HAL
open science

# Etude des marqueurs de la neuropathie à l'oxaliplatine

Jean-Baptiste Delmotte

## To cite this version:

Jean-Baptiste Delmotte. Etude des marqueurs de la neuropathie à l'oxaliplatine. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS600 . tel-02162059

**HAL Id: tel-02162059**

**https://theses.hal.science/tel-02162059v1**

Submitted on 21 Jun 2019

**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 PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLS600

Thèse de doctorat

UNIVERSITÉ PARIS SUD

Comprendre le monde, construire l'avenir

# Etude des marqueurs de la neuropathie à l'oxaliplatine.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué : Pharmacologie-Toxicologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 18 décembre 2018 par

**Jean-Baptiste DELMOTTE**

Composition du Jury :

| | |
|---|---|
| **Anne ROUSSIN**<br>Pr. Université de Toulouse | Président |
| **Claire DEMIOT**<br>Dr. Université de Limoges | Rapporteur |
| **Claude DUBRAY**<br>Pr. Université Clermont Auvergne | Rapporteur |
| **Nicolas AUZEIL**<br>Dr. Université Paris Descartes | Examinateur |
| **André RIEUTORD**<br>Dr. Hôpitaux universitaires Paris Sud | Examinateur |
| **François COUDORE**<br>Pr. Université Paris Sud | Directeur de thèse |

# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse, le Professeur **François COUDORE** pour son encadrement et son soutien tout au long de ce travail. Je lui suis profondément reconnaissant pour sa disponibilité, sa patience et pour tout le temps qu'il m'a consacré pour amener ce travail jusqu'à son terme.

J'adresse mes remerciements au Docteur **Claire DEMIOT** et au Professeur **Claude DUBRAY** qui ont joué des rôles clés dans la progression de mon doctorat et qui ont accepté de devenir rapporteurs de ce travail de recherche. Je remercie également le professeur **Anne ROUSSIN** d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie vivement le Docteur **Hélène BEAUSSIER** qui m'a offert l'opportunité de m'investir dans un projet passionnant. Son grand professionnalisme tant sur le plan scientifique que managérial constitue un exemple à observer pour accomplir au mieux le métier de pharmacien hospitalier.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Docteur **Nicolas AUZEIL** qui m'a initié à la rigueur scientifique. Il s'est toujours montré très disponible pour me former aux techniques d'analyses chimiques, m'accompagner dans la réalisation et dans l'interprétation des résultats. Merci pour ce soutien précieux qui a perduré bien au-delà de mon stage au laboratoire C-TAC.

Je remercie chaleureusement le Docteur **André RIEUTORD** qui a montré beaucoup d'intérêt pour mon projet de thèse, pour mon projet professionnel et mon projet de vie. Son leadership fondé sur la relation patient restera pour moi un modèle à cultiver et à retransmettre.

J'adresse de sincères remerciements au Docteur **France MASSICOT**, qui, à l'initiative du projet, m'a guidé dans la réalisation du travail de recherche. Je lui suis fort reconnaissant pour son écoute, son investissement, son soutien et pour m'avoir accompagné dans ce passionnant travail depuis mon Master 2.

Je suis reconnaissant envers le Professeur **Olivier LAPREVOTE** qui m'a accueilli avec beaucoup de bienveillance à mon égard dans son laboratoire de spectrométrie de masse à la faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes pour pouvoir y réaliser les travaux de lipidomique. Je remercie très chaleureusement le professeur **Jean-Michel WARNET** pour toutes les marques d'attention qu'il a portées à mon travail et à moi-même.

Je remercie vivement les étudiants que j'ai encadrés pendant ces quatre années de thèse, **Kahina ABDALLAH, Mihary ANDRIAMAMONJY et Rodolphe LEBEAU** qui m'ont apporté une aide fort précieuse dans la réalisation des différents travaux.

Je remercie les médecins, oncologues et neurologues ainsi que les infirmières de l'hôpital Saint Joseph pour le rôle capital qu'ils ont joué dans la réalisation du travail. Je remercie les attachés de recherche clinique de l'hôpital Paris Saint Joseph qui m'ont aidé dans la conception de l'étude et plus particulièrement **Meyada BENKACIMI, Lynda BENDJEMAR et Aymeric LE NEINDRE** qui ont assuré la continuité du projet de recherche clinique.

Je tiens également à rendre hommage aux **patients** que j'ai croisés au cours de mon expérience professionnelle sans qui ce travail n'aurait été possible. J'ai partagé avec eux une véritable expérience humaine.

Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant mon doctorat et mon internat : **doctorants, médecins, pharmaciens, co-internes, infirmiers** et **préparateurs**. J'ai construit mon parcours avec eux et je poursuis mon projet professionnel grâce à tout ce qu'ils m'ont transmis.

*Pour terminer, j'adresse mes plus intimes remerciements*

A toute ma famille, et tout particulièrement mon père, toujours présent en toutes circonstances pour me venir en soutien. Merci de m'avoir initié dès mon plus jeune âge à la science et de m'avoir donné goût à la recherche.

A ma grand-mère, partie cette année dans son centième printemps et à ma mère qui reprend vie chaque jour dans mes pensées et dans mes rêves.

A mon épouse pour qui je serai toujours admiratif de ses qualités et sans cesse émerveillé par la richesse de ses origines culturelles. C'est tous les jours un bonheur de marcher ensemble sur le même chemin.

A Thibault, mon premier enfant et mon plus merveilleux bouleversement. Il est ma plus grande richesse, une source intarissable de motivation, d'inspiration et de bonheur.

Merci pour ces premiers instants magiques et pour tous ceux à venir.

# SOMMAIRE

**SOMMAIRE** ..... **7**

**TABLES DES ILLUSTRATIONS** ..... **11**

1. Table des Figures ..... 12
2. Table des Tableaux ..... 18
3. Table des Annexes ..... 19

**ABREVIATIONS** ..... **20**

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS** ..... **24**

**PREAMBULE** ..... **27**

**PARTIE INTRODUCTIVE** ..... **29**

**Chapitre I : L'oxaliplatine et son utilisation en oncologie** ..... **31**

1. Présentation de l'oxaliplatine ..... 31
   - *1.1. Chimie de la molécule* ..... *31*
   - *1.2. Pharmacodynamie et pharmacocinétique* ..... *32*
   - *1.3. Indications thérapeutiques, efficacité et tolérance* ..... *34*
2. Neurotoxicité de l'oxaliplatine ..... 37
   - *2.1. Anatomie et physiologie des structures nerveuses* ..... *37*
   - *2.2. La sécrétion sudorale* ..... *41*
   - *2.3. Expression clinique des neuropathies périphériques* ..... *43*
   - *2.4. Physiopathologie de la neuropathie sous oxaliplatine* ..... *44*
3. Prophylaxie des neuropathies ..... 47
   - *3.1. Modification de l'administration* ..... *47*
   - *3.2. Chimioprophylaxie* ..... *48*
   - *3.3. Molécules antioxydantes et compléments alimentaires* ..... *51*
   - *3.4. Thérapies non pharmacologiques* ..... *52*

**Chapitre II : L'étude de la neuropathie** ..... **55**

1. Evaluation de la neuropathie induite par l'oxaliplatine .....55

*1.1. Etude de l'intégrité des structures nerveuses.....55*

*1.2. Evaluation par le patient .....57*

*1.3. Utilisation de biomarqueurs.....59*

2. Définitions et bases réglementaires de la recherche clinique en France.....61

3. Fonctionnement des dispositifs d'évaluation de la neuropathie.....63

*3.1. Description et fonctionnement du Thermotest .....63*

*3.2. Description et fonctionnement des filaments de Von Frey.....66*

*3.3. Description et fonctionnement du Sudoscan .....69*

**Chapitre III : L'analyse lipidomique ..... 77**

1. Des lipides à la lipidomique .....77

*1.1. Présentation et classification des lipides.....77*

*1.2. Rôles biologiques des lipides.....85*

*1.3. Biochimie des lipides cérébraux.....86*

*1.4. Définition de la lipidomique .....89*

2. Principe de l'analyse lipidomique.....90

*2.1. La préparation d'échantillon.....90*

*2.2. La séparation chromatographique .....96*

*2.3. Le système de d'analyse par spectrométrie de masse .....99*

*2.4. Design expérimental de l'analyse lipidomique.....104*

**PARTIE EXPERIMENTALE ..... 114**

**ENONCE DE LA PROBLEMATIQUE ..... 115**

**Chapitre IV : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche clinico-biologique ..... 117**

1. Méthodologie de l'étude clinique LIPIDOXA.....117

*1.1. Design de l'étude LIPIDOXA.....117*

*1.2. Réglementation de l'étude LIPIDOXA.....118*

*1.3. Evaluation de la neuropathie induite par l'oxaliplatine .....119*

*1.4. Evaluation des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation ..... 124*

2. Description de la population de l'étude LIPIDOXA ..... 128

3. Evolution des seuils de sensibilité ..... 133

*3.1. Evolution des seuils de détection thermique ..... 134*

*3.2. Evolution des seuils de détection mécanique ..... 138*

*3.3. Evolution de la douleur neuropathique ..... 141*

*3.4. Etude annexe : comparaison des seuils de sensibilité thermique au niveau de deux régions de la main ..... 144*

4. Evaluation des marqueurs biochimiques de l'inflammation et du stress oxydant .... 146

*4.1. Évaluation du niveau plasmatique de stress oxydant ..... 146*

*4.2. Dosage plasmatique de la prostaglandine $E_2$ ..... 149*

*4.3. Dosage plasmatique de l'interleukine 6 ..... 152*

*4.4. Evaluation de l'activation du récepteur $P2X_7$ ..... 154*

5. Discussion générale de l'étude LIPIDOXA ..... 155

*5.1. Discussion des résultats cliniques ..... 155*

*5.2. Discussion des résultats des tests biochimiques ..... 159*

*5.3. Pistes d'amélioration de la méthodologie de LIPIDOXA ..... 162*

**Chapitre V : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche électrochimique ..... 167**

1. Matériel et méthodes ..... 167

*1.1. Rationnel de l'étude ..... 167*

*1.2. Aspect réglementaire et enregistrements ..... 167*

*1.3. Patients ..... 168*

*1.4. Méthodes ..... 169*

2. Résultats de l'étude CANALOXA ..... 171

*2.1. Description de la population incluse ..... 171*

*2.2. Conductances électrochimiques de la peau ..... 172*

*2.3. Seuils de sensibilité thermique ..... 180*

*2.4. Douleur neuropathique ..... 183*

*2.5. Performance du Sudoscan dans la détection de la NPIO.....184*

Discussion des résultats de l'étude CANALOXA .....186

**Chapitre VI : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche lipidomique..... 191**

1. Analyse lipidomique globale : étude du lipidome des patients traités par oxaliplatine 191

*1.1. Matériel et méthodes.....191*

*1.2. Résultats .....194*

2. Analyse lipidomique ciblée : mise au point de la méthode d'étude des gangliosides200

*2.1. L'infusion directe des standards commerciaux .....201*

*2.2. Mise au point de l'analyse chromatographique.....203*

*2.3. Mise au point de l'extraction des gangliosides .....206*

*2.4. Analyse sur plasma .....208*

3. Discussion .....211

*3.1. Analyse lipidomique globale .....211*

*3.1. Analyse lipidomique ciblée.....214*

**DISCUSSION GENERALE ..... 217**

**CONCLUSION..... 225**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 227**

**ANNEXES..... 245**

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

# 1. Table des Figures

Figure 1 | Dérivés du platine utilisés en thérapeutique en 2018. .....32

Figure 2 | Le pharmacophore (matérialisé par un carré vert) des trois dérivés du platine utilisé en France.....32

Figure 3 | Bioactivation de l'oxaliplatine. .....33

Figure 4 | Mécanisme de formation des adduits d'oxaliplatine sur l'ADN. .....33

Figure 5 | Histologie d'un nerf.....38

Figure 6 | Classification des fibres nerveuses sensitives .....39

Figure 7 | Intensité de la perception des différents stimuli thermiques.....40

Figure 8| Histologie de la peau. .....43

Figure 9 | Transport des ions Na+ et Cl- dans la glande sudoripare. .....43

Figure 10 | Hypothèse du mécanisme physiopathologique d'induction des douleurs neuropathiques par l'oxaliplatine. *D'après Massicot et al, 2013* .....46

Figure 11 | Le Thermotest et l'interface graphique du logiciel pilotant l'appareil (SENSELab). .64

Figure 12| Schéma de la thermode.....65

Figure 13| Les deux méthodes de détermination des seuils de sensibilité avec le Thermotest.66

Figure 14| Enregistrement typique des seuils de sensibilité au froid puis au chaud au niveau du pouce droit chez un volontaire sain. *D'après Fruhstorfer, et al., 1976* .....66

Figure 15 | Filaments classiques de Von Frey.....68

Figure 16 | Filaments électroniques de Von Frey .....68

Figure 17| Test de sudation thermorégulatrice (TST) .....70

Figure 18| Résultats du test TST .....70

Figure 19| Dispositif médical Sudoscan (IMPETO, Paris, France) .....73

Figure 20| L'interface graphique du Sudoscan.....73

Figure 21| Principe de fonctionnement du Sudoscan (IMPETO, Paris, France) .....74

Figure 22|Formule générale des phospholipides .....79

Figure 23|Nomenclature des phospholipides .....80

Figure 24|Structure de la sphingosine.....81

Figure 25|Structure d'une céramide .....81

Figure 26|Structure d'un ganglioside ..... 82

Figure 27|Structure du noyau stérane ..... 84

Figure 28|Structure des principaux chefs de file des stéroïdes ..... 84

Figure 29 |Les sciences *omics* : la lipidomique fait partie de la métabolomique. ..... 90

Figure 30|Etapes de l'extraction liquide liquide ..... 91

Figure 31|Etapes de l'extraction SPE. ..... 94

Figure 32|Dispositif d'extraction sur phase solide SPE ..... 94

Figure 33 | Force éluante des principaux solvants de SPE. ..... 96

Figure 34| Principe de l'électronébulisation en mode positif ..... 100

Figure 35| Schéma de l'analyseur quadripôlaire ..... 102

Figure 36 | Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron. ..... 103

Figure 37|Schéma interne du SYNAPT G2 HDMS. ..... 104

Figure 38 | Étapes du prétraitement des données LC-MS à l'aide du logiciel XCMS ..... 106

Figure 39 | Principe de la détection des régions d'intérêt. ..... 107

Figure 40 | Principe de construction et de représentation d'une analyse en composantes principales ..... 110

Figure 41 | Représentation graphique d'un test de permutation ..... 112

Figure 42 | Représentation S-plot d'un modèle généré en OPLS-DA. ..... 113

Figure 43 |Résumé des caractéristiques du test de mesure des sensibilités thermiques. ..... 121

Figure 44 | Configuration des mesures du Thermotest. ..... 122

Figure 45 | Formule du 2',7'-diacétate de dichlorodihydrofluorescéine, sonde fluorescente utilisée dans la détection d'espèces réactives de l'oxygène. ..... 125

Figure 46 | Principe de l'isolement des cellules mononucléées du sang par gradient de Ficoll. 127

Figure 47| Evolution de l'effectif de la population dans l'étude. ..... 128

Figure 48| Moyennes des doses cumulées d'oxaliplatine selon le grade de neuropathie à 6 mois. ..... 130

Figure 49| Evolution des seuils de détection thermique pour l'ensemble de la population de l'étude. ..... 134

Figure 50| Evolution des seuils de détection thermique selon la durée du traitement. ..... 135

Figure 51| Evolution des seuils de détection thermique selon le grade de neuropathie. ..... 136

Figure 52| Evolution des seuils de détection thermique selon le délai d'adaptation posologique. ..... 137

Figure 53| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey pour l'ensemble de la population. ..... 139

Figure 54| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon la durée du traitement. ..... 139

Figure 55| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon le grade de neuropathie. ..... 140

Figure 56| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon le délai d'adaptation posologique. ..... 140

Figure 57| Evolution des seuils de douleur thermique pour l'ensemble de la population de l'étude. ..... 141

Figure 58| Evolution des seuils de douleur thermique selon le grade de neuropathie. ..... 142

Figure 59| Evolution des seuils de douleur thermique selon le délai d'adaptation posologique. ..... 142

Figure 60| Evolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps pour l'ensemble des patients ..... 146

Figure 61| Evolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps et selon le sexe. ..... 147

Figure 62 | Evolution du stress oxydant au cours du temps et selon le grade de neuropathie à 6 mois. ..... 148

Figure 63| Evolution de la concentration plasmatique en $PGE_2$ au cours du temps pour l'ensemble des patients ..... 149

Figure 64| Evolution de la concentration plasmatique en prostaglandines $E_2$ au cours du temps et selon le sexe ..... 150

Figure 65 | Evolution de la concentration en prostaglandines $E_2$ au cours du temps et selon le grade de neuropathie à six mois. ..... 151

Figure 66| Evolution de la concentration plasmatique en IL6 au cours du temps pour l'ensemble des patients ..... 152

Figure 67| Evolution de la concentration plasmatique en interleukine 6 au cours du temps et selon le sexe. ..... 153

Figure 68 | Evolution de la concentration en interleukine 6 au cours du temps et selon le grade de neuropathie à six mois. ..... 154

Figure 69| Représentation schématique de trois courbes ROC avec différentes valeurs d'AUC ..... 171

Figure 70| Distribution des valeurs d'ESC mesurées au niveau des mains chez les 36 patients. .....174

Figure 71| Distribution des valeurs d'ESC mesurées au niveau des mains chez les 36 patients. .....174

Figure 72| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le grade de neuropathie mesurée selon l'échelle CTCAE.....175

Figure 73| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le stade du cancer.176

Figure 74| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon la localisation de la tumeur. .....176

Figure 75| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le caractère douloureux ou non de la neuropathie évalué avec le questionnaire NPSI.....177

Figure 76| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le protocole de neuropathie.....177

Figure 77| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement.....178

Figure 78| Conductances électrochimiques des mains en fonction du score de neuropathie obtenu avec le questionnaire NPSI. .....179

Figure 79| Conductances électrochimiques des pieds en fonction du score de neuropathie obtenu avec le questionnaire NPSI. .....179

Figure 80| Dose cumulée d'oxaliplatine selon la conductance mesurée au niveau des mains et des pieds. .....180

Figure 81| Moyenne des seuils de détection du froid et du chaud mesurés au niveau des mains et des pieds chez les 36 patients de l'étude.....182

Figure 82| Moyenne des seuils de détection du froid et du chaud mesurés au niveau des mains et des pieds chez les 36 patients de l'étude.....182

Figure 83| Courbes ROC testant la performance du Sudoscan à détecter une neuropathie douloureuse à partir de la mesure des conductances électrochimiques au niveau des mains (A) et des pieds (B). .....185

Figure 84| Courbes ROC testant la performance du Sudoscan à détecter une neuropathie à partir de la mesure des conductances électrochimiques au niveau des mains (A) et des pieds (B). .....185

Figure 85 | Score scatter plot de la PCA-X univariée des CQ (pools) et des blancs de l'analyse en ESI+.....194

Figure 86 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif au genre des patients .....195

Figure 87 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif à la localisation de la tumeur....196

Figure 88 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif à la survenue d'une neuropathie chronique....196

Figure 89 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t3....198

Figure 90 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t6....199

Figure 91 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t12....199

Figure 92 | Evolution (T0 à t12) des taux plasmatiques des neuf TG insaturés présentant une baisse significative entre t0 et t6....200

Figure 93 | Spectre de masse de l'échantillon de gangliosides totaux acquis en mode ESI-....202

Figure 94 | Spectre de masse de l'échantillon GD3 ($10^{-6}$ M) acquis en mode ESI-....202

Figure 95 |Gradient d'élution des solvants de la phase mobile....203

Figure 96 | Profil de l'échantillon GD3 analysé par CLHP-HRMS....204

Figure 97 | Chromatogramme en mode ESI- de l'analyse d'un échantillon de gangliosides purifiés après extraction en phase solide....205

Figure 98 | Chromatogramme reconstitué à 290,08 m/z de l'analyse d'un échantillon de gangliosides en mélange....205

Figure 99 | Protocole d'extraction des gangliosides retenus....207

Figure 100 | Répartition des gangliosides selon les fractions d'élution....208

Figure 101| Distribution des seuils de détection du froid (CDT) et au chaud (WDT) des mains....259

Figure 102| Distribution des seuils de détection du froid (CDT) et au chaud (WDT) des pieds....259

Figure 103| Distribution des seuils de douleur au froid (CDT) et au chaud (WDT) des mains..260

Figure 104| Distribution des seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des pieds....260

Figure 105| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le grade de neuropathie évalué le jour de la visite....261

Figure 106| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le stade de cancer....261

Figure 107| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon la localisation primitive de la tumeur. ..... 262

Figure 108| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le caractère douloureux de la neuropathie évalué par le questionnaire NPSI. ..... 262

Figure 109| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le protocole de chimiothérapie. ..... 263

Figure 110| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement. ..... 263

Figure 111| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le grade de la neuropathie évalué le jour de la visite. ..... 264

Figure 112| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le stade du cancer. ..... 264

Figure 113| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon la localisation de la tumeur. ..... 265

Figure 114| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le caractère douloureux de la neuropathie évalué par le questionnaire NPSI. ..... 265

Figure 115| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le protocole de chimiothérapie. ..... 266

Figure 116| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement. ..... 266

## 2. Table des Tableaux

Tableau 1 | Protocoles de chimiothérapies à base d'oxaliplatine. .....36

Tableau 2 | Tableau d'ajustement posologique de l'oxaliplatine selon la toxicité neurologique. .....48

Tableau 3 | Classification des phases stationnaires en extraction SPE .....95

Tableau 4| Critères d'éligibilité à l'essai clinique LIPIDOXA. .....117

Tableau 5 | Caractéristiques des filaments de Von Frey utilisés pour l'étude LIPIDOXA. .....123

Tableau 6| Caractéristiques de la population de l'étude LIPIDOXA.....129

Tableau 7 | Contingence croisant l'adaptation posologique avec le grade de NPIO. .....131

Tableau 8 | Contingence croisant le stade du cancer avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part.....132

Tableau 9 | Contingence croisant l'âge avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part. .....132

Tableau 10 | Contingence croisant l'IMC avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part. .....133

Tableau 11 | Contingence croisant le genre avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part. .....133

Tableau 12 | Proportion de patients ayant un score positif au questionnaire NPSI.....144

Tableau 13| Critères d'éligibilité à l'essai clinique CANALOXA.....169

Tableau 14| Caractéristiques de la population de l'étude CANALOXA .....172

Tableau 15 | Matrice de corrélation croisant les conductances électrochimiques aux seuils thermiques et à la douleur neuropathique.....186

Tableau 16 | Liste des gangliosides identifiés dans l'échantillon GD3 .....204

Tableau 17 | Liste des gangliosides retrouvés dans le plasma de quelques patients.....209

Tableau 18 | Estimation des concentrations de gangliosides .....210

Tableau 19 | Listes des lipides détectés en mode ESI + présentant une variation statistiquement significative entre t0 et t3, t6 ou t12. .....269

Tableau 20 | listes des variables lipidiques détectées en mode ESI - présentant une variation statistiquement significative entre t0 et t3, ou t6 ou t12.....270

# 3. Table des Annexes

Annexe 1 : Classification des lipides selon LIPID MAPS® ..... 246

Annexe 2 : Lettre d'information au patient – Etude LIPIDOXA..... 249

Annexe 3 : Discours au patient pour réaliser le Thermotest..... 252

Annexe 4 : Questionnaire NPSI ..... 254

Annexe 5 : Lettre d'information au patient – Etude CANALOXA ..... 256

Annexe 6 : Figures supplémentaires de l'étude CANALOXA ..... 259

Annexe 7 : Listes des lipides détectés en mode ESI+ et ESI- ..... 267

Annexe 8 : liste des gangliosides identifiés lors de l'infusion de l'échantillon de gangliosides totaux en mode ESI –..... 271

Annexe 9 : Spectre de masse de l'échantillon de gangliosides totaux acquis en mode ESI+.... 272

Annexe 10 : Article n°1 : Is quantitative sensory testing helpful in the management of oxaliplatin neuropathy? A two-year clinical study..... 273

Annexe 11 : Article n°2 : Quantification of Chronic Oxaliplatin-Induced Hypesthesia in Two Areas of the Hand ..... 279

Annexe 12 : Article n°3 : Electrochemical Skin Conductance as a Marker of Painful Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy ..... 285

# ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| AA | Acide Arachidonique |
| ACN | Acétonitrile |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| AGPI | Acide Gras Polyinsaturé |
| ALA | Acide Alpha-Linolénique |
| ANSM | Agence Nationale du Médicament |
| APP | Protéine Précurseur de l'Amyloïde (Amyloid Precursor Protein) |
| AQUARE | Association pour la Qualité, la Recherche et l'Enseignement à Saint Joseph |
| ARC | Attaché de Recherche Clinique |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| AVC | Accident Vasculaire Cérébral |
| BHT | Hydrotoluène butylé (2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol) |
| CDT | Seuil de détection du froid (Cold Detection Threshold) |
| CL | Cardiolipine |
| CLHP | Chromatographie Liquide Haute Performance |
| CMR1 | Cold and Menthol Receptor 1 |
| CPP | Comité de Protection des Personnes |
| CPT | Seuil de douleur au froid (Cold Pain Threshold) |
| CQ | Contrôle Qualité |
| CRC | Centre de Recherche Clinique |
| CRF | Case Report Form |
| CV-ANOVA | Validation croisée par analyse de la variance |
| DACH | DiAminoCycloHexane |
| DG | DiacylgGycérols ou Diglycérides |
| DGOS | Direction Générale de l'Organisation des Soins |

| | |
|---|---|
| DHA | Acide DocosaHexaénoïque |
| ECN | Nombre d'Equivalent Carbone |
| ENMG | ElectroNeuroMyoGramme |
| EPA | Acide EicosaPentaénoïque |
| ERO | Espèces Réactives de l'Oxygène |
| ESC | Conductances électrochimiques de la peau (Electrochemical Skin Conductance) |
| ESCP | European Society of Clinical Pharmacy |
| ESI | Ionisation par nébulisation (ElectroSpray Ionization) |
| ETP | Education Thérapeutique du Patient |
| EudraCT | European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials |
| FDR | False Discovery Rate |
| GERCOR | Groupe Coopérateur Multidisciplinaire en Oncologie |
| GHPSJ | Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph |
| $H_2$DCF-DA | Diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' |
| HODE | Acide 9-HydrOxyoctaDecadiEnoïque |
| HPT | Seuil de douleur au chaud (Heat Pain Threshold) |
| HRMS | Spectrométrie de masse de haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry) |
| HUPS | Hôpitaux Universitaires Paris Sud |
| IENF | Fibre nerveuse intraépidermique (IntraEpidermal Nerve Fiber) |
| IL-6 | InterLeukine 6 |
| IMMPaCT | Impact de la Maladie, des Médicaments chez les Patients sous ChimioThérapie (Programme d'éducation thérapeutique) |
| INCa | Institut National du Cancer |
| LC-MS | Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse |
| LCR | Liquide Céphalo-Rachidien |
| LIF | Leukemia Inhibitory Factor |
| m/z | Rapport du nombre de masse sur le nombre de charge |

| | |
|---|---|
| MA | Maladie d'Alzheimer |
| MDA | Malondialdéhyde |
| MDT | Seuil de détection mécanique (Mechanical Detection Thresholds) |
| MP | Maladie de Parkinson |
| MS/MS | Spectrométrie de masse en tandem |
| MTBE | Méthyl ter-butyle éther |
| NCI-CTCAE | National Cancer Institute, Common Terminology Criteria for Adverse Events |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| NPF | Neuropathies à Petites Fibres |
| NPIO | Neuropathie Périphérique Induite par l'Oxaliplatine |
| NPSI | Neuropathic Pain Symptom Inventory |
| NS | Non significatif |
| OPLS-DA | Régression des moindres carrés partiels orthogonalisée (Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis) |
| OXA | Oxaliplatine |
| PA | Acide Phosphatidique *ou* Potentiel d'Action |
| PBMC | Cellule mononucléée sanguine périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cell) |
| PC | PhosphatidylCholines |
| PCA | Analyse en composantes principales (Principal Composante Analyze) |
| PE | PhosphatidylEthanolamines |
| PG | PhosphatidylGlycérols |
| PGE2 | Prostaglandine-E2 |
| PHRC | Programme Hospitalier de Recherche Clinique |
| PLS-DA | Régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares/Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis) |
| PRT-K | Programme de Recherche Translationnelle en Cancérologie |
| PS | PhosphatidylSérines |
| PSA | Antigène Spécifique Prostatique |

| | |
|---|---|
| QLQ-CIPN20 | Quality of Life Questionnaire to assess Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy, 20 questions |
| QST | Quantitative Sensory Testing |
| RBM | Recherches BioMédicales |
| RCP | Réunion de Concertation Pluridisciplinaire |
| RNI | Recherches non interventionnelles |
| RPLC | Chromatographie Liquide à polarité de Phase Inversée (Reversed-Phase Liquid Chromatography) |
| RSC | Recherches portant sur les Soins Courants |
| SEM | Erreur type, Standard Error of the Mean |
| SHAM | Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles |
| SM | Sphingomyélines |
| TG | Triacylglycérols ou triglycérides |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor alpha |
| TNS | Total Neuropathy Score |
| TPM | Tour Par Minute |
| TRPM8 | Transient Receptor Potential Melastin 8 |
| WDT | Seuil de détection du chaud (Warm Detection Threshold) |

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## Publication d'articles originaux

*Is quantitative sensory testing helpful in the management of oxaliplatin neuropathy? A two-year clinical study.*
Delmotte JB, Beaussier H, Auzeil N, Massicot F, Laprévote O, Raymond E, Coudoré F.
**Cancer Treatment and Research Communications,** Octobre 2018

*Electrochemical Skin Conductance as a Marker of Painful Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy.*
Delmotte JB, Tutakhail A, Abdallah K, Reach P, D'Ussel M, Deplanque G, Beaussier H, Coudoré F.
**Neurology Research International**, Septembre 2018

*Quantification of chronic oxaliplatin-induced hypoesthesia in two areas of the hand.*
Andriamamonjy M, Delmotte JB, Savinelli F, Beaussier H, Coudoré F.
**Journal of Clinical Neurophysiology**, Mars 2017

## Présentation de travaux à l'occasion de congrès à audience internationale

(1) *Identification of Biomarkers of Chronic Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy.*
Delmotte JB, Lebeau R, Beaussier H, Massicot F, Auzeil F, Coudoré F, Laprevote O

(2) *Assessment of Chronic Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy: Results of LIPIDOXA, a Two-Year Clinical Study.* Delmotte JB, Andriamamonjy M, Beaussier H, Cherifi M, Savinelli F, D'Ussel M, Coudoré F.

