepteurs GABA_{B(1b)} dans le noyau ventrobasal controlatéral ainsi qu'une surexpression transitoire de ces récepteurs dans le noyau postérieur (Kim et al., 2007). Ces modifications transcriptionnelles pourraient contribuer à des processus de plasticité synaptique au niveau thalamique conduisant à une sensibilisation douloureuse. Chez le primate, une lésion nerveuse périphérique produit une sous-expression des récepteurs GABA_A dans le thalamus (Rausell et al., 1992), et un traumatisme de la colonne dorsale provoque une réduction persistante du nombre de neurones GABAergiques

(>50%) dans le noyau ventrobasal du thalamus (Ralston et al., 1996). Plus récemment, Henderson et ses collaborateurs ont montré une réduction significative du volume du thalamus associé à une diminution locale des concentrations en GABA chez des patients souffrant de neuropathie trigéminal (Henderson et al., 2013). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une perte neuronale dans le noyau VP conduit à une diminution de l'activation du noyau réticulaire ce qui, en retour, produit une diminution de l'inhibition GABAergique dans le noyau VP. Cette altération de l'activité des neurones thalamiques pourrait conduire à une sensation douloureuse persistante (Henderson et al., 2013). Dans notre étude, l'augmentation du taux de GPC dans le thalamus des animaux neuropathiques serait en adéquation avec cette hypothèse. La GPC est exclusivement produite pendant le catabolisme des phospholipides membranaires. Une augmentation de ces concentrations est donc caractéristique d'une neurodégénération (Klein, 2000). Cependant, d'autres études complémentaires seraient nécessaires afin de préciser les noyaux thalamiques concernés par ces variations métaboliques. Des techniques d'immunomarquage de la glutamate décarboxylase¹⁵ permettraient de déterminer avec précision une éventuelle perte d'interneurones GABAergiques au niveau thalamique. Enfin, l'évaluation pharmacologique d'activateurs des récepteurs GABAergiques permettrait de confirmer le lien entre la diminution des concentrations en GABA et l'hypersensibilité douloureuse associée à la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

Implication de la neurotransmission cholinergique corticale dans le maintien de l'allodynie mécanique.

Dans cette étude, le cortex insulaire postérieur (pIC) est la seule structure corticale présentant des modifications neurochimiques significatives chez les animaux neuropathiques. Alors que le cortex SI a longtemps été regardé comme le site d'intégration principal des signaux nociceptifs, le cortex insulaire (ou insula chez l'Homme) est de plus en plus considéré comme l'aire corticale majeure de la représentation de la douleur (Brooks and Tracey, 2007). Chez l'Homme, il a été montré que la partie postérieure de l'insula reçoit des afférences thalamiques en provenance du noyau thalamique ventro-médian (Craig et al., 1994), véhiculant les informations nociceptives et thermosensorielles. Chez le rat, une voie relativement analogue a été mise en évidence, impliquant les projections du noyau triangulaire postérieur sur le cortex insulaire et le cortex SII (Gauriau and Bernard, 2004). Puisque des variations métaboliques ont été observées dans le thalamus et le pIC, il est possible que cette voie neurosensorielle soit impliquée dans la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine. La partie du cortex insulaire analysée dans cette étude, bien que dénommée « postérieure » par sa localisation caudale, correspond au cortex insulaire pariétal défini par Shi et

¹⁵ Enzyme catalysant la décarboxylation du glutamate en GABA

Cassell, et qui s'étend approximativement du bregma (0) à -3,8 mm en position caudale de celui-ci (Shi and Cassell, 1998b). Cette zone est interconnectée avec les cortex somatosensoriels SI et SII ainsi qu'avec le noyau postérieur du thalamus (Fabri and Burton, 1991, Shi and Cassell, 1998a) et représenterait donc une aire somesthésique majeure. L'implication du cortex insulaire dans la douleur chronique (et notamment la douleur neuropathique) a été confirmée dans différents modèles animaux. Une lésion de cette zone, située dans sa partie caudale ou rostrale, granulaire ou agranulaire, permet de supprimer (voire prévenir) l'allodynie mécanique consécutive à la ligature du nerf sciatique (Benison et al., 2011, Coffeen et al., 2011). Très récemment, une forme de plasticité synaptique NMDA-dépendante a été mise en évidence dans le cortex insulaire dans un modèle murin de neuropathie traumatique. L'administration d'antagonistes de la sous-unité NR2B permet de supprimer l'allodynie installée (Qiu et al., 2013). Dans ce contexte, les variations métaboliques observées chez les animaux traités par l'oxaliplatine pourraient indiquer la présence d'une forme de plasticité neuronale impliquée dans la sensibilisation douloureuse.

Parmi les variations neurochimiques mises en évidence dans la partie postérieure du cortex insulaire, une augmentation des concentrations en choline a été observée chez les rats traités par l'oxaliplatine par rapport aux contrôles. La choline est le seul métabolite corrélé de manière significative aux seuils nociceptifs des animaux, suggérant un lien de causalité entre les niveaux de choline dans le pIC et l'allodynie mécanique induite par l'oxaliplatine. La choline est un précurseur essentiel pour le métabolisme des glycérophospholipides et est donc considéré comme un indicateur de l'intégrité des membranes biologiques (Rudkin and Arnold, 1999). Cependant, une dégradation accrue des membranes cellulaires serait incompatible avec l'absence de variation de la GPC et de la PC dont les concentrations augmentent également au cours du catabolisme des phospholipides (Klein, 2000). La choline est aussi un précurseur métabolique pour la synthèse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur majeur du système nerveux central et périphérique. Une étude comparative entre la spectroscopie RMN *in vivo* et la microdialyse intracérébrale a montré une corrélation significative avec l'intensité du signal Cho observé par RMN et les concentrations en choline libre et en acétylcholine dans diverses structures cérébrales (Wang et al., 2008). En revanche, les concentrations en métabolites liposolubles contenant de la choline (constituant les membranes biologiques) n'étaient pas corrélées à l'intensité du signal à 3,23 ppm. Ainsi, une augmentation de la choline libre peut refléter une augmentation de la synthèse de l'acétylcholine (Wang et al., 2008). Le néocortex reçoit une innervation cholinergique dense provenant du prosencéphale basal (Eckenstein et al., 1988), jouant un rôle crucial dans plusieurs fonctions physiologiques, allant de l'attention (Yu and Dayan, 2005) à la mémoire (Banks et al., 2012). Nos résultats indiquent que

l'intégration corticale des stimuli nociceptifs peut également impliquer des projections cholinergiques.

Dans le but de préciser d'éventuelles perturbations du métabolisme de l'acétylcholine au niveau du pIC, l'expression de 34 gènes impliqués dans la synthèse, la dégradation et l'effet de l'acétylcholine a ensuite été évaluée. Une augmentation de l'expression du transporteur membranaire à haute-affinité de la choline (CHT) a été mise en évidence dans le pIC des animaux traités par l'oxaliplatine par rapport aux animaux contrôles. Le transporteur CHT est exclusivement exprimé dans les neurones libérant l'acétylcholine et constitue ainsi un marqueur moléculaire spécifique des fibres cholinergiques (Misawa et al., 2001). L'activité de ce transporteur est essentielle pour la recapture de la choline libre et son recyclage. Cette étape est considérée comme l'étape limitante de la synthèse d'acétylcholine dans les neurones (Misawa et al., 2001, Sarter and Parikh, 2005). En effet, l'enzyme choline-o-acétyltransférase¹⁶ est toujours en excès dans les neurones cholinergiques et est très peu régulée au niveau moléculaire et transcriptionnel (Sarter and Parikh, 2005). La synthèse d'acétylcholine est donc strictement dépendante de la disponibilité de ses substrats, la choline et l'acétyl-coA. En conséquence, une augmentation de l'expression de CHT dans le pIC des animaux neuropathiques indiquerait une augmentation de la production d'acétylcholine et donc une hyperactivité du système cholinergique. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation des transcrits des sous-unités des récepteurs nicotiques $\alpha 2$ et $\beta 4$ ainsi que du récepteur muscarinique M2 pour lequel nous avons observé la plus forte surexpression. Ces récepteurs cholinergiques sont principalement situés au niveau présynaptique où ils régulent la libération des neurotransmetteurs en inhibant l'adénylate cyclase (et donc la production d'AMP cyclique) (Krejci et al., 2004). Dans le cortex cérébral, ils sont exprimés dans les neurones excitateurs au niveau pré- et postsynaptique (Mrzljak et al., 1993). Plusieurs études ont démontré le rôle de l'acétylcholine dans la modulation des potentiels postsynaptiques excitateurs au niveau des neurones pyramidaux du néocortex (Kimura and Baughman, 1997, Levy et al., 2006). Ces effets inhibiteurs impliqueraient l'activation des récepteurs muscariniques présynaptiques (Levy et al., 2006, Xiao et al., 2009). Ainsi, sur la base de ces observations, une hypothèse mécanistique est proposée sur la Figure 45. Suivant cette hypothèse, la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine serait associée à une forme de plasticité synaptique au niveau du pIC impliquée dans la chronicisation de la douleur. L'hyperactivité du système cholinergique, indiquée par l'augmentation des taux de choline et la surexpression de CHT et de M2, représenterait un processus de rétrocontrôle négatif physiologique visant à limiter la neurotransmission excitatrice corticale. Cependant, ce système serait dépassé par l'augmentation excessive des entrées

¹⁶ Catalyse la formation d'acétylcholine à partir de la choline et acétyl-coA.

excitatrices associées à la sensibilisation périphérique induite par l'oxaliplatine. Un mécanisme similaire a été mis en évidence au niveau spinal dans différents modèles animaux de douleur neuropathique périphérique (Chen and Pan, 2003). Chez le rat diabétique, le développement de l'allodynie mécanique est accompagné d'une surexpression de M2 au niveau de la corne dorsale, responsable d'une augmentation de l'effet anti-allodynique des agonistes muscariniques administrés par voie intrathécale. Une augmentation de l'expression de M2 a également été mise en évidence au niveau des neurones sensitifs périphériques (et probablement dans leurs terminaisons centrales) suite à la ligature du nerf spinal (modèle SNL) (Hayashida et al., 2006). Cette surexpression pourrait également être responsable de l'efficacité accrue des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sur l'allodynie mécanique observée dans ce modèle (Hwang et al., 1999).

Afin de déterminer l'efficacité antinociceptive potentielle de la sur-activation des récepteurs M2 au niveau du pIC, l'effet d'une administration d'oxotrémorine (agoniste muscarinique non spécifique) sur l'allodynie mécanique induite par l'oxaliplatine a ensuite été évalué. L'oxotrémorine, même à très faible dose (0,1 nmol), a permis de supprimer complètement l'allodynie mécanique chez les animaux neuropathiques, évaluée 15 minutes après l'administration. Dans le but de confirmer l'implication des récepteurs M2 dans cet effet, l'oxotrémorine a été co-administrée avec la méthoctramine, un antagoniste spécifique des récepteurs M2. Conformément avec la surexpression des récepteurs M2 mise en évidence chez les animaux neuropathiques, l'administration de méthoctramine a permis de prévenir complètement l'effet anti-allodynique de l'oxotrémorine. Cependant, la durée de cet effet n'a pas pu être évaluée à cause de l'apparition de crises épileptiques chez les animaux traités par l'oxotrémorine, survenant aux alentours de 30 min après l'injection, comme précédemment décrit (Turski et al., 1989). Ces manifestations sont également apparues chez les animaux ayant reçu à la fois l'oxotrémorine et la méthoctramine, en cohérence avec l'implication préférentielle des récepteurs M1 (Whalley et al., 2005).

Plusieurs études cliniques et précliniques ont mis en évidence un effet antalgique des cholinomimétiques d'action centrale. L'administration intrathécale d'agonistes muscariniques et d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase réduit les réponses nociceptives chez l'animal (Yaksh et al., 1985) et produit une analgésie chez l'Homme (Hood et al., 1995). Au niveau supraspinal, l'administration intracérébroventriculaire d'oxotrémorine induit un effet antinociceptif chez la souris. Dans cette étude, aucun effet antinociceptif n'a été observé chez les animaux contrôles, suggérant un rôle spécifique du pIC dans la douleur pathologique. Ces résultats sont en accord avec les études de Benison et al. (2011) et Coffeen et al. (2011) qui ont montré qu'une lésion du cortex insulaire, que ce soit dans la partie agrulaire rostrale ou granulaire caudale, permettait de supprimer l'allodynie mécanique dans un modèle de neuropathie induite par la ligature du nerf

sciatique (CCI). Dans ces études, la lésion du cortex insulaire n'a pas modifié les réponses nociceptives des animaux sains (Benison et al., 2011, Coffeen et al., 2011).

Ainsi, la sur-activation du système cholinergique cortical permet de produire un effet anti-allodynique chez l'animal. Cet effet impliquerait l'activation des récepteurs muscariniques inhibiteurs M2 situés au niveau pré-synaptique. Dans ce contexte, l'utilisation des cholinomimétiques d'action centrale devrait permettre de réduire voire prévenir la douleur neuropathique associée à la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

L'administration systémique du donépézil permet de supprimer voire prévenir la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine.

L'évaluation de l'effet pharmacologique de l'oxotrémorine administrée dans le pIC a permis de prouver la pertinence des agents cholinergiques dans le traitement des douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine. Afin de confirmer ces résultats, et d'élargir ce concept à une stratégie applicable en clinique, l'effet antalgique du donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase d'action centrale, a été évalué sur le modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine. Le donépézil, commercialisé sous le nom d'Aricept[®] par le laboratoire Pfizer, est indiqué dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (dans ses formes légères à modérées). Les résultats de cette étude ont montré qu'une administration de donépézil par voie orale permet de supprimer l'allodynie mécanique et thermique induite par l'oxaliplatine chez le rat. Suite à un traitement chronique initié dès l'apparition des troubles nociceptifs, le donépézil permet de prévenir entièrement le développement de ces symptômes. De plus, sur le test d'interaction sociale, le donépézil a permis de supprimer l'anxiété associée à la neuropathie induite par l'oxaliplatine, un symptôme très largement retrouvé chez les patients souffrant de douleur chronique (Bair et al., 2003, McWilliams et al., 2003). En revanche, les résultats du test de préférence de place conditionnée n'indiquent pas d'effet du donépézil sur la douleur spontanée continue dans ce modèle.

Plusieurs études précliniques ont également mis en évidence l'intérêt du donépézil et d'autres inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans le traitement des douleurs neuropathiques. Sur un modèle par ligature du nerf spinal (SNL), l'administration de donépézil par voie orale (10 mg/kg) permet de réduire l'hypersensibilité mécanique des animaux, par une action majoritairement muscarinique et spinale (Clayton et al., 2007). Kimura et ses collaborateurs ont montré que ce mécanisme antalgique impliquait également les récepteurs nicotiques et GABAergiques au niveau de la moelle épinière (Kimura et al., 2013). Bien que nous ne puissions pas écarter un effet strictement spinal dans notre étude, les résultats obtenus doivent être remis dans le contexte de nos

résultats précédents montrant l'efficacité supraspinale de l'oxotrémorine dans le modèle de neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine. En inhibant l'acétylcholinestérase au niveau cérébral, le donépézil serait responsable d'une augmentation des taux d'acétylcholine au niveau du pIC, induisant un effet antalgique via la sur-activation des récepteurs muscariniques M2. Cette hypothèse reste à être confirmée, notamment par l'évaluation comportementale de l'effet d'une administration de méthocramine dans le pIC sur l'effet antalgique du donépézil en systémique. L'évaluation des taux d'acétylcholine dans le pIC par microdialyse intracérébrale permettra également de préciser à la fois les mécanismes physiopathologiques de la neuropathie induite par l'oxaliplatine et les mécanismes de l'effet anti-allodymique du donépézil.

Ces résultats offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la douleur chimio-induite en clinique. Le donépézil est relativement bien toléré chez l'Homme. Contrairement aux autres inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, cette molécule est rarement associée à une hépatotoxicité ou des effets indésirables gastro-intestinaux tels que des nausées ou des vomissements. L'effet préventif d'un traitement chronique au donépézil est particulièrement intéressant dans le cas des neuropathies chimio-induites, car leur apparition peut-être relativement anticipée suivant la dose cumulée reçue (neuropathies « programmées »). De plus, outre l'effet symptomatologique mis en évidence dans cette étude, le donépézil est connu pour être un agent neuroprotecteur *in vitro*, notamment en réponse à l'excitotoxicité NMDA-dépendante du glutamate (Takada et al., 2003) qui serait également impliquée dans l'apparition des douleurs neuropathiques chimio-induites (Rzeski et al., 2004). Sur la base de ces observations, il est possible que l'effet préventif du donépézil sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine soit le résultat d'un effet neuroprotecteur périphérique. Enfin, des données précliniques sur un autre modèle de neuropathie ont également montré que le donépézil permet de potentialiser l'effet antalgique de la gabapentine, un des traitements de référence des douleurs neuropathiques (Folkesson et al., 2010). Au vu des résultats obtenus ainsi que des données de la littérature, l'utilisation du donépézil semble représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement des douleurs neuropathiques, et plus particulièrement celles induites par l'oxaliplatine.

III.4. Conclusion et perspectives

L'analyse métabolomique de certaines structures supraspinales en utilisant la spectroscopie ^1H -RMN HRMAS a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans le maintien de l'allodynie mécanique dans un modèle animal de neuropathie induite par l'oxaliplatine. La principale observation concerne l'implication du système cholinergique au niveau du cortex insulaire postérieur dans la physiopathologie de l'hypersensibilité douloureuse, et l'intérêt majeur de son ciblage pour soulager ce symptôme. Le donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase centrale, permet de supprimer et de prévenir l'allodynie thermique et mécanique induite par l'oxaliplatine chez le rat. Cet effet antalgique s'accompagne également d'un effet de type anxiolytique. L'utilisation clinique du donépézil pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique intéressante afin de limiter l'apparition des symptômes sensitifs chez les patients recevant une chimiothérapie à base d'oxaliplatine et, par extension, améliorer leur qualité de vie.