**Congrès IASP, *International Association for the Study of the Pain*** (Yokohama, Japon), septembre 2016

## Présentation de travaux à l'occasion de congrès à audience francophone

*The Sudoscan® device: a new approach to assess oxaliplatin-induced peripheral neuropathy.*
Delmotte JB, Beaussier H, D'ussel M, Raymond E, Coudoré F
**Congrès de la Société Francophone du Nerf Périphérique, SFNP** (Paris), janvier 2018

Neurotoxicité de l'oxaliplatine : de l'exploration clinique à la prise en charge éducative de la neuropathie.
*Premier prix de mémoire de DES*
**Congrès de la Société Française de Pharmacie Oncologique, SFPO** (Nantes), octobre 2017

*Exploration de la neuropathie induite par l'oxaliplatine : intérêt de l'utilisation du Sudoscan®.*
Delmotte JB, Abdallah K, Beaussier H, Raymond E, Coudoré F
*Premier prix de poster*
**Journée de la Douleur et du Patient Douloureux, LDPD** (Versailles), octobre 2017

*Exploration of oxaliplatin-induced neuropathic pain by the SUDOSCAN® (Canaloxa study): preliminary results after 6 months follow-up.* Andriamamonjy M, Delmotte JB, Abdallah K, Beaussier H, Raymond E, Coudoré F.

**Congrès de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur, SFETD** (Bordeaux), novembre 2016

*Evaluation de la neuropathie chronique induite à l'oxaliplatine au moyen du Thermotest (SOMEDIC®) : résultats préliminaires de l'étude LIPIDOXA.* Delmotte JB, Beaussier H, Deplanque G, Coudoré F.

**Congrès de la Société Française du Cancer, SFC** (Paris), juin 2015

(1) *Assessment of oxaliplatin-induced neuropathy (LIPIDOXA Study): Preliminary clinical results.* Delmotte JB, Beaussier H, Deplanque G, Coudoré F.

(2) *Assessment of oxaliplatin-induced neuropathy (LIPIDOXA Study): Validation of a thermal assessment protocol.* Delmotte JB, Beaussier H, Chastang A, d'Ussel M, Deplanque G, Coudoré F.

**Congrès du Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique, GPCO** (Besançon), décembre 2014

## Présentation de travaux à l'occasion des journées scientifiques de l'école doctorale et de la faculté.

### Communication orale

Neurotoxicité de l'oxaliplatine : Description clinique et recherche de biomarqueurs.

**Journées de l'Ecole Doctorale**, juin 2017

### Communications affichées :

Exploration of oxaliplatin-induced neuropathic pain by the SUDOSCAN® (Canaloxa study): preliminary results after 6 months follow-up.

**Journées de la Recherche de la faculté de Pharmacie**, décembre 2016

Assessment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: results of IPIDOXA, a two-year clinical study.

**Journées de l'Ecole Doctorale**, juin 2016

(1) Assessment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: preliminary results of LIPIDOXA, a two-year clinical study, after 18 months follow-up.

(2) Characterization of chemotherapy-induced neuropathy in the hand after chronic exposure to oxaliplatin.

**Journées de la Recherche de la faculté de Pharmacie**, novembre 2015

Exploration de la neuropathie chronique induite à l'oxaliplatine au moyen du Thermotest (SOMEDIC®) Résultats préliminaires de l'étude LIPIDOXA.

**Journées de l'Ecole Doctorale**, juin 2015

# PREAMBULE

La recherche en cancérologie jouit d'un fort dynamisme : en l'espace d'un demi-siècle, des progrès considérables ont été réalisés, aussi bien dans l'amélioration de l'efficacité des traitements que dans le dépistage du cancer. Néanmoins, la prise en charge demeure toujours très lourde et la survenue d'effets indésirables sérieux sous traitement reste préoccupante aussi bien pour le patient que pour ses proches. Aussi, un des enjeux actuels de la recherche en cancérologie est de développer des prises en charge aussi efficaces que celles existantes mais mieux tolérées.

L'oxaliplatine est un anticancéreux couramment employé en oncologie, son efficacité étant reconnue en première intention dans le traitement de nombreux cancers gastro-intestinaux. Cependant, son utilisation est limitée par ses effets neurotoxiques. L'oxaliplatine provoque des neuropathies pouvant être invalidantes et présentant un impact négatif sur la qualité de vie.

L'exploration de la physiopathologie de cette neuropathie fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Il est reconnu que celle-ci est multifactorielle, mettant en jeu des mécanismes de nature variée. Parmi eux, le rôle du stress oxydant a été décrit par l'équipe du Professeur Olivier Laprévote (Laboratoire de Chimie – Toxicologie Analytique et Cellulaire, CNRS - UMR 8638) qui a étudié les effets de l'oxaliplatine chez la souris et sur des cultures cellulaires. Suite à ces observations, nous proposons de rechercher chez l'homme ces manifestations biologiques précédemment mises en évidence *in vitro* et de les corréler aux manifestations cliniques des patients traités. A cet effet, nous avons conduit une étude translationnelle clinico-biologique à l'hôpital Paris Saint Joseph, en collaboration avec la faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes. Il s'agit de **l'étude LIPIDOXA**. L'enjeu de cette première étude est de **mieux comprendre les rôles du stress oxydant et de la perturbation du métabolisme lipidique dans la genèse de cette neuropathie**. Par ailleurs, l'oxaliplatine est connu pour induire des lésions au niveau des petites fibres nerveuses intra-épidermiques, notamment les fibres C innervant les glandes sudoripares sécrétant des ions chlorures sous stimulation sympathique. Ces lésions neurologiques pourraient être objectivées par la mesure de la conductance aux ions chlorures de la sueur grâce à l'utilisation d'un dispositif innovant non invasif et fournissant une mesure objective, le Sudoscan. Une équipe française a déjà étudié l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic des neuropathies chimio-induites (oxaliplatine, paclitaxel) [1]. Dans ce contexte, nous avons conduit une seconde étude clinique à l'hôpital Paris Saint Joseph : **l'étude CANALOXA**. **L'enjeu de cette étude est de déterminer l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic de la neuropathie induite par l'oxaliplatine.**

Le manuscrit suit la progression suivante : la partie introductive fait état des connaissances scientifiques sur la **molécule d'oxaliplatine,** la **neuropathie induite par l'oxaliplatine** et les méthodes **d'évaluation de cette neuropathie**. La partie expérimentale présente les **travaux de recherche** des études LIPIDOXA et CANALOXA sous forme matériel et méthodes, résultats puis discussion. Le manuscrit se termine par une **discussion générale** qui synthétise les différents travaux, met en évidence les liens existants entre eux et propose des perspectives à ce travail de recherche.

# PARTIE INTRODUCTIVE

*Etat de la littérature scientifique et contexte des travaux.*

# Chapitre I : L'oxaliplatine et son utilisation en oncologie

## 1. Présentation de l'oxaliplatine

### 1.1. Chimie de la molécule

**L'oxaliplatine** est un anticancéreux appartenant à la classe pharmacologique des dérivés du platine. C'est un médicament couramment utilisé en oncologie, son efficacité est reconnue en **première ligne** dans le **traitement adjuvant** et dans le **traitement des formes métastatiques** de nombreux **cancers gastro-intestinaux** [2].

Les propriétés anti-tumorales des dérivés du platine sont étudiées depuis près de cinquante ans [3]. Dans les années 1960, l'équipe de Barnett Rosenberg (Université du Michigan, Etats-Unis) découvre les propriétés antimitotiques du platine oxydé en observant une inhibition de la division cellulaire d'*Escherichia coli* dans un bain d'électrolyse équipé d'électrodes de platine [4]. Il s'avère que ce composé était déjà connu des chimistes depuis le XIXe siècle sous le nom de chlorure de Peyrone, renommé par la suite cisplatine ou *cis*-diamminedichloroplatinum(II) [5]. Quelques années plus tard, son activité antinéoplasique est mise en évidence chez des souris atteintes de sarcomes et de leucémies [3]. Les premiers essais cliniques ont débuté en 1971 et le **cisplatine** reçut l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement du **cancer des testicules et du cancer de l'ovaire** en 1978 (Etats-Unis) et en **1979** (Europe) [6]. Depuis, environ 3 000 dérivés du platine ont été synthétisés mais seulement une quinzaine firent l'objet de développements cliniques [7]. La recherche de nouveaux dérivés du platine a permis de développer des composés au moins aussi efficaces mais de meilleure tolérance (moins neurotoxiques et moins ototoxiques) dits de deuxième génération comme le carboplatine ou le nedaplatine [8], [9]. Puis, l'émergence de résistance croisée entre ces deux derniers composés a conduit au développement de **l'oxaliplatine**, du lobaplatine et de l'heptaplatine considérés comme des produits de **troisième génération**. L'oxaliplatine présente une résistance croisée limitée avec le cisplatine [10]. Aujourd'hui, six dérivés du platine sont utilisés en thérapeutique (Figure 1) [9]. Cisplatine et carboplatine sont utilisés dans le monde entier, l'oxaliplatine n'est disponible que dans un nombre restreint de pays dont la France, le nedaplatine, le lobaplatine et l'heptaplatine ne sont disponibles que dans certains pays d'Asie [9], [11].

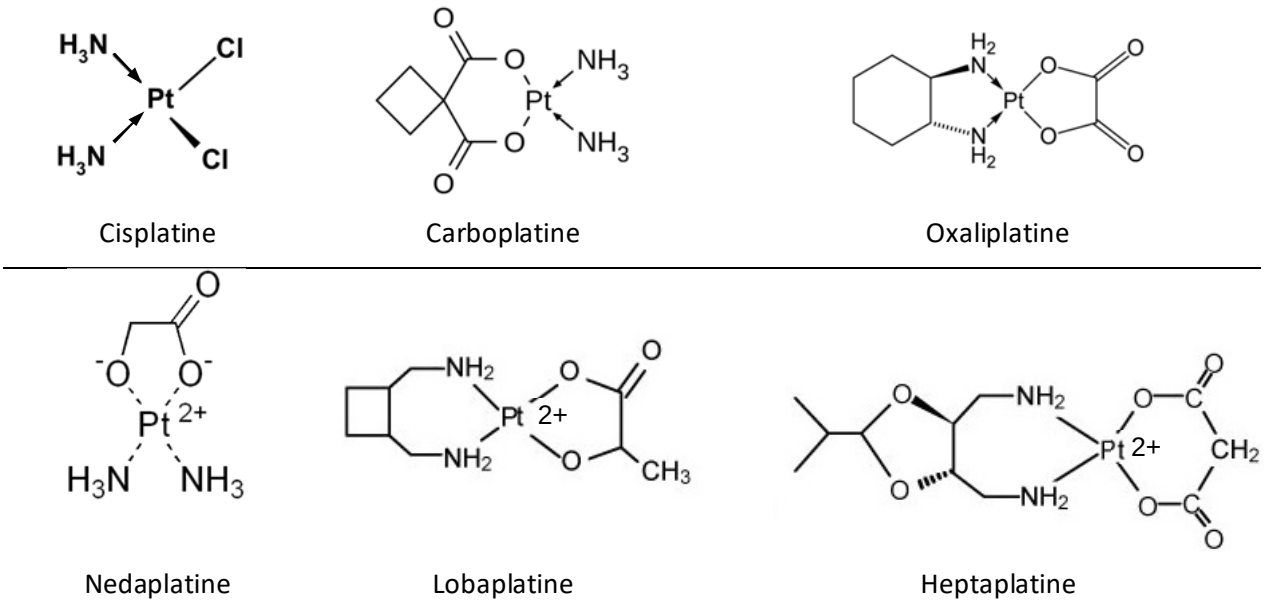



Figure 1 | Dérivés du platine utilisés en thérapeutique en 2018.

La molécule est carrée et centrée sur un atome de platine à l'état d'oxydation +II. Ce dernier est lié à deux ligands échangeables par divers nucléophiles et deux ligands azotés non labiles pour former un complexe. L'ensemble constitue le pharmacophore de la molécule dont la structure tridimensionnelle plane est à l'origine du mécanisme d'action (Figure 2). L'oxaliplatine est donc un complexe formé par un groupement oxalate facilement hydrolysable et un groupement diaminocyclohexane (DACH) non labile.

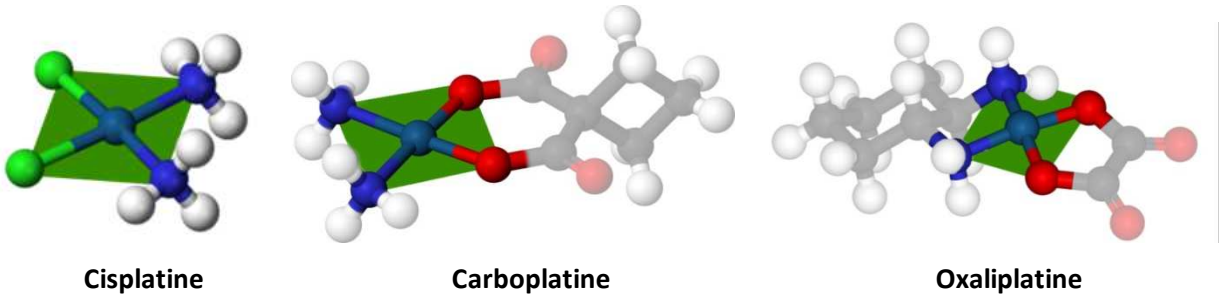



Figure 2 | Le pharmacophore (matérialisé par un carré vert) des trois dérivés du platine utilisé en France.

*Les quatre ligands et l'atome de platine sont dans le même plan, ils constituent le pharmacophore de la molécule.*

## 1.2. Pharmacodynamie et pharmacocinétique

### *1.2.1. Mécanisme d'action*

Dans le **plasma**, ce **complexe s'hydrolyse** en oxalate et en un composé électrophile (Figure 3) : le trans-diaminocyclohexane monochloro- ou dichloro- ou diaquo-platinum [11]. Ces **molécules électrophiles** hautement réactives **réagissent** avec les groupements aminés des

**protéines et des acides nucléiques** (acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN)), aussi, on considère les sels de platine comme des agents **alkylants** [12]. Au niveau de l'ADN, la liaison avec l'atome de platine s'établit à la position N7 de deux guanines contiguës (GG), d'une adénine et d'une guanine (AG) ou de deux guanines séparées par un autre nucléotide (GNG). Les adduits sont dits intra-brins lorsque les bases azotées liées à l'atome de platine se situent sur le même brin d'ADN et inter-brins lorsque les bases azotées liées à l'atome de platine sont chacune situées sur un brin différent de l'ADN. Les adduits d'oxaliplatine entraînent par conséquent une distorsion de la double hélice (Figure 4) empêchant l'ADN polymérase, l'ARN polymérase et d'autres enzymes affines pour l'ADN de s'y fixer. Les cellules cancéreuses ayant une forte activité de réparation de l'ADN deviennent résistantes au cisplatine [13]. Bien que l'oxaliplatine forme moins d'adduits que le cisplatine en concentration équimolaire, le potentiel cytotoxique de l'oxaliplatine est plus important. Ceci s'explique par l'encombrement stérique plus important et l'hydrophobie du groupement DACH. L'hydrolyse de l'oxaliplatine se traduit également par la perte du groupement oxalate, un toxique qui se trouve libéré dans le plasma. L'activité cytotoxique s'explique par l'inhibition de la réplication de l'ADN, la saturation des capacités de réparation de l'ADN et l'inhibition de la transcription avec comme conséquence un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

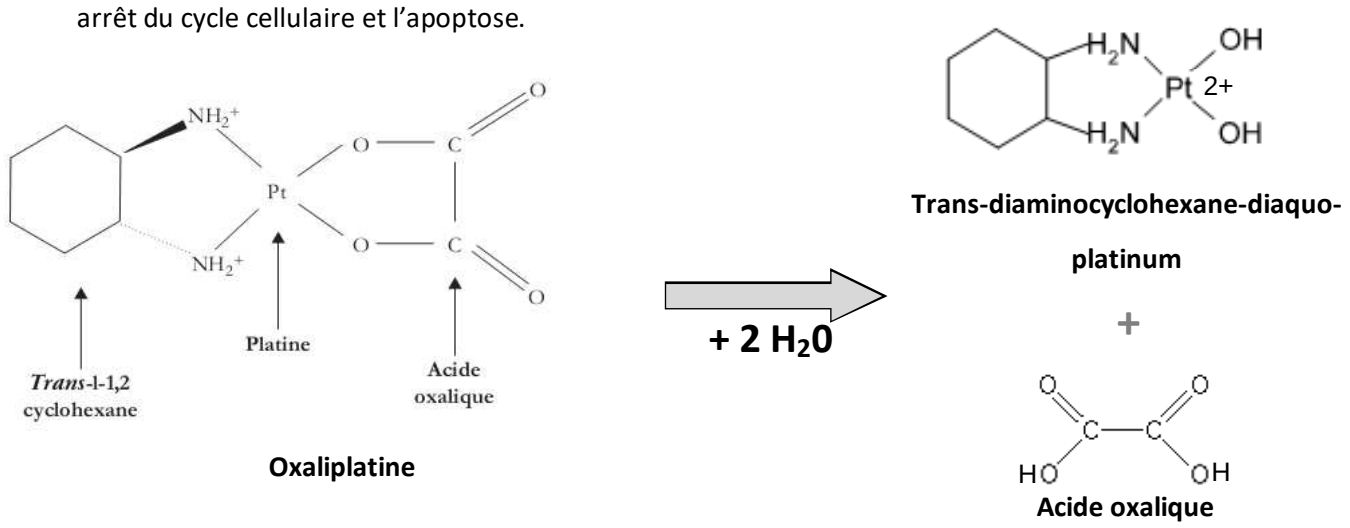



Figure 3 | Bioactivation de l'oxaliplatine.

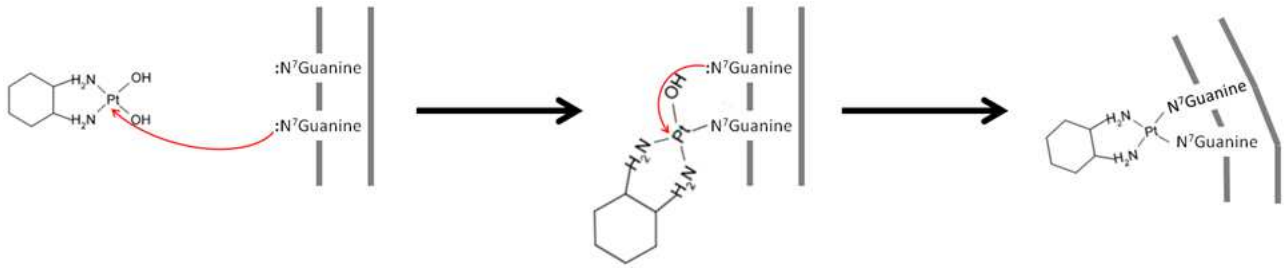



Figure 4 | Mécanisme de formation des adduits d'oxaliplatine sur l'ADN.

D'autres composants de la cellule peuvent être alkylés comme les phospholipides membranaires, l'ARN, l'ADN mitochondrial ou encore les groupements thiols des protéines. Les **sels de platine** sont également connus pour entretenir le phénomène de **stress oxydant**, dénaturant les molécules biologiques, ce qui aboutit *in fine* au processus d'apoptose. Par ailleurs, il a été montré que l'oxaliplatine induisait directement l'apoptose via l'activation du récepteur purinergique $P2X_7$ [14]. Aussi, le spectre de toxicité de l'oxaliplatine ne se limite pas qu'aux cellules au métabolisme le plus actif ou à celles en division mais toutes peuvent être potentiellement touchées, selon l'affinité de l'oxaliplatine pour tous les tissus.

### *1.2.2. Eléments de pharmacocinétique*

L'oxaliplatine se **fixe** de façon **importante à l'albumine** et aux gammaglobulines. Cette fixation se fait par l'intermédiaire de groupements soufrés des protéines, et fait intervenir la réactivité des composés [15]. Au terme d'une perfusion de deux heures, 15 % du platine administré est retrouvé dans la circulation systémique, le reste est rapidement distribué dans les tissus. **Aucune biotransformation du cycle diaminocyclohexane** (DACH) médiée par le cytochrome P450 n'a été mise en évidence. Le **platine** est principalement éliminé dans les **urines** : au cinquième jour, environ 54 % de la dose est retrouvée dans les urines et moins de 3 % dans les fèces. L'élimination est triphasique : une phase rapide $\alpha$ ($t_{1/2\alpha}$ = 26 min) ; une phase d'élimination plasmatique lente $\beta$ ($t_{1/2\beta}$ = 16,8 h) et une phase d'élimination terminale $\gamma$ ($t_{1/2}\gamma$ = 16,3 jours).

## 1.3. Indications thérapeutiques, efficacité et tolérance

### *1.3.1. Indications et molécules associées*

L'oxaliplatine occupe une place de choix dans la stratégie thérapeutique de nombreux cancers de la sphère **digestive** et **gynécologique**. Il est aujourd'hui à la base de nombreux protocoles, en association avec des antimétabolites ou des anthracyclines ou encore des inhibiteurs de topo-isomérases.

D'après le résumé des caractéristiques du produit (RCP), *l'oxaliplatine, en association avec le 5-fluorouracile (5-FU) et l'acide folinique (AF), est indiqué dans le traitement adjuvant du cancer du côlon au stade III (stade C de Dukes) après résection complète de la tumeur initiale, et dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques* [16]. Ces indications ont été demandées pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché sur la base de trois études pivots de phase III évaluant l'efficacité de l'association oxaliplatine (85 mg/m²) toutes les deux semaines chez des patients atteints d'un cancer colorectal non métastatique (de stades II/B2 et II/C) et métastatique. L'oxaliplatine était proposée en première ligne de traitement dans l'étude EFC2962 comparative,

420 patients métastatiques étaient randomisés entre le 5-FU/AF seul (LV5FU2) et l'association OXA/5-FU/AF. Dans l'étude comparative trois bras EFC4584, l'oxaliplatine était proposé chez des patients prétraités : 821 patients métastatiques étaient randomisés entre le 5-FU/AF seul, l'oxaliplatine en monothérapie et l'association OXA/5-FU/AF. Les taux de réponse étaient significativement supérieurs pour l'association OXA/5-FU/AF (49 % *vs* 22 % ; $p = 0{,}0001$ pour l'étude EFC2962 et 11,1 % *vs* 0,7 % ; $p < 0{,}0001$ pour l'étude EFC4584). La survie sans progression (PFS) rapportée au temps jusqu'à progression (TTP) était également en faveur de l'association OXA/5-FU/AF. Enfin, dans l'étude contrôlée MOSAÏC EFC3313, 2 246 patients non métastatiques étaient randomisés (stade II/B2 et stade III/C) entre le 5 FU/AF seul et l'association OXA/5-FU/AF. Le pourcentage de survie à trois ans était supérieur dans le groupe OXA/5-FU/AF (78,7 % *vs* 73,3 % ; $p = 0{,}0008$) [16].

Depuis sa mise sur le marché européen en 2001, l'utilisation de l'oxaliplatine s'est étendue à d'autres cancers et il est désormais employé en association avec d'autres cytotoxiques. Le Tableau 1 dresse une liste des principales associations de cytotoxiques réalisées avec l'oxaliplatine. Il convient de préciser que cette liste n'est pas exhaustive et que l'utilisation de ces associations (parfois en dehors du cadre légal de l'AMM) repose sur des recommandations internationales de sociétés savantes.

L'oxaliplatine est conditionné dans des flacons sous la forme d'une solution limpide et incolore dosée à 5 mg/mL. La reconstitution est extemporanée dans des poches de 250 à 500 mL de glucose 5 %, seul sans autre principe actif associé dans la même poche. Ce médicament est administré par perfusion intraveineuse de deux ou quatre heures.

| PROTOCOLE | Anticancéreux en association à l'oxaliplatine | Posologie de l'oxaliplatine | Indications | Durée d'un cycle (jours) | *Réf* |
|---|---|---|---|---|---|
| **EOX** | Capécitabine + Epirubicine | 130 mg/m² dans 500mL de G5 sur 2h00 | Estomac | 21 | [17] |
| **FOLFIRINOX** | 5-FU et folinate de Ca + Irinotecan | 85 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Pancréas Colon / Rectum métastatique | 14 | [18], [19] |
| **FOLFOX** | 5-FU et folinate de Ca | 85 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Colon / Rectum métastatique ou non | 14 | [20] |
| **FOLFOX - AVASTIN** | 5-FU et folinate de Ca + Bevacizumab | 85 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Colon / Rectum métastatique | 14 | [21] |
| **FOLFOX - VECTIBIX** | 5-FU et folinate de Ca + Panitumumab | 85 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Colon / Rectum métastatique | 14 | [22] |
| **FOLFOX - ERBITUX** | 5-FU et folinate de Ca + Cetuximab | 85 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Colon / Rectum métastatique | 14 | [23] |
| **GEMOX** | Gemcitabine | 100 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Canaux biliaires / Pancréas métastatique | 14 | [24] |
| **XELOX** | Capecitabine | 130 mg/m² dans 250mL de G5 sur 2h00 | Colon / Rectum métastatique | 21 | [25] |

Tableau 1 | Protocoles de chimiothérapies à base d'oxaliplatine.

### *1.3.2. Profil de toxicité de l'oxaliplatine*

Appartenant à la classe des cytotoxiques, l'oxaliplatine possède naturellement un profil de tolérance relativement médiocre avec une **toxicité hématologique, gastro-intestinale, cutanée, hépatique et neurologique** de prévalences supérieures à 10 % [16]. L'une des toxicités les plus remarquables de l'oxaliplatine est sa neurotoxicité périphérique.

La Neuropathie Périphérique Induite par l'Oxaliplatine (NPIO) est bien spécifique et se caractérise par une neuropathie sensitive périphérique douloureuse tout à fait typique avec des manifestations neuromusculaires. Son expression clinique est à la fois aiguë, les signes régressant spontanément entre chaque cycle, et chronique d'installation progressive tout au long de la cure d'oxaliplatine [26], [27]. Si celle-ci devient préoccupante, elle peut constituer une limite pour la poursuite du traitement. Parmi les organoplatines, le **cisplatine** présente une **neurotoxicité**

**chronique** mais sans manifestations aiguës alors que le **carboplatine** est quant à lui **peu neurotoxique** [28].

# 2. Neurotoxicité de l'oxaliplatine

## 2.1. Anatomie et physiologie des structures nerveuses

### *2.1.1. Neuroanatomie*

Le neurone, ou cellule nerveuse, est l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Il s'agit d'une cellule qui assure la transmission d'informations dans l'organisme grâce à deux propriétés physiologiques : l'excitabilité (générer un potentiel d'action (PA) en réponse à une dépolarisation suffisante de son potentiel de membrane) et la conductivité (transmettre le signal). Un neurone est composé d'un corps cellulaire et de deux types de prolongements : un axone et plusieurs milliers de dendrites. L'axone conduit l'information efférente (de manière centrifuge) alors que les dendrites conduisent l'information afférente (de manière centripète). L'axone est également appelé fibre nerveuse, son diamètre mesure quelques micromètres alors que sa longueur varie d'un millimètre à plus d'un mètre. L'origine de l'axone est appelé cône d'émergence, il s'agit d'une région riche en microtubules au niveau de laquelle est générée le PA. L'extrémité de l'axone se ramifie en une arborisation terminale dont chaque ramification se termine par un renflement, il s'agit du bouton synaptique où s'accumulent des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs. Les axones sont regroupés au sein d'enveloppes conjonctives (périnèvre) pour former un fascicule. Les fascicules sont eux-mêmes regroupés au sein d'une enveloppe conjonctive contenant des vaisseaux sanguins (épinèvre) pour former un nerf (Figure 5).

Un nerf est formé de prolongements d'axones dont les corps cellulaires sont situés soit dans la corne antérieure de la moelle épinière pour les fibres motrices, soit dans le ganglion spinal ou ganglion rachidien pour les fibres sensitives soit dans un ganglion de la chaine sympathique pour les fibres végétatives. Notons que le ganglion spinal est une zone particulièrement vulnérable du système nerveux périphérique dans la mesure où la barrière hémato-encéphalique est plus perméable à cet endroit [29]. Les axones peuvent être protégés par une gaine de myéline formée par des cellules de Schwann, on parle de fibres nerveuses myélinisées. Dans cette configuration, chaque cellule de Schwann recouvre au plus un millimètre d'axone, ce dernier est donc recouvert par des centaines voire des milliers de cellules de Schwann. L'écart entre deux cellules de Schwann (espace non couvert par la gaine de myéline) est appelé Nœud de Ranvier, c'est à ce niveau que se font les échanges d'ions avec l'extérieur. Cet agencement permet la conduction

saltatoire du potentiel d'action à grande vitesse (environ 50 m/s chez l'homme). En revanche, lorsque les axones ne sont pas protégés par une gaine de myéline (fibres nerveuses amyéliniques), la propagation de l'influx nerveux est de proche en proche. Le signal est dans ce cas plus lent (de 0,5 à 2 m/s).

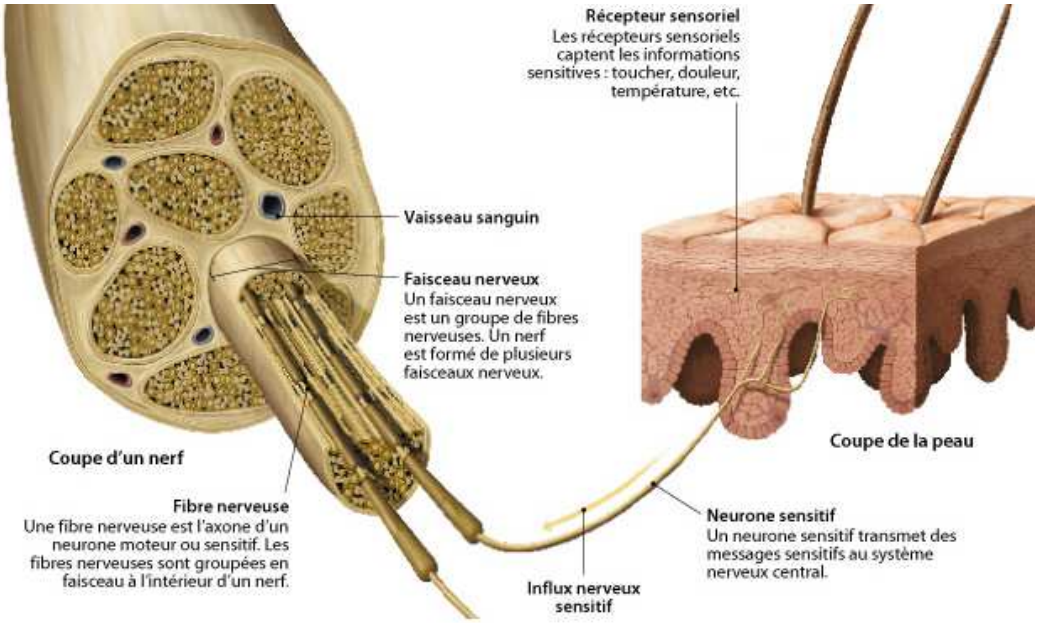



Figure 5 | Histologie d'un nerf

*Adapté de la banque d'image science photo library (www.sciencephoto.com)*

Les classifications de Lloyd (fibres myélinisées : groupes I, II, III, et non myélinisées : groupe IV) et de Gasser-Erlanger (fibres myélinisées : types Aα, Aβ, Aδ et non myélinisées : type C) sont utilisées en pratique. Les fibres Aα (groupes Ia et Ib) sont des fibres fortement myélinisées de très gros calibre (12 – 25 µm) et de vitesse de conduction très élevée (50 – 120 m/s) (Figure 6). Les fibres sont connectées à des terminaisons spécialisées dans les muscles, les tendons, les ligaments, les articulations et conduisent des informations sur la proprioception (degré d'étirement musculaire, positionnement d'une articulation…). Les fibres Aβ (groupe II) sont des fibres myélinisées de gros calibre (5 – 12 µm) et de vitesse de conduction élevée (30 – 70 m/s). Ces fibres sont connectées à des terminaisons spécialisées dans la peau (corpuscules de Pacini, corpuscules de Meissner, corpuscules de Ruffini et disques de Merkel). Ces fibres conduisent des informations sur la stimulation cutanée complexe (vibration, discrimination tactile, la pression subie par la surface cutanée). Les fibres Aδ (groupe III) sont des fibres faiblement myélinisées de petit calibre (2 – 5 µm) et de vitesse de conduction faible (10 – 30 m/s). Les terminaisons de ces fibres sont libres, sans structures différenciées. Ces fibres conduisent des informations sur le toucher léger, la stimulation thermique froide non douloureuse et sur la douleur aiguë rapide de

type "piqûre". Les fibres C (groupe IV) sont des fibres non myélinisées de très petit calibre (0,4 – 1,2 µm) et de vitesse de conduction la plus faible de toute (0,5 – 2 m/s). Les fibres C représentent la majorité des afférences cutanées et représentent la presque totalité de toutes les afférences viscérales. Les terminaisons de ces fibres sont également libres sans structures différenciées. Ces fibres conduisent des informations sur la stimulation thermique chaude non douloureuse et sur la douleur aiguë de type brûlure.

| Classification d'Erlanger -Gasser | Classification de Lloyd-Hunt | Description | Diamètre (µm) | Vitesse de conduction (m/s) | Fonction |
|---|---|---|---|---|---|
| Aα | I (Ia et Ib) | Fibres myélinisées de gros diamètre | 12-25 | 50-120 | Proprioception |
| Aβ | II | | 5-12 | 30-70 | Sensibilité cutanée |
| Aδ | III | Fibres faiblement myélinisées de moyen calibre | 2-5 | 10-30 | Pression cutanée, Temperature, douleur. |
| C | IV | Fibres amyéliniques de petit calibre | 0,4-1,2 | 0,5-2 | Douleur |

Figure 6 | Classification des fibres nerveuses sensitives

Les mécanorécepteurs sont des structures neurologiques différenciées, localisés dans la peau et qui sont associés à des fibres nerveuses myélinisées de type Aβ. Il existe quatre types de mécanorécepteurs : les corpuscules de Pacini, sensibles aux pressions et aux vibrations, les corpuscules de Ruffini, sensibles à l'étirement de la peau, les disques de Merkel et corpuscules de Meissner, sensibles à la pression fine et au tact.

Les thermorécepteurs sont constitués par des terminaisons nerveuses libres. Les récepteurs sensibles au chaud répondent pour des stimulations entre 30 °C et 50 °C (Figure 7). Ceux sensibles au froid répondent pour des stimulations entre 10 °C et 35 °C. Tous deux sont reliés à des fibres Aδ myélinisées de faible diamètre et non myélinisées de type C. Les stimuli nociceptifs sont eux aussi transmis par des fibres Aδ et C mais leur seuil d'excitation est bien plus élevé. Par ailleurs, leur fréquence de décharge dépend de l'intensité du stimulus.

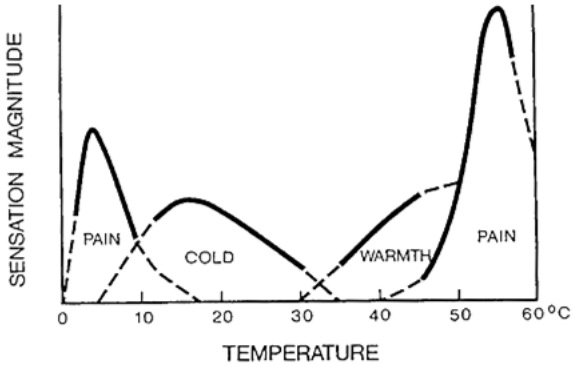



Figure 7 | Intensité de la perception des différents stimuli thermiques.
*D'après Boivie, et al. 1993.*

### *2.1.2. Le trafic axonal*

La synthèse protéique est réalisée au niveau du corps cellulaire uniquement, l'axone étant dépourvu de ribosomes. Les protéines et autres macromolécules sont par la suite transportées vers les extrémités grâce aux microtubules. L'ensemble des constituants du neurone provient donc du corps cellulaire. Aussi, le maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurelle des neurones repose sur un trafic axonal intense de macromolécules et d'organites. Ce trafic est bidirectionnel : antérograde (*i.e.* vers les terminaisons synaptiques) et rétrograde (*i.e.* vers le corps cellulaire). Le transport antérograde est dit rapide : plusieurs dizaines de cm par jour (canaux ioniques, enzymes impliquées dans le métabolisme des neurotransmetteurs) ou lent : quelques mm par jour (protéines du cytosquelette microfilaments et neurofilaments) [30]. Le transport axoplasmique rétrograde est un transport rapide permettant le recyclage de macromolécules et le transfert d'informations au soma sur la partie distale de l'axone. Le transport axoplasmique rétrograde concerne également des facteurs de croissance comme le NGF (Nerve Growth Factor) ou des toxines et virus (toxine tétanique, virus de l'herpès…). Il existe également un flux de mitochondries qui s'effectue dans le sens antérograde pour approvisionner le bouton synaptique. Il s'agit en fait d'un va-et-vient permanent. Lorsque les mitochondries ne sont plus fonctionnelles, elles dégénèrent en corps multilamellaires qui sont transportés par le flux rétrograde pour être dégradés par les lysosomes.

Lorsqu'un neurone subit des lésions, les extrémités peuvent dégénérer en premier. Dans ce cas, ce phénomène évolue ensuite sur un mode centripète et donne lieu au processus de la dégénérescence distale rétrograde ou *dying back* [31]. Les prolongements les plus longs sont souvent les plus impactés. À cette dégénérescence s'associe une altération de la gaine de myéline.

L'établissement d'un trafic bidirectionnel est donc essentiel au neurone, cela lui confère une grande souplesse fonctionnelle et lui assure une adaptation à l'environnement.

### *2.1.3. L'influx nerveux*

L'influx nerveux est une onde électrique qui se propage le long des fibres nerveuses sous la forme d'un potentiel d'action. Sur le plan électrophysiologique, il s'agit d'un transfert de charges électriques entre le compartiment extracellulaire et le compartiment intracellulaire séparés par la membrane cytoplasmique qui isole électriquement ces deux espaces. Au repos, il existe un potentiel transmembranaire de -70 mV. Le potentiel d'action est constitué d'une succession de quatre phases : (1) une phase de dépolarisation de 100 mV, le potentiel de la membrane passe de -70 à +30 mV, (2) une phase de repolarisation de la membrane interne, le potentiel repasse à -70 mV, (3) une phase d'hyperpolarisation, le potentiel atteint -90 mV puis retourne au potentiel de repos (-70 mV). Pendant les phases de repolarisation et d'hyperpolarisation, le neurone est insensible à tout stimulus, c'est la période réfractaire. A noter que le potentiel d'action dure entre un et deux millisecondes.

## 2.2. La sécrétion sudorale

La peau est recouverte d'un film hydrolipidique qui la protège du desséchement et des agressions microbiennes. Il s'agit d'une émulsion complexe formée de substances provenant des sécrétions sudorales et sébacées ainsi que de débris de kératinocytes. La sécrétion sudorale chez l'homme est hétérogène tant par la nature des glandes que par leurs fonctions et les quantités de sueur produite. On distingue principalement deux catégories de glandes sudoripares (Figure 8) : les **glandes eccrines** qui déversent directement à la surface de la peau une sueur composée à 99 % d'eau et les **glandes apocrines** qui déversent dans le follicule pileux une sueur de composition complexe constituée d'eau, d'ammoniaque, de protéines, de pigments et de lipides (squalène, glycérides, acides gras, cholestérol, esters de cholestérol) [32]. La sécrétion sébacée est due aux glandes sébacées. Ce sont des glandes annexées au poil qui sécrètent le sébum directement dans la partie supérieure du follicule pileux. Le sébum est une sécrétion lipidique composée de triglycérides, de cérides, de squalène et d'acides gras libres. C'est la **sécrétion sudorale eccrine** qui est **explorée par les dispositifs de mesure des conductances électrochimiques cutanées** tel que le Sudoscan. Aussi, nous nous intéresserons par la suite à la description de cette fonction sudorale. Les glandes sudoripares eccrines sont inégalement distribuées sur la peau : la concentration est maximale sur les régions palmoplantaires (600 glandes par cm²) et sur le visage (350 glandes par cm²). Le reste de la peau présente une densité moyenne de 100 à 200 glandes par cm², certaines zones en sont dépourvues. Les glandes

sudoripares eccrines sont formées d'un tube prenant son origine au niveau d'un peloton sécrétoire situé dans le derme. Chaque glande sudorale eccrine comporte deux parties histologiquement bien distinctes : le glomérule sudoral qui produit la sueur et un conduit sudorifère qui évacue la sueur vers l'épiderme. L'abouchement de ce conduit porte le nom de pore sudoral. La première sueur produite au niveau du glomérule est isotonique au plasma. Cette sueur primitive est fabriquée par les cellules claires du glomérule à partir du plasma de la vascularisation périglandulaire. Le phénomène principal est le passage du sodium du plasma vers la lumière du glomérule à travers les cellules claires (Figure 9). L'acétylcholine sécrétée par les terminaisons nerveuses sympathiques amyéliniques de type C induit une augmentation de la perméabilité de la membrane basale aux ions sodium ce qui entraîne une pénétration de sodium dans les cellules claires. Les ions sodium sont ensuite excrétés dans la lumière du glomérule grâce à l'action d'une pompe Na/K ATPase dépendante. L'eau suit passivement les ions sodium en raison du gradient osmotique ainsi créé. De même, les ions chlorures rejoignent passivement la lumière en empruntant des canaux chlorures transmembranaires. Par la suite, le canal d'excrétion modifie les concentrations des composants sudoraux pour élaborer la sueur définitive [33]. Les cellules du canal possèdent des canaux ioniques au niveau apical : canaux sodiques et canaux chlorures CFTR et une pompe Na/K ATPase au niveau basal. Cette pompe permet de rejeter le sodium intracellulaire vers le tissu interstitiel péri-tubulaire, le flux de sodium ainsi créé entraîne une entrée passive d'ions $Na^+$ au niveau apical et donc une réabsorption de sodium à partir de la sueur primitive. En parallèle, des ions $H^+$ sont sécrétés dans la lumière. Ceci confère un caractère acide à la sueur définitive. Cependant, le processus de réabsorption de sodium est limité, en cas de sudation importante, les capacités de réabsorption sont saturées et ainsi, la concentration en NaCl de la sueur finale augmente [34]. La sueur définitive est hypotonique par rapport au plasma. Chez le diabétique présentant des neuropathies, la quantité de sueur produite est diminuée par rapport à un sujet sain. Ceci s'explique par une diminution de l'innervation sympathique des glandes sudoripares eccrines et donc une moindre production de sueur primitive [35], [36]. Chez le patient atteint de mucoviscidose, le canal chlorure CFTR est déficient et ne permet pas la réabsorption d'ions chlorures de la sueur définitive. Il en résulte une sueur de mauvaise qualité, riche en NaCl [37].

La sueur éliminée du pore sudoral est composée à 99 % d'eau et d'électrolytes, représentés essentiellement par le chlorure de sodium et en moindre proportion par les ions potassium, calcium et magnésium. La fraction restante (1 %) est constituée de composés organiques, majoritairement l'acide lactique, mais aussi de l'urée, de l'ammoniaque et des traces d'acide pyruvique [38]. Le pH de la sueur est fixé par la concentration en acide lactique et varie entre 4 et 6,8 [38].

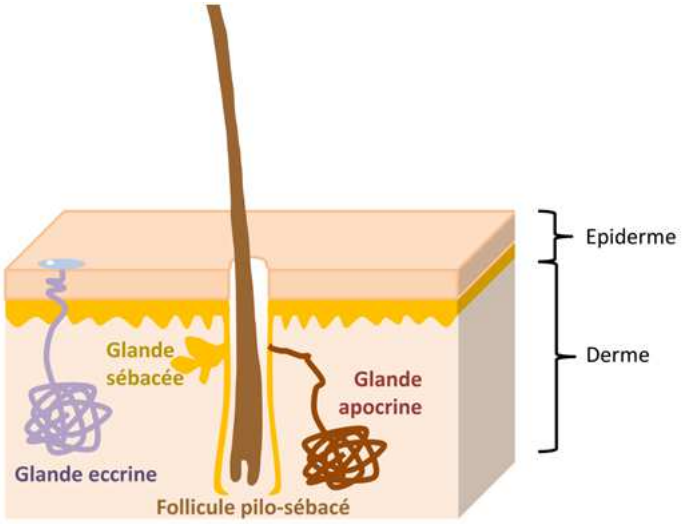



Figure 8| Histologie de la peau.

*Les glandes sudorales eccrines et apocrines sécrètent la sueur, les glandes sébacées sécrètent le sébum.*

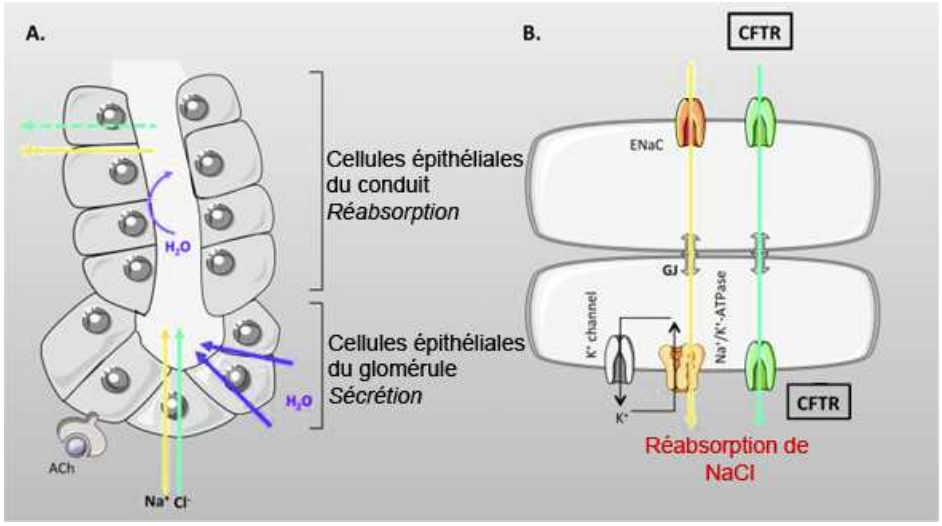



Figure 9 | Transport des ions Na+ et Cl- dans la glande sudoripare.

*[A] Les cellules épithéliales du glomérule sécrètent des ions Na+ et Cl- et de l'eau principalement en réponse à la stimulation cholinergique (acétylcholine, ACh).*

*[B] Les cellules épithéliales du conduit réabsorbent les ions chlorures via le canal ionique CFTR et les ions sodium via le canal ionique ENaC. Les ions Na + intracellulaires sont pompés vers le liquide interstitiel par la pompe Na/K ATPase basale, générant un gradient électrique transépithélial favorisant par la suite l'expulsion des ions Cl- vers le liquide interstitiel.*

*Adapté de Vinciane Saint-Criq and Michael A. Gray, 2017*

## 2.3.Expression clinique des neuropathies périphériques

La **neuropathie aiguë** est un effet indésirable **propre à l'oxaliplatine** puisqu'elle n'est pas retrouvée chez les autres dérivés du platine. Observée chez 95 % des patients, cet effet

indésirable survient de façon **quasi constante** après administration. Elle se manifeste par des **paresthésies**, **dysesthésies** et des **allodynies** dans les mains ou sur le visage **à la suite d'une exposition au froid**. Le seuil de douleur au froid est abaissé : les patients ressentent une vive douleur en touchant des objets rafraichis. Ces symptômes sont **réversibles** et spontanément résolutifs entre chaque cycle. La neuropathie ne perdure que quelques jours, cependant, l'intensité et la durée des signes augmentent tout au long de la cure d'oxaliplatine, au fur et à mesure des cycles [26]. En revanche, la **neuropathie chronique** n'est **pas spécifique** de l'oxaliplatine, en effet, elle concerne également le cisplatine et à moindre mesure le carboplatine. Les symptômes se manifestent au niveau des membres par des **dysesthésies**, **hypoesthésies** et **déficiences fonctionnelles persistant** entre chaque cycle. Cette neuropathie chronique s'installe de façon progressive au cours du traitement mais n'affecte pas tous les patients [26], [27]. Les manifestations neurologiques peuvent être invalidantes et présentent un réel impact négatif sur la qualité de vie [39].

## 2.4. Physiopathologie de la neuropathie sous oxaliplatine

La physiopathologie du développement des neuropathies sous oxaliplatine n'est pas encore bien comprise. Nombreux sont les travaux traitant de l'exploration des mécanismes cellulaires de cette neurotoxicité mais aucune hypothèse étudiée ne parvient à l'expliquer totalement. Il est désormais reconnu que ces mécanismes sont multifactoriels et aboutissent conjointement à l'expression clinique que l'on connait. Schématiquement, la **neurotoxicité aiguë** est d'ordre **fonctionnel**, alors que la toxicité **chronique** est à la fois **fonctionnelle et organique** avec une altération morphologique des neurones. En revanche, les zones où l'oxaliplatine exerce préférentiellement sa toxicité sont bien identifiées, en effet, **cette molécule s'accumule au niveau des ganglions des racines dorsales** [40].

L'allodynie aiguë au froid s'expliquerait par des dysfonctionnements fonctionnels de certains canaux ioniques et récepteurs transmembranaires, le tout se traduisant par une modification de l'excitabilité neuronale [41]. Les **canaux sodiques $Na_V1.6$** et **$Na_V1.9$** semblent jouer un rôle central dans le développement de l'allodynie au froid. Ainsi, en altérant les courants sodiques, l'oxaliplatine potentialise le signal de sensation de froid [42]–[44]. De même, il a été montré que l'oxaliplatine atténuait le courant potassique en modulant les **canaux $K^+$ voltage-dépendant de type $K_V2.2$** [45], [46]. Enfin, de plus en plus d'équipes s'intéressent désormais à l'effet de l'oxaliplatine sur la protéine **Transient Receptor Potential Melastin 8** (TRPM8), également appelée cold and menthol receptor 1 (CMR1). Il s'agit d'un homotétramère formant un pore non sélectif aux cations essentiellement exprimé par les neurones sensitifs et plus particulièrement les

neurones des racines des ganglions dorsaux. TRPM8 joue un rôle important dans la perception du froid, en effet, des souris déficientes pour cette protéine éprouvent des difficultés à discriminer le chaud du froid et à ressentir la sensation de froid pour des températures supérieures à +10 °C [47]. Son activation par le froid ou certains agonistes comme le menthol entraînent une entrée de calcium dans la cellule et à moindre mesure de sodium aboutissant à une dépolarisation et à la génération d'un potentiel d'action [48]. L'équipe de Kawashiri a montré que l'oxaliplatine et les ions oxalates augmentaient l'expression membranaire de TRPM8 dans des cultures neuronales de racines de ganglions dorsaux murins. Des antagonistes de TRPM8, comme la capsazepine, inhibent l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine [49], [50]. Ces observations suggèrent que l'oxaliplatine sensibilise l'organisme au froid en potentialisant l'expression des récepteurs TRPM8.

Par ailleurs, l'oxaliplatine provoque des **altérations morphologiques** des cellules nerveuses, ce qui est responsable de l'installation de la **neuropathie chronique**. Au niveau anatomique, l'oxaliplatine réduit la densité en fibres nerveuses intra-épidermiques [51]. Ces fibres sont les terminaisons nerveuses libres des fibres sensitives peu myélinisées de type Aδ et non myélinisées de type C qui finissent leur trajet dans l'épiderme. Il est désormais clairement démontré que la **perte en fibres nerveuses intra-épidermiques** sous traitement par oxaliplatine est à l'origine de la neuropathie douloureuse et de la perte de sensibilité [52], [53]. Cependant, la maladie cancéreuse elle-même prédispose à cette altération morphologique. En effet, la densité en fibres nerveuses intra-épidermique peut être considérablement réduite chez le patient atteint de cancer, même avant le début de la chimiothérapie par oxaliplatine [54]. Il existe alors une neuropathie infraclinique qui n'est pas objectivable par les signes cliniques [55]. Au niveau cellulaire, la neurotoxicité se manifeste par une inhibition de la croissance dendritique et axonale [56], par des dommages au niveau des corps cellulaires et du noyau [57], ainsi que par l'atrophie d'une sous-population de neurones des racines des ganglions dorsaux [40]. L'oxaliplatine induit un **stress oxydant** et de **l'apoptose**. Plus précisément, une production d'espèces réactives de l'oxygène, de monoxyde d'azote, une peroxydation lipidique et une mitotoxicité ont été mis en évidence sur des cultures cellulaires de macrophages et de neuroblastomes traités par oxaliplatine [14]. D'autre part, il a été montré que l'oxaliplatine activait de façon concentration-dépendante le **récepteur $P2X_7$**, impliqué dans les voies de mort cellulaire et de dysfonction mitochondriale via l'activation de la caspase-3 (Figure 10). Ceci a pour effet de provoquer une libération de cytokines pro-inflammatoires tels que le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) et l'interleukine-6 (IL-6) mais aussi d'induire la condensation de la chromatine après activation de la caspase-3. Enfin, les auteurs ont montré que des inhibiteurs pharmacologiques du stress oxydant (N-acétylcystéine, ibuprofène et paracétamol) réduisent *in vitro* les effets neurotoxiques

de l'oxaliplatine. Cette étude fait suite à la publication de précédents travaux ayant révélé le rôle de $P2X_7$ dans le développement de neuropathies d'origine inflammatoire. En effet, la neurotoxicité induite à l'oxaliplatine n'est plus retrouvée chez des souris knock-out pour le gène du récepteur à $P2X_7$ ou après administration d'antagonistes du récepteur à $P2X_7$ [58], [59].