Outre l'intérêt du donépézil dans le traitement et la prévention de la douleur neuropathique chimio-induite, ce travail offre des perspectives cliniques intéressantes. En effet, la choline est un des rares métabolites quantifiables de manière non invasive chez l'Homme par spectroscopie RMN *in vivo*. Ainsi, la concentration en choline au niveau de l'insula postérieure pourrait représenter un véritable marqueur moléculaire de la douleur neuropathique et servir à son diagnostic objectif. Un essai clinique à visée physiopathologique est en cours de préparation afin de vérifier cette hypothèse. Le résumé des caractéristiques de l'étude est présenté ci-après.

IV. Etude clinique : INSULOX

IV.1. Rationnel de l'étude

- **Dernier état des connaissances scientifiques**

L'oxaliplatine est un sel de platine de 3^{ème} génération qui fait partie du traitement de première ligne des cancers colorectaux avancés, en association avec l'acide folinique et le 5-FU (protocole FOLFOX). Cependant, l'utilisation de l'oxaliplatine est fortement limitée par sa neurotoxicité, se manifestant sous la forme de neuropathies périphériques sensitivomotrices fortement invalidantes (Pasetto et al., 2006). Chez plus de 90% des patients traités, l'oxaliplatine est responsable d'une neurotoxicité aiguë qui se manifeste par un ensemble de symptômes neurologiques comprenant des dysesthésies induites par le froid affectant les mains et la région périorale (le plus souvent au niveau de la gorge mais peuvent également toucher les mâchoires et la bouche), des engourdissements et des picotements dans les extrémités, une faiblesse musculaire et des douleurs neurogènes (Raymond et al., 1998a, Raymond et al., 1998b). Ces troubles sensitifs sont souvent accompagnés de symptômes musculaires tels que des spasmes ou des crampes, souvent décrits comme une raideur dans les mains et les pieds (Saif et Hashmi, 2008). De plus, des sensations subjectives de dyspnée ou dysphagie peuvent apparaître chez certains patients sans signe évident d'obstruction physique (stridor ou sifflement respiratoire) ou de modification des gaz du sang (Haller, 2000). Ces symptômes apparaissent rapidement après la perfusion d'oxaliplatine (de quelques heures à quelques jours après la chimiothérapie) et demeurent transitoires, disparaissant en quelques jours. Cependant, cette symptomatologie réapparaît généralement lors de la perfusion suivante et augmente à la fois en intensité et en durée (Leonard et al., 2005).

Pour 48 à 76% des patients recevant de l'oxaliplatine, une neuropathie périphérique persistante peut s'installer, se manifestant sous forme d'une atteinte sensori-motrice symétrique des extrémités, caractérisée par une persistance des paresthésies entre les cures de chimiothérapie, des engourdissements des membres ainsi que des douleurs neuropathiques. Dans les formes les plus sévères, les patients présentent le plus souvent une ataxie sensorielle ainsi qu'une perte de sensibilité superficielle et profonde, conduisant à une gêne fonctionnelle et une détérioration majeure de la qualité de vie. La sévérité de ces neuropathies dépend fortement de la dose cumulée et de la dose intensité d'oxaliplatine, avec une médiane d'apparition se situant autour du 10^{ème} cycle de chimiothérapie pour les neuropathies de grade 3 (Leonard et al., 2005), soit une dose cumulée de 874 mg/m² (Grothey, 2003). Une amélioration des symptômes peut être observée dans les mois suivant l'arrêt du traitement, mais la récupération est lente et souvent incomplète. Le délai médian

de récupération est d'environ 13 semaines après la fin de la chimiothérapie (Grothey, 2003). Cependant, une étude récente a montré la persistance des symptômes neuropathiques 29 mois après la dernière cure de chimiothérapie pour près de 80% des patients, mettant en cause le caractère réversible de ces neuropathies (Park et al., 2011).

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement neuroprotecteur efficace pour prévenir ou soulager ces neuropathies iatrogènes, ce qui contraint les oncologues à diminuer les doses voire interrompre la chimiothérapie. Cependant, ces adaptations posologiques peuvent se traduire par une perte de chance pour les patients face à la maladie cancéreuse (Balayssac et al., 2011). De plus, les neuropathies aux sels de platine ont la particularité de continuer à s'aggraver même plusieurs mois après la fin du traitement (Windebank and Grisold, 2008). Ainsi, il existe un réel besoin d'innovation thérapeutique pour la prise en charge de ces douleurs, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de ces neuropathies.

- **Dernier état des connaissances sur l'expérimentation préclinique**

Au cours de ces dernières décennies, l'essor des techniques modernes d'imagerie cérébrale a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant dans la genèse et le maintien des douleurs neuropathiques (Moisset and Bouhassira, 2007). Ces douleurs peuvent être aussi bien dues à une activité atypique des fibres périphériques endommagées qu'à des activités spontanées des neurones centraux. L'atteinte des nerfs sensitifs périphériques entraîne une neuroplasticité inadaptée du système somatosensoriel qui se traduit par des modifications morphologiques, neurochimiques et fonctionnelles, aboutissant à un état de sensibilisation douloureuse (Costigan et al., 2009). Le rôle central du cortex cérébral dans l'intégration et la modulation de la douleur est maintenant bien établi, que ce soit en conditions physiologiques (Treede et al., 1999) ou pathologiques (Zhuo, 2008).

Des travaux récents, réalisés au sein de l'UMR U1107 NEURO-DOL, sur un modèle animal de neuropathie induite par l'oxaliplatine ont permis d'évaluer les variations métaboliques cérébrales associées au développement de la douleur neuropathique (travaux en cours de publication). Dans ce modèle, l'administration répétée d'oxaliplatine (2 mg/kg, 2 fois par semaine pendant 4,5 semaines, dose cumulée de 18 mg/kg) entraîne l'apparition d'une hypersensibilité thermique (froid et chaud) et tactile, persistant plusieurs semaines après la fin des injections (Ling et al., 2007a). A la fin des administrations d'oxaliplatine, plusieurs structures cérébrales, connues pour leur implication dans le traitement du signal douloureux, ont été prélevées et analysées par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN-HRMAS). L'acquisition de spectres RMN à une dimension a permis d'identifier et de quantifier 17 métabolites dans ces structures. Cette étude a

permis de mettre en évidence des variations métaboliques cérébrales importantes chez les animaux neuropathiques comparativement aux animaux contrôles (non traités). Plus particulièrement, il a été montré une **augmentation significative des concentrations en choline** (produit de la dégradation des phospholipides membranaires et précurseur métabolique de l'acétylcholine) dans le cortex insulaire postérieur des animaux neuropathiques par rapport aux animaux non traités (+22%, $p=0,0046$) (Tableau 5). De plus, la concentration en choline dans cette zone du cerveau était corrélée négativement aux seuils douloureux des animaux avant sacrifice, et pourrait donc servir de marqueur biologique de la douleur neuropathique (Figure 51).

Métabolites	Contrôles	Oxaliplatine	p
Acétate	0.0014 ± 0.001	0.0013 ± 0.001	0.9164
Alanine	0.0041 ± 0.001	0.0041 ± 0.001	0.8336
Aspartate	0.0057 ± 0.001	0.0034 ± 0.001	0.0063
Choline	0.0027 ± 0.0003	0.0033 ± 0.0004	0.0046
Créatine	0.0312 ± 0.003	0.0276 ± 0.004	0.046
GABA	0.0147 ± 0.001	0.0151 ± 0.002	0.7527
Glutamate	0.0369 ± 0.005	0.0387 ± 0.004	0.3446
Glutamine	0.0128 ± 0.002	0.0105 ± 0.003	0.0209
Glutathion	0.0053 ± 0.001	0.0057 ± 0.001	0.5286
Glycerophosphocholine	0.002 ± 0.0005	0.0024 ± 0.001	0.1722
Glycine	0.0056 ± 0.001	0.0061 ± 0.001	0.3446
Lactate	0.0426 ± 0.005	0.0396 ± 0.004	0.248
Myo-inositol	0.0383 ± 0.004	0.0396 ± 0.003	0.5286
NAA	0.0359 ± 0.003	0.0365 ± 0.004	0.4622
Phosphocholine	0.0051 ± 0.001	0.0055 ± 0.001	0.4008
Scyllo-inositol	0.003 ± 0.0003	0.0030 ± 0.001	0.8336
Taurine	0.0267 ± 0.003	0.0275 ± 0.002	0.5995

Tableau 5 : Concentrations des métabolites identifiés et quantifiés dans le cortex insulaire postérieur des animaux traités par l'oxaliplatine et des animaux contrôles (unités arbitraires normalisées). Test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon, $n=8$ par groupe.

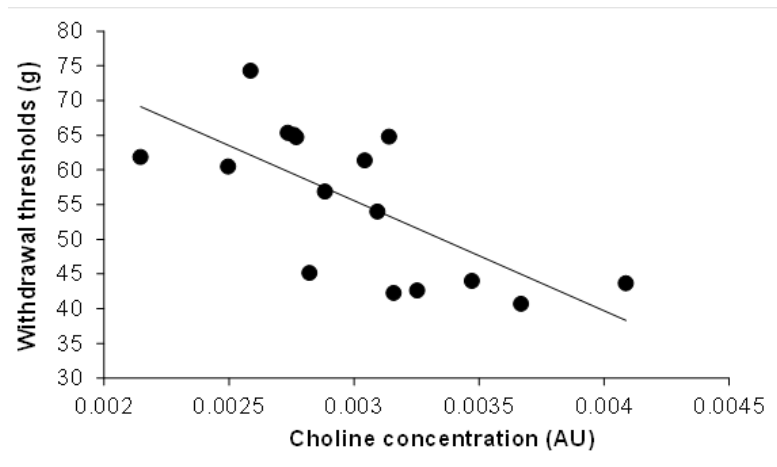


Figure 51 : Droite de corrélation entre les seuils de retrait de la patte avant sacrifice (ordonnées) et les concentrations en choline dans le cortex insulaire postérieur des animaux (abscisses). Régression linéaire simple, coefficient de Pearson $R^2 = -0,69308$, $p = 0,00291$, $n=8$ par groupe.

Chez le primate (y compris l'Homme), le cortex insulaire, ou insula, constitue le cinquième lobe du cerveau, enfoui sous les profondeurs de la vallée sylvienne. L'insula inclut les aires 13 et 16 de Brodmann et se présente sous forme d'une pyramide à base triangulaire, divisée par le sillon central insulaire en deux parties, antérieure et postérieure (Ture et al., 1999, Ture et al., 2000). La partie antérieure contient 3 gyri courts : antérieur, médian et précentral. La partie postérieure contient 2 gyri longs : post-central et postérieur (Figure 52).

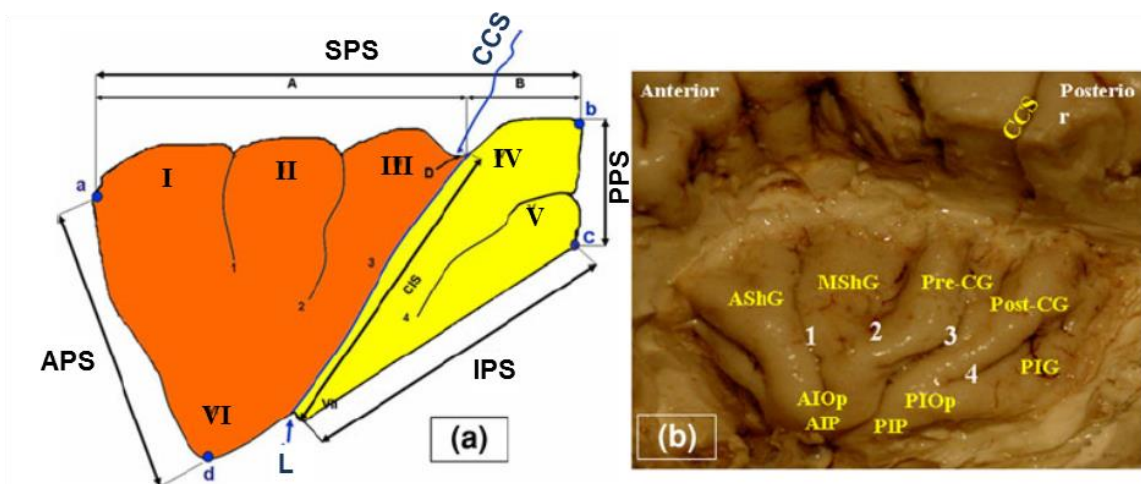


Figure 52 : Représentation schématique (a) et photographique (b) d'une insula gauche, incluant sillons et gyri. SPS = sillon péri-insulaire supérieur, APS = sillon péri-insulaire antérieur, IPS = sillon péri-insulaire inférieur, PPS = sillon péri-insulaire postérieur. I = gyrus court antérieur, II = gyrus court moyen, III = gyrus précentral, IV = gyrus post-central, V = insula postérieure, VI = pôle de l'insula antérieure, VII = pôle de l'insula postérieure. 1 = sillon insulaire antérieur, 2 = sillon pré-central, 3 = sillon central (CIS), 4 = sillon post-central, CCS = sillon central, L = limen insulae.

Cette aire cérébrale, bien qu'occupant moins de 2% de la surface corticale totale, est impliquée dans un vaste nombre de fonctions, allant de la production de la parole à l'addiction (Nieuwenhuys, 2012). Ce n'est que très récemment que le rôle central de l'insula dans le processus algique a été mis en évidence. L'insula présente toutes les caractéristiques anatomo-fonctionnelles pour être considérée comme une aire somesthésique majeure : (a) elle reçoit des connexions ascendantes par une voie spino-thalamo-insulaire directe (Craig, 2003b) ; (b) c'est la structure la plus fréquemment retrouvée activée dans les études d'imagerie cérébrale de la douleur (Apkarian et al., 2005) ; (c) la stimulation directe de l'insula peut provoquer de la douleur et/ou des sensations thermiques dans l'hémicorps controlatéral (Ostrowsky et al., 2002), et (d) la lésion de cette zone entraîne des déficits sensitifs (Greenspan et al., 1999) voire des douleurs neuropathiques (Garcia-Larrea et al., 2010). De plus, les zones de l'insula sensibles à des stimuli nociceptifs présentent une organisation somatotopique bien distincte (Brooks et al., 2005, Ostrowsky et al., 2002).

• Exposé des hypothèses et des objectifs

Ainsi, les douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine mettraient en jeu l'insula postérieure et seraient associées à une augmentation des concentrations en choline à ce niveau. La translation clinique de ces travaux précliniques est réalisable en pratique puisque les concentrations

en choline peuvent être déterminées au niveau cérébral et de manière non-invasive par spectroscopie par résonance magnétique. L'objectif de cette étude sera de mettre en évidence une augmentation significative des concentrations en choline dans l'insula postérieure de patients atteints de neuropathie induite par l'oxaliplatine. La choline intra-insulaire pourrait représenter un marqueur biologique de la douleur neuropathique permettant son diagnostic de manière objective.

Les objectifs secondaires seront la mise en évidence d'une corrélation entre les concentrations métaboliques dans l'insula postérieure et la fréquence/intensité des symptômes douloureux (scores des questionnaires NPSI et QCD). Ces concentrations métaboliques pourraient d'autre part être corrélées au seuil de douleur déclenchée par le chaud ou par le froid, et aux seuils de détection des vibrations. En effet, Attal et ses collaborateurs (2009) ont mis en évidence une hypersensibilité thermique au chaud et au froid, et une altération de la perception des vibrations chez les patients après traitement par oxaliplatine. Enfin, l'insula antérieure étant davantage dévolue au traitement des informations émotionnelles (peur, anxiété, dégoût,...), les concentrations métaboliques dans cette zone du cerveau pourront être corrélées aux scores des questionnaires HADS (évaluation de l'anxiété et de la dépression) et QLQ-C30 (évaluation de la qualité de vie).

- **Résumé des bénéfices et des risques prévisibles et connus pour les personnes se prêtant à la recherche**

Cette étude, de par son caractère descriptif, n'apporte aucun bénéfice direct pour le patient. Cependant, les images obtenues par l'IRM seront analysées par un radiologue quelques jours après le passage du patient. Si ces images révèlent une anomalie ou le début d'une pathologie, le patient en sera immédiatement informé. L'IRM étant une technique non-invasive utilisée en routine en pratique hospitalière, les risques encourus par les patients sont quasiment nuls, si les contre-indications de l'IRM sont respectées.

- **Retombées attendues**

Les processus impliqués dans la représentation cérébrale de la douleur chronique sont encore peu étudiés à l'heure actuelle. Cette étude exploratoire permettra une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la persistance des douleurs neuropathiques chez les patients traités par l'oxaliplatine.