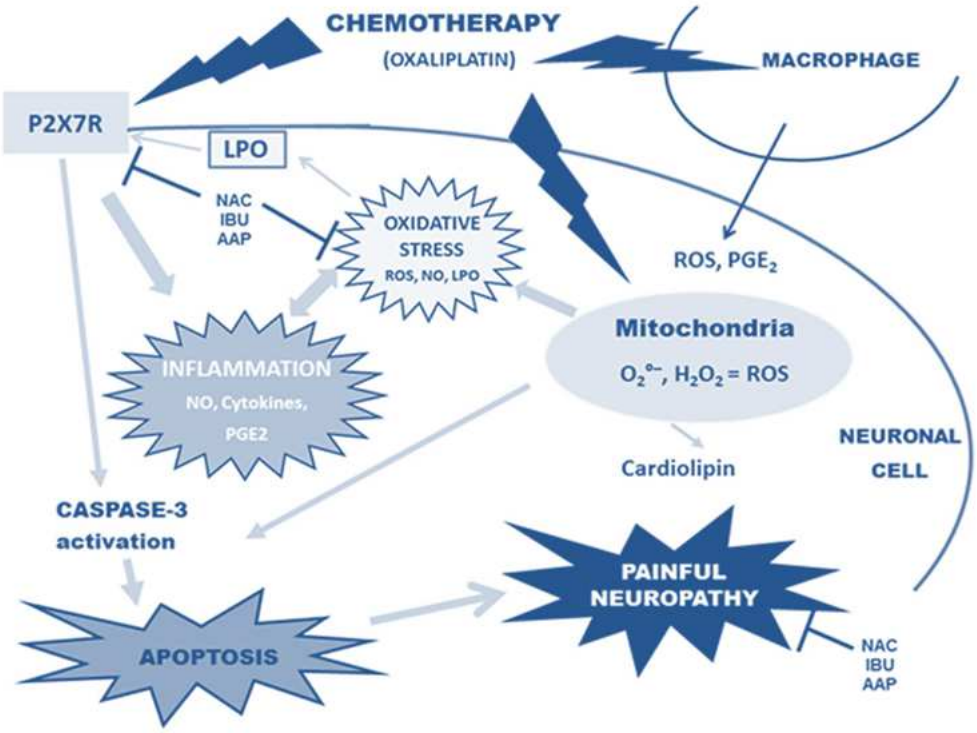



Figure 10 | Hypothèse du mécanisme physiopathologique d'induction des douleurs neuropathiques par l'oxaliplatine. *D'après Massicot et al, 2013*

*Les douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine semblent médiées par l'activation du récepteur de mort $P2X_7$ et par une toxicité mitochondriale qui induit l'apoptose.*

*Légende : LPO = lipoperoxydation ; AAP = paracétamol ; IBU = ibuprofène ; NAC = N-acetylcystéine*

D'autre part, **l'environnement cellulaire** des neurones joue un rôle important dans le développement de la neuropathie. Les cellules de la microglie et les astrocytes potentialisent ainsi la neurotoxicité de l'oxaliplatine en générant et en entretenant une neuro-inflammation [60], [61].

L'équipe de Sakurai a étudié la neurotoxicité des métabolites de l'oxaliplatine chez le rat et a mis en évidence l'importance du rôle de l'**oxalate** dans **l'allodynie au froid**. En effet, l'administration d'oxalate seul induit une allodynie au froid dans la phase précoce sans altération de la sensibilité aux stimuli mécaniques. A l'inverse, l'administration de **$Pt(DACH)Cl_2$** seul est responsable d'une **allodynie aux stimuli mécaniques** sans provoquer d'allodynie au froid. La co-administration de sels de calcium ou de magnésium avant celle d'oxaliplatine ou d'oxalate limite

l'apparition d'allodynie au froid mais n'a pas d'action sur la prévention de l'allodynie aux stimuli mécaniques [62]. Ainsi, l'utilisation de sels de calcium et de magnésium a été proposée comme traitement préventif de l'allodynie quelques années seulement après sa mise sur le marché [63]. Le mécanisme reposerait sur la capacité de chélation des ions divalents de magnésium et de calcium par l'ion oxalate. En effet, la neuropathie induite par l'oxaliplatine soulève des préoccupations majeures puisqu'elle conduit parfois à l'arrêt d'un traitement qui se révèle être efficace contre la maladie cancéreuse. Aussi, la recherche de prophylaxies contre cette neurotoxicité fait l'objet de nombreuses études.

## 3. Prophylaxie des neuropathies

L'expérience acquise par les cliniciens qui manipulent cet anticancéreux ainsi que l'étude des mécanismes neurotoxiques de l'oxaliplatine ont permis le développement de différentes stratégies prophylactiques de la NPIO. On peut distinguer trois approches prophylactiques différentes : la **modification de l'administration** de l'oxaliplatine, l'utilisation de médicaments **antalgiques** actifs dans les douleurs neuropathiques ou autres médicaments **neurotropes mais non antalgiques** et enfin l'utilisation **de compléments alimentaires**.

### 3.1. Modification de l'administration

**La modification des modalités d'administration de l'oxaliplatine** apparaît comme une pratique efficace et aisée à mettre en œuvre pour réduire les effets indésirables (hématotoxicité, neurotoxicité, hypersensibilité…). En pratique, lorsque la neuropathie se présente sous forme de paresthésies **douloureuses transitoires**, la **posologie** d'oxaliplatine est généralement **réduite**. En revanche, lorsque celles-ci persistent entre chaque cycle, la suspension ou l'arrêt définitif est indiqué [64], [65]. Par ailleurs, il est recommandé **d'augmenter la durée de perfusion** de l'oxaliplatine à quatre, voire six heures lorsqu'un spasme laryngé survient pendant l'administration. Le Tableau 2 est un exemple de conduite à tenir pour adapter la posologie de l'oxaliplatine en fonction de la tolérance neurologique au traitement.

D'autre part, au-delà de la modification de la dose et de la vitesse de perfusion, il est possible de jouer sur le **rythme d'administration de l'oxaliplatine**. En effet, le Groupe Coopérateur Multidisciplinaire en Oncologie (GERCOR) préconise de **réduire la durée des cures d'oxaliplatine** pour diminuer l'intensité de la neuropathie chronique. Plusieurs essais cliniques appelés OPTIMOX ont évalué l'efficacité et la tolérance d'un traitement court par oxaliplatine ou de la répétition de plusieurs cures courtes de FOLFOX espacées de périodes prolongées sans oxaliplatine. Il en résulte qu'effectuer un arrêt ou une pause dans l'administration de

l'oxaliplatine, méthode appelée *Stop-and-Go*, permet de réduire la prévalence des neuropathies chroniques sans compromettre la survie sans progression et la survie globale [66], [67]. Concrètement, il s'agit d'administrer l'oxaliplatine à la dose de 130 mg/m² en association avec le 5-FU/AF toutes les deux semaines pendant trois mois. L'oxaliplatine est ensuite arrêté et le 5-FU/AF est poursuivi pendant six mois. Enfin, à l'issue de ces neuf mois de traitement, l'oxaliplatine est réintroduit. Comparé au protocole classique FOLFOX (oxaliplatine 85 mg/m² + 5-FU/AF toutes les deux semaines pendant six mois), il en résulte une baisse significative dans la prévalence de la neurotoxicité de grade III sans modification de la durée de survie sans progression [68]. Par ailleurs, certaines études suggèrent qu'administrer l'oxaliplatine à la dose de 100 mg/m² augmente la durée de survie sans progression par comparaison à l'administration de l'oxaliplatine à la dose de 85 mg/m² sans augmentation significative des troubles neurologiques [69].

Les patients précédemment traités par oxaliplatine peuvent recevoir, après échec des autres stratégies anticancéreuses, de nouveau une ligne de traitement à base d'oxaliplatine. Ce second traitement par oxaliplatine, survenant en général plusieurs années après le premier, est alors appelé *traitement de sauvetage*. L'étude de Besora *et al.* a estimé qu'un tiers des patients ayant reçu deux lignes de traitement à base d'oxaliplatine, séparées par une durée médiane de 30 mois, ont subi une aggravation de leur neuropathie suite au second traitement [70].

| Toxicités neurologiques | Grade | Durée de la toxicité | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 à 7 jours | Plus de 7 jours | Persiste entre les cycles[a] |
| Paresthésies/dysesthésies[b] qui n'interfèrent pas avec la motricité fine | 1 | Pas de réduction de dose | | |
| Paresthésies/dysesthésies[b] qui interfèrent avec la motricité fine mais n'affectent pas les activités de la vie quotidienne (AVQ) | 2 | Pas de réduction de dose | | 75 % de la dose |
| Paresthésies/dysesthésies[b] avec douleurs ou diminution de la motricité fine qui affectent les activités de la vie quotidienne (AVQ) | 3 | 1ière fois : 75 % de la dose<br>2ième fois : 50 % de la dose | | Cesser le traitement |
| Paresthésies/dysesthésies persistantes ou incapacitantes ou qui peuvent être mortelles | 4 | Cesser le traitement | | |
| TOXICITÉ AIGUË : Dysesthésie laryngopharyngée[b] (durant ou dans les 2 heures suivant la perfusion) | Non applicable | Prolonger la perfusion de l'oxaliplatine à 6 heures au prochain traitement | Non applicable | |

a. *Toxicité toujours présente au début du prochain cycle.*
b. *Peuvent être provoquées par le froid.*
c. *Les benzodiazépines peuvent aussi être utilisées en prémédication.*

Tableau 2 | Tableau d'ajustement posologique de l'oxaliplatine selon la toxicité neurologique. D'après *Bradley et al*

## 3.2.Chimioprophylaxie

L'administration de **sels de calcium et de magnésium** est une pratique répandue et traditionnellement utilisée pour diminuer les symptômes de la neuropathie aiguë. Selon une

étude rétrospective publiée en 2004 sur 161 patients, l'administration d'un gramme de gluconate de calcium et d'un gramme de sulfate de magnésium en intraveineuse lente sur 15 minutes juste avant la perfusion d'oxaliplatine réduit l'incidence et l'intensité des symptômes neurologiques [63]. L'effet prophylactique reposerait sur la chélation des ions calcium et magnésium par l'oxalate libéré lors du métabolisme de l'oxaliplatine [63]. Une autre hypothèse de fonctionnement est l'effet stabilisateur du calcium et du magnésium sur le potentiel de repos des canaux sodiques voltage-dépendants [71], [72]. Toutefois, l'intérêt de cette pratique est sérieusement remis en cause et fait actuellement l'objet d'une vive polémique [73]–[75].

L'observation de modifications électrophysiologiques sous oxaliplatine amène à tester l'effet de molécules neurotropes agissant sur les canaux ioniques sodium voltage-dépendants et potassium voltage-dépendants précédemment décrits. Parmi ces principes actifs, certains ont l'indication comme antalgiques des douleurs neuropathiques. La **duloxétine** est un antidépresseur appartenant à la classe pharmacologique des inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline IRSNa. Dès 2012, des premières études non contrôlées avaient mis en évidence un possible effet de la duloxétine sur la réduction de l'intensité de la douleur neuropathique et du grade de neuropathie [76], [77]. Par la suite, des études contrôlées et randomisées ont par la suite confirmé cet effet protecteur contre la NPIO. La prise de duloxétine à la dose de 30 mg/j pendant sept jours puis augmentée à 60 mg/j pendant quatre semaines réduit de façon significative la NPIO [78], [79]. Les patients avec une qualité de vie diminuée en début de traitement sont de meilleurs répondeurs [79]. Il a été montré *in vivo* chez des rongeurs que cette action antalgique était due à une inhibition de l'hyperexcitabilité des neurones WDR (Wide Dynamic Range) de la corne dorsale de la moelle épinière [80]. La **venlafaxine** est également un antidépresseur de la classe des IRSNa. Plusieurs études ont mis en évidence qu'un traitement par venlafaxine 37,5 à 75 mg par jour diminue les symptômes neurologiques de la NPIO [81]–[83]. Cependant, parmi ces deux molécules, la Société Américaine d'Oncologie Clinique (ASCO) recommande depuis 2015 l'usage de la duloxétine dans le traitement de la neuropathie iatrogène aux anticancéreux (douleur neuropathique, engourdissements et picotements) dans sa recommandation 3.9 relative à la prise en charge des neuropathies et douleurs neuropathiques [84]. La duloxetine (Cymbalta), 30 mg et 60 mg, est indiquée dans la douleur neuropathique [85]. La venlafaxine (Effexor®), 37,5 mg et 75 mg, en revanche ne possède pas cette indication [86].

La **carbamazépine** est un anti-épileptique inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants capable d'antagoniser les effets électrophysiologiques de l'oxaliplatine *in vitro* [87]. Cependant, son action préventive n'a pas été clairement démontrée chez l'homme, le problème est lié à l'impossibilité d'administrer ce médicament à des doses neuroprotectrices efficaces sans éprouver les effets indésirables de la carbamazépine [28]. La **gabapentine** est également un anti-

épileptique, indiqué dans le traitement des douleurs neuropathiques. C'est un analogue de l'acide gamma amino butirique (GABA) ayant une affinité pour la sous unité $\alpha_2\delta_1$ des canaux calciques voltage-dépendants. Dans une étude ouverte non contrôlée de faible effectif (n = 15), la prise de 200 mg à 300 mg/j dès le début des symptômes neurologiques a permis la résolution des symptômes chez tous les patients et aucun patient n'a eu d'arrêt prématuré du traitement pour neurotoxicité [64]. Cependant, ces résultats encourageants n'ont pas été retrouvés par la suite. Une étude contrôlée en double aveugle et en cross-over (n = 115 patients) a évalué l'efficacité de la gabapentine administrée à la dose de 900 mg/j dans la résolution des symptômes douloureux [88]. La gabapentine ainsi administrée est inefficace pour diminuer la douleur. A la posologie testée, les patients se plaignent d'effets indésirables de type vertiges ($p$ = 0,02) et nystagmus ($p$ = 0,009). De même, la **prégabaline**, également un analogue du GABA développée après la gabapentine a été proposée comme candidat potentiel de chimioprophylaxie. La prégabaline est un anti-épileptique indiqué dans le traitement des douleurs neuropathiques. En effet, dans un essai ouvert non contrôlé de 23 patients atteints de cancer gastro-intestinaux, il a été montré que la prégabaline administrée à la dose de 450 mg/j réduisait la sévérité des symptômes de la NPIO [89]. Ces premiers résultats publiés en 2010 nécessitent d'être complétés par des études de meilleure qualité méthodologique. Plus récemment, le **riluzole,** un médicament indiqué dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique et inhibant les processus glutamatergiques a montré des résultats intéressants chez le rat. Il a été montré que les rats souffrants de NPIO présentaient un niveau élevé de glutamate extracellulaire dans la moelle épinière. Par ailleurs, cette observation était associée à une diminution de l'expression du transporteur GLT-1 (Glutamate Transporteur 1), transporteur jouant un rôle important dans la recapture synaptique du glutamate. Lorsque ces rats étaient traités par riluzole, le niveau de glutamate extracellulaire était abaissé par rapport aux rats non traités et l'expression des transporteurs GLT-1 était plus élevée. Enfin, les rats traités présentaient moins de symptômes de NPIO de type allodynie mécanique [90]. Ces résultats chez l'animal sont encourageants mais les études nécessitent d'être transposées à l'homme pour pouvoir apprécier l'effet prophylactique chez les patients.

Les effets neuroprotecteurs de la **mélatonine** ont été mis en évidence chez le rat traité par oxaliplatine [91]. La mélatonine est une hormone naturelle mais aussi un médicament utilisé dans les troubles du sommeil. Il pourrait ainsi faire l'objet d'essai clinique contrôlé en double aveugle chez l'homme.

D'autres médicaments, *a priori* non ionotropes, ont également été testés comme la **minocycline**, un antibiotique de la classe des tétracyclines. Une étude publiée en 2011 a montré une efficacité de la minocycline chez le rat traité par oxaliplatine dans la prévention de l'allodynie mécanique et dans la protection des fibres nerveuses intra-épidermiques contre la

dégénérescence chimio-induite [52]. Les effets neuroprotecteurs de la minocycline sont en effet connus depuis le début des années 2000 [92]. De même, la **clonidine**, un agoniste des récepteurs alpha-2 adrénergiques indiqué en seconde intention dans l'hypertension artérielle, a montré une efficacité dans la prévention de l'allodynie mécanique de l'oxaliplatine chez la souris [93]. L'**exenatide**, un antidiabétique de la famille des incrétinomimétiques, s'est montré efficace dans la résolution de la NPIO après traitement mais pas en prévention chez la souris [94]. Ces effets bien éloignés de leurs destinations thérapeutiques apportent de nouvelles pistes de recherche originales pour la chimioprophylaxie de la NPIO. Cependant, il convient de réaliser des études contrôlées en double aveugle chez l'homme pour confirmer leur efficacité.

### 3.3.Molécules antioxydantes et compléments alimentaires

Enfin, en se basant sur le rationnel du stress oxydatif comme responsable de la neuropathie, de nombreux antioxydants ont été proposés comme chimioprophylaxie. Le **glutathion**, tripeptide (acide glutamique, cystéine et glycine) connu pour ses propriétés antioxydantes, a été évalué dans une étude randomisée contrôlée de 52 patients traités par oxaliplatine. Les auteurs rapportent une réduction significative de la prévalence et de l'intensité de la NPIO dans le bras recevant du glutathion par voie intraveineuse (1 500 mg/m²) par rapport au bras placebo recevant du sérum physiologique [95]. Par ailleurs, l'**amifostine** (Ethyol®), un analogue de la cystéamine possédant une fonction thiol libre capable de conjuguer les métaux lourds et les radicaux libres a également été testé dans la prévention des neuropathies induites par des agents cytotoxiques. C'est un médicament indiqué dans la prévention de la myélotoxicité du cyclophosphamide et la néphrotoxicité du cisplatine. Son intérêt dans la prévention de la neurotoxicité induite par les platines est actuellement étudié sans aboutir sur un consensus clair [64], [96]. L'utilisation de **l'acide alpha-lipoïque**, molécule soufrée hautement antioxydante, a également été proposée. Une étude non contrôlée sur 15 patients a suggéré une certaine efficacité dans le traitement des NPIO déjà installées [97]. Cependant, une étude contrôlée contre placebo en double aveugle et publiée en 2013 a rapporté une inefficacité de cette thérapie. D'autres antioxydants comme les **flavonoïdes,** des polyphénols issus du règne végétal (rutine et quercetine), ont été testés chez la souris avec des résultats positifs intéressants [98]. D'autres au contraire comme l'**α-tocophérol** (vitamine E), n'ont pas démontré d'effets protecteurs. En fin de compte, l'administration des antioxydants comme agent préventif de la NPIO chez l'homme semble décevante malgré des études précliniques prometteuses [99]. Chez le patient atteint de cancer colorectal, le pouvoir antioxydant du plasma est très variable d'un individu à un autre [100] et la quantité d'antioxydants administrée au patient n'est pas proportionnelle au pouvoir antioxydant du plasma du patient traité [101].

Les extraits de ***Ginkgo biloba*** sont utilisés dans le traitement symptomatique des troubles cognitifs, le traitement de l'insuffisance veino-lymphatique et le traitement des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire. Une étude rétrospective conduite par l'université de Georgetown (Washington, Etats-Unis) suggère un possible effet prophylactique d'extraits de *Ginkgo Biloba* per os [102]. Cependant, cette piste n'a pas fait l'objet d'études contrôlées ultérieures.

Ces dernières années, l'étude du métabolisme dans la maladie cancéreuse soulève un intérêt grandissant. Ainsi, il a été montré dans une étude randomisée contrôlée en double aveugle que la **supplémentation en acides gras polyinsaturés :** acide éicosapentaénoïque (EPA, C20:5 ω-3) et acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 ω-3) est efficace dans la réduction de l'incidence et de l'intensité des signes de la NPIO [103]. Ces acides gras sont apportés par l'alimentation ou synthétisés par l'organisme à partir de l'acide α-linolénique (C18:3 ω-3), acide gras essentiel apporté exclusivement par l'alimentation (poissons, l'huile de colza, l'huile de lin…). Dans l'étude de Esfahani, 345 mg de DHA et 64 mg d'EPA étaient administrés trois fois par jour dès le début de la chimiothérapie et jusqu'à un mois après l'arrêt du traitement par oxaliplatine. Cet essai clinique fait suite à de nombreuses autres études ayant montré un intérêt de la supplémentation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans la résolution de l'inflammation, de la neuropathie et de la douleur [104]–[106]. Ces études sont prometteuses mais la tolérance et la sécurité d'emploi de tels composés doivent être évaluées à long terme. Au plan moléculaire, l'acide linoléique (C18:2 ω-6) et l'acide α-linolénique (ALA) sont les précurseurs des éicosanoïdes que sont les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes. Ces messagers chimiques jouent un rôle capital dans l'homéostasie de nombreuses fonctions du corps mais sont responsables de la régulation des phénomènes inflammatoires et douloureux. Schématiquement, les métabolites dérivés des acides gras de type omega-3 (ALA, EPA, DHA) interviennent dans la résolution de la douleur et de l'inflammation alors que les métabolites dérivés des acides gras de type omega-6 (acide linoléique, acide arachidonique) sont majoritairement pro-inflammatoires [107]. Toutefois, certains métabolites issus de l'acide arachidonique pourraient avoir des effets antalgiques [108].

## 3.4. Thérapies non pharmacologiques

Les études traitant des stratégies de prévention et de prise en charge de ces neuropathies sont largement basées sur l'utilisation de traitements pharmacologiques. Bien que certains médicaments comme les IRSNa aient montré des effets antalgiques sur la composante douloureuse de la NPIO, l'efficacité sur les autres composantes neurosensoriels de la NPIO et sur la persistance de cet effet protecteur à long terme ne sont pas connus [80], [82]. Cependant, au-

delà de ces stratégies de type chimioprophylaxie, d'autres pistes non pharmacologiques sont à l'étude.

Des exercices de **stimulations sensorielles et motrices** ont été développés pour prévenir ou retarder la progression des neuropathies iatrogènes aux anticancéreux dont la NPIO [109]. Une revue systématique de la littérature publiée en 2014 ayant colligé 18 études sur le sujet (dix essais contrôlés randomisés et huit essais contrôlés non randomisés) a révélé que les exercices de stimulation sensorielles et/ou motrices présentaient des effets bénéfiques sur la réduction des symptômes neurologiques, et ce, pour des neuropathies d'étiologies variées (neuropathie chimio-induite, neuropathie diabétique, neuropathie amyloïde familiale, syndrome de Guillain-Barré) [110]. Par ailleurs, il a été montré que la pratique de **l'ergothérapie** et de la **physiothérapie** (exercices de marche et d'équilibre) amélioraient les capacités neurologiques des patients [109]. L'utilisation de plateformes vibrantes est également à l'étude avec des premiers résultats encourageants sur la diminution de la douleur neuropathique chez les patients traités par chimiothérapie neurotoxique (dérivés du platine, taxanes, alcaloïdes de la pervenche, bortézomib)[111]. Les plateformes vibrantes sont des machines de fitness produisant des vibrations de basses fréquences (20-60 Hz) et d'amplitude faible (jusqu'à 15 mm). Le fonctionnement est basé sur la mise en œuvre du réflexe ostéotendineux : les vibrations provoquent des contractions involontaires des muscles à une vitesse très supérieure à celle de l'entraînement traditionnel. Cet exercice permet le renforcement musculo-tendineux, l'antalgie et le relâchement musculaire. L'équipe de Streckmann (Université de Cologne) conduit actuellement un essai clinique contrôlé randomisé multicentrique en prospectif visant à étudier l'effet d'exercices de stimulation sensorielle (exercice d'équilibre sur support instable) et d'exercices de vibration (utilisation de plateformes vibrantes) chez des patients traités par oxaliplatine et alcaloïdes de la pervenche [109]. Les exercices sont réalisés durant toute la durée du traitement et ce, deux fois par semaine à raison de 15 à 30 minutes par session. Il est prévu d'inclure 236 patients dont 118 traités par oxaliplatine. L'évaluation des patients est basée sur la réalisation d'examens (examen neurologique clinique, mesure de vitesse de conduction nerveuse…), et l'administration de questionnaires (EORTC CIPN 20, QLQ-C30…) à différents temps (début de traitement, 12 semaines de traitement, fin de traitement et trois mois après la fin du traitement). Il est attendu une diminution de l'incidence de la NPIO, une réduction de la propension à modifier les doses d'oxaliplatine ou d'arrêt du traitement ainsi qu'une augmentation de la qualité de vie des patients.

La stimulation sensorielle et motrice permet d'améliorer la perception, la proprioception, et la mobilité. Ce rétablissement de la coordination motrice et des réflexes sensitivo-moteurs s'explique par une adaptation fonctionnelle du système neuro-musculaire [112]–[114]. La

pratique régulière de ces exercices permet de compenser les fonctions perdues selon le processus de vicariance et de neuroplasticité des circuits neuronaux périphériques [102]. La régénérescence antérograde de l'axone des nerfs périphériques est un processus complexe sous le contrôle de divers facteurs de croissance tels que le NGF (Nerve Growth Factor) ou le FGF (Fibroblast Growth Factor) et rendu possible grâce à la prolifération des cellules de Schwann. Ainsi, les neurones sensoriels dont le corps cellulaire se trouve dans les ganglions rachidiens peuvent régénérer la branche axonale qui va vers la périphérie [115].

L'acupuncture est à l'essai dans la prophylaxie de la NPIO. Des piqûres quotidiennes **d'acupuncture avec du venin dilué d'abeille** réduit l'allodynie mécanique et au froid chez les souris traitées et favorise la restauration des petites fibres nerveuses intra-épidermiques [51], [116]. Chez l'homme, deux études récentes, non contrôlées, réalisées sur 10 (série de cas) et 17 (cohorte) patients ayant pratiqué l'acupuncture ont montré des résultats positifs [117], [118].

A notre connaissance, **l'Education Thérapeutique du Patient** (ETP) est encore peu développée dans le domaine de la neuropathie iatrogène. Elle pourrait cependant constituer une réponse originale à cette problématique. Concrètement, il s'agirait de proposer à côté des soins classiques d'oncologie, un ensemble d'activités d'informations, de conseils, et de formation destinées à rendre le patient plus autonome dans la gestion des effets indésirables de son traitement neurotoxique. L'enjeu serait de donner au patient les compétences pour gérer au mieux son quotidien et favoriser la construction d'un nouvel équilibre de vie. L'ETP fait partie intégrante des soins et ne prétend pas se substituer aux stratégies prophylactiques décrites précédemment. Un tel programme existe cependant pour les patients atteints de neuropathies amyloïdes familiales, il s'agit du programme d'éducation thérapeutique dirigé par le professeur David Adams et le docteur Cécile Cauquil du service de neurologie de l'hôpital Bicêtre [119].

# Chapitre II : L'étude de la neuropathie

## 1. Evaluation de la neuropathie induite par l'oxaliplatine

L'évaluation et l'étude de la neuropathie induite par l'oxaliplatine mettent en jeu différentes approches complémentaires, aussi bien subjectives qu'objectives, parmi lesquelles l'évaluation de **la perception des stimuli extérieurs** (seuils de sensibilité, de douleur) et l'évaluation de **l'intégrité des structures neurologiques** (biopsie cutanée, mesure des vitesses de conduction nerveuse, mesure de la conductance cutanée à l'ion chlorure). L'utilisation de **biomarqueurs** pour évaluer la neuropathie est une approche peu développée mais à fort potentiel compte-tenu de l'évolution des techniques analytiques actuelles.

### 1.1.Etude de l'intégrité des structures nerveuses

L'oxaliplatine est connu pour léser les fibres nerveuses intra-épidermiques (IENF) [51], [52], [54]. Ces IENF sont entre autres les terminaisons nerveuses libres des fibres faiblement myélinisées de type Aδ et non myélinisées de type C qui transmettent les informations thermiques et algiques. Lorsque ces petites fibres intra-épidermiques sont touchées, on parle alors de neuropathies à petites fibres (NPF) [120]. La **biopsie cutanée** est la **méthode de référence** pour étudier l'intégrité des IENF et donc la NPF. Il s'agit d'une évaluation anatomopathologique. Cette technique est totalement objective : les fibres nerveuses sont mises en évidence par immunohistochimie et la perte des terminaisons distales des nerfs peut être quantifiée directement [121]. Quelques études traitant de la NPIO se sont basées sur cette technique [54], [122]. Cependant, en raison de son caractère invasif, les cliniciens préfèrent employer des méthodes alternatives moins traumatiques.

L'électroneuromyogramme (ENMG) est une exploration fonctionnelle permettant d'évaluer le fonctionnement des structures nerveuses de façon non invasive. L'ENMG comporte différents types de tests qui sont réalisés par un spécialiste en neurologie. L'étude des vitesses de conduction des fibres **nerveuses sensitives** et motrices permet d'évaluer l'intégrité des fibres nerveuses. En pratique, un territoire cutané distal est excité grâce à une impulsion électrique (quelques microvolts) puis le potentiel électrique transmis à travers la structure nerveuse est mesuré en proximal quelques centimètres plus loin. L'étude des vitesses de conduction est capitale pour préciser l'étendue, la répartition et orienter vers le type d'atteinte neurologique (gaine de myéline, axone…). Une baisse de la conduction signe une atteinte nerveuse. Cette technique a été employée dans quelques études sur la NPIO [103]. Cependant, celle-ci a une

sensibilité très mauvaise : les vitesses de conduction nerveuse sont souvent normales chez des patients atteints de NPIO. La mesure des vitesses de conduction nerveuse motrice ou l'électromyogramme sont également des tests d'ENMG mais ne présentent pas d'intérêt dans l'exploration de la NPIO.

La mesure des **potentiels évoqués** est une exploration fonctionnelle permettant d'évaluer le fonctionnement des structures nerveuses de façon non invasive également. Un potentiel évoqué se définit comme la modification de l'activité électrique du système nerveux en réponse à une stimulation externe (visuelle, auditive, sensitive ou motrice). Ces examens sont non douloureux, le sujet doit être calme, détendu, confortablement installé. Il peut lui être demandé de coopérer selon le type de test. La durée de l'examen varie d'une demi-heure à deux heures. En pratique, plusieurs électrodes sont placées en différents points du corps. La stimulation est répétée un grand nombre de fois pour extraire une réponse évoquée de l'activité électrique de base du système nerveux. Le délai entre la stimulation et l'onde enregistrée ainsi que l'amplitude de celle-ci sont comparés aux valeurs obtenues chez des sujets sains. On distingue différents types de potentiels évoqués : les potentiels évoqués visuels (fonctionnement des voies visuelles), les potentiels évoqués auditifs (fonctionnement des voies auditives), les potentiels évoqués somesthésiques (fonctionnement des voies de la sensibilité au niveau des nerfs périphériques), les potentiels évoqués moteurs (fonctionnement de la voie motrice) et les potentiels évoqués laser (fonctionnement des voies de la sensibilité thermique et de la douleur). Les potentiels évoqués laser (PEL) sont mesurés en appliquant une stimulation calorique sur la peau grâce à un laser. La sensation ressentie est celle d'une piqûre chaude. La mesure des PEL permettent d'étudier le fonctionnement des voies de la sensibilité thermique et de la douleur neuropathique. En théorie, l'utilisation des PEL dans l'exploration de la NPIO pourrait présenter un grand intérêt, cependant, la littérature scientifique est encore relativement pauvre à ce sujet [123].

Le **Sudoscan** (Impeto Medical, Paris, France) est un dispositif permettant d'évaluer l'intégrité des IENF de façon non invasive et objective [124]. Le Sudoscan est un dispositif médical destiné à évaluer le degré de neuropathie grâce à la mesure de la fonction sudorale au niveau des mains et des pieds. Les glandes sudoripares étant innervées par des fibres nerveuses de type C, si celles-ci sont atteintes, la production de la sueur en résultera perturbée. Sur le plan électrochimique, cette méthode est basée sur la mesure de la conductance aux ions chlorures au moyen de deux paires d'électrodes placées au niveau de la paume de la main et de la plante des pieds [125]. A ce jour, le Sudoscan n'est validé que dans l'évaluation des neuropathies du diabétique mais une équipe française a étudié l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans la NPIO [1].

## 1.2. Evaluation par le patient

### *1.2.1. Les seuils de sensibilité : perception sensorielle et douleur*

L'oxaliplatine modifie les seuils de détection thermique et de douleur. Aussi, des dispositifs permettant de quantifier la sensibilité thermique sont largement utilisés dans le domaine. On parle de Quantitative Sensory Testing (QST). Différentes sociétés fabriquent et distribuent de tels dispositifs comme la société Somedic AB qui commercialise le **Thermotest** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède). Cet appareil est validé dans le domaine de l'exploration de la neuropathie douloureuse de cause métabolique (diabète) ou toxique (anticancéreux) [26], [126], [127]. Sa principale fonction est de déterminer les seuils de détection thermique au froid et au chaud (CDT, *Cold Detection Threshold* ; WDT, *Warm Detection Threshold*) ainsi que les seuils de douleur thermique au froid et au chaud (CPT, *Cold Pain Threshold* ; HPT, *Heat Pain Threshold*). Cet appareil délivre sur la peau un stimulus thermique (chaud ou froid) à une valeur définie et stable (5 °C - 50 °C) au moyen d'un dispositif appelé thermode. Le stimulus thermique est pur, c'est à dire dénué de composante tactile. Le principe de fonctionnement du Thermotest repose sur l'effet Peltier. Il s'agit d'un phénomène physique de déplacement de chaleur en présence d'un courant électrique : l'une des jonctions se refroidit pendant que l'autre se réchauffe. La température est mesurée en permanence par des thermocouples situés dans la thermode permettant ainsi le contrôle au plus juste de la température et d'assurer ainsi sa stabilité.

Le **vibromètre** est un dispositif médical permettant de mesurer la sensibilité vibratoire. L'évaluation des seuils vibratoires est déterminée selon la méthode des limites. La méthode des limites est une variation continue de l'intensité du stimulus à partir de la valeur basale jusqu'à atteindre le seuil de perception du stimulus en question. Cette méthode s'oppose à la méthode des niveaux, qui est une variation discrète de la température, c'est-à-dire par palier. Des stimulations d'intensité croissante sont appliquées et le sujet doit signaler verbalement l'apparition d'une sensibilité vibratoire. Ce dispositif a déjà été utilisé dans l'étude de la NPIO [128].

Les **filaments de Von Frey** permettent d'explorer la sensibilité tactile statique. Ils sont rarement utilisés chez l'homme dans l'exploration des neuropathies mais quelques études sur la NPIO les mentionnent [117], [128]. Leur facilité de mise en œuvre et le faible coût d'investissement en font pourtant un examen de choix.

### *1.2.2. Questionnaires et échelles cliniques*

Il existe plusieurs questionnaires validés dans le domaine, permettant d'évaluer la neuropathie. Ces questionnaires présentent l'intérêt **d'accéder directement au ressenti** du

patient. La **subjectivité** des réponses aux questionnaires autorise le clinicien à recueillir la plainte du patient telle qu'il la ressent, sans *a priori* sur les autres paramètres physiologiques. Le **Total Neuropathy Score (TNS)** est un questionnaire initialement développé pour évaluer les neuropathies chez le diabétique [129]. Il a par la suite été adapté pour l'étude des neuropathies se développant sous chimiothérapies en TNS-chemotherapy [1], [103]. Le **questionnaire Neuropathic Pain Symptom Inventory** (NPSI) a été développé pour caractériser la nature et l'intensité des douleurs neuropathiques. C'est un questionnaire largement utilisé dans ce domaine et validé [130]. Cet outil a déjà fait l'objet d'études portant sur l'évaluation des douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine [82]. Ce questionnaire formule 12 questions organisées en cinq domaines explorant une composante de la douleur neuropathique : douleur de type brûlures spontanées superficielles (question 1) ; douleur de type constrictions spontanées profondes (questions 2 et 3) ; douleurs paroxystiques (questions 5 et 6) ; douleurs évoquées (questions 8, 9 et 10) ; paresthésies et dysesthésies (questions 11 et 12). Pour chacun des items, il convient de coter sur une échelle numérique de un à dix l'intensité du trouble en question. Le score total donne une note sur 100. Les cinq composantes de douleurs neuropathiques citées ci-dessus sont estimées par des sous-scores correspondant aux moyennes des valeurs des items concernés. Le **questionnaire QLQ-CIPN20** (Quality of Life Questionnaire to assess Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy, 20 questions) est un questionnaire de qualité de vie évaluant les symptômes neuropathiques de type troubles de la sensibilité (neuf questions), troubles de la motricité (huit questions), troubles végétatifs (trois questions) [131], [132]. Chaque question est notée de 1 à 4 (1 = « pas du tout » ; 2 = « un peu » ; 3 = « moyennement » ; 4 = « beaucoup »). Le tout est additionné pour obtenir une somme intermédiaire sur 36 pour les symptômes neuro-sensoriels, une somme intermédiaire sur 32 pour les symptômes neuromusculaires et une somme intermédiaire sur 12 pour les symptômes végétatifs. Ce questionnaire a été spécialement développé pour évaluer la qualité de vie chez les patients traités par chimiothérapie neurotoxique. A ce jour, plusieurs études explorant la NPIO ont intégré ce questionnaire de qualité de vie [133], [134].

Enfin, il existe une échelle largement utilisé pour quantifier de façon universelle les effets indésirables des anti-cancéreux, il s'agit de l'échelle **Common Terminology Criteria for Adverse Events du National Cancer Institute (NCI-CTCAE).** Le NCI-CTCAE permet de grader la neuropathie sur une échelle allant de 1 à 5 :

Grade 1 : asymptomatique ou symptômes légers ; diagnostic à l'examen clinique uniquement ; ne nécessitant pas de traitement.

Grade 2 : symptômes modérés ; nécessitant un traitement minimal, local ou non-invasif ; interférant avec les activités instrumentales de la vie quotidienne.

Grade 3 : symptômes sévères mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital ; indication d'hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation ; invalidant ; interférant avec les activités élémentaires de la vie quotidienne.

Grade 4 : Mise en jeu du pronostic vital ; nécessitant une prise en charge en urgence.

### 1.3. Utilisation de biomarqueurs

Un **biomarqueur** est un **indicateur biologique mesurable** d'un état physiologique, pathologique ou encore d'une réponse pharmacologique [135]. L'évolution des techniques analytiques a permis un véritable essor de l'utilisation des biomarqueurs à des fins de dépistage, de diagnostic et de suivi de traitement. Les applications en médecine sont nombreuses et intéressent des domaines aussi variés que l'oncologie (*e.g.* CA 125 dans le cancer de l'ovaire, CA 15.3 dans le cancer du sein, l'antigène spécifique prostatique ou PSA dans le cancer de la prostate), la cardiologie (*e.g.* troponine, BNP, D-Dimères), l'infectiologie (*e.g.* procalcitonine), l'obstétrique (*e.g.* beta-hCG) ou encore la neurologie. L'utilisation des biomarqueurs est à la base de la **médecine personnalisée**, le traitement s'adapte au patient pour une prise en charge optimale en terme d'efficacité et de tolérance au traitement [136]. Les biomarqueurs sont de natures variées : il peut s'agir de gènes, protéines ou polypeptides, lipides ou autres petites molécules endogènes.

Un **biomarqueur** doit être **sensible** (capacité à donner un résultat positif lorsqu'une hypothèse est vérifiée) et **spécifique** (capacité à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée). En outre, un biomarqueur présente davantage d'intérêt lorsqu'il est **facilement accessible** (*e.g.* sang, urine) et lorsque les résultats sont **d'interprétation aisée** (*e.g.* résultat quantitatif avec seuils non ambigus). Un biomarqueur présentant ces caractéristiques est par conséquent très pertinent pour le clinicien et peut fonder le diagnostic d'une pathologie ou son évolution.

De nombreux biomarqueurs ont été identifiés dans un certain nombre de **pathologies neurologiques**. **Dans les accidents neuro-vasculaires**, la clinique et l'imagerie sont les éléments uniques de prise en charge des patients, cependant l'utilisation de biomarqueurs pourraient être utile dans le diagnostic ou dans le suivi des accidents vasculaires cérébraux (AVC) notamment [137], [138]. En effet, les AVC ischémiques et hémorragiques entraînent des changements rapides dans les voies de signalisation et les processus métaboliques. De fait, les études actuelles se concentrent sur la recherche de marqueurs du stress oxydant et de la neuro-inflammation [136].

De plus, les lésions cérébrales, la souffrance ischémique, l'activation du système immunitaire et l'altération de la barrière hémato-encéphalique conduisent à la libération de molécules potentiellement détectables dans le sang [139]. Ainsi, la *S100 bêta*, la *glial fibrillary acidic protein* et la *myelin basic protein* sont des biomarqueurs de l'activation gliale. La *S100 bêta* est un marqueur de l'activation des astrocytes et des lésions tissulaires cérébrales avec une faible spécificité pour l'AVC ischémique [136]. La *glial fibrillary acidic protein* permet, dans les cinq heures suivant l'apparition des symptômes, de différencier l'AVC hémorragique de l'AVC ischémique [140]. D'autres marqueurs du stress oxydant tels que PARK-7 et le malonialdéhyde pourraient quant à eux aider au diagnostic précoce de l'AVC et à son pronostic [136]. A côté de celles des troubles neuro-vasculaires, la prise en charge des **maladies neurodégénératives** restent limitée par des difficultés de diagnostic et de prise en charge de la pathologie. Dans ce contexte, le développement de biomarqueurs est un enjeu essentiel. Dans la **maladie de Parkinson** (MP), l'examen clinique permet uniquement le diagnostic des formes patentes, l'utilisation de biomarqueurs pourrait quant à elle favoriser l'identification des formes infra-cliniques et donc d'améliorer la prise en charge [136]. Parmi ces candidats biomarqueurs, citons l'*α-synucléine* présente dans les corps de Lewy. Cette protéine, détectée dans le plasma, la salive et le LCR [141] est significativement plus élevée dans le plasma des patients parkinsoniens [142]. De plus, les autoanticorps dirigés contre l'*α-synucléine* sont retrouvés dans 90 % des cas des formes familiales de Parkinson et dans 51 % des cas sporadiques [143]. Dans la **maladie d'Alzheimer** (MA), l'examen clinique demeure prépondérant dans le diagnostic, cependant un certain nombre de candidats biomarqueurs ont été proposés parmi lesquelles les protéines tau et β-amyloïde. Effectivement, la mesure de la concentration de ces marqueurs biologiques dans le LCR présente une forte valeur diagnostique [144]. Par ailleurs, la protéine APP (*amyloid precursor protein ou protéine précurseur de l'amyloïde*) présente au niveau du système nerveux central et dans la membrane des plaquettes voit son taux plaquettaire modifié dès les premiers stades de la maladie et pourrait donc constituer un biomarqueur intéressant [145]. Un nouvel axe de recherche concerne le **métabolisme des lipides** et plus particulièrement celui du cholestérol. Effectivement, les patients atteints de MA ou d'autres démences avancées présentent un taux réduit de 24-hydroxycholestérol dans le plasma et le LCR. La concentration dans le LCR de ce métabolite d'oxydation du cholestérol est d'ailleurs corrélée à la phosphorylation de la protéine Tau [146]. Le 24-déshydrocholestérol ou desmosterol, autre métabolite du cholestérol est diminué dans le plasma des patients atteints de MA [147].

La recherche de **biomarqueurs de nature lipidique** connait un grand essor depuis le début du XXIe siècle. Actuellement, le principal biomarqueur lipidique est le cholestérol dont le dosage est utilisé dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique.

L'utilisation de lipides en lien avec d'autres pathologies, maladies neurodégénératives, cancers est prometteuse [148]. Les progrès considérables dans le domaine des techniques analytiques de séparations, de détection et de traitement des données ont contribué à développer l'analyse exhaustive des lipides de l'organisme. Cette analyse globale sans *a priori* du lipidome constitue une approche novatrice de la recherche de biomarqueurs. La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution constitue l'une des techniques de choix.

**A notre connaissance, aucune étude lipidomique traitant de neuropathie induite par l'oxaliplatine n'a été publiée à ce jour.** En revanche, de telles études **ont été réalisées dans diverses pathologies neurologiques** avec des **résultats très prometteurs.** Ainsi, dans la **sclérose en plaque**, une diminution du rapport lyso-glycérophosphatidylcholine (lysoPC) sur glycérophosphatidylcholine (PC) total plasmatique a été mis en évidence chez des patients atteints [149]. De même, dans la **maladie d'Alzheimer**, une diminution du taux de glycérophospholipides et de sphingolipides cérébraux avec pour origine une dysfonction peroxysomale a été identifée [150]. Dans la **maladie de Parkinson**, c'est une augmentation du taux de gangliosides GM3 chez les patients atteints qui a été mis en évidence [151]. Enfin, chez la souris ayant subi un **traumatisme crânien**, il a été observé une diminution des taux de phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) corticaux et cérébelleux ainsi qu'une élévation des concentrations en PC, sphingomyéline et PE de l'hippocampe. Parallèlement à cette perturbation du profil lipidique des structures nerveuses, une diminution des taux d'acides gras polyinsaturés plasmatiques a également été mis en évidence [152].

Etudier les marqueurs cliniques et biologiques de neuropathie à l'oxaliplatine **chez des patients** traités est une activité de recherche qui appartient au domaine de la **recherche clinique**.

## 2. Définitions et bases réglementaires de la recherche clinique en France

La recherche clinique a pour objectif d'étudier chez l'être humain des stratégies thérapeutiques ou des caractéristiques pharmacologiques d'un médicament ou encore d'établir des données de santé publique.

La loi n° 88-1138 du 20 décembre 1988, dite Huriet-Sérusclat, a défini les bases législatives des activités de recherche clinique interventionnelle dans l'article L209 du Code de la Santé Publique [153]. Depuis, cet article de loi a été modifié et est désormais représenté par l'article L1121. Selon les risques engagés pour les patients participants, on distinguait, jusqu'en novembre

2016, trois catégories de recherche sur la personne. L'article de loi L1121-1 et l'article réglementaire R1121 du Code de la Santé Publique définissaient encore à cette date trois catégories de recherche sur l'être humain : les **recherches biomédicales** (RBM), les **recherches portant sur les soins courants** (RSC), toutes deux des recherches interventionnelles et les **recherches non interventionnelles** (RNI). Les RBM sont des recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. Les RSC sont des recherches visant à évaluer les soins courants, autres que celles portant sur les médicaments, lorsque tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle mais que des modalités particulières de surveillance sont prévues par un protocole. Les RNI sont des recherches pour lesquelles la stratégie médicale destinée à une personne qui se prête à la recherche n'est pas fixée à l'avance par un protocole et relève de la pratique courante.

Les deux études cliniques présentées dans cette thèse, LIPIDOXA et CANALOXA, ont été autorisées en mai 2014 et avril 2016 respectivement. Elles relèvent donc de la réglementation précédemment énoncée. En mars 2012 est promulguée une nouvelle loi ayant pour ambition d'harmoniser la réglementation française sur la recherche clinique avec le règlement européen, notamment suite à la directive 2001/20/CE qui imposait à la France un nouveau texte de loi en remplacement de la loi Huriet-Sérusclat : il s'agit de la loi Jardé *relative aux recherches impliquant la personne humaine (RIPH)* [154]. Ce texte de loi avait pour objectifs de rendre plus cohérente la catégorisation des différents types de recherche, de faciliter la mise en œuvre des recherches peu interventionnelles à faible risque et d'intégrer les recherches non interventionnelles dans le champ de la loi [155]. Cette loi entre en application en novembre 2016 avec le décret d'application (n°2016-1537) qui modifie le Code de la Santé Publique législatif et réglementaire [156]. La loi Jardé définit la recherche sur la personne comme la *recherche organisée et pratiquée sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales*. La précédente catégorisation en trois types de recherche est reprise mais les terminologies sont quelque peu différentes. Les anciennes *recherches biomédicales* s'appellent désormais *recherches interventionnelles*, il s'agit d'interventions non justifiées par la prise en charge médicale. Les anciennes *recherches en soins courants* s'appellent désormais *recherches interventionnelles à risques et contraintes minimes*. La liste de ces interventions dites à risques et contraintes minimes est fixée par un arrêté (*par exemple, l'arrêté du 3 mai 2017 fixant la liste des recherches mentionnées au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique*)[157]. Il ne peut s'agir en aucun cas d'un médicament (recherche interventionnelle stricte). Les anciennes recherches interventionnelles conservent cette dénomination, cependant le champ d'application est quelque peu différent. Elles ne concernent pas par exemple les RNI sur données déjà recueillies ou

échantillons biologiques existants, pour lesquelles il est considéré qu'elles n'impliquent pas la personne humaine.

L'article L1121-1 définit également les termes **promoteur** « personne physique ou morale qui prend l'initiative d'un essai clinique, qui en assure la gestion et qui vérifie que son financement est prévu » et **investigateur** «personne physique qui dirige et surveille la réalisation de la recherche sur un lieu». L'investigateur est nécessairement inscrit à l'Ordre des Médecins. C'est lui qui propose aux patients de participer à un essai et en recueille le consentement s'il y a lieu.

Tous les essais cliniques réalisés en France doivent être enregistrés auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament **(ANSM)**. L'autorité délivre un numéro d'enregistrement destiné à identifier chaque recherche réalisée en France. Par ailleurs, lorsqu'un essai clinique appartient à la recherche interventionnelle et possède au moins un site en Europe, ce dernier doit être enregistré dans une base de données européenne sous un **numéro EudraCT** (European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials).

La souscription d'une **assurance** par le promoteur est indispensable pour les recherches biomédicales, elle garantit la responsabilité civile. De même, lorsque la recherche en soins courants comporte un acte à risque, comme un prélèvement de sang par exemple, une assurance est requise.

L'autorisation d'un **Comité de Protection des Personnes** (CPP) garantit l'aspect éthique de la recherche. Le CPP est composé d'experts médicaux, de représentants de la société civile, et de représentants des patients tous indépendants des acteurs de la recherche. Les essais cliniques ne peuvent être mis en œuvre qu'après avis favorable. Les CPP sont répartis sur tout le territoire, il en existe plusieurs par régions. Avant novembre 2016, le promoteur choisissait le CPP, la loi Jardé met en place désormais la gestion centralisée des soumissions avec tirage au sort des CPP chargés d'examiner le projet. La mise en place d'une RNI nécessite désormais l'avis favorable d'un CPP, ce qui n'était pas le cas avant la loi Jardé.

## 3. Fonctionnement des dispositifs d'évaluation de la neuropathie

Les dispositifs d'évaluation de la neuropathie que nous avons utilisés dans ce travail sont décrits ci-après. Il s'agit du **Thermotest**, des **filaments de Von Frey** et du **Sudoscan**.

### 3.1. Description et fonctionnement du Thermotest

Le **Thermotest** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède) (Figure 11) est un dispositif de mesure de la sensibilité thermique validé dans le domaine de l'exploration de la neuropathie douloureuse de

cause métabolique (diabète) ou toxique (dérivés du platine) [26], [126], [127]. Le rendu de résultat est sous forme de seuils de détection du chaud et au froid, ainsi que sous forme de seuils de douleur au chaud et au froid. Cet appareil délivre sur la peau un stimulus thermique (chaud ou froid) à une valeur définie et stable (5 °C - 50 °C) au moyen d'un dispositif appelé thermode (Figure 12). La vitesse de montée et de descente en température est parfaitement paramétrable, elle s'exprime en °C/s.

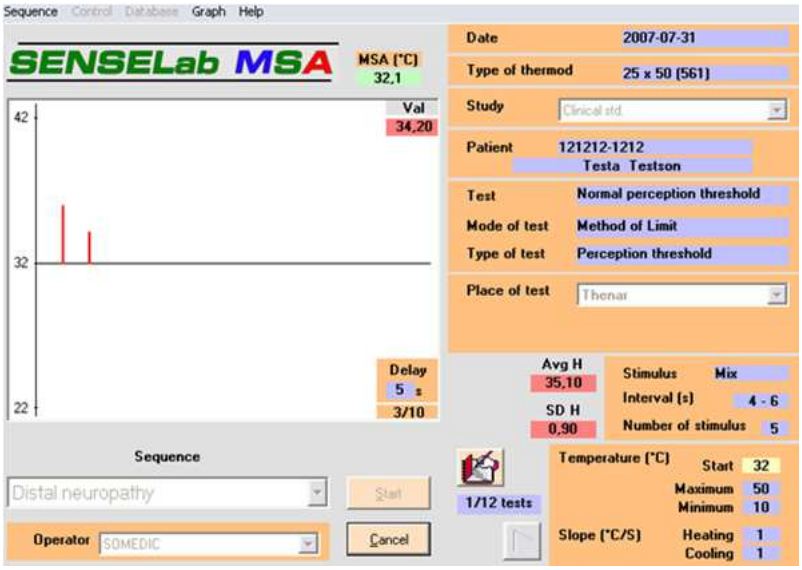



Figure 11 | Le Thermotest et l'interface graphique du logiciel pilotant l'appareil (SENSELab).

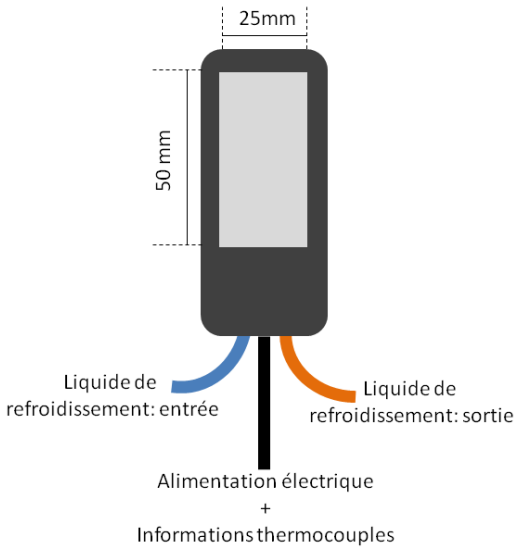



Figure 12| Schéma de la thermode.

La thermode est appliquée sur la peau du patient. Sa température basale (sans stimulus) recommandée est de 32 °C [126], [127], [158]. Elle correspond à une température pour laquelle aucune sensation de froid ni de chaud n'est ressentie : il s'agit d'une température neutre. Il existe deux manières pour déterminer les seuils de sensibilité (Figure 13). La première méthode, appelée *méthode des limites* est une variation continue de la température à partir de la valeur basale jusqu'à atteindre le seuil de perception du stimulus en question. La seconde méthode, appelée *méthode des niveaux*, est une variation discrète de la température, c'est-à-dire par pallier. Des valeurs fixes de température sont appliquées et le patient indique s'il ressent ou non le stimulus d'intérêt.

Dans la méthode des limites, la détermination des seuils de sensibilité dépend de la vitesse de variation de la température. Aussi, ceux-ci ont tendance à être plus élevés que pour l'autre méthode à cause du délai de réaction du sujet. A l'inverse, la méthode des niveaux est indépendante du temps de réaction. Toutefois, la méthode des limites est davantage préférée car elle est considérée comme plus rapide et plus fiable [127].

Il est recommandé de reproduire cinq fois de suite la mesure et de ne conserver que les trois derniers réplicats. En effet, la première valeur est souvent erronée en raison de l'effet de surprise. En revanche, les suivantes sont plus stables et plus représentatives de la réalité (Figure 14). On considère donc que les deux premiers stimuli permettent au patient de se familiariser avec la machine. Moyennes et écarts-types sont donc effectués sur les trois dernières valeurs.