IV.2. Synopsis de l'étude

TITRE	Exploration métabolique par spectroscopie RMN des concentrations en choline dans l'insula de patients souffrant de douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine (INSULOX)
PROMOTEUR	CHU de Clermont-Ferrand
INVESTIGATEURS – CENTRES	Pr Denis Pezet - Service de Chirurgie Digestive, Unité d'Oncologie Digestive - CHU de Clermont-Ferrand
OBJECTIFS	<p>Objectif principal</p> <p>L'objectif principal sera l'étude de l'effet de la douleur neuropathique périphérique induite par l'oxaliplatine sur la concentrations en choline dans l'insula postérieure, en comparant des patients traités souffrant de douleur à des patients traités indemnes de douleur, 1 mois après la fin du protocole de la chimiothérapie.</p> <p>Objectifs secondaires</p> <p>Les objectifs secondaires suivants seront évalués 1 mois et 6 mois après la fin de la chimiothérapie entre les 2 groupes de patients :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Comparaison des concentrations de métabolites (choline, myo-inositol, N-acétylaspartate, créatine, glutamate/glutamine, lactate, taurine) dans l'insula antérieure et postérieure droite - Etude des relations entre les concentrations des métabolites (choline, myo-inositol, N-acétylaspartate, créatine, glutamate/glutamine, lactate, taurine) dans l'insula antérieure et postérieure droite et les éléments suivants : <ul style="list-style-type: none"> o Score d'EVA de la douleur (/10) o Score du questionnaire DN4 (diagnostic de douleur neuropathique) o Score du questionnaire NPSI (intensité de la douleur neuropathique) o Score du questionnaire QCD (douleur) o Seuils de douleur déclenchée par le chaud ou par le froid o Seuil de sensibilité aux vibrations o Score du questionnaire HADS (évaluation de l'anxiété et de la dépression) o Score du questionnaire QLQ-C30 v3 (évaluation de la qualité de vie)
CARACTERISTIQUES DE L'ESSAI	Etude interventionnelle prospective exploratoire monocentrique ouverte et contrôlée.
NOMBRE DE PATIENTS	20 patients par groupe soit 40 patients

<p>CRITERES D'INCLUSION</p>	<p><i>Groupe cas : patients traités par oxaliplatine et atteints de douleurs neuropathiques</i></p> <p>Patients atteints de douleurs neuropathiques périphériques induites par l'oxaliplatine :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patients ayant terminé une chimiothérapie adjuvante FOLFOX 4 pour un cancer digestif - Score d'EVA de la douleur $\geq 3/10$, 1 mois après la fin de la chimiothérapie - Score au questionnaire DN4 $\geq 4/10$, 1 mois après la fin de la chimiothérapie <p><i>Groupe contrôle : patients traités par oxaliplatine et non atteints de douleurs neuropathiques</i></p> <p>Patients non atteints de douleurs neuropathiques périphériques induites par l'oxaliplatine :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patients ayant terminé une chimiothérapie adjuvante FOLFOX 4 pour un cancer digestif - Score d'EVA de la douleur $< 3/10$, 1 mois après la fin de la chimiothérapie - Score au questionnaire DN4 $< 4/10$, 1 mois après la fin de la chimiothérapie <p><i>Tous les patients</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Patients droitiers - Patients ayant rempli le questionnaire de compatibilité à l'IRM et n'ayant pas de contre-indication à l'IRM - Patients ayant donné leur consentement écrit, libre et éclairé - Patients affiliés à un régime de la sécurité sociale - Contraception efficace pour les patients, homme ou femme, en âge de procréer - Indice de performance OMS ≤ 2
<p>CRITERES DE NON INCLUSION</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Age < 18 ans - Patient gaucher - IMC > 30 kg/m² - Patient amputé de tout ou partie d'un membre supérieur - Patient diabétique - Actes douloureux programmés après l'inclusion (ex : chirurgie d'exérèse) - Pathologies neurologiques (ex : syndrome parkinsonien, accident vasculaire cérébral, migraine, fibromyalgie...) - Antécédent de douleur chronique avant la chimiothérapie FOLFOX4 - Traitement antalgique en cours, autre que paracétamol et opioïdes faibles - Consommation d'alcool >3 unités d'alcool/jour (30 g/jour) pour l'homme et >2 unités d'alcool/jour (20 g/jour) pour la femme

	<ul style="list-style-type: none"> - Toute affection évolutive non équilibrée (insuffisance hépatique, insuffisance rénale (clairance de la créatinine <30 mL/min), insuffisance respiratoire, insuffisance cardiaque congestive, infarctus du myocarde au cours des 6 derniers mois...) - Tout cancer évolutif - Patient porteur d'un pacemaker, d'implants métalliques ou de tout autre élément magnétique - Claustrophobie - Femme enceinte ou en cours d'allaitement - Incapacité légale (personne privée de liberté ou sous tutelle) - Patients qui pour des raisons psychologiques, sociales, familiales ou géographiques, ne pourront pas être suivis et/ou compliants aux exigences de l'étude - Patients déjà inclus dans un autre essai thérapeutique
CRITERES D'EVALUATION	<p>Critère de jugement principal</p> <p>Le critère d'évaluation principal sera la mesure par spectroscopie RMN de la concentration en choline (mmol/L) dans l'insula postérieure droite des patients 1 mois après la fin de leur protocole de chimiothérapie.</p>
	<p>Critères d'évaluation secondaires</p> <p>Les critères d'évaluation secondaires seront les suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Concentration (mmol/L) de choline mesurée par spectroscopie RMN dans l'insula postérieure droite à 6 mois et dans l'insula antérieure droite à 1 mois et à 6 mois - Concentration (mmol/L) des métabolites (myo-inositol, N-acétylaspartate, créatine, glutamate, lactate, taurine) mesurée par spectroscopie RMN dans l'insula antérieure et postérieure droite - Score d'EVA de la douleur sur une échelle numérique de 0 à 10 (Price et al., 1983) - Score du questionnaire DN4 (diagnostic de douleur neuropathique) (Bouhassira et al., 2005) - Score du questionnaire NPSI (intensité des symptômes de douleur neuropathique) (Bouhassira et al., 2004) - Score du questionnaire concis sur les douleurs (QCD) (HAS, 1999) - Seuil de douleur déclenchée par le froid (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies) (Attal et al., 2009) - Seuil de douleur déclenchée par le chaud (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies) (Attal et al., 2009) - Seuil de sensibilité aux vibrations (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies) (Attal et al., 2009) - Grade de neuropathie sensitive et/ou motrice (guide de la NCI-CTCAE v4, National Cancer Institute, 2009) (Kautio et al., 2011) - Scores du questionnaire HADS (anxiété et dépression) (Gore et al., 2005, Zigmond and Snaith, 1983) - Score du questionnaire QLQ-C30 v3 (qualité de vie des patients) (EORTC) (Cavaletti et al., 2013)

DEROULEMENT DE L'ETUDE	<p>La visite de pré-inclusion des patients sera réalisée lors de la première visite de suivi par l'oncologue qui a lieu 1 mois après la fin de la chimiothérapie. Lors de cette visite, le patient se verra remettre :</p> <ul style="list-style-type: none"> - La lettre d'information et le formulaire de consentement - Le questionnaire de diagnostic des douleurs neuropathiques DN4 - Le questionnaire de compatibilité à la réalisation d'une IRM <p>Une IRM sera programmée dans les 15 jours suivants l'inclusion du patient. Le jour de l'IRM, les patients devront d'abord aller dans le service d'oncologie digestive pour répondre à l'ensemble des questionnaires (DN4, NPSI, QCD, HADS et QLQ-C30) et effectuer la mesure des seuils de douleur déclenchés par le chaud et le froid et le seuil de détection des vibrations (Système MEDOC TSA-II, Abioz Technologies). Ces tests sont prévus pour une durée de 2 heures. Ensuite les patients devront se déplacer à l'IRM 3T pour effectuer la mesure des concentrations en métabolites dans l'insula postérieure et antérieure droite dans le service de Radiologie. La séquence d'acquisition sera d'une durée de 45 min. La réponse aux questionnaires et la mesure des seuils de douleur déclenchée par le chaud et le froid et le seuil de détection des vibrations, ainsi que l'IRM seront réalisées une nouvelle fois 6 mois après la fin de la chimiothérapie.</p> <p>Le protocole IRM sera réalisé à 3 Tesla (3T) sur un système d'imagerie RMN General Electric (GE Healthcare), l'émission des ondes de radiofréquence et la réception du signal se feront grâce à un résonateur en quadrature tête (antenne phase-array 32 canaux). Le protocole d'IRM se déroulera en trois phases :</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Séquence morphologique pour l'identification de la zone d'intérêt.</u> Après que le patient soit positionné dans l'aimant, des images multicoupes 3D pondérées en T1 seront acquises (durée d'acquisition = 3min43) pour permettre la localisation du voxel sur la zone d'intérêt. Les images seront acquises à partir d'un plan de coupe passant par des repères anatomiques conventionnels, la ligne bi-commissurale CA/CP afin d'obtenir un plan de coupe identique pour chaque patient permettant ainsi de positionner de façon reproductible le voxel. - <u>Acquisition d'un spectre RMN 1D dans l'insula postérieure droite.</u> Les spectres seront acquis dans un VOI de $1,5 \times 1,5 \times 2,5 \text{ cm}^3$ (5,6 mL) recouvrant l'insula postérieure droite grâce à une séquence de spectroscopie localisée PRESS, avec et sans présaturation du signal de l'eau, dont les paramètres principaux sont : TR (temps de répétition) = 1500ms ; TE (temps d'écho) = 29 ms ; nombre de répétitions = 512 ; durée d'acquisition = 13min24). - <u>Acquisition d'un spectre RMN 1D dans l'insula antérieure droite.</u> Les spectres seront acquis avec la même séquence dans un VOI de $1,5 \times 1,5 \times 2,0 \text{ cm}^3$ (4,5 mL) recouvrant l'insula antérieure droite.
-------------------------------	--

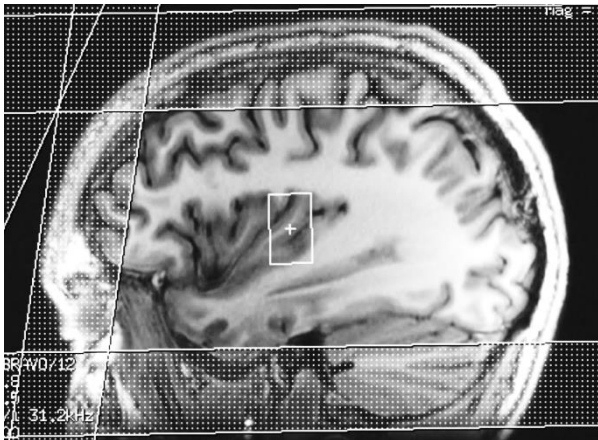
<p>CONSIDERATIONS STATISTIQUES</p>	<p>Analyse principale</p> <p>La comparaison concernant la concentration en choline mesurée par spectroscopie RMN dans l'insula postérieure, entre des patients souffrant de douleurs neuropathiques périphériques induites par l'oxaliplatine et des patients traités par oxaliplatine non douloureux 1 mois après la fin du protocole de chimiothérapie, sera réalisée par un test t de Student ou test de Mann-Whitney si conditions du t-test non respectées (test de Shapiro-Wilk pour la normalité et test de Fisher-Snedecor pour l'homoscédasticité).</p> <p>Analyses secondaires</p> <p>L'étude des relations entre les concentrations de métabolites (choline, myo-inositol, N-acétylaspartate, créatine, glutamate/glutamine, lactate, taurine) dans l'insula antérieure/postérieure d'une part et le score, d'EVA de la douleur et des questionnaires DN4 (diagnostic de neuropathie), NPSI (douleur neuropathique), QCD (douleur), HADS (évaluation de l'anxiété et de la dépression) et QLQ-C30 v3 (évaluation de la qualité de vie), et les seuils de douleurs déclenchées par le chaud et par le froid et le seuils de détection des vibrations, d'autre part, sera réalisée par coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman). Le cas échéant, les comparaisons entre groupes indépendants concernant des variables quantitatives seront réalisées de manière analogue à ce qui est proposé pour le critère de jugement principal ; pour les paramètres catégoriels, les tests du Chi2 ou exact de Fisher seront mis en œuvre. Ces analyses seront menées pour chacun des groupes et tous groupes confondus. Dans ce dernier cas, un modèle de régression incluant le groupe comme covariable et des possibles facteurs d'ajustement (dont traitements antalgiques) pourra être considéré.</p> <p>Les analyses à 6 mois post chimiothérapie seront réalisées selon un plan d'analyse statistique identique.</p> <p><i>In fine</i>, l'étude du suivi longitudinal des paramètres métaboliques et de leurs relations avec les caractéristiques cliniques sera réalisée par modèle mixte prenant en compte l'effet aléatoire sujet et les effets fixes groupe, temps et interaction groupe x temps.</p>
<p>CALENDRIER DE L'ETUDE</p>	<p>Durée de l'étude estimée à : 18 mois Date de début de l'étude (premier patient inclus) : Décembre 2013 Date de fin (fin de suivi du dernier patient inclus) : Juin 2015</p>

TABLEAU RECAPITULATIF DES EXAMENS

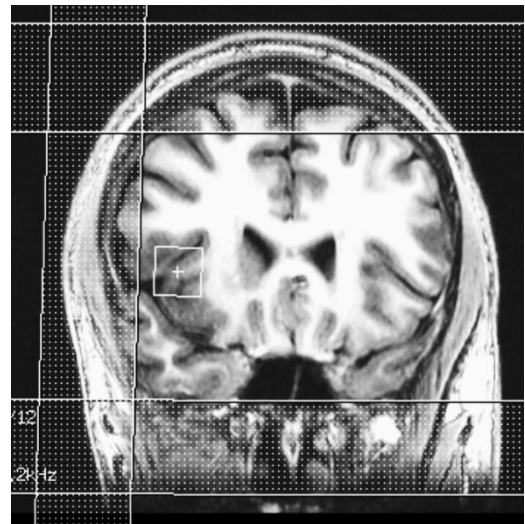
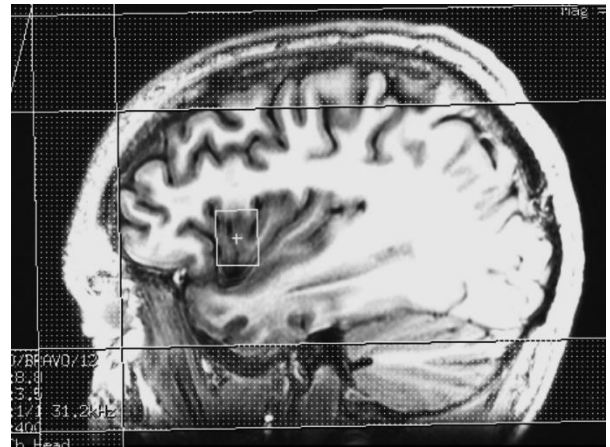
Visites	Inclusion Bilan	IRM 1	IRM 2
	Visite de contrôle 1 mois après la dernière chimiothérapie	1 mois après la chimiothérapie + un délai de 15 jours selon disponibilité de l'IRM	6 mois après la chimiothérapie + un délai de 15 jours selon disponibilité de l'IRM
Critères d'inclusion / non inclusion (antécédents, traitements concomitants, histoire de la maladie....)	X		
Consentement éclairé signé	X		
Examen clinique	X		
IRM (dosage des métabolites)			
IRM (dosage des métabolites)		X	X
Questionnaire DN4	X	X	X
Questionnaire NPSI		X	X
Questionnaire QCD		X	X
Questionnaire HADS		X	X
Questionnaire QLQ-C30		X	X
Grade de neuropathie sensitive et/ou motrice selon le guide de la NCI-CTCAE v4		X	X
Seuils de détection (froid, chaud et vibrations)		X	X
Seuils de douleur déclenchée par le froid et le chaud		X	X

PLACEMENT DES VOXELS (ESSAI VOLONTAIRE SAIN)

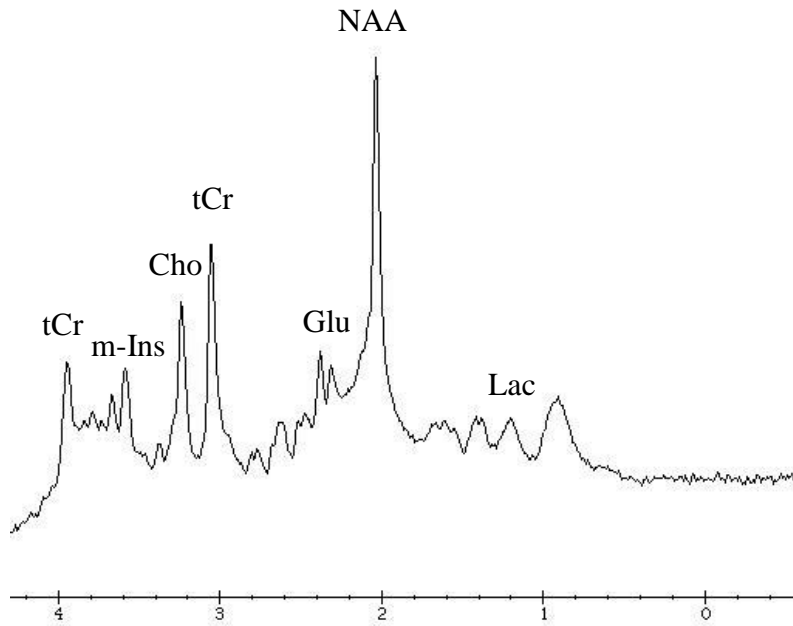
Insula postérieure



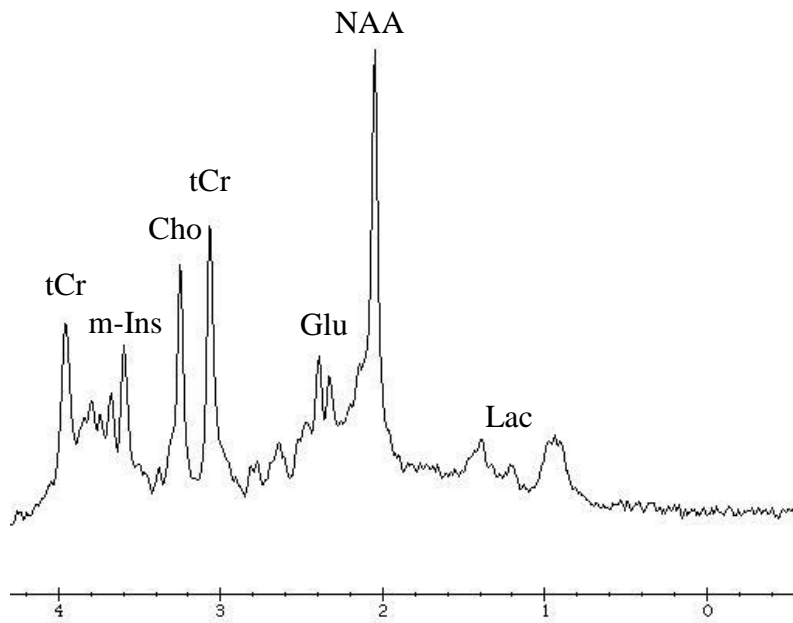
Insula antérieure



SPECTRES RMN 1D (ESSAI VOLONTAIRE SAIN)



Insula postérieure



Insula antérieure

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

La neurotoxicité des agents anticancéreux demeure un effet indésirable majeur de nombreuses chimiothérapies. Les neuropathies périphériques qui en résultent affectent une large population de patients et peuvent persister pendant plusieurs années, contrairement à la plupart des toxicités chimio-induites. La symptomatologie sensitivomotrice, et particulièrement la douleur neuropathique, contribuent à l'altération de la qualité de vie des patients, déjà atteints d'une pathologie lourde, et occasionne des dépenses de santé importantes. A l'heure actuelle, aucun traitement n'a montré d'efficacité substantielle justifiant son utilisation en pratique clinique. Face à cet arsenal thérapeutique limité, la meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques apparaît comme primordiale. Dans une stratégie translationnelle, l'identification des acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans l'apparition de ces douleurs permettrait d'élargir les perspectives thérapeutiques actuelles.