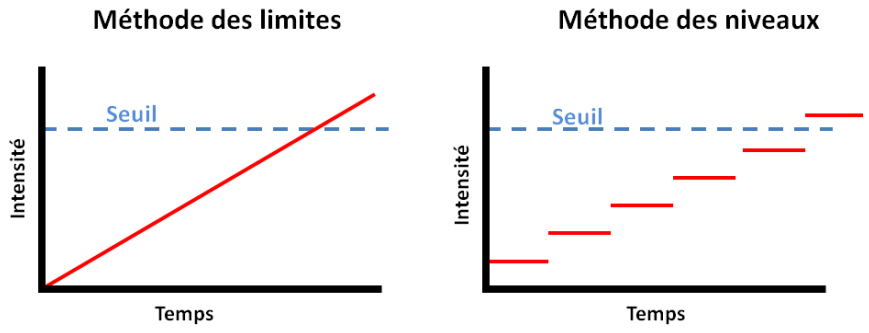



Figure 13| Les deux méthodes de détermination des seuils de sensibilité avec le Thermotest.

*Méthode des limites : variation continue de la température à partir de la valeur basale jusqu'à atteindre le seuil de perception du stimulus en question.*

*Méthode des niveaux : variation discrète de la température. Des valeurs fixes de température sont appliquées et le patient indique s'il ressent ou non le stimulus d'intérêt.*

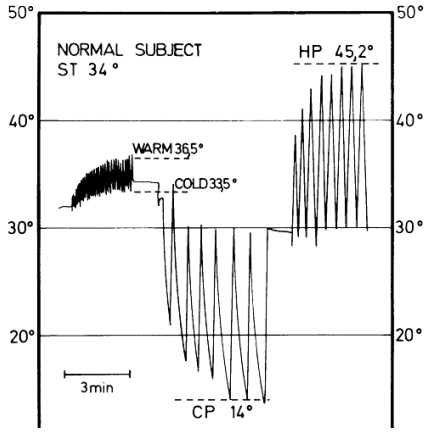



Figure 14| Enregistrement typique des seuils de sensibilité au froid puis au chaud au niveau du pouce droit chez un volontaire sain. *D'après Fruhstorfer, et al., 1976*

*Les premières réponses au test ne sont pas représentatives du réel seuil de sensibilité du sujet.*

*ST= Skin Temperature; CP = Cold Pain threshold; HP = Heat Pain threshold.*

La sensibilité varie selon les différentes parties du corps et l'état pathologique. La thermode est conçue pour être appliquée au niveau de l'éminence thénar, saillie musculaire arrondie à la partie antéro-supérieure de la main à la base du pouce.

Certains auteurs ont publié des valeurs de référence physiologiques des seuils de sensibilité thermique [158]–[160]. Les facteurs influant les résultats sont les conditions environnementales extérieures, les instructions données par le manipulateur, la taille de la thermode, la partie du corps, la motivation du patient, son sexe, son âge et son origine ethnique [127]. En revanche, la température de la peau du patient a peu d'influence [126].

## 3.2.Description et fonctionnement des filaments de Von Frey

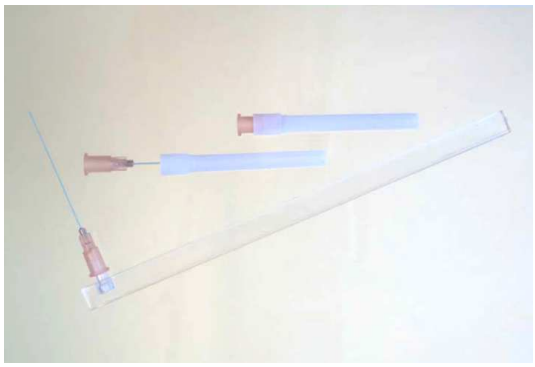
Le filament de Von Frey est un dispositif de mesure de la sensibilité tactile statique validé dans le domaine de l'exploration de la neuropathie douloureuse de cause métabolique (diabète) ou

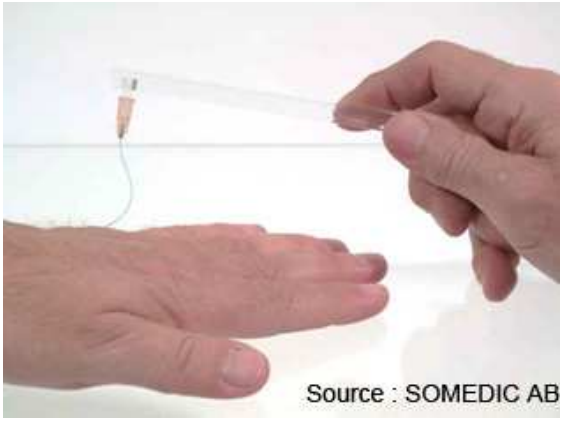
toxique (dérivés du platine) [117], [128], [161]. Ils ont été conçus par Maximilien von Frey et sont utilisés depuis plus d'un siècle.

Ils permettent de mesurer des seuils de détection mécanique et de caractériser le type de douleur neuropathique (allodynie, hyperalgésie). Les filaments de Von Frey sont des filaments de nylon qui ont la propriété de délivrer une pression reproductible lorsqu'ils sont appliqués contre la peau à angle droit et ce, quelle que soit la force appliquée (Figure 15). Cette pression, appelée pression nominale est atteinte lorsque le filament ploie. L'intensité de la pression délivrée dépend du diamètre du filament : plus le diamètre est élevé, plus la rigidité du filament est importante, par conséquent, plus la pression appliquée est importante (la surface de contact avec la peau est standardisée et identique : l'extrémité des filaments est la même). Ces filaments testent la sensibilité au tact (fibres Aβ) et à la piqûre (fibres Aδ).

L'examen par les filaments de Von Frey n'est pas utilisé en pratique courante. En revanche, sa variante, le test au **monofilament de Semmes-Weinstein** est couramment utilisé dans le dépistage des neuropathies diabétiques [162]. Il s'agit d'un filament unique dont la force est standardisée à 10 g. Ce test simple et peu coûteux permettant de dépister les troubles de la sensibilité superficielle du pied du diabétique et les risques d'ulcérations. Il est recommandé une fois par an chez les diabétiques selon la HAS. En pratique, le professionnel applique le monofilament sur une autre partie du corps que les pieds (*e.g.* les mains) afin de le familiariser avec la sensation puis il l'applique sur la plante du pied au niveau de trois zones distinctes. Le patient ne doit pas voir le monofilament et les réponses sont binaires : le patient ressent ou ne ressent pas chaque stimulus.

Il existe également des Von Frey électroniques (EVF). Il s'agit d'un dispositif unique comprenant une pointe capable d'enregistrer en temps réel la valeur de la pression appliquée contre la peau (Figure 16). Cette pression est variable et augmente jusqu'à la perception du stimulus par le patient, perception qui implique immédiatement le retrait du dispositif. La valeur maximale de pression est enregistrée juste avant le retrait et correspond au seuil de sensibilité mécanique. Les avantages de l'EVF sont la facilité d'utilisation (acquisition automatique des mesures), la rapidité de mesure (un dispositif au lieu de 7 à 20), une meilleure reproductibilité des mesures et une meilleure précision (résolution de 0,1 gramme).





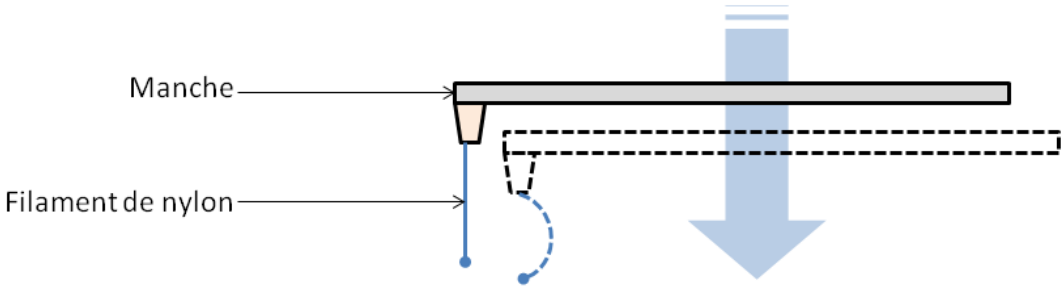




Figure 15 | Filaments classiques de Von Frey

*Schéma : Principe d'utilisation des filaments de Von Frey, le manipulateur applique une pression contre la peau jusqu'à ce que le filament de nylon ploie.*

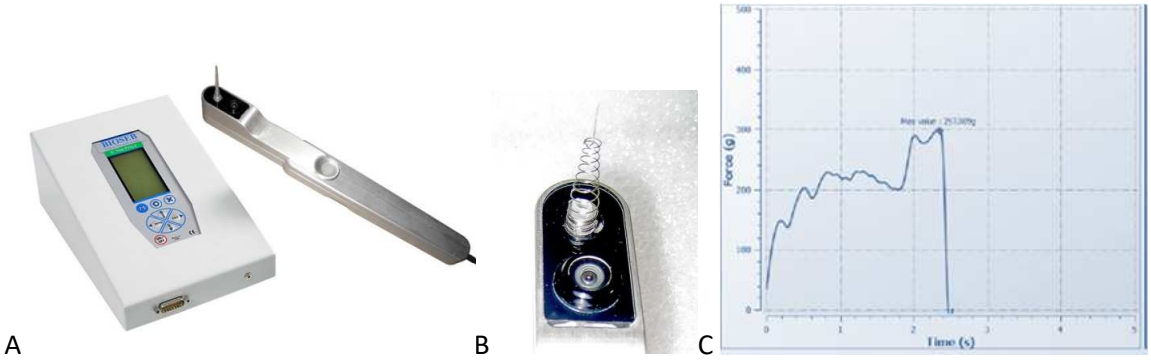



Figure 16 | Filaments électroniques de Von Frey

A. *Le dispositif*
B. *Détail du filament électronique*
C. *Acquisition en temps réel de la force appliquée par le dispositif.*

*Source : BIOSEB*

## 3.3. Description et fonctionnement du Sudoscan

### *3.3.1. Bases de développement du sudoscan : les autres tests évaluant la fonction sudorale*

La dysfonction sudomotrice est l'une des premières anomalies neurophysiologiques détectables dans la neuropathie distale des petites fibres [163]. Aussi, étudier la fonction sudorale renseigne sur **l'intégrité fonctionnelle des petites fibres nerveuses intraépidermiques** qui innervent les glandes sudoripares. Or ces petites fibres nerveuses intraépidermiques sont lésées dès les premiers stades de la neuropathie. C'est pourquoi, de nombreux tests basés sur l'évaluation de la fonction sudorale existent pour détecter des lésions neurologiques.

Parmi ces tests de mesure neurophysiologique traditionnel de la fonction sudorale, on distingue le **test TST** (thermoregulatory sweat testing, transpiration thermorégulatrice), le **test QSART** (quantitative sudomotor axon reflex testing, test quantitatif de réflexe axonaux sudomoteur), le **test d'impression sur silicone** (silicone impression), le **test QDIRT** (quantitative direct and indirect axon reflex testing, test quantitatif de réflexes axonaux directs et indirects), le test **Neuropad®**, le **Sudoscan®/Ezscan®.**

Le test TST évalue l'intégrité des voies sudorales sympathiques. En pratique, le patient est placé dans une pièce où température et humidité sont contrôlées (Figure 17). Ce dernier est recouvert d'indicateurs colorés (rouge d'alizarine et amidon de maïs iodé) qui changent de couleur en présence de sueur. La température de la pièce est ajustée à 45-50 °C avec une humidité relative de 35-40 %, la transpiration produit un changement du pH local, ce qui entraîne le virage de couleur des indicateurs (du jaune au rouge foncé pour le rouge d'alizarine et du brun au violet avec de l'iode) et marque les emplacements de la production de sueur. Des photographies numériques sont prises et une carte de densité de sudation est générée. La lecture des clichés obtenus permettent de déterminer le type d'atteinte neurologique (Figure 18). Ce test dure environ une heure. Le TST ne peut être réalisé que dans des centres hautement spécialisés et il nécessite un équipement spécial. A notre connaissance, l'utilisation du TST dans la NPIO n'a pas fait l'objet de travaux publiés.

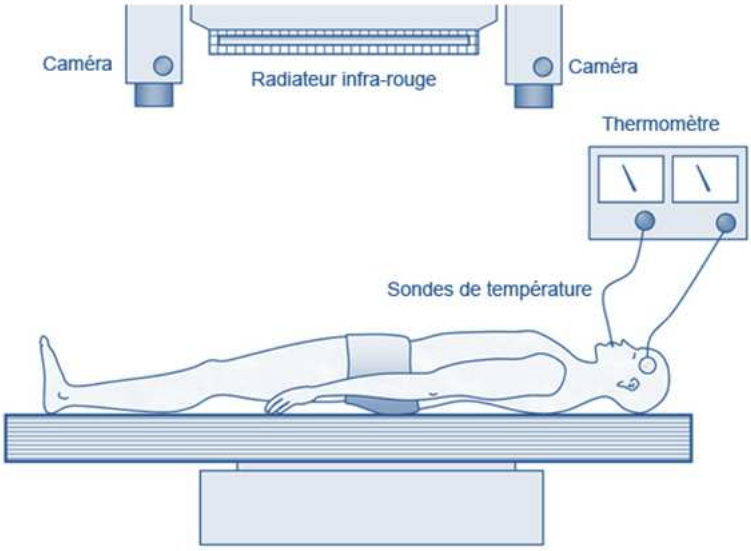



Figure 17| Test de sudation thermorégulatrice (TST)

*Le patient est placé en décubitus dorsal. Le test est démarré en augmentant la température ambiante grâce aux radiateurs infrarouges montés au plafond. À la fin du test, les images sont prises et utilisées pour générer une carte topographique du modèle de sueur.*

*Adapté de Ben MW Illigens et al.*

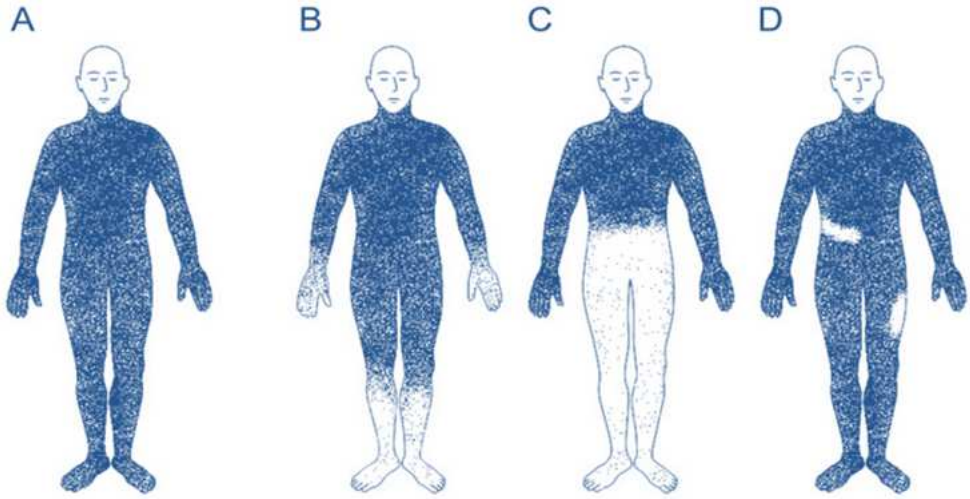



Figure 18| Résultats du test TST

*(A) Schéma de sudation normal : réponse sudorale présente sur l'ensemble du corps*

*(B) Schéma de sudation pathologique : patient atteint de neuropathie diabétique*

*(C et D) Schéma de sudation pathologique : les lésions des nerfs peuvent montrer des défauts focaux.*

*D'après Ben MW Illigens et al.*

Le Test QSART (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test) évalue la fonction sudorale cholinergique sympathique postganglionnaire. En pratique, les glandes sudoripares sont stimulées par iontophorèse d'un agent cholinergique et la production de sueur est mesurée grâce à un hygromètre situé au niveau de la peau [164]. Chez les individus à fonction sudorale normale, la production de sueur commence avec un retard d'une à deux minutes. La production de sueur augmente jusqu'à cinq minutes après la stimulation puis diminue par la suite. Une modification de la production de sueur est observée dans les neuropathies à petites fibres telles que la neuropathie diabétique [165]. L'intérêt du test QSART est qu'il permet de mesurer la réponse post-ganglionnaire. Le test QSART est relativement long et nécessite également un équipement spécial. Une étude récente a mis en évidence une altération de la fonction sudorale chez des patients préalablement traités par chimiothérapies neurotoxiques lesquels étaient le paclitaxel, la vinblastine, la vincristine et l'oxaliplatine [166].

Le test QDIRT est une technique plus récente qui évalue également la fonction sudorale cholinergique postganglionnaire sympathique. En pratique, les glandes sudoripares sont stimulées par l'iontophorèse de l'acétylcholine pendant cinq minutes. Par la suite, un colorant (alizarine) est appliqué sur la zone stimulée et des photographies sont prises toutes les 15 secondes pendant sept minutes. Les résultats peuvent être quantifiés par le nombre de points colorés, la taille de ces points, l'emplacement et la latence de la réponse [167]. L'avantage du QDIRT est qu'il est plus simple, moins coûteux que les tests précédemment évoqués et qu'il peut être utilisé par des cliniciens sans laboratoire spécialisé. A notre connaissance, cette technique n'a pas été encore utilisée dans l'exploration de la NPIO.

La méthode d'impression sur silicone évalue la fonction sudorale cholinergique sympathique postganglionnaire. En pratique, les glandes sudoripares sont stimulées par iontophorèse d'acétylcholine, de pilocarpine ou de méthacholine, puis, une fine couche de silicone est appliquée sur la peau. Les gouttelettes de sueur formées par les glandes sudoripares laissent des empreintes permanentes dans le silicone. Ces empreintes sont ensuite révélées en appliquant de la poudre de toner avant de quantifier la densité des gouttelettes par ordinateur. Des distributions anormales sont observées en cas de lésions nerveuses postganglionnaires. La méthode d'impression sur silicone est facile à mettre en œuvre mais est sujette aux artéfacts dues aux poils et à la saleté. De même, à notre connaissance, cette technique n'a pas fait l'objet d'étude dans l'exploration de la NPIO.

Le test Neuropad® est un test qualitatif de dépistage de la neuropathie périphérique diabétique. Il s'agit d'un dispositif dermique imprégné d'un indicateur coloré qui vire du bleu au rose en présence de sueur. En pratique, le test est appliqué sur la plante du pied et la lecture de la

couleur du dispositif est faite à 10 minutes. Un résultat dont la couleur reste bleue ou ne vire que très légèrement (bleu-rosée) est en faveur de lésions neuropathiques. Le Neuropad® est sensible mais peu spécifique. La possibilité d'auto-utilisation par les patients en ferait un bon outil d'éducation et de dépistage précoce des complications neurologiques du diabète [168]. Ce test est essentiellement utilisé chez le patient diabétique et, en raison de son caractère qualitatif, ne présente pas d'intérêt dans l'exploration de la NPIO.

Le Sudoscan (Impeto Medical, Paris, France) est un dispositif médical employé pour détecter et suivre les neuropathies autonomes périphériques des patients diabétiques de façon objective et non invasive. Cet appareil mesure la conductance électrochimique de la peau ou ESC (Electrochemical Skin Conductance), laquelle est diminuée en cas d'atteinte neurologique. Le résultat est quantitatif et exprimé en µS. L'EZscan (Impeto Medical, Paris, France) est un dispositif très similaire au Sudoscan, il a été développé pour dépister les complications nerveuses périphériques des patients qu'ils soient ou non connus diabétiques. Son principe de fonctionnement est identique au Sudoscan (mesure de la conductance électrochimique de la peau en µS). Le Sudoscan a vocation à dépister le risque de complications chez les patients diabétiques alors que l'EZscan a davantage vocation à détecter le risque de diabète ou d'insulinorésistance [169].

### *3.3.2. Principe de fonctionnement du Sudoscan*

Le fonctionnement du Sudoscan est basé la mesure de la conductance des ions chlorures de la sueur grâce à deux paires d'électrodes placées au niveau de la paume de la main et de la plante des pieds [125] (Figure 19 et Figure 20). Une faible tension d'amplitude variable (environ 4 V) est appliquée au moyen de deux paires d'électrodes sur la paume des mains et la plante des pieds. Ces zones ont été choisies car elles présentent une forte densité en glandes sudorales [170]. La mesure dure trois minutes. Les ions chlorures migrent vers l'électrode qui joue le rôle d'anode, ce qui crée un courant. Le signal mesuré est la conductance électrochimique de la peau (*Electrochemical Skin Conductance, ESC*). La conductance électrique est une représentation de la capacité d'un corps à laisser passer le courant. C'est l'inverse de la résistance : $G = \frac{1}{R}$ ou $G = \frac{I}{U}$. Les conductances sont exprimées en siemens (S). A faible tension, la couche cornée agit comme un condensateur et la migration des ions se fait uniquement par les canaux sudorifères : les ions chlorures qui arrivent à l'anode ne peuvent passer que par les canaux sudorifères (Figure 21). Le signal mesuré est donc en fait la conductance électrochimique de la sueur, conductance qui est liée aux ions chlorures présents dans la sueur. Ainsi, les conductances mesurées correspondent bien au fonctionnement des glandes sudoripares, reflet de l'état fonctionnel des fibres nerveuses intra épidermiques [171], [172]. Sur le plan électrochimique, une réaction se produit entre les ions

chlorures et l'anode d'une part, et entre les ions $H^+$ et la cathode d'autre part. Les valeurs d'ESC, dépendent du pH et de la concentration d'ions chlorures provenant des glandes. Pour un sujet ayant une fonction sudorale normale, l'ESC mesurée est élevée. Dans certaines pathologies affectant les petites fibres nerveuses, des lésions des petites fibres nerveuses sympathiques provoquent une dégradation de la fonction sudorale. Lorsqu'un sujet ayant une fonction sudorale anormale est testé, la quantité d'ions chlorures sécrétés vers les électrodes en inox est moindre dû à une moindre innervation des glandes sudoripares. La conductance mesurée est donc plus faible. Les dysfonctionnements de la fonction sudorale constituent donc une anomalie neurophysiologique décelable dans les neuropathies à petites fibres. En effet, la dégénérescence de ces petites fibres diminue l'innervation des glandes sudoripares et altère donc leur fonctionnement [124], [173].

Figure 19| Dispositif médical Sudoscan (IMPETO, Paris, France)

*A gauche : le dispositif sur son chariot, à droite, les deux paires électrodes (pieds et mains)*

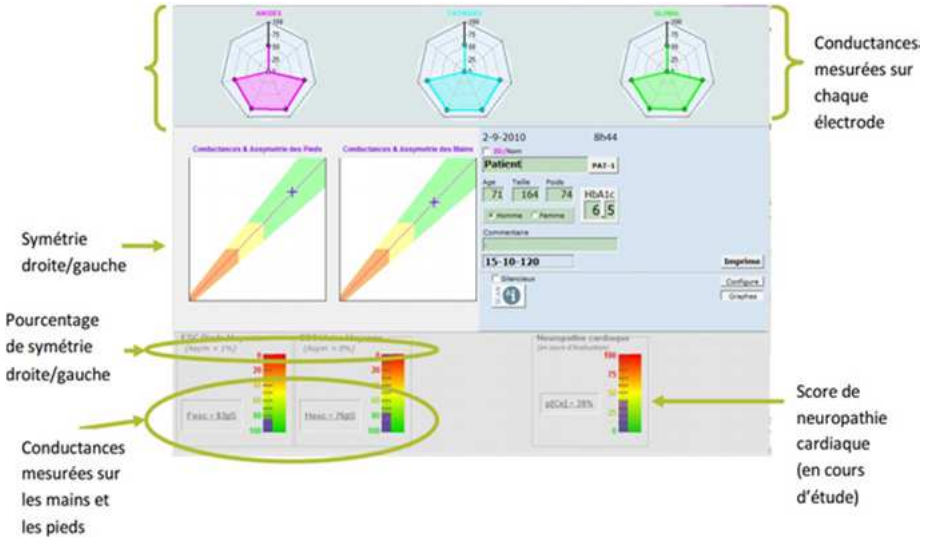



Figure 20| L'interface graphique du Sudoscan

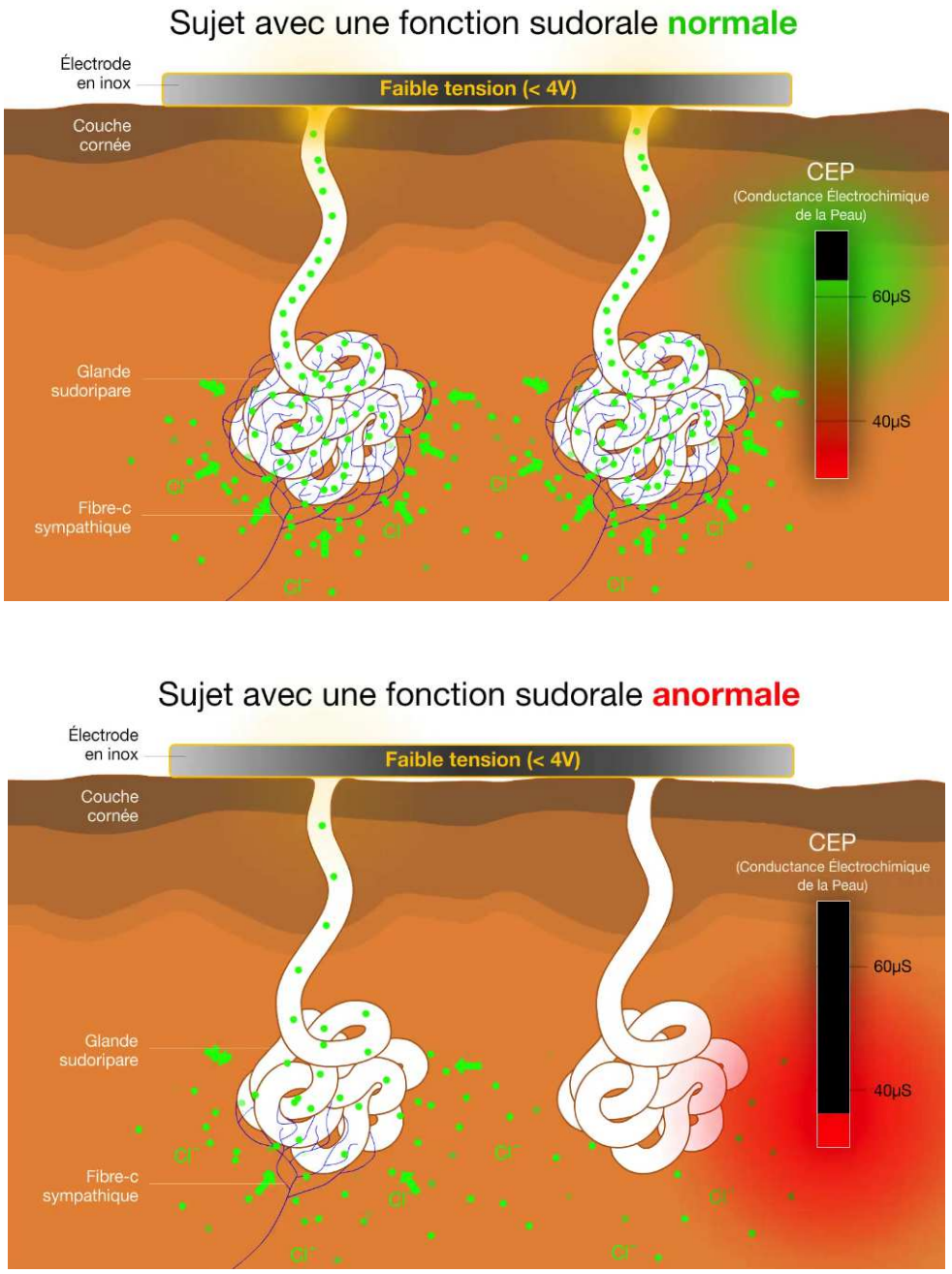



Figure 21| Principe de fonctionnement du Sudoscan (IMPETO, Paris, France)

*En haut : innervation des glandes sudoripares chez un individu sain.*

*En bas : défaut d'innervation des glandes sudoripares chez un individu présentant une neuropathie diabétique.*

*Source : impeto-medical.com*

### *3.3.3. Intérêt d'utiliser le Sudoscan dans l'exploration de la NPIO*

L'évaluation quantitative de la réponse sudorale a été proposée comme indicateur de la sévérité et de la distribution des défaillances du système autonome et aussi comme indicateur de la régénération des petites fibres [163], [173], [174]. A ce jour, le Sudoscan n'est validé que dans

l'évaluation des neuropathies diabétiques [125], [171], [172], [175]. La NPIO étant une neuropathie des petites fibres, une équipe française a étudié l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans l'exploration de la neuropathie à l'oxaliplatine [1]. Il est donc judicieux de compléter ces premiers résultats de recherche.

A l'inverse du Thermotest, l'interprétation des résultats obtenus à l'aide du Sudoscan, est simple et univoque. Effectivement, alors qu'une valeur d'ESC supérieure à 60 µS est physiologique, une valeur comprise entre 40 et 60 µS indique une atteinte végétative modérée et une valeur inférieure à 40 µS signe une atteinte sévère [169]. Les mesures de conductances sont reproductibles et peu dépendantes de l'opérateur puisque les coefficients de variation sont de l'ordre de 7 % [124]. La facilité d'usage de l'appareil, la rapidité d'acquisition des données (deux minutes) et l'interprétation aisée des résultats sont autant d'arguments en faveur d'une utilisation en oncologie.

# Chapitre III : L'analyse lipidomique

## 1. Des lipides à la lipidomique

### 1.1. Présentation et classification des lipides

Les lipides regroupent des composés organiques de structures très diverses définis sur la base d'une propriété physico-chimique commune, leur caractère hydrophobe important qui leur confère une grande solubilité dans certains solvants organiques. Les lipides sont strictement hydrophobes lorsqu'ils ne contiennent que des groupements non polaires et amphiphiles (ou amphipathiques) lorsqu'ils contiennent à la fois des groupements polaires et non polaires.

Les lipides sont répartis en différentes catégories, classes et sous-classes selon leurs structures de base. La classification présentée dans ce manuscrit reprend celle de LIPID MAPS (Lipid Metabolites and Pathways Strategy) qui établit huit catégories (Annexe 1).

#### *1.1.1. Les acides gras*

Les acides gras sont des lipides composés d'une chaîne aliphatique greffée d'une fonction carboxylique (-COOH). Cette chaîne carbonée comporte entre 4 et 36 atomes de carbone mais la plupart des acides gras naturels possèdent un nombre d'atomes de carbone compris entre 14 et 24 [176]. Ce nombre est presque toujours pair car les acides gras sont synthétisés par condensation d'unités à deux atomes de carbone. La biosynthèse des acides gras est essentiellement catalysée par l'acide gras synthase à partir de plusieurs unités de malonyl-CoA et d'une unité d'acétyl-CoA qui joue le rôle d'amorce.

On distingue les acides gras saturés, pour lesquelles toutes les liaisons C-C sont simples, des acides gras insaturés pour lesquelles une ou plusieurs liaisons C=C sont doubles. Les acides gras insaturés naturels adoptent en général une configuration cis (carbones du même côté), ce qui tend à courber à 30° la chaîne hydrocarbonée. Ceci tend à fluidifier les bicouches lipidiques, le point de fusion est également abaissé. A noter qu'il existe des acides gras *trans* naturels, mais ces derniers résultent le plus souvent d'un processus d'hydrogénation artificiel.

La nomenclature simplifiée répond à la formule : $Cn{:}x\Delta^{m,n,o}$ où n correspond au nombre d'atomes de carbone, x correspond au nombre de doubles liaisons et m, n, o… correspondent aux positions des doubles liaisons à partir de l'atome de carbone ayant le niveau d'oxydation le plus élevé (i.e. groupe carboxyle). On attribue également des lettres de l'alphabet grec aux atomes de carbone adjacents au premier atome de carbone C1 : $\alpha$ pour le C2, $\beta$ pour le C3… Le dernier

atome de carbone (groupement méthyle) reçoit toujours la lettre ω. La nomenclature des acides gras insaturée est caractérisée par la position de la première double liaison à partir de l'atome de carbone ω. Par exemple, l'acide linoléique fait partie de la série des ω-6 et a pour formule : C18:2$\Delta^{9,12,15}$. L'acide α-linolénique fait partie de la série des ω-3 et a pour formule : C18:3$\Delta^{9,12,15}$.

Les acides palmitiques C16:0 et stéarique C18:0 sont les acides gras saturés les plus répandus. L'acide oléique (série ω-9) C18:1$\Delta^{9}$ est l'acide gras insaturé le plus répandu. Les acides gras dits essentiels ne peuvent être synthétisés en quantité suffisante par l'organisme, ceux-ci doivent donc être apportés partiellement ou entièrement par l'alimentation. Il s'agit de l'acide α-linolénique (ω-3), de l'acide linoléique (ω-6) et de l'acide arachidonique C20:4$\Delta^{5,8,11,14}$ (ω-6). Les mammifères peuvent transformer l'acide α-linolénique ou l'acide linoléique, plus court, en acide arachidonique par élongation ou bien convertir l'acide α-linolénique en acide docosahexaénoïque (DHA), C22:6$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$, un autre acide gras ω-3.

Dans l'organisme, les acides gras sont estérifiés par réaction avec des alcools (glycérol, cholestérol…) et forment les graisses et les lipides membranaires. On trouve également des acides gras libres, c'est-à-dire non estérifiés, dans le sang. Ces acides gras libres (AGL) sont amphiphiles et sont le plus souvent liés à des protéines telles que l'albumine. Dans le plasma, les quatre principaux acides gras libres sont l'acide oléique, palmitique, linoléique et stéarique, ils représentent 85 % des AGNE. Ils proviennent des triglycérides du tissu adipeux. Ceux-ci sont hydrolysés en cas de jeûne sous l'action de la lipoprotéine lipase. Leur concentration varie en fonction de l'âge, de la prise de repas et de l'exercice physique et ce, dans des proportions importantes.

### *1.1.2. Les glycérides*

Les glycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol. On parle de monoacylglycérol lorsqu'un seul acide gras est estérifié au glycérol, de diacylglycerol et triacylglycerol (triglycéride) lorsque deux et trois acides gras respectivement sont estérifiés au glycérol. Les trois acides gras d'un triglycéride peuvent différer par la longueur de leurs chaînes et le nombre de doubles liaisons. Il en résulte un grand nombre de combinaisons possibles, aussi, les graisses extraites de matériel biologique constituent un mélange de molécules voisines qui se différencient par la nature de leurs acides gras. La longueur des chaînes d'acide gras et le nombre de doubles liaisons influencent la température de fusion des glycérides. Elle est d'autant plus basse que la longueur de la chaîne d'acide gras est petite et le nombre de doubles liaisons élevé.

Les glycérides servent essentiellement à stocker de l'énergie et ils constituent l'essentiel de la graisse animale. L'hydrolyse des liaisons esters pour libérer le glycérol et les acides gras constitue

la première étape de la lipolyse, elle-même poursuivie par la β-oxydation des acides gras. Les glycérides sont stockés dans le cytoplasme des cellules sous forme de gouttelettes et sont transportés dans le sang au cœur des lipoprotéines.

### *1.1.3. Phosphoglycérides*

Les phosphoglycérides sont des lipides composés d'un résidu de glycérol-3-phosphate estérifié sur les carbones C1 et C2 par deux acides gras. Ceux-ci comportent en général 16 à 20 atomes de carbones et l'acide gras en position C2 est insaturé (Figure 22). Cet ensemble forme un acide phosphatidique. Le résidu phosphate est lui-même engagé dans une liaison phosphodiester avec le résidu alcool d'une molécule polaire tels que la sérine, l'éthanolamine, la choline, l'inositol, le glycérol (Figure 23). Les phosphoglycérides sont des molécules amphiphiles en raison de la présence d'une tête polaire hydrophile et de leur queue aliphatiques hydrophobe.

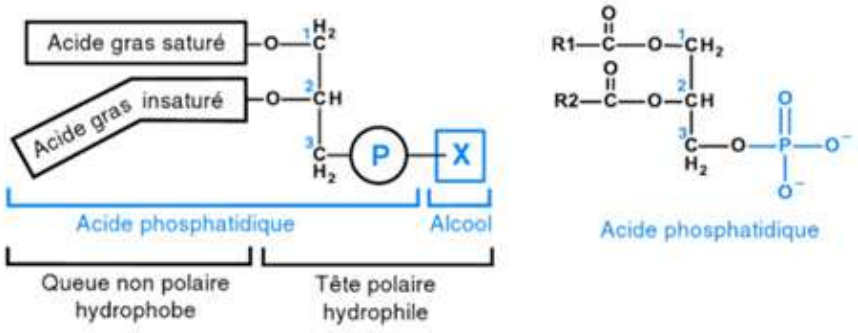



Figure 22 | Formule générale des phospholipides

Les phosphoglycérides sont avec les sphingolipides, les principaux phospholipides des membranes biologiques. Ils jouent également un rôle important dans le métabolisme et la signalisation cellulaire. Le tissu nerveux est très riche en phospholipides. Des changements dans leur composition ou des altérations de leur métabolisme sont responsables de troubles neurologiques [177].

| Substituant X | | Nom du phospholipide |
|---|---|---|
| Hydrogène | —H | Acide phosphatidique (PA) |
| Choline | $-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ | Phosphatidylcholine (PC) |
| Ethanolamine | $-CH_2-CH_2-NH_3^+$ | Phosphatidyléthanolamine (PE) |
| Sérine | $-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ | Phosphatidylsérine (PS) |
| Glycérol | $-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ | Phosphatidylglycérol (PG) |
| Inositol | $C_6H_6(OH)_6$ | Phosphatidylinositol (PI) |
| Phosphatidylglycerol | $-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(O-C(=O)-R_2)-CH_2-O-C(=O)-R_1$ | Cardiolipine (CL) |

Figure 23|Nomenclature des phospholipides

### *1.1.4. Sphingolipides*

Les sphingolipides forment un ensemble complexe de lipides tous constitués à partir d'une molécule de sphingosine. La sphingosine est un alcool aliphatique aminé à 18 atomes de carbones, porteur d'une double liaison trans en C4-C5, un groupe aminé en C2 et deux hydroxyles en C1 et C3 (Figure 24). Elle est produite de novo à partir d'une sérine et d'un acylCoA à longue chaîne (le palmitoylCoA). La sphingosine est acylée : le carboxyle d'un acide gras saturé s'unit par une liaison amide au $NH_2$ du carbone C2 de la sphingosine, il se forme ainsi un céramide (Cer) (Figure 25). Les sphingolipides sont construits sur cette unité de base. Les différentes catégories de sphingolipides se distinguent par la nature du substituant lié à l'alcool primaire du carbone C1 : sphingophospholipides et les sphingoglycolipides (cérébrosides, globosides, sulfatides et gangliosides). Les sphingoglycolipides peuvent être classés parmi les glycolipides.

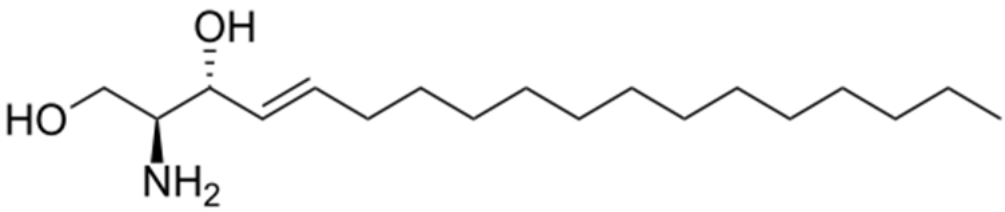



Figure 24|Structure de la sphingosine

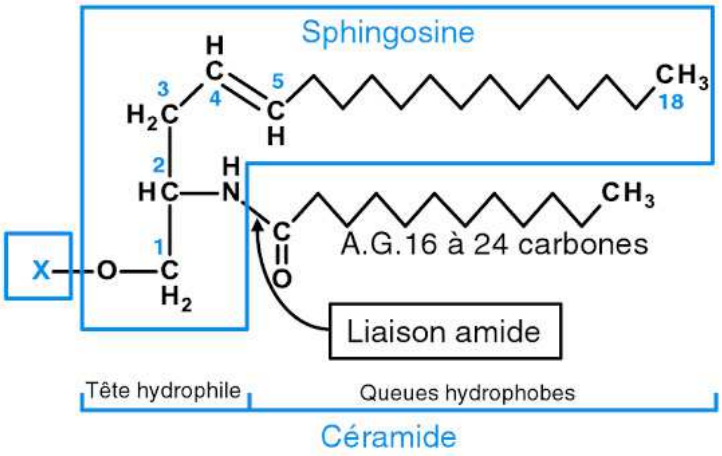



Figure 25|Structure d'une céramide

Les substituants des **sphingophospholipides** sont des constituants organiques phosphorylés tels que la phosphorylcholine, la phosphoryléthanolamine, le phosphorylglycérol ou le phosphorylinositol. Le sphingophospholipide le plus répandu est la sphingomyéline, composé d'un céramide et d'une phosphorylcholine. Les sphingomyélines sont présentes dans les membranes plasmiques et dans les gaines de myéline en grande quantité.

Les substituants des **cérébrosides** sont des monosaccharides liés au carbone C1 du céramide par une liaison β-osidique. Lorsqu'il s'agit d'un galactose (Gal), le sphingolipide est appelé galactosylcérébroside (Cer-Gal). Les Cer-Gal sont situés surtout dans les membranes des tissus nerveux. Lorsque l'ose est un glucose (Glc), le sphingolipide est appelé glucosylcérébroside (Cer-Glc). Ce sont des glycolipides neutres, simples et abondants sur la surface externe des membranes plasmiques.

Les substituants des **globosides** sont des oligosaccharides formés généralement à partir d'unités N-acétylgalactosamine, D-glucose ou D-galactose. Ce sont des composés électriquement neutres à pH = 7 qui ne contiennent pas de fonction amine libre. Les acides gras sont à très longue chaîne, tels que l'acide lignocérique (C24, saturé), l'acide nervonique (C24, insaturé en oméga-9) et l'acide cérébronique (correspondant à l'acide lignocérique α-hydroxylé).

Les substituants des sulfatides sont des monosaccharides estérifiés par l'acide sulfurique. On peut par exemple citer le galactocérébroside sulfaté, très présent dans les structures nerveuses du système nerveux central.

Les **gangliosides** constituent le groupe le plus complexe. Ils sont constitués d'un céramide liée par une liaison éther à un ou plusieurs oses chargés dont l'un au moins est estérifié par l'acide sialique (ou N-acétylneuraminique, NeuNac) (Figure 26). Le pKa de l'acide sialique étant de 2,6, les gangliosides portent une ou plusieurs charges négatives aux pH physiologiques. Par conséquent, les gangliosides sont fortement polaires en raison des fonctions carboxylates des acides sialiques et des nombreuses fonctions hydroxyles de la chaîne oligosaccharidique. Ils se trouvent en quantité importante dans les radeaux lipidiques des membranes plasmiques et sont impliqués dans la transduction du signal cellulaire. Les gangliosides respectent une nomenclature à trois caractères : deux lettres et un chiffre (ex : GM1, GD3).

- La première lettre est « G », elle signifie ganglioside
- La seconde lettre : M,D,T,Q pour mono-, di-, tri-, quatuor, définit le nombre de résidus acides sialiques (de un à quatre respectivement).
- Le dernier chiffre définit de façon indirecte (5 – x) le nombre d'oses présents sur la molécule (quatre oses pour le GM1, deux oses pour le GD3).

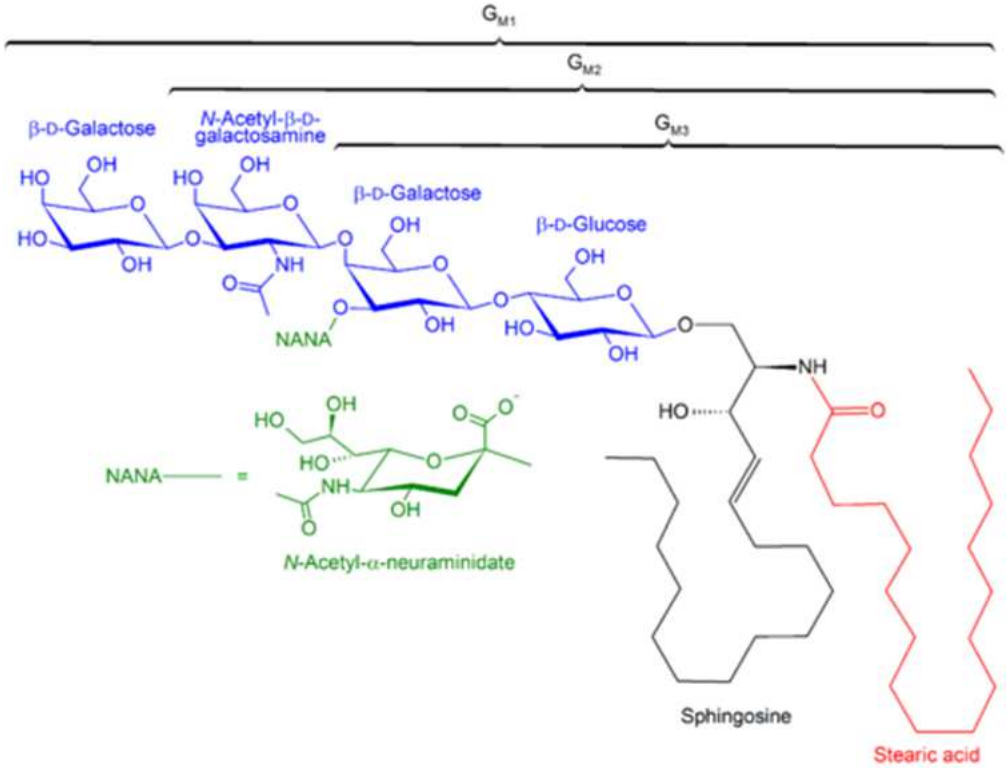



Figure 26|Structure d'un ganglioside

### 1.1.5. Glycolipides

Les glycolipides sont formés d'une partie lipidique et de résidus mono- ou oligosaccharidiques. Les glycolipides sont des molécules amphiphiles. Selon la structure de la partie lipidique, les glycolipides peuvent être classés en cinq sous-classes. On distingue les **glycéroglycolipides** (oligosaccharide lié à un diacylglycérol), les **sphingoglycolipides** (oligosaccharide lié à un céramide), les **lipopolysaccharides** (oligosaccharide phosphorylé lié à des acides gras), les **glycolipides phénoliques** (alcool phénolique lié à des acides gras) et les **glycopeptidolipides** (peptide glycosylé lié à un acide gras). Les glycolipides les plus représentés chez l'homme sont les sphingoglycolipides. Les unités glucidiques sont liées au groupement C1-OH de la N-acylsphingosine par des liaisons glycosidiques et sont formés par additions successives d'unités monosaccharidiques activées. Les groupes polaires glucidiques des glycolipides font partie le plus souvent du glycocalyx recouvrant la face externe de la plupart des membranes plasmiques des cellules. Les glycolipides jouent un rôle dans la signalisation et la communication cellulaire.

### 1.1.6. Polycétides

Les polycétides forment une famille de molécules naturelles très diverses. Il s'agit de métabolites secondaires de bactéries, champignons, végétaux et animaux qui proviennent de la condensation itérative de sous-unités d'acétyl-CoA, de propionyl-CoA et de dérivé du malonyl-CoA, selon un processus semblable à celui de la biosynthèse des acides gras. On trouve parmi les polycétides des molécules diverses tels que des macrolides, des ansamycines, des polyènes, des polyéthers, des tétracyclines, des acétogénines, ainsi que divers composés tels que l'acide usnique, le discodermolide ou le radicicol. On distingue trois types de polycétides : les polycetides de type I sont produits par des mégasynthases multimodulaires, ceux de type II sont produits par un ensemble d'enzymes dissociées selon un processus itératif, ceux de type III sont de petites molécules aromatiques produites par des espèces fongiques. De nombreux polycétides sont utilisés en thérapeutique comme antibiotiques antimicrobiens (érythromycine, clarithromycine, azithromycine, tétracyclines), antiparasitaires (avermectines), antifongiques (amphotéricine B) et anticancéreux (les épothilones).

### 1.1.7. Stéroïdes

Les stéroïdes sont des lipides formés autour d'un noyau commun, le noyau stérane. Il s'agit d'un alcane quadricyclique constitué des trois cycles à six atomes de carbone (A, B, C) et d'un cycle à cinq atomes de carbone (D) (Figure 27). Le noyau stérane est partiellement ou totalement hydrogéné, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle et le carbone C17 à un groupe

alkyle. Les différents types de stéroïdes se distinguent selon la présence de chaînes latérales et la position des insaturations : sous-classe des stérols, des hormones stéroïdes, des sécostéroïdes, des acides biliaires, des stéroïdes conjugués et des hopanoïdes (Figure 28). Les stéroïdes agissent biologiquement comme hormones et comme vecteurs de signalisation cellulaire.

Les stérols sont des stéroïdes portant un groupe hydroxyle sur le carbone 3, groupement qui confère à la molécule une tête polaire. La fonction hydroxyle du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras, rendant la molécule de cholestérol estérifiée (CE) totalement insoluble dans l'eau. Les acides biliaires et leurs conjugués sont également des stérols, ce sont des dérivés oxydés du cholestérol. Les stérols des plantes sont appelés phytostérols, les principaux représentants de cette classe sont le β-sitostérol, le stigmastérol, le brassicastérol. Les stérols des mycètes sont appelés ergostérol.

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes à 18 atomes de carbone tandis que les androgènes (testostérone et androstérone) sont des stéroïdes à 19 atomes de carbone. Les progestatifs mais aussi les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes sont des stéroïdes à 21 atomes de carbone. Le clivage du cycle B du noyau stérane aboutit à la formation des sécostéroïdes qui comprennent diverses formes de vitamine D (ergocalciférol et cholécalciférol).

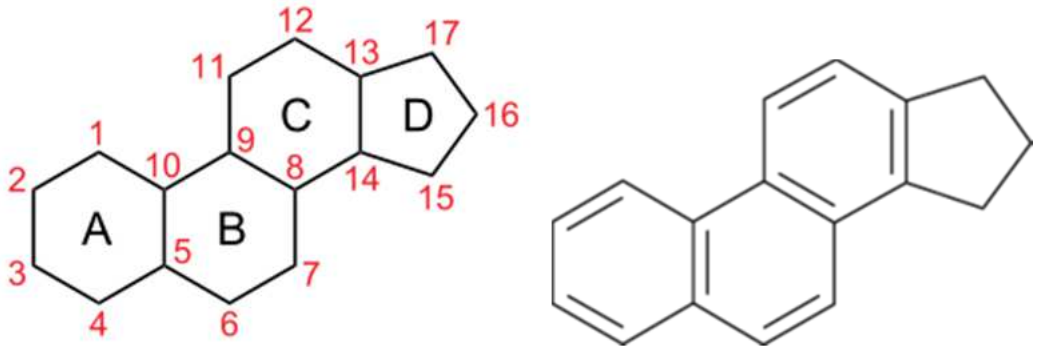
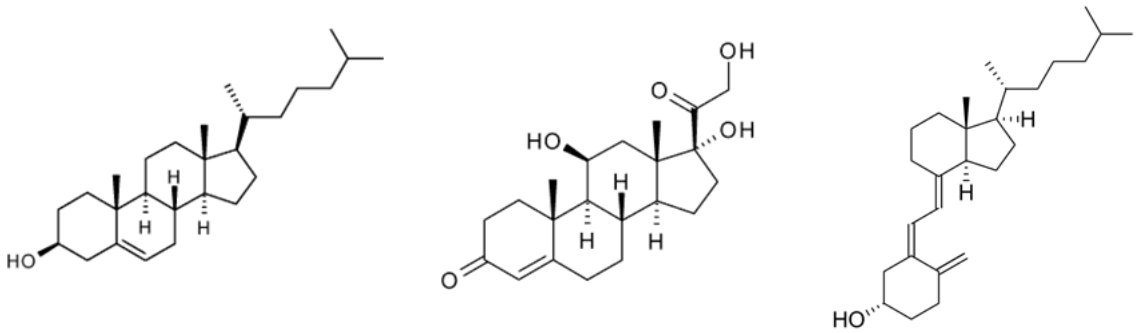



Figure 27|Structure du noyau stérane




Cholestérol

Cortisol

Cholécalciférol (Vitamine D3)

Figure 28|Structure des principaux chefs de file des stéroïdes

### 1.1.8. Prénols ou isoprénoïdes

Les isoprénoïdes constituent une vaste famille de molécules diverses, toutes formées par addition successive d'un même précurseur à cinq atomes de carbones et modifiés à la suite de réactions chimiques. Ce précurseur est l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène) ou isopentényl-pyrophosphate (IPP) lorsqu'il est activé, il est utilisé pour la synthèse d'oligomères et de polymères linéaires ou cycliques. Les isoprénoïdes simples sont classés selon le nombre d'unités terpène. Les monoterpènes sont des isoprénoïdes formés à partir de deux molécules d'isoprène (dix atomes de carbone). Certains représentants sont des composés cycliques et sont principalement retrouvés dans les huiles essentielles (limonène, camphre, eucalyptol…). Les sesquiterpènes sont des isoprénoïdes formés à partir de trois molécules d'isoprènes (15 atomes de carbone). Une molécule de sesquiterpène peut être acyclique ou contenir un à trois cycles et sont principalement retrouvés dans les huiles essentielles (farnésène, cadinène). Les diterpènes sont des isoprénoïdes formés à partir de quatre molécules d'isoprène (20 atomes de carbone). Les diterpènes forment une famille de composés cycliques et linéaires dans laquelle on retrouve des vitamines ou des précurseurs de vitamines telles que le rétinol (vitamine A) et le phytol (précurseur des vitamines E et K) ou encore des molécules anticancéreuses telles que les taxanes (contenant le noyau taxadiène, un diterpène). Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes formés à partir de huit unités terpéniques (40 atomes de carbones, tétraterpènes). Les caroténoïdes sont des molécules pigmentées ayant des propriétés antioxydantes (carotène, lycopène). Le carotène est le précurseur de la vitamine A. Les ubiquinones sont une autre classe de polyterpènes, ils possèdent une chaîne latérale isoprénique (six à dix unités terpéniques) attachée à un noyau quinonoïde d'origine non isoprénique. Le coenzyme Q10 est une ubiquinone qui joue le rôle de transporteurs d'électrons dans la chaîne respiratoire.

## 1.2. Rôles biologiques des lipides

### 1.2.1. Combustible

Les lipides constituent le vecteur énergétique majeur de la nourriture. En terme quantitatif, ils constituent la réserve d'énergie la plus importante chez les animaux. Les graisses neutres sont principalement stockées sous formes de gouttelettes lipidiques dans des cellules spécialisées, les adipocytes. En cas de besoin, les acides gras peuvent de nouveau être libérés et oxydés dans les mitochondries grâce à la bêta-oxydation. Cette réaction aboutit à la réduction d'acétyl-CoA dont le groupe acétyle est oxydé par le cycle de Krebs et des coenzymes $NADH,H^+$ et $FADH_2$ dont les électrons à haut potentiel alimentent la chaîne respiratoire.

### 1.2.2. Matériau et isolant

Les lipides amphiphiles seront utilisés par les cellules pour la formation des membranes. Les lipides typiques des membranes sont les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol.

Les lipides sont de remarquables isolants. Chez les animaux supérieurs, les graisses neutres présentes dans les tissus sous-cutanés et autour de certains organes (graisse constitutive) participent à l'isolation thermique et mécanique. En tant que composants essentiels des membranes cellulaires, ils servent à l'isolation mécanique et électrique (*e.g.* gaine de myéline) des cellules vis-à-vis de leur environnement. L'imperméabilité des lipides membranaires aux ions permet l'établissement d'un potentiel de membrane.

### 1.2.3. Rôles particuliers

Certains lipides remplissent dans l'organisme des tâches particulières. Les stéroïdes, les éicosanoïdes et quelques métabolites des phospholipides jouent un rôle de signal. Ils servent d'hormone, de médiateur ou de second messager. Quelques lipides servent d'ancrage pour insérer les molécules dans la membrane. D'autres lipides sont des cofacteurs de réactions enzymatiques.