Dans un premier temps, nous nous sommes proposés d'étudier l'efficacité d'une alimentation sans polyamines sur l'apparition de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. En contexte préclinique, cette nutrithérapie s'est révélée particulièrement efficace pour prévenir la symptomatologie sensitive aiguë (voire chronique) associée à l'administration d'oxaliplatine chez le rat. Par l'observation phénotypique de la corne dorsale de la moelle épinière (cible supposée de la déplétion en polyamines exogènes), l'approche métabolomique utilisée a permis de caractériser la réponse thérapeutique d'un point de vue moléculaire. L'effet préventif d'une alimentation sans polyamines est associé à une modulation de la neurotransmission glutamatergique au niveau spinal, en lien avec le phénotype comportemental observé. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au profilage métabolique des structures cérébrales, connues pour être impliquées dans le processus algique, dans un modèle animal reproduisant la symptomatologie de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine. Cette approche, couplée à la transcriptomique et l'évaluation comportementale de composés pharmacologiques, a permis de mettre en évidence des variations métaboliques dans certaines structures cérébrales et de fournir des interprétations biologiques en cohérence et en complémentarité avec les données de la littérature. Nous avons notamment mis en évidence l'implication du cortex insulaire caudal dans l'hypersensibilité douloureuse chimio-induite, et un rôle important du système cholinergique dans la modulation de son intégration. Ces résultats ont été étendus à l'évaluation comportementale de l'effet curatif et préventif du donépézil, un agent anti-cholinestérasique, sur les troubles nociceptifs induits par l'oxaliplatine. En vertu des effets bénéfiques observés et de la bonne tolérance clinique de cette molécule, l'efficacité du donépézil sur la neuropathie chimio-induite par l'oxaliplatine mériterait d'être évaluée par un essai

clinique. Dans ce contexte, l'évaluation de l'intérêt du donépézil dans le traitement des douleurs neuropathiques d'origine post-traumatique fait actuellement l'objet de 4 études cliniques déclarées sur ClinicalTrials (<http://clinicaltrials.gov>).

L'extrapolation de ces résultats expérimentaux à la clinique doit être prudente, en raison des limites des modèles précliniques. Ces limites concernent principalement les différences d'ordre physiologique inter-espèces. L'anthropomorphisme, bien que très séduisant, doit être envisagé avec prudence, et surtout en ce qui concerne les processus neurologiques. Les mécanismes de régénération et de plasticité neuronale mis en jeu lors d'une lésion périphérique d'une part, et la phylogénèse du substratum anatomique de la représentation cérébrale de la douleur d'autre part, diffèrent fondamentalement entre le Rat et l'Homme. La pertinence clinique des résultats exposés dans ce manuscrit ne peut être déterminée que par le biais d'essais thérapeutiques contrôlés. C'est dans cette optique que les projets NEUROXAPOL et INSULOX ont été mis en place. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas fournir de résultats préliminaires concernant ces études. Cependant, nous espérons qu'elles confirmeront les effets observés chez l'animal et qu'elles permettront d'élargir les perspectives thérapeutiques de la prise en charge des douleurs neuropathiques chimio-induites.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Mishina, M., Nakai, Y. & Ito, S. 2005. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *Eur J Neurosci*, 22, 1445-54.
2. Adelsberger, H., Quasthoff, S., Grosskreutz, J., Lepier, A., Eckel, F. & Lersch, C. 2000. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol*, 406, 25-32.
3. Adrian, E. 1940. Double representation of the feet in the sensory cortex of the cat. *Journal of Physiology*, 98, 16-18.
4. Afif, A. & Mertens, P. 2010. Description of sulcal organization of the insular cortex. *Surg Radiol Anat*, 32, 491-8.
5. Afonseca, S. O., Cruz, F. M., Cubero Dde, I., Lera, A. T., Schindler, F., Okawara, M., Souza, L. F., Rodrigues, N. P. & Giglio, A. 2013. Vitamin E for prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized clinical trial. *Sao Paulo Med J*, 131, 35-8.
6. Al-Hallaq, R. A., Jarabek, B. R., Fu, Z., Vicini, S., Wolfe, B. B. & Yasuda, R. P. 2002. Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, 62, 1119-27.
7. Alcindor, T. & Beauger, N. 2011. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*, 18, 18-25.
8. Allen, W. L., McLean, E. G., Boyer, J., McCulla, A., Wilson, P. M., Coyle, V., Longley, D. B., Casero, R. A., Jr. & Johnston, P. G. 2007. The role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in determining response to chemotherapeutic agents in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 6, 128-37.
9. Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I. & de Gramont, A. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, 350, 2343-51.
10. Antonacopoulou, A. G., Argyriou, A. A., Scopa, C. D., Kottorou, A., Kominea, A., Peroukides, S. & Kalofonos, H. P. 2010. Integrin beta-3 L33P: a new insight into the pathogenesis of chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy? *Eur J Neurol*, 17, 963-8.
11. Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D. & Zubieta, J. K. 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9, 463-84.
12. Apkarian, A. V., Hashmi, J. A. & Baliki, M. N. 2011. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain*, 152, S49-64.
13. Apkarian, A. V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R. M., Harden, R. N., Parrish, T. B. & Gitelman, D. R. 2004. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci*, 24, 10410-5.
14. Arango, D., Wilson, A. J., Shi, Q., Corner, G. A., Aranes, M. J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J. M. & Augenlicht, L. H. 2004. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*, 91, 1931-46.
15. Argyriou, A. A., Briani, C., Cavaletti, G., Bruna, J., Alberti, P., Velasco, R., Lonardi, S., Cortinovis, D., Cazzaniga, M., Campagnolo, M., Santos, C. & Kalofonos, H. P. 2013a. Advanced age and liability to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: post hoc analysis of a prospective study. *Eur J Neurol*, 20, 788-94.
16. Argyriou, A. A., Cavaletti, G., Briani, C., Velasco, R., Bruna, J., Campagnolo, M., Alberti, P., Bergamo, F., Cortinovis, D., Cazzaniga, M., Santos, C., Papadimitriou, K. & Kalofonos, H.

- P. 2013b. Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer. *Cancer*, 119, 438-44.
17. Argyriou, A. A., Chroni, E., Polychronopoulos, P., Iconomou, G., Koutras, A., Makatsoris, T., Gerolymos, M. K., Gourzis, P., Assimakopoulos, K. & Kalofonos, H. P. 2006. Efficacy of oxcarbazepine for prophylaxis against cumulative oxaliplatin-induced neuropathy. *Neurology*, 67, 2253-5.
18. Ashburner, J. & Friston, K. J. 2000. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage*, 11, 805-21.
19. Atiya Ali, M., Poortvliet, E., Stromberg, R. & Yngve, A. 2011. Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutr Res*, 55.
20. Attal, N., Bouhassira, D., Gautron, M., Vaillant, J. N., Mitry, E., Lepere, C., Rougier, P. & Guirimand, F. 2009. Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain*, 144, 245-52.
21. Authier, N., Balayssac, D., Marchand, F., Ling, B., Zangarelli, A., Descoeur, J., Coudore, F., Bourinet, E. & Eschalier, A. 2009. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics*, 6, 620-9.
22. Bachrach, U. 2005. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr Protein Pept Sci*, 6, 559-66.
23. Bair, M. J., Robinson, R. L., Katon, W. & Kroenke, K. 2003. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med*, 163, 2433-45.
24. Balayssac, D., Ferrier, J., Descoeur, J., Ling, B., Pezet, D., Eschalier, A. & Authier, N. 2011. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf*, 10, 407-17.
25. Baliki, M. N., Schnitzer, T. J., Bauer, W. R. & Apkarian, A. V. 2011. Brain morphological signatures for chronic pain. *PLoS One*, 6, e26010.
26. Banke, T. G. & Traynelis, S. F. 2003. Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 6, 144-52.
27. Banks, P. J., Bashir, Z. I. & Brown, M. W. 2012. Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. *Hippocampus*, 22, 2012-31.
28. Baranauskas, G. & Nistri, A. 1998. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*, 54, 349-65.
29. Bardócz, S. 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 341-346.
30. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-84.
31. Basso, M., Modoni, A., Spada, D., Cassano, A., Schinzari, G., Lo Monaco, M., Quaranta, D., Tonali, P. A. & Barone, C. 2011. Polymorphism of CAG motif of SK3 gene is associated with acute oxaliplatin neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 67, 1179-87.
32. Baumgartner, U., Iannetti, G. D., Zambreanu, L., Stoeter, P., Treede, R. D. & Tracey, I. 2010. Multiple somatotopic representations of heat and mechanical pain in the operculo-insular cortex: a high-resolution fMRI study. *J Neurophysiol*, 104, 2863-72.
33. Becerra, L., Morris, S., Bazes, S., Gostic, R., Sherman, S., Gostic, J., Pendse, G., Moulton, E., Scrivani, S., Keith, D., Chizh, B. & Borsook, D. 2006. Trigeminal neuropathic pain alters responses in CNS circuits to mechanical (brush) and thermal (cold and heat) stimuli. *J Neurosci*, 26, 10646-57.
34. Bello-Fernandez, C., Packham, G. & Cleveland, J. L. 1993. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7804-8.
35. Benison, A. M., Chumachenko, S., Harrison, J. A., Maier, S. F., Falci, S. P., Watkins, L. R. & Barth, D. S. 2011. Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy. *J Neurosci*, 31, 6317-28.

36. Bennett, B. K., Park, S. B., Lin, C. S., Friedlander, M. L., Kiernan, M. C. & Goldstein, D. 2012. Impact of oxaliplatin-induced neuropathy: a patient perspective. *Support Care Cancer*, 20, 2959-67.
37. Bennett, G. J. 2000. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage*, 19, S2-6.
38. Bennett, M. I. 2011. Effectiveness of antiepileptic or antidepressant drugs when added to opioids for cancer pain: systematic review. *Palliat Med*, 25, 553-9.
39. Benoit, E., Brienza, S. & Dubois, J. M. 2006. Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na⁺ and K⁺ channels in frog peripheral myelinated axons. *Gen Physiol Biophys*, 25, 263-76.
40. Benveniste, M. & Mayer, M. L. 1993. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol*, 464, 131-63.
41. Bergeron, C., Bansard, J. Y., Le Moine, P., Bouet, F., Goasguen, J. E., Moulinoux, J. P., Le Gall, E. & Catros-Quemener, V. 1997. Erythrocyte spermine levels: a prognostic parameter in childhood common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 11, 31-6.
42. Berretta, M., Taibi, R., Bearz, A., La Mura, N., Berretta, S., Tirelli, U. & Frustaci, S. 2004. Dysphonia as an unusual toxic event of oxaliplatin-based chemotherapy. *J Chemother*, 16, 595-8.
43. Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncaglia, R., Boraldi, F., Tiozzo, R., Sharrard, M. & Corti, A. 1999. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*, 446, 18-22.
44. Binder, A., Stengel, M., Maag, R., Wasner, G., Schoch, R., Moosig, F., Schommer, B. & Baron, R. 2007. Pain in oxaliplatin-induced neuropathy--sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. *Eur J Cancer*, 43, 2658-63.
45. Binks, S. P. & Dobrota, M. 1990. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol*, 40, 1329-36.
46. Blanc, C., Deveraux, Q. L., Krajewski, S., Janicke, R. U., Porter, A. G., Reed, J. C., Jaggi, R. & Marti, A. 2000. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, 60, 4386-90.
47. Bouhassira, D., Attal, N., Alchaar, H., Boureau, F., Brochet, B., Bruxelle, J., Cunin, G., Fermanian, J., Ginies, P., Grun-Overdyking, A., Jafari-Schluep, H., Lanteri-Minet, M., Laurent, B., Mick, G., Serrie, A., Valade, D. & Vicaut, E. 2005. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain*, 114, 29-36.
48. Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J. & Boureau, F. 2004. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain*, 108, 248-57.
49. Bowsher, D. 2006. Somatic sensation and the insular-opercular cortex: relationship to central pain. *Eur Neurol*, 55, 160-5.
50. Bowsher, D., Brooks, J. & Enevoldson, P. 2004. Central representation of somatic sensations in the parietal operculum (SII) and insula. *Eur Neurol*, 52, 211-25.
51. Boyce, S., Wyatt, A., Webb, J. K., O'Donnell, R., Mason, G., Rigby, M., Sirinathsinghji, D., Hill, R. G. & Rupniak, N. M. 1999. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology*, 38, 611-23.
52. Brooks, J. C. & Tracey, I. 2007. The insula: a multidimensional integration site for pain. *Pain*, 128, 1-2.
53. Brooks, J. C., Zambreau, L., Godinez, A., Craig, A. D. & Tracey, I. 2005. Somatotopic organisation of the human insula to painful heat studied with high resolution functional imaging. *Neuroimage*, 27, 201-9.

54. Burger, H., Zoumaro-Djayoon, A., Boersma, A. W., Helleman, J., Berns, E. M., Mathijssen, R. H., Loos, W. J. & Wiemer, E. A. 2010. Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br J Pharmacol*, 159, 898-908.
55. Burnashev, N. 1996. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 311-7.
56. Burton, H. 1986. Second somatosensory cortex and related areas. In: PETERS, A. & JONES, E. (eds.) *Cerebral cortex, vol 5: Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity* New York: Plenum Press.
57. Burton, H., Fabri, M. & Alloway, K. 1995. Cortical areas within the lateral sulcus connected to cutaneous representations in areas 3b and 1: a revised interpretation of the second somatosensory area in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 355, 539-62.
58. Burton, H. & Jones, E. G. 1976. The posterior thalamic region and its cortical projection in New World and Old World monkeys. *J Comp Neurol*, 168, 249-301.
59. Bushnell, M. C., Duncan, G. H., Hofbauer, R. K., Ha, B., Chen, J. I. & Carrier, B. 1999. Pain perception: is there a role for primary somatosensory cortex? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7705-9.
60. Carozzi, V., Marmiroli, P. & Cavaletti, G. 2008. Focus on the role of Glutamate in the pathology of the peripheral nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7, 348-60.
61. Carozzi, V. A., Chiorazzi, A., Canta, A., Lapidus, R. G., Slusher, B. S., Wozniak, K. M. & Cavaletti, G. 2010. Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotox Res*, 17, 380-91.
62. Carvalho, A. L., Duarte, C. B. & Carvalho, A. P. 2000. Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. *Neurochem Res*, 25, 1245-55.
63. Cascinu, S., Catalano, V., Cordella, L., Labianca, R., Giordani, P., Baldelli, A. M., Beretta, G. D., Ubiali, E. & Catalano, G. 2002. Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 20, 3478-83.
64. Casero, R. A., Jr. & Marton, L. J. 2007. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 373-90.
65. Casey, K. L., Minoshima, S., Berger, K. L., Koeppe, R. A., Morrow, T. J. & Frey, K. A. 1994. Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli. *J Neurophysiol*, 71, 802-7.
66. Casey, K. L., Minoshima, S., Morrow, T. J. & Koeppe, R. A. 1996. Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain. *J Neurophysiol*, 76, 571-81.
67. Cassidy, J., Bjarnason, G. A., Hickish, T., Topham, C., Provencio, M., Bodoky, G., Landherr, L., Koralewski, P., Lopez-Vivanco, G. & Said, G. 2006. Randomized double blind (DB) placebo (Plcb) controlled phase III study assessing the efficacy of xaliproden (X) in reducing the cumulative peripheral sensory neuropathy (PSN) induced by the oxaliplatin (Ox) and 5-FU/LV combination (FOLFOX4) in first-line treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 24, 147S-147S.
68. Cavaletti, G., Cornblath, D. R., Merkies, I. S., Postma, T. J., Rossi, E., Frigeni, B., Alberti, P., Bruna, J., Velasco, R., Argyriou, A. A., Kalofonos, H. P., Psimaras, D., Ricard, D., Pace, A., Galie, E., Briani, C., Dalla Torre, C., Faber, C. G., Lalisang, R. I., Boogerd, W., Brandsma, D., Koeppen, S., Hense, J., Storey, D., Kerrigan, S., Schenone, A., Fabbri, S., Valsecchi, M. G. & Group, C. I.-P. 2013. The chemotherapy-induced peripheral neuropathy outcome measures standardization study: from consensus to the first validity and reliability findings. *Ann Oncol*, 24, 454-62.
69. Cavaletti, G. & Marmiroli, P. 2010. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Nat Rev Neurol*, 6, 657-66.

70. Cervelli, M., Amendola, R., Politicelli, F. & Mariottini, P. 2012. Spermine oxidase: ten years after. *Amino Acids*, 42, 441-50.
71. Chao, J., Seiler, N., Renault, J., Kashiwagi, K., Masuko, T., Igarashi, K. & Williams, K. 1997. N1-dansyl-spermine and N1-(n-octanesulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists: block and permeation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol*, 51, 861-71.
72. Chaplan, S. R., Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. 1997. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 829-38.
73. Chay, W. Y., Tan, S. H., Lo, Y. L., Ong, S. Y., Ng, H. C., Gao, F., Koo, W. H. & Choo, S. P. 2010. Use of calcium and magnesium infusions in prevention of oxaliplatin induced sensory neuropathy. *Asia Pac J Clin Oncol*, 6, 270-7.
74. Chazot, P. L. 2004. The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem*, 11, 389-96.
75. Chazot, P. L., Coleman, S. K., Cik, M. & Stephenson, F. A. 1994. Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J Biol Chem*, 269, 24403-9.
76. Chen, B. S. & Roche, K. W. 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*, 53, 362-8.
77. Chen, G. G., Fiori, L. M., Moquin, L., Gratton, A., Mamer, O., Mechawar, N. & Turecki, G. 2010a. Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1477-84.
78. Chen, H. S. & Lipton, S. A. 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem*, 97, 1611-26.
79. Chen, L. & Huang, L. Y. 1992. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*, 356, 521-3.
80. Chen, N., Moshaver, A. & Raymond, L. A. 1997. Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol*, 51, 1015-23.
81. Chen, S. R. & Pan, H. L. 2003. Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 676-81.
82. Chen, Y. C., Tzeng, C. H., Chen, P. M., Lin, J. K., Lin, T. C., Chen, W. S., Jiang, J. K., Wang, H. S. & Wang, W. S. 2010b. Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci*, 101, 530-5.
83. Chen, Y. Y., Shih, Y. Y., Lo, Y. C., Lu, P. L., Tsang, S., Jaw, F. S. & Liu, R. S. 2010c. MicroPET imaging of noxious thermal stimuli in the conscious rat brain. *Somatosens Mot Res*, 27, 69-81.
84. Chesler, M. & Kaila, K. 1992. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci*, 15, 396-402.
85. Childers, W. E., Jr. & Baudy, R. B. 2007. N-methyl-D-aspartate antagonists and neuropathic pain: the search for relief. *J Med Chem*, 50, 2557-62.
86. Chizh, B. A., Reissmuller, E., Schlutz, H., Scheede, M., Haase, G. & Englberger, W. 2001. Supraspinal vs spinal sites of the antinociceptive action of the subtype-selective NMDA antagonist ifenprodil. *Neuropharmacology*, 40, 212-20.
87. Christine, C. W. & Choi, D. W. 1990. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci*, 10, 108-16.
88. Cipolla, B., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. 2009. Phase II prospective trial associating a polyamine free diet and docetaxel in hormone refractory prostate cancer patients: preliminary results. *Amino Acids*, 39, 20-21.

89. Cipolla, B. G., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. 2007. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, 33, 203-12.
90. Cipolla, B. G., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. 2010. Polyamine reduced diet (PRD) nutrition therapy in hormone refractory prostate cancer patients. *Biomed Pharmacother*, 64, 363-8.
91. Clayton, B. A., Hayashida, K., Childers, S. R., Xiao, R. & Eisenach, J. C. 2007. Oral donepezil reduces hypersensitivity after nerve injury by a spinal muscarinic receptor mechanism. *Anesthesiology*, 106, 1019-25.
92. Coffeen, U., Manuel Ortega-Legaspi, J., Lopez-Munoz, F. J., Simon-Arceo, K., Jaimes, O. & Pellicer, F. 2011. Insular cortex lesion diminishes neuropathic and inflammatory pain-like behaviours. *Eur J Pain*, 15, 132-8.
93. Cook, A. J., Woolf, C. J., Wall, P. D. & McMahon, S. B. 1987. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature*, 325, 151-3.
94. Cortinovis, D., Bidoli, P., Zilembo, N., Fusi, A. & Bajetta, E. 2008. Oxaliplatin doublets in non-small cell lung cancer: a literature review. *Lung Cancer*, 60, 325-31.
95. Costigan, M., Scholz, J. & Woolf, C. J. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1-32.
96. Craig, A. D. 1995. Supraspinal projections of lamina I neurons. In: BESSON, J.-M. & GUILBAUD, G. (eds.) *Forebrain areas involved in pain processing*. Paris: John Libbey.
97. Craig, A. D. 2003a. A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci*, 26, 303-7.
98. Craig, A. D. 2003b. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci*, 26, 1-30.
99. Craig, A. D., Bushnell, M. C., Zhang, E. T. & Blomqvist, A. 1994. A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*, 372, 770-3.
100. Craig, A. D., Chen, K., Bandy, D. & Reiman, E. M. 2000. Thermosensory activation of insular cortex. *Nat Neurosci*, 3, 184-90.
101. Cunningham, D., Okines, A. F. & Ashley, S. 2010. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*, 362, 858-9.
102. Cusick, C. G., Wall, J. T., Felleman, D. J. & Kaas, J. H. 1989. Somatotopic organization of the lateral sulcus of owl monkeys: area 3b, S-II, and a ventral somatosensory area. *J Comp Neurol*, 282, 169-90.
103. Danysz, W. & Parsons, C. G. 1998. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev*, 50, 597-664.
104. DaSilva, A. F., Becerra, L., Pendse, G., Chizh, B., Tully, S. & Borsook, D. 2008. Colocalized structural and functional changes in the cortex of patients with trigeminal neuropathic pain. *PLoS One*, 3, e3396.
105. Davis, K. D., Kiss, Z. H., Tasker, R. R. & Dostrovsky, J. O. 1996. Thalamic stimulation-evoked sensations in chronic pain patients and in nonpain (movement disorder) patients. *J Neurophysiol*, 75, 1026-37.
106. de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendlér, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F. & Bonetti, A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18, 2938-47.
107. Descartes, R. 1992. *Les Méditations métaphysiques (1641)*, Paris, GF Flammarion.
108. Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., Authier, N. & Bourinet, E. 2011. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med*, 3, 266-78.

109. Deuis, J. R., Zimmermann, K., Romanovsky, A. A., Possani, L. D., Cabot, P. J., Lewis, R. J. & Vetter, I. 2013. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain*, 154, 1749-57.
110. Di Piero, V., Jones, A. K., Iannotti, F., Powell, M., Perani, D., Lenzi, G. L. & Frackowiak, R. S. 1991. Chronic pain: a PET study of the central effects of percutaneous high cervical cordotomy. *Pain*, 46, 9-12.
111. Dickenson, A. H. & Sullivan, A. F. 1991. NMDA receptors and central hyperalgesic states. *Pain*, 46, 344-6.
112. Dimitrov, A. G. & Dimitrova, N. A. 2011. A possible link of oxaliplatin-induced neuropathy with potassium channel deficit. *Muscle Nerve*, 45, 403-11.
113. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51, 7-61.
114. Disbrow, E., Roberts, T. & Krubitzer, L. 2000. Somatotopic organization of cortical fields in the lateral sulcus of Homo sapiens: evidence for SII and PV. *J Comp Neurol*, 418, 1-21.
115. Dudley, H. W., Rosenheim, O. & Starling, W. W. 1927. The Constitution and Synthesis of Spermidine, a Newly Discovered Base Isolated from Animal Tissues. *Biochem J*, 21, 97-103.
116. Dum, R. P., Levinthal, D. J. & Strick, P. L. 2009. The spinothalamic system targets motor and sensory areas in the cerebral cortex of monkeys. *J Neurosci*, 29, 14223-35.
117. Durand, G. M., Bennett, M. V. & Zukin, R. S. 1993. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6731-5.
118. Durand, J. P., Brezault, C. & Goldwasser, F. 2003. Protection against oxaliplatin acute neurosensory toxicity by venlafaxine. *Anticancer Drugs*, 14, 423-5.
119. Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G. K., Haanpaa, M. L., Kent, J. L., Krane, E. J., Lebel, A. A., Levy, R. M., Mackey, S. C., Mayer, J., Miaskowski, C., Raja, S. N., Rice, A. S., Schmader, K. E., Stacey, B., Stanos, S., Treede, R. D., Turk, D. C., Walco, G. A. & Wells, C. D. 2010. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, 85, S3-14.
120. Eckenstein, F. P., Baughman, R. W. & Quinn, J. 1988. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 25, 457-74.
121. Eickhoff, S. B., Amunts, K., Mohlberg, H. & Zilles, K. 2006a. The human parietal operculum. II. Stereotaxic maps and correlation with functional imaging results. *Cereb Cortex*, 16, 268-79.
122. Eickhoff, S. B., Grefkes, C., Zilles, K. & Fink, G. R. 2007. The somatotopic organization of cytoarchitectonic areas on the human parietal operculum. *Cereb Cortex*, 17, 1800-11.
123. Eickhoff, S. B., Schleicher, A., Zilles, K. & Amunts, K. 2006b. The human parietal operculum. I. Cytoarchitectonic mapping of subdivisions. *Cereb Cortex*, 16, 254-67.
124. Eickhoff, S. B., Weiss, P. H., Amunts, K., Fink, G. R. & Zilles, K. 2006c. Identifying human parieto-insular vestibular cortex using fMRI and cytoarchitectonic mapping. *Hum Brain Mapp*, 27, 611-21.
125. Erreger, K. & Traynelis, S. F. 2005. Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *J Physiol*, 569, 381-93.
126. Erreger, K. & Traynelis, S. F. 2008. Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J Physiol*, 586, 763-78.
127. Estebe, J. P., Legay, F., Gentili, M., Wodey, E., Leduc, C., Ecoffey, C. & Moulinoux, J. P. 2006. An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. *Anesth Analg*, 102, 1781-8.
128. Fabri, M. & Burton, H. 1991. Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. *J Comp Neurol*, 311, 405-24.

129. Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B. & Woynarowski, J. M. 2003. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 66, 225-37.
130. Fiori, L. M. & Turecki, G. 2008. Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatry Neurosci*, 33, 102-10.
131. Foerster, B. R., Petrou, M., Edden, R. A., Sundgren, P. C., Schmidt-Wilcke, T., Lowe, S. E., Harte, S. E., Clauw, D. J. & Harris, R. E. 2012. Reduced insular gamma-aminobutyric acid in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 64, 579-83.
132. Folkesson, A., Honore, P. H., Andersen, L. M., Kristensen, P. & Bjerrum, O. J. 2010. Low dose of donepezil improves gabapentin analgesia in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain: single and multiple dosing studies. *J Neural Transm*, 117, 1377-85.
133. Fraser, A. D. 2002. Clinical toxicologic implications of ethylene glycol and glycolic acid poisoning. *Ther Drug Monit*, 24, 232-8.
134. Frederickson, C. J., Suh, S. W., Silva, D., Frederickson, C. J. & Thompson, R. B. 2000. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr*, 130, 1471S-83S.
135. Friebel, U., Eickhoff, S. B. & Lotze, M. 2011. Coordinate-based meta-analysis of experimentally induced and chronic persistent neuropathic pain. *Neuroimage*, 58, 1070-80.
136. Friedman, D. P. & Murray, E. A. 1986. Thalamic connectivity of the second somatosensory area and neighboring somatosensory fields of the lateral sulcus of the macaque. *J Comp Neurol*, 252, 348-73.
137. Frot, M., Magnin, M., Mauguier, F. & Garcia-Larrea, L. 2007. Human SII and posterior insula differently encode thermal laser stimuli. *Cereb Cortex*, 17, 610-20.
138. Fuhrman, S., Palkovits, M., Cassidy, M. & Neale, J. H. 1994. The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. *J Neurochem*, 62, 275-81.
139. Fukaya, M., Hayashi, Y. & Watanabe, M. 2005. NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci*, 21, 1432-6.
140. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. & Inokuchi, K. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, 38, 447-60.
141. Fukui, S., Matsuno, M., Inubushi, T. & Nosaka, S. 2006. N-Acetylaspartate concentrations in the thalami of neuropathic pain patients and healthy comparison subjects measured with (1)H-MRS. *Magn Reson Imaging*, 24, 75-9.
142. Gallay, D. S., Gallay, M. N., Jeanmonod, D., Rouiller, E. M. & Morel, A. 2012. The insula of Reil revisited: multiarchitectonic organization in macaque monkeys. *Cereb Cortex*, 22, 175-90.
143. Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Delva, R., Guerin-Meyer, V., Ifrah, N., Morel, A. & Gamelin, E. 2004. 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*, 10, 4055-61.
144. Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Morel, A., Poirier, A. L., Berger, V., Gamelin, E., Tournigand, C. & de Gramont, A. 2008. Oxaliplatin-related neurotoxicity: interest of calcium-magnesium infusion and no impact on its efficacy. *J Clin Oncol*, 26, 1188-9; author reply 1189-90.
145. Gamelin, L., Capitain, O., Morel, A., Dumont, A., Traore, S., Anne le, B., Gilles, S., Boisdron-Celle, M. & Gamelin, E. 2007. Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res*, 13, 6359-68.
146. Garcia-Larrea, L. 2012. The posterior insular-opercular region and the search of a primary cortex for pain. *Neurophysiol Clin*, 42, 299-313.

147. Garcia-Larrea, L., Perchet, C., Creac'h, C., Convers, P., Peyron, R., Laurent, B., Mauguiere, F. & Magnin, M. 2010. Operculo-insular pain (parasyylvian pain): a distinct central pain syndrome. *Brain*, 133, 2528-39.
148. Garrido, N., Perez-Martos, A., Faro, M., Lou-Bonafonte, J. M., Fernandez-Silva, P., Lopez-Perez, M. J., Montoya, J. & Enriquez, J. A. 2008. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochem J*, 414, 93-102.
149. Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A. & Kuraishi, Y. 2009. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett*, 458, 93-5.
150. Gauriau, C. & Bernard, J. F. 2004. Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat. *J Neurosci*, 24, 752-61.
151. Gerke, M. B., Duggan, A. W., Xu, L. & Siddall, P. J. 2003. Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience*, 117, 715-22.
152. Gielen, M., Le Goff, A., Stroebel, D., Johnson, J. W., Neyton, J. & Paoletti, P. 2008. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron*, 57, 80-93.
153. Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J. W. & Paoletti, P. 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*, 459, 703-7.
154. Giffard, R. G., Monyer, H., Christine, C. W. & Choi, D. W. 1990. Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res*, 506, 339-42.
155. Gill, J. S. & Windebank, A. J. 1998. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest*, 101, 2842-50.
156. Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C. & Alberts, S. R. 2004. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 22, 23-30.
157. Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. & Perez, J. M. 2001. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*, 59, 657-63.
158. Gore, M., Brandenburg, N. A., Dukes, E., Hoffman, D. L., Tai, K. S. & Stacey, B. 2005. Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep. *J Pain Symptom Manage*, 30, 374-85.
159. Grachev, I. D., Fredrickson, B. E. & Apkarian, A. V. 2001. Dissociating anxiety from pain: mapping the neuronal marker N-acetyl aspartate to perception distinguishes closely interrelated characteristics of chronic pain. *Mol Psychiatry*, 6, 256-8.
160. Grachev, I. D., Fredrickson, B. E. & Apkarian, A. V. 2000. Abnormal brain chemistry in chronic back pain: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Pain*, 89, 7-18.
161. Grachev, I. D., Fredrickson, B. E. & Apkarian, A. V. 2002. Brain chemistry reflects dual states of pain and anxiety in chronic low back pain. *J Neural Transm*, 109, 1309-34.
162. Graham, M. A., Lockwood, G. F., Greenslade, D., Brienza, S., Bayssas, M. & Gamelin, E. 2000. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res*, 6, 1205-18.
163. Graziano, A. & Jones, E. G. 2004. Widespread thalamic terminations of fibers arising in the superficial medullary dorsal horn of monkeys and their relation to calbindin immunoreactivity. *J Neurosci*, 24, 248-56.
164. Greenspan, J. D., Lee, R. R. & Lenz, F. A. 1999. Pain sensitivity alterations as a function of lesion location in the parasyylvian cortex. *Pain*, 81, 273-82.

165. Gregg, R. W., Molepo, J. M., Monpetit, V. J., Mikael, N. Z., Redmond, D., Gadia, M. & 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*, 10, 795-803.
166. Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Lapied, B., Pelhate, M. & Gamelin, E. 2001. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol*, 85, 2293-7.
167. Grothey, A. 2003. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol*, 30, 5-13.
168. Grothey, A., Hart, L. L., Rowland, K. M., Ansari, R. H., Alberts, S. R., Chowhan, N. M., Shpilsky, A. & Hochster, H. S. 2008. Intermittent oxaliplatin (oxali) administration and time-to-treatment-failure (TTF) in metastatic colorectal cancer (mCRC): Final results of the phase III CONcePT trial. *J Clin Oncol*, 26, 4010.
169. Grothey, A., Kellermann, L. & Schmoll, H. J. 2002. [Deficits in management of patients with colorectal carcinoma in Germany. Results of multicenter documentation of therapy algorithms]. *Med Klin (Munich)*, 97, 270-7.
170. Grothey, A., Nikcevich, D. A., Sloan, J. A., Kugler, J. W., Silberstein, P. T., Dentchev, T., Wender, D. B., Novotny, P. J., Chitale, U., Alberts, S. R. & Loprinzi, C. L. 2011. Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol*, 29, 421-7.
171. Gu, T., Ma, X. X., Xu, Y. H., Xiu, J. J. & Li, C. F. 2008. Metabolite concentration ratios in thalami of patients with migraine and trigeminal neuralgia measured with ¹H-MRS. *Neurol Res*, 30, 229-33.
172. Guenther, S., Reeh, P. W. & Kress, M. 1999. Rises in [Ca²⁺]_i mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci*, 11, 3143-50.
173. Guo, W., Zou, S., Guan, Y., Ikeda, T., Tal, M., Dubner, R. & Ren, K. 2002. Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci*, 22, 6208-17.
174. Guo, Y., Palmer, J. L., Forman, A., S. R. Dakhil, S. R., Velasco, M. R., Weiss, M., Gilman, P., Mills, G. M., Noga, S. J., Eng, C., Overman, M. J. & Fisch, M. 2011. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of oral alpha lipoic acid to prevent platinum-induced polyneuropathy. *J Clin Oncol* 29.
175. Gustin, S. M., Peck, C. C., Wilcox, S. L., Nash, P. G., Murray, G. M. & Henderson, L. A. 2011. Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes. *J Neurosci*, 31, 5956-64.
176. Gwilym, S. E., Filippini, N., Douaud, G., Carr, A. J. & Tracey, I. 2010. Thalamic atrophy associated with painful osteoarthritis of the hip is reversible after arthroplasty: a longitudinal voxel-based morphometric study. *Arthritis Rheum*, 62, 2930-40.
177. Ha, H. C., Woster, P. M., Yager, J. D. & Casero, R. A., Jr. 1997. The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11557-62.
178. Haller, D. G. 2000. Safety of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*, 14, 15-20.
179. Hama, A., Woon Lee, J. & Sagen, J. 2003. Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 459, 49-58.
180. Harris, R. E. & Clauw, D. J. 2012. Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurosci Lett*, 520, 192-6.
181. Harris, R. E., Sundgren, P. C., Craig, A. D., Kirshenbaum, E., Sen, A., Napadow, V. & Clauw, D. J. 2009. Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Arthritis Rheum*, 60, 3146-52.

182. Harris, R. E., Sundgren, P. C., Pang, Y., Hsu, M., Petrou, M., Kim, S. H., McLean, S. A., Gracely, R. H. & Clauw, D. J. 2008. Dynamic levels of glutamate within the insula are associated with improvements in multiple pain domains in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 58, 903-7.
183. Hayashida, K. I., Bynum, T., Vincler, M. & Eisenach, J. C. 2006. Inhibitory M2 muscarinic receptors are upregulated in both axotomized and intact small diameter dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 140, 259-268.
184. Head, H. & Holmes, G. 1911. Sensory disturbances from cerebral lesions. *Brain Res*, 31, 102-254.
185. Henderson, L. A., Peck, C. C., Petersen, E. T., Rae, C. D., Youssef, A. M., Reeves, J. M., Wilcox, S. L., Akhter, R., Murray, G. M. & Gustin, S. M. 2013. Chronic pain: lost inhibition? *J Neurosci*, 33, 7574-82.
186. Herrero, J. F., Laird, J. M. & Lopez-Garcia, J. A. 2000. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*, 61, 169-203.
187. Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. & Robinson, S. R. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*, 57, 417-28.
188. Hirayama, T., Dostrovsky, J. O., Gorecki, J., Tasker, R. R. & Lenz, F. A. 1989. Recordings of abnormal activity in patients with deafferentation and central pain. *Stereotact Funct Neurosurg*, 52, 120-6.
189. Hochster, H. S., Grothey, A. & Childs, B. H. 2007. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol*, 25, 4028-9.
190. Holmes, J., Stanko, J., Varchenko, M., Ding, H., Madden, V. J., Bagnell, C. R., Wyrick, S. D. & Chaney, S. G. 1998. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model. *Toxicol Sci*, 46, 342-51.
191. Holzer, A. K., Manorek, G. H. & Howell, S. B. 2006. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*, 70, 1390-4.
192. Hood, D. D., Eisenach, J. C. & Tuttle, R. 1995. Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans. *Anesthesiology*, 82, 331-43.
193. Hougaard, D. M., Bolund, L., Fujiwara, K. & Larsson, L. I. 1987. Endogenous polyamines are intimately associated with highly condensed chromatin in vivo. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of spermine and spermidine during the cell cycle and in reactivated nuclei. *Eur J Cell Biol*, 44, 151-5.
194. Hromas, R. A., North, J. A. & Burns, C. P. 1987. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett*, 36, 197-201.
195. Hsieh, J. C., Belfrage, M., Stone-Elander, S., Hansson, P. & Ingvar, M. 1995. Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. *Pain*, 63, 225-36.
196. Huggins, D. J. & Grant, G. H. 2005. The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model*, 23, 381-8.
197. Hummel, M., Strassle, B., Miller, S., Kaftan, E. & Whiteside, G. 2008. Anatomical localization and expression pattern for the NMDA-2D receptor subunit in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 155, 492-502.
198. Hwang, J. H., Hwang, K. S., Leem, J. K., Park, P. H., Han, S. M. & Lee, D. M. 1999. The antiallodynic effects of intrathecal cholinesterase inhibitors in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, 90, 492-9.
199. Iadarola, M. J., Max, M. B., Berman, K. F., Byas-Smith, M. G., Coghill, R. C., Gracely, R. H. & Bennett, G. J. 1995. Unilateral decrease in thalamic activity observed with positron emission tomography in patients with chronic neuropathic pain. *Pain*, 63, 55-64.
200. Iannetti, G. D. & Mouraux, A. 2010. From the neuromatrix to the pain matrix (and back). *Exp Brain Res*, 205, 1-12.

201. Igarashi, K. & Kashiwagi, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 39-51.
202. Inada, M., Sato, M., Morita, S., Kitagawa, K., Kawada, K., Mitsuma, A., Sawaki, M., Fujita, K. & Ando, Y. 2010. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 48, 729-34.
203. Ingvar, M. 1999. Pain and functional imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 1347-58.
204. Ip, V., Liu, J. J., Mercer, J. F. & McKeage, M. J. 2010. Differential expression of ATP7A, ATP7B and CTR1 in adult rat dorsal root ganglion tissue. *Mol Pain*, 6, 53.
205. Ishibashi, K., Okada, N., Miyazaki, T., Sano, M. & Ishida, H. 2010. Effect of calcium and magnesium on neurotoxicity and blood platinum concentrations in patients receiving mFOLFOX6 therapy: a prospective randomized study. *Int J Clin Oncol*, 15, 82-7.
206. Isnard, J., Guenot, M., Ostrowsky, K., Sindou, M. & Mauguiere, F. 2000. The role of the insular cortex in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 48, 614-23.
207. Isnard, J., Guenot, M., Sindou, M. & Mauguiere, F. 2004. Clinical manifestations of insular lobe seizures: a stereo-electroencephalographic study. *Epilepsia*, 45, 1079-90.
208. Isnard, J., Magnin, M., Jung, J., Mauguiere, F. & Garcia-Larrea, L. 2011. Does the insula tell our brain that we are in pain? *Pain*, 152, 946-51.
209. Jaggi, A. S. & Singh, N. 2011. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res*, 1381, 187-201.
210. Jerremalm, E., Wallin, I. & Ehrsson, H. 2009. New insights into the biotransformation and pharmacokinetics of oxaliplatin. *J Pharm Sci*, 98, 3879-85.
211. Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. & Woolf, C. J. 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 26, 696-705.
212. Ji, R. R. & Woolf, C. J. 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, 8, 1-10.
213. Jong, N. N., Nakanishi, T., Liu, J. J., Tamai, I. & McKeage, M. J. 2011. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 537-47.
214. Joseph, E. K., Chen, X., Bogen, O. & Levine, J. D. 2008. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain*, 9, 463-72.
215. Joseph, E. K. & Levine, J. D. 2009. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Pain*, 10, 534-41.
216. Kaas, J. H. & Collins, C. E. 2003. The organization of somatosensory cortex in anthropoid primates. *Adv Neurol*, 93, 57-67.
217. Kagiava, A., Tsingotjidou, A., Emmanouilides, C. & 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, 1100-6.
218. Kahn, K. L., Adams, J. L., Weeks, J. C., Chrischilles, E. A., Schrag, D., Ayanian, J. Z., Kiefe, C. I., Ganz, P. A., Bhoopalam, N., Potosky, A. L., Harrington, D. P. & Fletcher, R. H. 2010. Adjuvant chemotherapy use and adverse events among older patients with stage III colon cancer. *JAMA*, 303, 1037-45.
219. Kanda, M., Nagamine, T., Ikeda, A., Ohara, S., Kunieda, T., Fujiwara, N., Yazawa, S., Sawamoto, N., Matsumoto, R., Taki, W. & Shibasaki, H. 2000. Primary somatosensory cortex is actively involved in pain processing in human. *Brain Res*, 853, 282-9.
220. Kashiwagi, K., Fukuchi, J., Chao, J., Igarashi, K. & Williams, K. 1996. An aspartate residue in the extracellular loop of the N-methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons. *Mol Pharmacol*, 49, 1131-41.

221. Katano, T., Nakazawa, T., Nakatsuka, T., Watanabe, M., Yamamoto, T. & Ito, S. 2011. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 60, 609-16.
222. Kautio, A. L., Haanpaa, M., Kautiainen, H., Leminen, A., Kalso, E. & Saarto, T. 2011. Oxaliplatin scale and National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria in the assessment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Anticancer Res*, 31, 3493-6.
223. Kawamata, M. & Omote, K. 1996. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain*, 68, 85-96.
224. Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Yano, T. & Oishi, R. 2012. L type Ca(2)+ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain*, 8, 7.
225. Kergozien, S., Bansard, J. Y., Delcros, J. G., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. 1996. Polyamine deprivation provokes an antalgic effect. *Life Sci*, 58, 2209-15.
226. Kergozien, S., Delcros, J. G., Desury, D. & Moulinoux, J. P. 1999. Polyamine deprivation alters formalin-induced hyperalgesia and decreases morphine efficacy. *Life Sci*, 65, 2175-83.
227. Kim, J. H., Greenspan, J. D., Coghill, R. C., Ohara, S. & Lenz, F. A. 2007. Lesions limited to the human thalamic principal somatosensory nucleus (ventral caudal) are associated with loss of cold sensations and central pain. *J Neurosci*, 27, 4995-5004.
228. Kim, Y., Park, Y. K., Cho, H. Y., Kim, J. & Yoon, Y. W. 2011. Long-term changes in expressions of spinal glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Res*, 1389, 194-9.
229. Kimura, F. & Baughman, R. W. 1997. Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol*, 77, 709-16.
230. Kimura, M., Hayashida, K., Eisenach, J. C., Saito, S. & Obata, H. 2013. Relief of hypersensitivity after nerve injury from systemic donepezil involves spinal cholinergic and gamma-aminobutyric acid mechanisms. *Anesthesiology*, 118, 173-80.
231. Klein, J. 2000. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm*, 107, 1027-63.
232. Knijn, N., Tol, J., Koopman, M., Werter, M. J., Imholz, A. L., Valster, F. A., Mol, L., Vincent, A. D., Teerenstra, S. & Punt, C. J. 2011. The effect of prophylactic calcium and magnesium infusions on the incidence of neurotoxicity and clinical outcome of oxaliplatin-based systemic treatment in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*, 47, 369-74.
233. Kramer, D. L., Vujcic, S., Diegelman, P., Alderfer, J., Miller, J. T., Black, J. D., Bergeron, R. J. & Porter, C. W. 1999. Polyamine analogue induction of the p53-p21WAF1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells. *Cancer Res*, 59, 1278-86.
234. Krejci, A., Michal, P., Jakubik, J., Ricny, J. & Dolezal, V. 2004. Regulation of signal transduction at M2 muscarinic receptor. *Physiol Res*, 53 Suppl 1, S131-40.
235. Krubitzer, L., Clarey, J., Tweedale, R., Elston, G. & Calford, M. 1995. A redefinition of somatosensory areas in the lateral sulcus of macaque monkeys. *J Neurosci*, 15, 3821-39.
236. Kupers, R. C., Gybels, J. M. & Gjedde, A. 2000. Positron emission tomography study of a chronic pain patient successfully treated with somatosensory thalamic stimulation. *Pain*, 87, 295-302.
237. Kurth, F., Eickhoff, S. B., Schleicher, A., Hoemke, L., Zilles, K. & Amunts, K. 2010a. Cytoarchitecture and probabilistic maps of the human posterior insular cortex. *Cereb Cortex*, 20, 1448-61.
238. Kurth, F., Zilles, K., Fox, P. T., Laird, A. R. & Eickhoff, S. B. 2010b. A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis. *Brain Struct Funct*, 214, 519-34.
239. Kweekel, D. M., Gelderblom, H., Antonini, N. F., Van der Straaten, T., Nortier, J. W., Punt, C. J. & Guchelaar, H. J. 2009. Glutathione-S-transferase pi (GSTP1) codon 105 polymorphism

- is not associated with oxaliplatin efficacy or toxicity in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*, 45, 572-8.
240. Kweekel, D. M., Gelderblom, H. & Guchelaar, H. J. 2005. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev*, 31, 90-105.
241. Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J. & Morato, S. 2008. Thigmotactic responses in an open-field. *Braz J Med Biol Res*, 41, 135-40.
242. Larque, E., Sabater-Molina, M. & Zamora, S. 2007. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23, 87-95.
243. Latremoliere, A. & Woolf, C. J. 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10, 895-926.
244. Le Roy, C., Laboureyras, E., Laulin, J. P. & Simonnet, G. 2013. A polyamine-deficient diet opposes hyperalgesia, tolerance and the increased anxiety-like behaviour associated with heroin withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 103, 510-9.
245. Lecomte, T., Landi, B., Beaune, P., Laurent-Puig, P. & Loriot, M. A. 2006. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 12, 3050-6.
246. Legrain, V., Iannetti, G. D., Plaghki, L. & Mouraux, A. 2011. The pain matrix reloaded: a salience detection system for the body. *Prog Neurobiol*, 93, 111-24.
247. Lenz, F. A., Kwan, H. C., Dostrovsky, J. O. & Tasker, R. R. 1989. Characteristics of the bursting pattern of action potentials that occurs in the thalamus of patients with central pain. *Brain Res*, 496, 357-60.
248. Lenz, F. A., Seike, M., Richardson, R. T., Lin, Y. C., Baker, F. H., Khoja, I., Jaeger, C. J. & Gracely, R. H. 1993. Thermal and pain sensations evoked by microstimulation in the area of human ventrocaudal nucleus. *J Neurophysiol*, 70, 200-12.
249. Leonard, A. S. & Hell, J. W. 1997. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem*, 272, 12107-15.
250. Leonard, G. D., Wright, M. A., Quinn, M. G., Fioravanti, S., Harold, N., Schuler, B., Thomas, R. R. & Grem, J. L. 2005. Survey of oxaliplatin-associated neurotoxicity using an interview-based questionnaire in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 5, 116.
251. Levi, F., Metzger, G., Massari, C. & Milano, G. 2000. Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet*, 38, 1-21.
252. Levi, F., Perpoint, B., Garufi, C., Focan, C., Chollet, P., Depres-Brummer, P., Zidani, R., Brienza, S., Itzhaki, M., Iacobelli, S. & et al. 1993. Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur J Cancer*, 29A, 1280-4.
253. Levy, R. B., Reyes, A. D. & Aoki, C. 2006. Nicotinic and muscarinic reduction of unitary excitatory postsynaptic potentials in sensory cortex; dual intracellular recording in vitro. *J Neurophysiol*, 95, 2155-66.
254. Li, Q. F., Yao, R. Y., Liu, K. W., Lv, H. Y., Jiang, T. & Liang, J. 2010. Genetic polymorphism of GSTP1: prediction of clinical outcome to oxaliplatin/5-FU-based chemotherapy in advanced gastric cancer. *J Korean Med Sci*, 25, 846-52.
255. Lin, P. C., Lee, M. Y., Wang, W. S., Yen, C. C., Chao, T. C., Hsiao, L. T., Yang, M. H., Chen, P. M., Lin, K. P. & Chiou, T. J. 2006. N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data. *Support Care Cancer*, 14, 484-7.
256. Lin, X., Okuda, T., Holzer, A. & Howell, S. B. 2002. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*, 62, 1154-9.
257. Ling, B., Authier, N., Balayssac, D., Eschalier, A. & Coudore, F. 2007a. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain*, 128, 225-34.

258. Ling, B., Coudore-Civiale, M. A., Balayssac, D., Eschalier, A., Coudore, F. & Authier, N. 2007b. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology*, 234, 176-84.
259. Liu, X. J., Gingrich, J. R., Vargas-Caballero, M., Dong, Y. N., Sengar, A., Beggs, S., Wang, S. H., Ding, H. K., Frankland, P. W. & Salter, M. W. 2008. Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex. *Nat Med*, 14, 1325-32.
260. Loprinzi, C. L., Qin, R., Dakhil, S. R., Fehrenbacher, L., Stella, P. J., Atherton, P. J., Seisler, D. K., Qamar, R., Carlton Lewis, G. & Grothey, A. 2013. Phase III randomized, placebo (PL)-controlled, double-blind study of intravenous calcium/magnesium (CaMg) to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (sNT), N08CB: An alliance for clinical trials in oncology study. *J Clin Oncol* 31, abstr 3501.
261. Low, C. M., Lyuboslavsky, P., French, A., Le, P., Wyatte, K., Thiel, W. H., Marchan, E. M., Igarashi, K., Kashiwagi, K., Gernert, K., Williams, K., Traynelis, S. F. & Zheng, F. 2003. Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol*, 63, 1212-22.
262. Lu, P., Fan, Q. X., Wang, L. X., Wang, X., Zong, H. & Wang, R. L. 2008. [Prophylactic effect of amifostine on oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with digestive tract tumors]. *Ai Zheng*, 27, 1117-20.
263. Lughezzani, G., Karakiewicz, P. I., Bigot, P., Perrotte, P., Crepel, M., Rioux-Leclercq, N., Catros-Quemener, V., Moulinoux, J. P., Bouet, F., Cipolla, B. & Patard, J. J. 2010. The prognostic value of erythrocyte polyamines in the preoperative evaluation of patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 46, 1927-35.
264. Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R. P., Dunah, A. W. & Wolfe, B. B. 1997. The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol*, 51, 79-86.
265. Mani, S., Graham, M. A., Bregman, D. B., Ivy, P. & Chaney, S. G. 2002. Oxaliplatin: a review of evolving concepts. *Cancer Invest*, 20, 246-63.
266. Mann, S. C., Andrews, P. A. & Howell, S. B. 1991. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer*, 48, 866-72.
267. Martinez-Balibrea, E., Martinez-Cardus, A., Musulen, E., Gines, A., Manzano, J. L., Aranda, E., Plasencia, C., Neamati, N. & Abad, A. 2009. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer*, 124, 2905-10.
268. Marvizon, J. C., McRoberts, J. A., Ennes, H. S., Song, B., Wang, X., Jinton, L., Corneliussen, B. & Mayer, E. A. 2002. Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J Comp Neurol*, 446, 325-41.
269. Masuko, T., Kusama-Eguchi, K., Sakata, K., Kusama, T., Chaki, S., Okuyama, S., Williams, K., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. 2003. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J Neurochem*, 84, 610-7.
270. Mathe, G., Kidani, Y., Triana, K., Brienza, S., Ribaud, P., Goldschmidt, E., Ecstein, E., Despax, R., Musset, M. & Misset, J. L. 1986. A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalato-platinum (I-OHP). *Biomed Pharmacother*, 40, 372-6.
271. Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. & Hayashi, S. 1995. Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, 80, 51-60.
272. May, A. 2008. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain*, 137, 7-15.
273. Mayer, M. L. 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, 440, 456-62.

274. Mazzola, L., Isnard, J. & Mauguiere, F. 2006. Somatosensory and pain responses to stimulation of the second somatosensory area (SII) in humans. A comparison with SI and insular responses. *Cereb Cortex*, 16, 960-8.
275. Mazzola, L., Isnard, J., Peyron, R., Guenot, M. & Mauguiere, F. 2009. Somatotopic organization of pain responses to direct electrical stimulation of the human insular cortex. *Pain*, 146, 99-104.
276. Mazzola, L., Isnard, J., Peyron, R. & Mauguiere, F. 2012. Stimulation of the human cortex and the experience of pain: Wilder Penfield's observations revisited. *Brain*, 135, 631-40.
277. McBain, C. J. & Mayer, M. L. 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 74, 723-60.
278. McDonald, E. S., Randon, K. R., Knight, A. & Windebank, A. J. 2005. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 18, 305-13.
279. McWilliams, L. A., Cox, B. J. & Enns, M. W. 2003. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain*, 106, 127-33.
280. Meddows, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P. & McIlhinney, R. A. 2001. Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 276, 18795-803.
281. Melzack, R. 1989. Phantom limbs, the self and the brain (the D. O. Hebb Memorial Lecture). *Canadian Psychology*, 30, 1-16.
282. Melzack, R. & Casey, K. L. 1968. Sensory, motivational, and central control determinants of pain. A new conceptual model. In: KENSHALO, D. R. (ed.) *The Skin Senses*. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
283. Mendell, L. M. 1966. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol*, 16, 316-32.
284. Merskey, H. 1986. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl*, 3, S1-226.
285. Mesulam, M. M. & Mufson, E. J. 1982. Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. *J Comp Neurol*, 212, 1-22.
286. Metz, A. E., Yau, H. J., Centeno, M. V., Apkarian, A. V. & Martina, M. 2009. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2423-8.
287. Mihara, Y., Egashira, N., Sada, H., Kawashiri, T., Ushio, S., Yano, T., Ikesue, H. & Oishi, R. 2011. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol Pain*, 7, 8.
288. Milovic, V. 2001. Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13, 1021-5.
289. Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Nagao, M., Okuda, T. & Haga, T. 2001. Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 105, 87-98.
290. Mitchell, J. L., Judd, G. G., Bareyal-Leyser, A. & Ling, S. Y. 1994. Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells. *Biochem J*, 299 (Pt 1), 19-22.
291. Mitchell, P. L., Goldstein, D., Michael, M., Beale, P., Friedlander, M., Zalberg, J., White, S., Thomson, J. A. & Clarke, S. 2006. Addition of gabapentin to a modified FOLFOX regimen does not reduce oxaliplatin-induced neurotoxicity. *Clin Colorectal Cancer*, 6, 146-51.
292. Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J. P. 2005. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*, 24, 184-97.
293. Moisset, X. & Bouhassira, D. 2007. Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage*, 37 Suppl 1, S80-8.

294. Mony, L., Kew, J. N., Gunthorpe, M. J. & Paoletti, P. 2009. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 157, 1301-17.
295. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12, 529-40.
296. Morel, A., Gallay, M. N., Baechler, A., Wyss, M. & Gallay, D. S. 2013. The human insula: Architectonic organization and postmortem MRI registration. *Neuroscience*, 236, 117-35.
297. Morisset, V. & Nagy, F. 2000. Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci*, 12, 3087-95.
298. Moulinoux, J. P., Le Pogamp, P., Quemener, V., Le Calve, M., Joyeux, V. & Chevet, D. 1981. Red cell free polyamine concentrations in patients on maintenance hemodialysis. *Life Sci*, 29, 955-62.
299. Mouraux, A., Diukova, A., Lee, M. C., Wise, R. G. & Iannetti, G. D. 2011. A multisensory investigation of the functional significance of the "pain matrix". *Neuroimage*, 54, 2237-49.
300. Mouraux, A. & Iannetti, G. D. 2009. Nociceptive laser-evoked brain potentials do not reflect nociceptive-specific neural activity. *J Neurophysiol*, 101, 3258-69.
301. Mrzljak, L., Levey, A. I. & Goldman-Rakic, P. S. 1993. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5194-8.
302. Mufson, E. J. & Mesulam, M. M. 1984. Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol*, 227, 109-20.
303. Muggia, F. 2009. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 112, 275-81.
304. Murakami, Y., Tanaka, K., Matsufuji, S., Miyazaki, Y. & Hayashi, S. 1992. Antizyme, a protein induced by polyamines, accelerates the degradation of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary-cell extracts. *Biochem J*, 283 (Pt 3), 661-4.
305. Mutel, V., Buchy, D., Klingelschmidt, A., Messer, J., Bleuel, Z., Kemp, J. A. & Richards, J. G. 1998. In vitro binding properties in rat brain of [3H]Ro 25-6981, a potent and selective antagonist of NMDA receptors containing NR2B subunits. *J Neurochem*, 70, 2147-55.
306. Narita, M., Miyoshi, K., Narita, M. & Suzuki, T. 2007. Changes in function of NMDA receptor NR2B subunit in spinal cord of rats with neuropathy following chronic ethanol consumption. *Life Sci*, 80, 852-9.
307. Nedergaard, M., Kraig, R. P., Tanabe, J. & Pulsinelli, W. A. 1991. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol*, 260, R581-8.
308. Nicholson, B. & Verma, S. 2004. Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med*, 5 Suppl 1, S9-S27.
309. Niethammer, M., Kim, E. & Sheng, M. 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci*, 16, 2157-63.
310. Nieuwenhuys, R. 2012. The insular cortex: a review. *Prog Brain Res*, 195, 123-63.
311. Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M. & Hayashi, Y. 2001. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci*, 21, RC185.
312. Norcini, M., Vivoli, E., Galeotti, N., Bianchi, E., Bartolini, A. & Ghelardini, C. 2009. Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. *Pain*, 146, 141-7.

313. Obermann, M., Nebel, K., Schumann, C., Holle, D., Gizewski, E. R., Maschke, M., Goadsby, P. J., Diener, H. C. & Katsarava, Z. 2009. Gray matter changes related to chronic posttraumatic headache. *Neurology*, 73, 978-83.
314. Oldenburg, J. & Fossa, S. D. 2009. [Long-term toxicity after therapy for testicular cancer with special focus on sexual disorders]. *Urologe A*, 48, 372-6.
315. Ostrowsky, K., Isnard, J., Ryvlin, P., Guenot, M., Fischer, C. & Mauguiere, F. 2000. Functional mapping of the insular cortex: clinical implication in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 41, 681-6.
316. Ostrowsky, K., Magnin, M., Ryvlin, P., Isnard, J., Guenot, M. & Mauguiere, F. 2002. Representation of pain and somatic sensation in the human insula: a study of responses to direct electrical cortical stimulation. *Cereb Cortex*, 12, 376-85.
317. Paoletti, P., Ascher, P. & Neyton, J. 1997. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci*, 17, 5711-25.
318. Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14, 383-400.
319. Paoletti, P. & Neyton, J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7, 39-47.
320. Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I. & Neyton, J. 2000. Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron*, 28, 911-25.
321. Park, M. S., De Leon, M. & Devarajan, P. 2002. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*, 13, 858-65.
322. Park, S. B., Lin, C. S., Krishnan, A. V., Goldstein, D., Friedlander, M. L. & Kiernan, M. C. 2009. Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. *Brain*, 132, 2712-23.
323. Park, S. B., Lin, C. S., Krishnan, A. V., Goldstein, D., Friedlander, M. L. & Kiernan, M. C. 2011. Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. *Oncologist*, 16, 708-16.
324. Parsons, C. G. 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 429, 71-8.
325. Parsons, C. G., Danysz, W. & Quack, G. 1999. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*, 38, 735-67.
326. Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Rossi, E. & Monfardini, S. 2006. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol*, 59, 159-68.
327. Pattany, P. M., Yeziarski, R. P., Widerstrom-Noga, E. G., Bowen, B. C., Martinez-Arizala, A., Garcia, B. R. & Quencer, R. M. 2002. Proton magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with chronic neuropathic pain after spinal cord injury. *AJNR Am J Neuroradiol*, 23, 901-5.
328. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10625-9.
329. Penfield, W. & Boldrey, E. 1937. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, 60, 389-443.
330. Penfield, W. & Jasper, H. 1954. *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain*, Boston, MA: Little Brown and Company.
331. Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H. & Shimoji, K. 2003. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*, 97, 1108-16.
332. Petrovic, P., Ingvar, M., Stone-Elander, S., Petersson, K. M. & Hansson, P. 1999. A PET activation study of dynamic mechanical allodynia in patients with mononeuropathy. *Pain*, 83, 459-70.

333. Peyron, R. 2007. Physiologie de la douleur. *EMC - Neurologie* 151, 1-14.
334. Peyron, R., Frot, M., Schneider, F., Garcia-Larrea, L., Mertens, P., Barral, F. G., Sindou, M., Laurent, B. & Mauguiere, F. 2002. Role of operculoinsular cortices in human pain processing: converging evidence from PET, fMRI, dipole modeling, and intracerebral recordings of evoked potentials. *Neuroimage*, 17, 1336-46.
335. Peyron, R., Garcia-Larrea, L., Gregoire, M. C., Costes, N., Convers, P., Lavenne, F., Mauguiere, F., Michel, D. & Laurent, B. 1999. Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: sensory and attentional networks. *Brain*, 122 (Pt 9), 1765-80.
336. Peyron, R., Laurent, B. & Garcia-Larrea, L. 2000. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiol Clin*, 30, 263-88.
337. Peyron, R., Schneider, F., Faillenot, I., Convers, P., Barral, F. G., Garcia-Larrea, L. & Laurent, B. 2004. An fMRI study of cortical representation of mechanical allodynia in patients with neuropathic pain. *Neurology*, 63, 1838-46.
338. Piano, V., Verhagen, S., Schalkwijk, A., Hekster, Y., Kress, H., Lanteri-Minet, M., Burgers, J., Treede, R. D., Engels, Y. & Vissers, K. 2013. Treatment for Neuropathic Pain in Patients with Cancer: Comparative Analysis of Recommendations in National Clinical Practice Guidelines from European Countries. *Pain Pract*.
339. Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., Schlattau, A., Lathroum, L. & Windebank, A. J. 2011. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis*, 41, 661-8.
340. Postma, T. J., Heimans, J. J., Muller, M. J., Ossenkoppele, G. J., Vermorcken, J. B. & Aaronson, N. K. 1998. Pitfalls in grading severity of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Ann Oncol*, 9, 739-44.
341. Price, D. D. 2000. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*, 288, 1769-72.
342. Price, D. D., Hu, J. W., Dubner, R. & Gracely, R. H. 1977. Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. *Pain*, 3, 57-68.
343. Price, D. D., McGrath, P. A., Rafii, A. & Buckingham, B. 1983. The validation of visual analogue scales as ratio scale measures for chronic and experimental pain. *Pain*, 17, 45-56.
344. Price, D. D., Verne, G. N. & Schwartz, J. M. 2006. Plasticity in brain processing and modulation of pain. *Prog Brain Res*, 157, 333-352.
345. Prut, L. & Belzung, C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463, 3-33.
346. Qiu, S., Chen, T., Koga, K., Guo, Y. Y., Xu, H., Song, Q., Wang, J. J., Descalzi, G., Kaang, B. K., Luo, J. H., Zhuo, M. & Zhao, M. G. 2013. An increase in synaptic NMDA receptors in the insular cortex contributes to neuropathic pain. *Sci Signal*, 6, ra34.
347. Qiu, S., Hua, Y. L., Yang, F., Chen, Y. Z. & Luo, J. H. 2005. Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 280, 24923-30.
348. Qu, X. X., Cai, J., Li, M. J., Chi, Y. N., Liao, F. F., Liu, F. Y., Wan, Y., Han, J. S. & Xing, G. G. 2009. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 215, 298-307.
349. Quasthoff, S. & Hartung, H. P. 2002. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol*, 249, 9-17.
350. Ralston, H. J., 3rd, Ohara, P. T., Meng, X. W., Wells, J. & Ralston, D. D. 1996. Transneuronal changes of the inhibitory circuitry in the macaque somatosensory thalamus following lesions of the dorsal column nuclei. *J Comp Neurol*, 371, 325-35.
351. Randic, M., Jiang, M. C. & Cerne, R. 1993. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 13, 5228-41.

352. Ransom, R. W. & Stec, N. L. 1988. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem*, 51, 830-6.
353. Rao, R. D., Flynn, P. J., Sloan, J. A., Wong, G. Y., Novotny, P., Johnson, D. B., Gross, H. M., Renno, S. I., Nashawaty, M. & Loprinzi, C. L. 2008. Efficacy of lamotrigine in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial, N01C3. *Cancer*, 112, 2802-8.
354. Rausell, E., Cusick, C. G., Taub, E. & Jones, E. G. 1992. Chronic deafferentation in monkeys differentially affects nociceptive and nonnociceptive pathways distinguished by specific calcium-binding proteins and down-regulates gamma-aminobutyric acid type A receptors at thalamic levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2571-5.
355. Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A. & Cvitkovic, E. 1998a. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol*, 9, 1053-71.
356. Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M. & Chaney, S. G. 1998b. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol*, 25, 4-12.
357. Renn, C. L., Carozzi, V. A., Rhee, P., Gallop, D., Dorsey, S. G. & Cavaletti, G. 2011. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol Pain*, 7, 29.
358. Reynolds, I. J. & Rothermund, K. D. 1995. Characterization of the effects of polyamines on the modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor by glycine. *Neuropharmacology*, 34, 1147-57.
359. Riou, M., Stroebel, D., Edwardson, J. M. & Paoletti, P. 2012. An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PLoS One*, 7, e35134.
360. Rivat, C., Richebe, P., Laboureyras, E., Laulin, J. P., Havouis, R., Noble, F., Moulinoux, J. P. & Simonnet, G. 2008. Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain*, 137, 125-37.
361. Robinson, C. J. & Burton, H. 1980a. Organization of somatosensory receptive fields in cortical areas 7b, retroinsula, postauditory and granular insula of M. fascicularis. *J Comp Neurol*, 192, 69-92.
362. Robinson, C. J. & Burton, H. 1980b. Somatic submodality distribution within the second somatosensory (SII), 7b, retroinsular, postauditory, and granular insular cortical areas of M. fascicularis. *J Comp Neurol*, 192, 93-108.
363. Rodriguez-Raecke, R., Niemeier, A., Ihle, K., Ruether, W. & May, A. 2009. Brain gray matter decrease in chronic pain is the consequence and not the cause of pain. *J Neurosci*, 29, 13746-50.
364. Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. & Stevens, C. F. 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, 280, 1596-9.
365. Rothenberg, M. L., Oza, A. M., Bigelow, R. H., Berlin, J. D., Marshall, J. L., Ramanathan, R. K., Hart, L. L., Gupta, S., Garay, C. A., Burger, B. G., Le Bail, N. & Haller, D. G. 2003. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol*, 21, 2059-69.
366. Ruan, H., Shantz, L. M., Pegg, A. E. & Morris, D. R. 1996. The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. *J Biol Chem*, 271, 29576-82.
367. Rudkin, T. M. & Arnold, D. L. 1999. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. *Arch Neurol*, 56, 919-26.
368. Ruzzo, A., Graziano, F., Loupakis, F., Rulli, E., Canestrari, E., Santini, D., Catalano, V., Ficarelli, R., Maltese, P., Bissoni, R., Masi, G., Schiavon, G., Giordani, P., Giustini, L., Falcone, A., Tonini, G., Silva, R., Mattioli, R., Floriani, I. & Magnani, M. 2007.

- Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*, 25, 1247-54.
369. Ryvlin, P., Minotti, L., Demarquay, G., Hirsch, E., Arzimanoglou, A., Hoffman, D., Guenet, M., Picard, F., Rheims, S. & Kahane, P. 2006. Nocturnal hypermotor seizures, suggesting frontal lobe epilepsy, can originate in the insula. *Epilepsia*, 47, 755-65.
370. Rzeski, W., Pruskil, S., Macke, A., Felderhoff-Mueser, U., Reiher, A. K., Hoerster, F., Jansma, C., Jarosz, B., Stefovská, V., Bittigau, P. & Ikonomidou, C. 2004. Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. *Ann Neurol*, 56, 351-60.
371. Saif, M. W. & Hashmi, S. 2008. Successful amelioration of oxaliplatin-induced hyperexcitability syndrome with the antiepileptic pregabalin in a patient with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 61, 349-54.
372. Saif, M. W. & Reardon, J. 2005. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Ther Clin Risk Manag*, 1, 249-58.
373. Salter, M. W. 1998. Src, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol*, 56, 789-98.
374. Samimi, G., Katano, K., Holzer, A. K., Safaei, R. & Howell, S. B. 2004a. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol*, 66, 25-32.
375. Samimi, G., Safaei, R., Katano, K., Holzer, A. K., Rochdi, M., Tomioka, M., Goodman, M. & Howell, S. B. 2004b. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10, 4661-9.
376. Sandkuhler, J. 2000. Learning and memory in pain pathways. *Pain*, 88, 113-8.
377. Sandkuhler, J. 2007. Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain*, 3, 9.
378. Sanes, J. R. & Lichtman, J. W. 1999. Can molecules explain long-term potentiation? *Nat Neurosci*, 2, 597-604.
379. Sarter, M. & Parikh, V. 2005. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 6, 48-56.
380. Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V., Wong, H. K., Gong, X., Chan, S. F., Zhang, D., Nakanishi, N., Sucher, N. J. & Lipton, S. A. 2002. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol*, 87, 2052-63.
381. Sauve, D. M., Anderson, H. J., Ray, J. M., James, W. M. & Roberge, M. 1999. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol*, 145, 225-35.
382. Sawada, Y., Pereira, S. P., Murphy, G. M. & Dowling, R. H. 1994. Polyamines in the intestinal lumen of patients with small bowel bacterial overgrowth. *Biochem Soc Trans*, 22, 392S.
383. Schorge, S. & Colquhoun, D. 2003. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*, 23, 1151-8.
384. Schulze, C., McGowan, M., Jordt, S. E. & Ehrlich, B. E. 2011. Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signaling: a new mechanism to explain oxaliplatin-associated peripheral neuropathy. *Clin Colorectal Cancer*, 10, 126-33.
385. Schweinhardt, P., Glynn, C., Brooks, J., McQuay, H., Jack, T., Chessell, I., Bountra, C. & Tracey, I. 2006a. An fMRI study of cerebral processing of brush-evoked allodynia in neuropathic pain patients. *Neuroimage*, 32, 256-65.
386. Schweinhardt, P., Lee, M. & Tracey, I. 2006b. Imaging pain in patients: is it meaningful? *Curr Opin Neurol*, 19, 392-400.
387. Seifert, F. & Maihofner, C. 2011. Functional and structural imaging of pain-induced neuroplasticity. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24, 515-23.
388. Seiler, N. 1981. Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem Int*, 3, 95-110.

389. Seiler, N., Delcros, J. G. & Moulinoux, J. P. 1996. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol*, 28, 843-61.
390. Seiler, N., Sarhan, S., Grauffel, C., Jones, R., Knodgen, B. & Moulinoux, J. P. 1990. Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res*, 50, 5077-83.
391. Seminowicz, D. A., Laferriere, A. L., Millecamps, M., Yu, J. S., Coderre, T. J. & Bushnell, M. C. 2009. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *Neuroimage*, 47, 1007-14.
392. Shah, N., Thomas, T., Shirahata, A., Sigal, L. H. & Thomas, T. J. 1999. Activation of nuclear factor kappaB by polyamines in breast cancer cells. *Biochemistry*, 38, 14763-74.
393. Shi, C. J. & Cassell, M. D. 1998a. Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *J Comp Neurol*, 399, 469-91.
394. Shi, C. J. & Cassell, M. D. 1998b. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol*, 399, 440-68.
395. Shimozuma, K., Ohashi, Y., Takeuchi, A., Aranishi, T., Morita, S., Kuroi, K., Ohsumi, S., Makino, H., Mukai, H., Katsumata, N., Sunada, Y., Watanabe, T. & Hausheer, F. H. 2009. Feasibility and validity of the Patient Neurotoxicity Questionnaire during taxane chemotherapy in a phase III randomized trial in patients with breast cancer: N-SAS BC 02. *Support Care Cancer*, 17, 1483-91.
396. Siddik, Z. H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.
397. Siegel, A. M., Williamson, P. D., Roberts, D. W., Thadani, V. M. & Darcey, T. M. 1999. Localized pain associated with seizures originating in the parietal lobe. *Epilepsia*, 40, 845-55.
398. Silva, M. A., Klafke, J. Z., Rossato, M. F., Gewehr, C., Guerra, G. P., Rubin, M. A. & Ferreira, J. 2011. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. *Biochem Pharmacol*, 82, 269-77.
399. Slutsky, D. A., Manger, P. R. & Krubitzer, L. 2000. Multiple somatosensory areas in the anterior parietal cortex of the California ground squirrel (*Spermophilus beecheyii*). *J Comp Neurol*, 416, 521-39.
400. Smith, E. M., Pang, H., Cirrincione, C., Fleishman, S., Paskett, E. D., Ahles, T., Bressler, L. R., Fadul, C. E., Knox, C., Le-Lindqwister, N., Gilman, P. B., Shapiro, C. L. & Alliance for Clinical Trials in, O. 2013. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*, 309, 1359-67.
401. Sorensen, L., Siddall, P. J., Trenell, M. I. & Yue, D. K. 2008. Differences in metabolites in pain-processing brain regions in patients with diabetes and painful neuropathy. *Diabetes Care*, 31, 980-1.
402. Soulet, D., Covassin, L., Kaouass, M., Charest-Gaudreault, R., Audette, M. & Poulin, R. 2002. Role of endocytosis in the internalization of spermidine-C(2)-BODIPY, a highly fluorescent probe of polyamine transport. *Biochem J*, 367, 347-57.
403. Stefanelli, C., Stanic, I., Zini, M., Bonavita, F., Flamigni, F., Zambonin, L., Landi, L., Pignatti, C., Guarnieri, C. & Caldarera, C. M. 2000. Polyamines directly induce release of cytochrome c from heart mitochondria. *Biochem J*, 347 Pt 3, 875-80.
404. Stephenson, F. A. 2001. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets*, 2, 233-9.
405. Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G. & Lipton, S. A. 1995. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci*, 15, 6509-20.

406. Sundstrom, E., Whittemore, S., Mo, L. L. & Seiger, A. 1997. Analysis of NMDA receptors in the human spinal cord. *Exp Neurol*, 148, 407-13.
407. Ta, L. E., Espeset, L., Podratz, J. & Windebank, A. J. 2006. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*, 27, 992-1002.
408. Ta, L. E., Low, P. A. & Windebank, A. J. 2009. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol Pain*, 5, 9.
409. Tabor, H. 1962. The protective effect of spermine and other polyamines against heat denaturation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1, 496-501.
410. Takada, Y., Yonezawa, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Sugimoto, H. & Akaike, A. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 772-7.
411. Takai, H., Katayama, K., Uetsuka, K., Nakayama, H. & Doi, K. 2003. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Mol Pathol*, 75, 89-94.
412. Takao, H., Abe, O. & Ohtomo, K. 2010. Computational analysis of cerebral cortex. *Neuroradiology*, 52, 691-8.
413. 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., Ivy, P., Egorin, M., Greenslade, D., Goetz, A. & Grem, J. L. 2003. Administration of oxaliplatin to patients with renal dysfunction: a preliminary report of the national cancer institute organ dysfunction working group. *Semin Oncol*, 30, 20-5.
414. Tan-No, K., Taira, A., Wako, K., Nijima, F., Nakagawasai, O., Tadano, T., Sakurada, C., Sakurada, T. & Kisara, K. 2000. Intrathecally administered spermine produces the scratching, biting and licking behaviour in mice. *Pain*, 86, 55-61.
415. Tatsushima, Y., Egashira, N., Narishige, Y., Fukui, S., Kawashiri, T., Yamauchi, Y. & Oishi, R. 2013. Calcium channel blockers reduce oxaliplatin-induced acute neuropathy: a retrospective study of 69 male patients receiving modified FOLFOX6 therapy. *Biomed Pharmacother*, 67, 39-42.
416. Thibault, K., Calvino, B., Dubacq, S., Roualle-de-Rouville, M., Sordoillet, V., Rivals, I. & Pezet, S. 2012. Cortical effect of oxaliplatin associated with sustained neuropathic pain: exacerbation of cortical activity and down-regulation of potassium channel expression in somatosensory cortex. *Pain*, 153, 1636-47.
417. Thomas-Anterion, C., Creac'h, C., Dionet, E., Borg, C., Extier, C., Faillenot, I. & Peyron, R. 2010. De novo artistic activity following insular-SII ischemia. *Pain*, 150, 121-7.
418. Thomas, T., Shah, N., Klinge, C. M., Faaland, C. A., Adihkarakunnathu, S., Gallo, M. A. & Thomas, T. J. 1999. Polyamine biosynthesis inhibitors alter protein-protein interactions involving estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*, 22, 131-9.
419. Thomas, T. & Thomas, T. J. 1994. Estradiol control of ornithine decarboxylase mRNA, enzyme activity, and polyamine levels in MCF-7 breast cancer cells: therapeutic implications. *Breast Cancer Res Treat*, 29, 189-201.
420. Thomas, T. J. & Bloomfield, V. A. 1984. Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers*, 23, 1295-306.
421. Thompson, S. W., King, A. E. & Woolf, C. J. 1990. Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *Eur J Neurosci*, 2, 638-49.
422. Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T. & Huganir, R. L. 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C

- phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem*, 272, 5157-66.
423. Todd, R. C. & Lippard, S. J. 2009. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 1, 280-91.
424. Tofthagen, C. 2010. Surviving chemotherapy for colon cancer and living with the consequences. *J Palliat Med*, 13, 1389-91.
425. Tofthagen, C., McAllister, R. D. & McMillan, S. C. 2011. Peripheral neuropathy in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin. *Clin J Oncol Nurs*, 15, 182-8.
426. Tolle, T. R., Berthele, A., Zieglgansberger, W., Seeburg, P. H. & Wisden, W. 1993. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci*, 13, 5009-28.
427. Torgner, I. & Kvamme, E. 1990. Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol*, 12, 11-7.
428. Tournigand, C., Cervantes, A., Figer, A., Lledo, G., Flesch, M., Buyse, M., Mineur, L., Carola, E., Etienne, P. L., Rivera, F., Chirivella, I., Perez-Staub, N., Louvet, C., Andre, T., Tabah-Fisch, I. & de Gramont, A. 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*, 24, 394-400.
429. Tracey, I. 2008. Imaging pain. *Br J Anaesth*, 101, 32-9.
430. Tracey, I., Becerra, L., Chang, I., Breiter, H., Jenkins, L., Borsook, D. & Gonzalez, R. G. 2000. Noxious hot and cold stimulation produce common patterns of brain activation in humans: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett*, 288, 159-62.
431. Tracey, I. & Mantyh, P. W. 2007. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, 55, 377-91.
432. Traynelis, S. F., Burgess, M. F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P. & Powers, J. L. 1998. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci*, 18, 6163-75.
433. Traynelis, S. F., Hartley, M. & Heinemann, S. F. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268, 873-6.
434. Treede, R. D. 2006. Chapter 1 Pain and hyperalgesia: definitions and theories. *Handb Clin Neurol*, 81, 3-10.
435. Treede, R. D., Kenshalo, D. R., Gracely, R. H. & Jones, A. K. 1999. The cortical representation of pain. *Pain*, 79, 105-11.
436. Ture, U., Yasargil, D. C., Al-Mefty, O. & Yasargil, M. G. 1999. Topographic anatomy of the insular region. *J Neurosurg*, 90, 720-33.
437. Ture, U., Yasargil, M. G., Al-Mefty, O. & Yasargil, D. C. 2000. Arteries of the insula. *J Neurosurg*, 92, 676-87.
438. Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A. & Cavalheiro, E. A. 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3, 154-71.
439. Ultenius, C., Linderoth, B., Meyerson, B. A. & Wallin, J. 2006. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett*, 399, 85-90.
440. van den Broeke, E. N., van Rijn, C. M., Biurrun Manresa, J. A., Andersen, O. K., Arendt-Nielsen, L. & Wilder-Smith, O. H. 2010. Neurophysiological correlates of nociceptive heterosynaptic long-term potentiation in humans. *J Neurophysiol*, 103, 2107-13.
441. Varma, R., Hector, S., Greco, W. R., Clark, K., Hawthorn, L., Porter, C. & Pendyala, L. 2007. Platinum drug effects on the expression of genes in the polyamine pathway: time-course and concentration-effect analysis based on Affymetrix gene expression profiling of A2780 ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59, 711-23.

442. Vincenzi, B., Frezza, A. M., Schiavon, G., Spoto, C., Silvestris, N., Addeo, R., Catalano, V., Graziano, F., Santini, D. & 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*, 21, 1313-9.
443. Vion-dury, J., Salvan, A. M. & Cozzone, P. J. 1999. La spectrométrie de résonance magnétique du proton dans l'exploration non invasive du métabolisme cérébral humain : applications cliniques actuelles et futures. *Rev Neurol*, 155, 903-926.
444. Vogt, B. A., Berger, G. R. & Derbyshire, S. W. 2003. Structural and functional dichotomy of human midcingulate cortex. *Eur J Neurosci*, 18, 3134-44.
445. von Delius, S., Eckel, F., Wagenpfeil, S., Mayr, M., Stock, K., Kullmann, F., Obermeier, F., Erdmann, J., Schmelz, R., Quasthoff, S., Adelsberger, H., Bredenkamp, R., Schmid, R. M. & Lersch, C. 2007. 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*, 25, 173-80.
446. von Hehn, C. A., Baron, R. & Woolf, C. J. 2012. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73, 638-52.
447. Vujcic, S., Diegelman, P., Bacchi, C. J., Kramer, D. L. & Porter, C. W. 2002. Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J*, 367, 665-75.
448. Wallace, H. M., Fraser, A. V. & Hughes, A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*, 376, 1-14.
449. Wallace, H. M. & Mackarel, A. J. 1998. Regulation of polyamine acetylation and efflux in human cancer cells. *Biochem Soc Trans*, 26, 571-5.
450. Wang, D. & Lippard, S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 307-20.
451. Wang, W. S., Lin, J. K., Lin, T. C., Chen, W. S., Jiang, J. K., Wang, H. S., Chiou, T. J., Liu, J. H., Yen, C. C. & Chen, P. M. 2007. Oral glutamine is effective for preventing oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer patients. *Oncologist*, 12, 312-9.
452. Wang, X. C., Du, X. X., Tian, Q. & Wang, J. Z. 2008. Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat. *Neurochem Res*, 33, 814-9.
453. Warwick, R. A. & Hanani, M. 2013. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain*, 17, 571-80.
454. Wasserman, E., Cuvier, C., Lokiec, F., Goldwasser, F., Kalla, S., Mery-Mignard, D., Ouldkaci, M., Besmaine, A., Dupont-Andre, G., Mahjoubi, M., Marty, M., Misset, J. L. & Cvitkovic, E. 1999. Combination of oxaliplatin plus irinotecan in patients with gastrointestinal tumors: results of two independent phase I studies with pharmacokinetics. *J Clin Oncol*, 17, 1751-9.
455. Webster, R. G., Brain, K. L., Wilson, R. H., Grem, J. L. & Vincent, A. 2005. Oxaliplatin induces hyperexcitability at motor and autonomic neuromuscular junctions through effects on voltage-gated sodium channels. *Br J Pharmacol*, 146, 1027-39.
456. Wei, F., Wang, G. D., Kerchner, G. A., Kim, S. J., Xu, H. M., Chen, Z. F. & Zhuo, M. 2001. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci*, 4, 164-9.
457. Whalley, B. J., Postlethwaite, M. & Constanti, A. 2005. Further characterization of muscarinic agonist-induced epileptiform bursting activity in immature rat piriform cortex, in vitro. *Neuroscience*, 134, 549-66.
458. Widerstrom-Noga, E., Pattany, P. M., Cruz-Almeida, Y., Felix, E. R., Perez, S., Cardenas, D. D. & Martinez-Arizala, A. 2013. Metabolite concentrations in the anterior cingulate cortex predict high neuropathic pain impact after spinal cord injury. *Pain*, 154, 204-12.
459. Wilkes, G. 2007. Peripheral neuropathy related to chemotherapy. *Semin Oncol Nurs*, 23, 162-73.

460. Williams, K. 1994. Modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor by polyamines: molecular pharmacology and mechanisms of action. *Biochem Soc Trans*, 22, 884-7.
461. Williams, K. 1996. Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett*, 215, 9-12.
462. Williams, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J*, 325 (Pt 2), 289-97.
463. Williams, K., Kashiwagi, K., Fukuchi, J. & Igarashi, K. 1995. An acidic amino acid in the N-methyl-D-aspartate receptor that is important for spermine stimulation. *Mol Pharmacol*, 48, 1087-98.
464. Williams, K., Zappia, A. M., Pritchett, D. B., Shen, Y. M. & Molinoff, P. B. 1994. Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, 45, 803-9.
465. Willis, W. D., Jr., Zhang, X., Honda, C. N. & Giesler, G. J., Jr. 2002. A critical review of the role of the proposed VMpo nucleus in pain. *J Pain*, 3, 79-94.
466. Wilson, J. A., Garry, E. M., Anderson, H. A., Rosie, R., Colvin, L. A., Mitchell, R. & Fleetwood-Walker, S. M. 2005. NMDA receptor antagonist treatment at the time of nerve injury prevents injury-induced changes in spinal NR1 and NR2B subunit expression and increases the sensitivity of residual pain behaviours to subsequently administered NMDA receptor antagonists. *Pain*, 117, 421-32.
467. Windebank, A. J. & Grisold, W. 2008. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 13, 27-46.
468. Wollmuth, L. P. & Sobolevsky, A. I. 2004. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci*, 27, 321-8.
469. Wong, C. G., Bottiglieri, T. & Snead, O. C., 3rd 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*, 54 Suppl 6, S3-12.
470. Woolf, C. J. 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306, 686-8.
471. Woolf, C. J. & Salter, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-9.
472. Woolf, C. J. & Thompson, S. W. 1991. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, 44, 293-9.
473. Woynarowski, J. M., Faivre, S., Herzig, M. C., Arnett, B., Chapman, W. G., Trevino, A. V., Raymond, E., Chaney, S. G., Vaisman, A., Varchenko, M. & Juniewicz, P. E. 2000. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol*, 58, 920-7.
474. Wu, Z., Ouyang, J., He, Z. & Zhang, S. 2012. Infusion of calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 48, 1791-8.
475. Xiao, W. H., Zheng, H. & Bennett, G. J. 2012. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience*, 203, 194-206.
476. Xiao, Z., Deng, P. Y., Yang, C. & Lei, S. 2009. Modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in the entorhinal cortex of juvenile rats. *J Neurophysiol*, 102, 659-69.
477. Xu, X. T., Dai, Z. H., Xu, Q., Qiao, Y. Q., Gu, Y., Nie, F., Zhu, M. M., Tong, J. L. & 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, 288-98.
478. Yaksh, T. L., Dirksen, R. & Harty, G. J. 1985. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur J Pharmacol*, 117, 81-8.
479. Yamamoto, T. & Yaksh, T. L. 1992. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 49, 121-8.

480. Yoon, S. Y., Robinson, C. R., Zhang, H. & Dougherty, P. M. 2013. Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J Pain*, 14, 205-14.
481. Yu, A. J. & Dayan, P. 2005. Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron*, 46, 681-92.
482. Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J. & Johnson, L. R. 2001. Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G130-8.
483. Zhang, R. X., Lu, Z. H., Wan, D. S., Wu, X. J., Ding, P. R., Kong, L. H., Pan, Z. Z. & Chen, G. 2012. Neuroprotective effect of neurotrophin on chronic oxaliplatin-induced neurotoxicity in stage II and stage III colorectal cancer patients: results from a prospective, randomised, single-centre, pilot clinical trial. *Int J Colorectal Dis*, 27, 1645-50.
484. Zhang, S., Lovejoy, K. S., Shima, J. E., Lagpacan, L. L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J. W., Chen, X., Lippard, S. J. & Giacomini, K. M. 2006. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res*, 66, 8847-57.
485. Zhang, W., Shi, C. X., Gu, X. P., Ma, Z. L. & Zhu, W. 2009. Ifenprodil induced antinociception and decreased the expression of NR2B subunits in the dorsal horn after chronic dorsal root ganglia compression in rats. *Anesth Analg*, 108, 1015-20.
486. Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T. & Kaneko, S. 2012. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain*, 8, 55.
487. Zheng, F., Erreger, K., Low, C. M., Banke, T., Lee, C. J., Conn, P. J. & Traynelis, S. F. 2001. Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci*, 4, 894-901.
488. Zhuo, M. 2008. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci*, 31, 199-207.
489. Zigmond, A. S. & Snaith, R. P. 1983. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*, 67, 361-70.
490. Zwelling, L. A., Anderson, T. & Kohn, K. W. 1979. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis- and trans-platinum(II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer Res*, 39, 365-9.