Les eicosanoïdes sont un autre exemple d'acides gras qui jouent un rôle physiologique important, cette fois comme vecteurs de signalisation cellulaire (signalisation lipidique). Issus principalement de l'acide arachidonique et de l'acide eicosapentaénoïque, ils regroupent les prostaglandines, les leucotriènes, la prostacycline et les thromboxanes.

## 1.3. Biochimie des lipides cérébraux

### 1.3.1. Composition lipidique des structures nerveuses

Le système nerveux est très riche en lipides, notamment les structures myéliniques. Les lipides constituent plus de la moitié du poids sec du cerveau. Ces lipides jouent essentiellement des rôles structuraux et de signalisation et sont dépourvus de fonctions énergétiques.

La gaine de myéline est composée majoritairement de lipides (70 %) et de 30 % de protéines. Les cellules de Schwann synthétisent la gaine de myéline au niveau du système nerveux périphérique. La cellule de Schwann produit une quantité importante de membranes qui s'enroulent en cercles concentriques autour de l'axone pour former une gaine compacte, ce qui permet d'accélérer la conduction nerveuse [178]. Les lipides qui la composent appartiennent à la classe des phospholipides, glycérophospholipides, gangliosides et des stérols [179], [180]. Ce dernier, constituant clé de la myéline, peut être oxydé et/ou hydroxylé en oxystérols, eux-mêmes

impliqués dans le processus de myélinisation. En cas de lésion ou d'atteinte nerveuse, la gaine de myéline peut être altérée et sa composition lipidique modifiée.

Les acides gras et les alcools sont présents à l'état de traces sous forme libre dans le tissu nerveux mais ils entrent dans la composition des lipides complexes. De même, le système nerveux contient en quantité très faible des glycérides et des esters du cholestérol qui, en revanche, peuvent apparaître en grande quantité au cours d'épisode de dégénérescence neuronale.

La nature des acides gras constituant ces lipides confèrent des propriétés particulières aux membranes cérébrales. En effet, la myéline contient de fortes quantités d'acides gras à très longues chaînes [181] puisqu'un acide gras sur six a un nombre d'atomes de carbone supérieur à dix-huit. Par ailleurs les **terminaisons nerveuses** (synaptosomes) sont particulièrement **riches en acides gras polyinsaturés**.

Le cerveau contient deux types d'acides gras :

- **acides gras saturés et monoinsaturés** : à longues chaînes (16 et 18 atomes de carbone, acide palmitique C16:0, acide stéarique C18:0, oléique C18:1) et à très longues chaînes (20 à 24 et jusqu'à 28 atomes de carbone). Ces dernières sont essentiellement trouvées dans les sphingolipides myéliniques.

- **acides gras polyinsaturés** avec 20 et 22 atomes de carbone contenant respectivement quatre et six doubles liaisons. Ils sont issus d'acides gras essentiels, provenant donc de l'alimentation : les acides linoléique (C18:2) et linolénique (C18:3).

Les acides gras cérébraux non essentiels sont issus de deux sources majeurs, synthèse in situ et origine extra-cérébrale avec transport à travers la barrière hémato-encéphalique.

### *1.3.2. Synthèse des acides gras in situ*

**Synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés**

Il existe différents lieux de synthèse intracellulaire des acides gras. Tout d'abord, au niveau cytosolique, le complexe enzymatique palmitate synthétase synthétise des acides gras à chaînes moyennes, essentiellement l'acide palmitique. Au niveau microsomial, l'acide palmitique est synthétisé in situ puis allongé par la suite pour aboutir à la production d'acides gras saturés à chaînes très longues. Les acides gras monoinsaturés sont synthétisés par le même complexe d'allongement que leurs homologues saturés et ces derniers entrent dans la composition des gaines de myéline [182]. Au niveau mitochondrial, il existe également une synthèse de novo (distinctes de celle existant dans les microsomes) avec des mécanismes d'élongation des chaînes aliphatiques. Les lipides synthétisés par les mitochondries n'entrent pas dans les processus de

myélinisation. La palmitate synthétase cytosolique joue un rôle dans l'élaboration des membranes gliales et donc dans la myélinisation. La C16-élongase synthétise de l'acide stéarique (C18) à partir de palmityl-CoA et la C18-élongase l'acide arachidique (C20). Les membranes de la gaine de myéline contiennent d'abord des sphingolipides formés d'acides gras à chaînes moyennes (C16 et C18) puis, plus tard, constitués de très longues chaînes comme l'acide lignocérique (C24). L'allongement des acides gras résulte d'une somme de plusieurs étapes intermédiaires dont les plus importantes sont la condensation (α-ceto acyl synthétase, qui condense le malonyl-CoA sur un acyl-CoA), la première réduction (α-hydroxyacyl déshydrogénase), la déshydratation (acyl-déshydrogénase) et la deuxième réduction (enoyl-reductase).

**Synthèse des acides gras polyinsaturés.**

Les acides gras polyinsaturés sont synthétisés à partir d'homologues insaturés et mono-insaturés. La double liaison est introduite par une oxydoréductase appelée acide gras désaturase. Celle-ci introduit une double liaison C=C dans la chaîne carbonée d'un acide gras par déshydrogénation. Ces enzymes sont désignées par la position delta de l'atome de carbone concerné par la désaturation. Il existe plusieurs désaturases, chacune introduisant une double liaison dans une position donnée. La Δ9-désaturase permet de transformer l'acide stéarique, saturé, en acide oléique, mono-insaturé (oméga-9) en introduisant une double liaison entre les carbones 9 et 10. La Δ12-désaturase transforme l'acide oléique en acide linoléique, bi-insaturé (oméga-6) en introduisant une double liaison entre les carbones 12 et 13. La Δ15-désaturase transforme l'acide linoléique en acide α-linolénique, tri-insaturé (oméga-3) en introduisant une double liaison entre les carbones 15 et 16. Les Δ12- et Δ13-désaturases n'existent pas dans le règne animal. La Δ6-désaturase transforme l'acide linoléique en acide γ-linolénique en introduisant une double liaison entre les carbones 6 et 7. La Δ5-désaturase transforme l'acide dihomoγ-linolénique en acide arachidonique en introduisant une double liaison entre les carbones 5 et 6. L'acide arachidonique est le précurseur des éïcosanoïdes. Les Δ6- et Δ5-désaturases sont présentes chez les mammifères. En association avec des élongases, qui assurent l'allongement de la chaîne carbonée, ces enzymes permettent la biosynthèse de nombreux acides gras polyinsaturés de type oméga-6 et oméga-3. Il existe également une Δ4-désaturase mais la biosynthèse de l'acide docosahexaénoïque semble plutôt dépendre de la Δ6-désaturase (élongation-désaturation d'une chaîne à 24 atomes de carbone, raccourcie ensuite à 22 par bêta-oxydation).

### *1.3.3. Origine extra-cérébrale des acides gras*

Le système nerveux central ne peut élaborer que 60 % environ de ses acides gras, le reste étant apporté par voie exogène via la circulation sanguine [183].

**Transport d'acides gras non essentiels.**

Les acides palmitique et stéarique plasmatiques captés par le système nerveux central à partir de la circulation sanguine sont par la suite intégrés au niveau des structures nerveuses tels que la myéline, les synaptosomes, les membranes des neurones et des astrocytes [184], [185]. L'acide stéarique peut être incorporé tel quel dans les membranes (au sein de phospholipides ou de sphingolipides) ou bien métabolisé *in situ* (allongement de chaînes ou synthèse de chaînes plus courtes à partir d'éléments du catabolisme). La relation sang-cerveau pour l'acide stéarique varie au cours du développement cérébral. La captation des acides gras est majorée en période de myélinisation et de multiplication gliale.

**Transport d'acides gras essentiels.**

La position β des phospholipides est généralement occupée par un acide gras polyinsaturé, généralement le 20:4ω6, le 22:5ω3 et le 22:6ω3. Ces acides proviennent tels quels de la circulation plasmatique ou bien sont dérivés des acides gras essentiels linoléique et linolénique après allongement et désaturation. Une carence en acides gras essentiels provoquera des anomalies au cours du développement cérébral, période où le besoin est particulièrement important [186]. Le tissu nerveux compensera partiellement ce déficit en synthétisant des acides gras polyinsaturés en ω9 [187].

## 1.4. Définition de la lipidomique

La **lipidomique** est l'étude extensive de la structure, de la fonction et des voies métaboliques des lipides au niveau cellulaire dans les systèmes biologiques [148]. Ce terme est un néologisme formé du terme lipide et du suffixe "-ome". Le dictionnaire *Oxford English Dictionary* définit ainsi le suffixe "-ome" : *in cellular and molecular biology, forming nouns with the sense "all constituents considered collectively"*. La lipidomique correspond à l'analyse du lipidome, c'est-à-dire le profil lipidique complet d'une cellule, d'un tissu (ou d'une partie de celui-ci), d'un organisme. La lipidomique fait partie de la métabolomique qui étudie les quatre types de métabolites suivants : les sucres (le glycome), les nucléotides, les acides-aminés et les lipides. La métabolomique quant à elle appartient au champ des études *omics* parmi lesquelles on compte également la protéomique, la transcriptomique et la génomique qui s'intéressent à l'analyse des protéines, de l'ARN et de l'ADN, respectivement (Figure 29). Les études *omics* permettent une mesure qualitative et quantitative de la réponse des systèmes vivants à divers stimuli endogènes ou exogènes [188].

L'analyse lipidomique est fondée sur l'utilisation de techniques d'extraction, de séparation chromatographiques, de détection, d'identification et de dosage, notamment la chromatographie

liquide haute performance à polarité de phase inversée couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. L'utilisation d'algorithmes de traitement des données est requise. Ces analyses permettent le traitement simultané d'un grand nombre de données qui font par la suite l'objet d'analyses statistiques, notamment comparatives lorsqu'il s'agit par exemple d'étudier l'effet d'une pathologie, d'un traitement ou d'un contaminant.

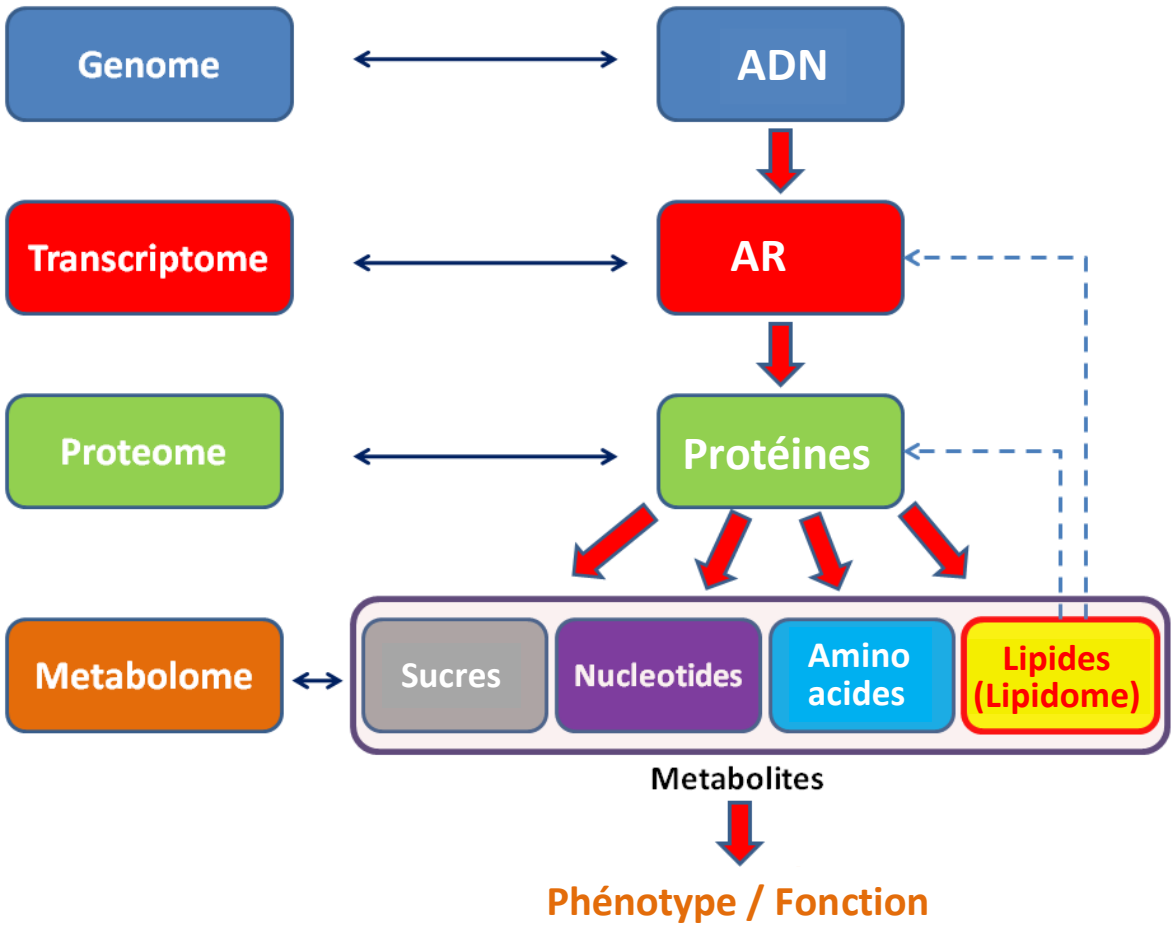



Figure 29 |Les sciences *omics* : la lipidomique fait partie de la métabolomique.

## 2. Principe de l'analyse lipidomique

### 2.1.La préparation d'échantillon

La préparation d'échantillons constitue la première étape critique de l'analyse lipidomique. Celle-ci conditionne la qualité et les résultats de l'étude. La méthode choisie pour la préparation de l'échantillon sera adaptée au type d'échantillon biologique (organes, tissus, cellule, fluides…) et à la nature des composés d'intérêt. Dans la présente étude, deux types de préparation d'échantillons sont employés : l'extraction liquide-liquide et l'extraction sur phase solide.

### 2.1.1. L'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (LLE) repose sur la partition d'un composé organique entre une phase aqueuse (échantillon biologique) et une phase organique (solvant organique) non-miscible. Cette partition dépend du coefficient de partage $K_p$ de l'analyte entre la phase organique et la phase aqueuse. Ce dernier correspond au rapport des solubilité de l'analyte dans la phase organique ([S]org) et dans la phase aqueuse ([S]aq) : $Kp = \frac{[S]org}{[S]aq}$.

Lorsque les deux phases sont en contact, les molécules hydrophobes se solubilisent préférentiellement dans la phase organique et sont ainsi extraites de l'échantillon biologique. Quant aux molécules hydrophiles, celles-ci restent dans la phase aqueuse.

L'extraction suit les étapes suivantes :

1. Ajout du solvant organique d'extraction à la phase aqueuse
2. Agitation pour favoriser le transfert d'analytes de la phase aqueuse vers la phase organique.
3. Séparation des phases par centrifugation
4. Récupération de la phase organique qui contient les analytes d'intérêt
5. Evaporation du solvant organique
6. Reprise de ces résidus par un solvant organique différent du premier

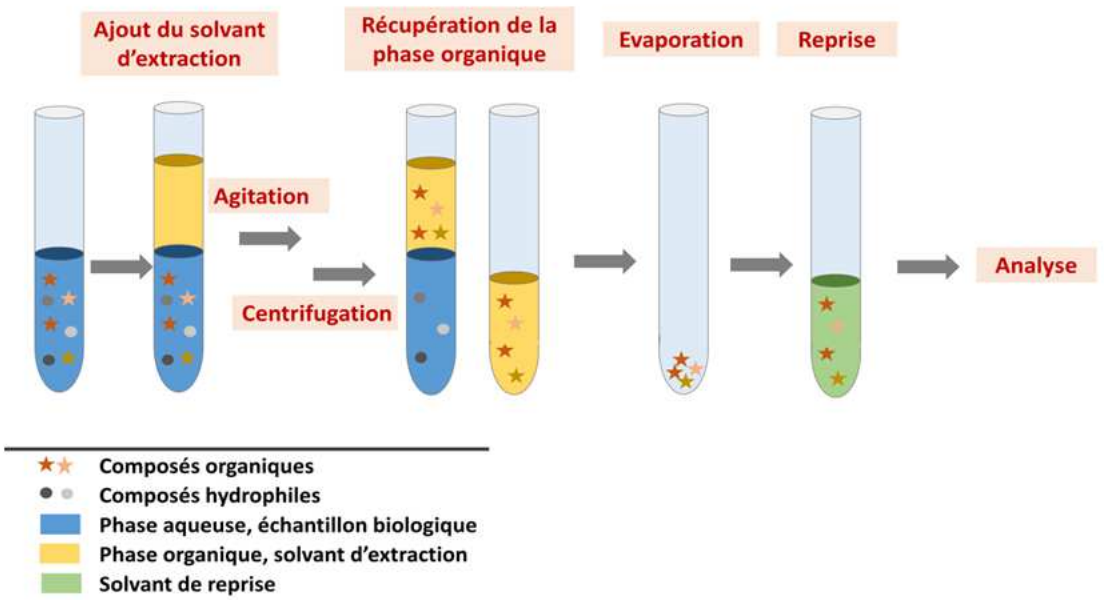



Figure 30 | Etapes de l'extraction liquide liquide

Le rendement de l'extraction des analytes dépend d'un certain nombre de paramètres que l'on peut ajuster pour optimiser l'extraction : la nature du solvant organique, le volume utilisé, le pH de la phase aqueuse lorsque l'analyte comporte des fonctions ionisable ou

encore le nombre d'extractions successives. La phase organique ne doit pas être miscible avec la phase aqueuse et la solubilité de l'analyte dans la phase organique doit être élevée. La phase organique peut correspondre soit à un solvant d'extraction pur, soit à un mélange de solvants.

La LLE est une méthode aisée à mettre en œuvre. Requérant du matériel basique de laboratoire (mélangeurs par retournement, centrifugeuses, tubes à essai) et autorisant un large choix de solvants organiques permettant l'extraction d'une grande gamme de composés, la LLE constitue, en analyse lipidomique, une méthode d'extraction de premier choix [189], [190]. Cependant, il s'agit d'une méthode longue, difficilement automatisable et qui manque de reproductibilité. En effet, la formation d'émulsions suite à l'agitation mécanique est un phénomène fréquent qui rend alors la méthode d'extraction non reproductible [191]. Par ailleurs, la LLE utilise une quantité non négligeable de solvants toxiques (*e.g.* méthanol, chloroforme).

Le caractère hydrophobe des molécules est évalué par le logP, défini par le logarithme du coefficient de partage pour le système octanol/eau. Ainsi, plus le logP est élevé (valeurs positives), plus le composé est hydrophobe. Un logP nul indique que le composé est soluble à part égale dans l'eau et l'octanol. Un logP négatif caractérise une molécule hydrophile. La gamme de polarité des lipides est très large : le logP des lipides s'étend de 5 (*e.g.* phosphatidylcholines) à 22 (*e.g.* triglycérides) [192]. C'est pourquoi, un mélange de solvants organiques est nécessaire pour réaliser une extraction liquide liquide.

Une des premières méthodes d'extraction de lipides a été proposée en 1957 par Folch. La phase organique est un mélange de chloroforme (log P = 1,97) et de méthanol (log P = -0,77) en proportion 2/1 *v/v* [193]. L'utilisation de solvants de polarités différentes permet ainsi l'extraction de différentes catégories de lipides. La méthode de Folch reste une référence, mais celle-ci a par la suite été optimisée dans le but notamment de diminuer la quantité de solvants nécessaire à l'extraction. La méthode de Bligh et Dyer, publiée en 1959, est dérivée de celle de Folch. La phase organique est également un mélange de chloroforme et de méthanol mais en proportion quelque peu différente : 1/1 *v/v.* Le volume de la phase organique ne représente plus que cinq fois le volume d'échantillon [194]. La méthode Bligh et Dyer apporte également l'avantage de permettre une meilleure séparation de phase en un temps plus court que par la méthode de Folch. Dans ces deux méthodes, la phase organique est plus dense que la phase aqueuse et la phase organique à récupérer se situe ainsi sous la phase aqueuse. Par la suite, d'autres solvants moins toxiques ont été testés, tels que le dichlorométhane et le *tert*-butyl méthyl éther (MTBE) [195], [196]. Ainsi, Matyash *et al.* ont proposé une nouvelle méthode d'extraction à base d'un mélange de MTBE et de méthanol, en proportion 10/3 *v/v*, représentant environ 50 fois le volume de l'échantillon. Dans la mesure où les rendements d'extraction sont comparables, voire supérieurs, à ceux obtenus avec les méthodes de Folch ou celle de Bligh et Dyer et étant donné que le MTBE est

moins toxique que le chloroforme, cette méthode d'extraction est devenue une méthode de choix en analyse lipidomique. En outre, dans la mesure où la phase organique est moins dense que la phase aqueuse, cette méthode est plus aisée à réaliser : la phase organique se situe au-dessus de la phase aqueuse et le prélèvement de la phase organique est ainsi facilité.

La LLE est une technique peu spécifique qui permet l'extraction d'une large gamme de familles de lipides. Cependant, il peut être parfois judicieux de réaliser des extractions plus spécifiques et de réduire la gamme de lipides extraits, notamment lorsque les lipides d'intérêt sont en faible concentration dans l'échantillon biologique ou lorsqu'ils présentent des polarités extrêmes. L'extraction sur phase solide (SPE) est une autre technique d'extraction qui, combinée à la première technique, permet de répondre à ces objectifs. Cette technique est également régulièrement employée pour l'extraction des lipides.

### *2.1.2. L'extraction sur phase solide*

L'extraction en phase solide est fondée sur la rétention de molécules d'intérêt dissous ou en suspension dans un liquide (la phase mobile) par adsorption sur une phase solide (la phase stationnaire). La rétention des composés dépend alors des propriétés physico-chimiques et donc de leur affinité relative pour la phase stationnaire et la phase liquide. La SPE comporte schématiquement les quatre étapes suivantes :

1. **Conditionnement** : il s'agit d'activer la phase stationnaire par la percolation de solvant, généralement éthanol et eau. Cette étape est essentielle pour permettre la rétention des analytes, elle favorise les échanges dans l'adsorbant et augmente également la mouillabilité de la phase stationnaire. Si cette étape est mal conduite ou si la cartouche sèche avant le dépôt de l'échantillon, la rétention des analytes peut être compromise.
2. **Percolation** : dépôt de l'échantillon liquide. L'analyte d'intérêt établit des interactions avec la phase stationnaire sur laquelle il est retenu. A l'inverse, les molécules ayant plus d'affinité pour la phase mobile aqueuse ne sont pas retenues.
3. **Lavage** : cette étape permet d'éliminer les molécules interférentes qui ont été retenues sur la phase stationnaire lors de l'étape de percolation. Ces composés échangent moins d'interactions avec l'adsorbant et plus d'interactions avec le solvant de lavage que les composés d'intérêts. Les molécules interférentes sont ainsi éliminées avec le ou les solvants de lavage. Le solvant de lavage est choisi de façon à éliminer les interférents, sans éluer l'analyte d'intérêt.

4. **Elution** : c'est l'étape finale, elle permet de rompre les interactions entre l'analyte d'intérêt et la phase stationnaire. Le solvant d'élution doit être le plus efficace possible, son volume doit être faible de manière à obtenir un facteur de pré-concentration très important.

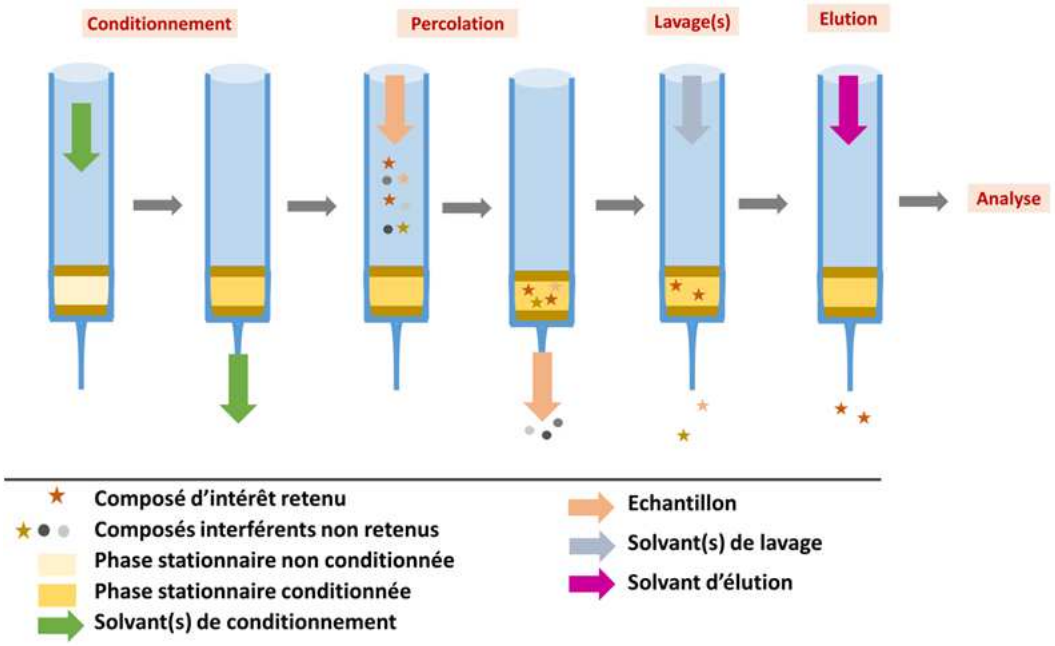



Figure 31|Etapes de l'extraction SPE

Figure 32|Dispositif d'extraction sur phase solide SPE

L'extraction par SPE est le plus souvent réalisée à l'aide de cartouches commerciales. Il s'agit de petits tubes de plastique contenant la phase stationnaire comprimée entre deux filtres. Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres dont le type de phase stationnaire, la capacité des cartouches, la nature, le pH et le volume de solvants utilisé lors des étapes de lavage et d'élution.

Le choix de la phase stationnaire dépend du type d'analyte d'intérêt. On distingue deux grandes familles de phase stationnaire : les polymères et les silices. Les polymères de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB), polystyrène divinyl pyrrolidone (PS-PVP) et dimethylacry-oxymethyl naphtalène divinylbenzène (DMN-DVB) sont très stables chimiquement. Ils résistent le plus souvent à un pH compris entre 1 et 14 et possèdent une capacité de charge élevée. Cependant, ils sont faiblement sélectifs. Les silices sont moins stables chimiquement (pH compris entre 2 et 7,5) mais elles sont beaucoup plus sélectives que les polymères, avec une capacité de charge moins importante. Les silices restent toujours des adsorbants de référence très utilisés. On distingue quatre familles de silices identifiables par leur mode de rétention de l'analyte ainsi que par leur sélectivité (Tableau 3) [197].

| Mode | Greffage de la phase stationnaire et type d'interactions | Composés retenus |
|---|---|---|
| Polarité de phase inverse | Greffons de type alkyl<br>*Interactions hydrophobes* | Composé apolaires ou faiblement polaires |
| Polarité de phase normale | Greffage cyano (CN)<br>Greffage Diol<br>*Liaisons hydrogènes* | Composés avec des fonctions polaires |
| Echange d'anions | Greffage par des fonctions amine, sulfonique ou carboxylique<br>Liaisons ioniques | Composés avec des fonctions ionisables : acides ou bases |
| Mixte | Greffage double : Greffons hydrophobes et fonctions amine, sulfonique ou carboxylique | Composés présentant des fonctions ionisables et des chaînes hydrophobes |

Tableau 3 | Classification des phases stationnaires en extraction SPE

Le choix de la phase stationnaire et des différents solvants sont ainsi conditionnés par les propriétés physico-chimiques des analytes d'intérêt. Pour un échantillon aqueux, l'élution est obtenue grâce à un solvant hydrophobe alors que pour un échantillon organique, l'élution est

obtenue grâce à un solvant plus polaire. La force éluante des solvants est un paramètre essentiel à prendre en compte dans le choix du solvant.

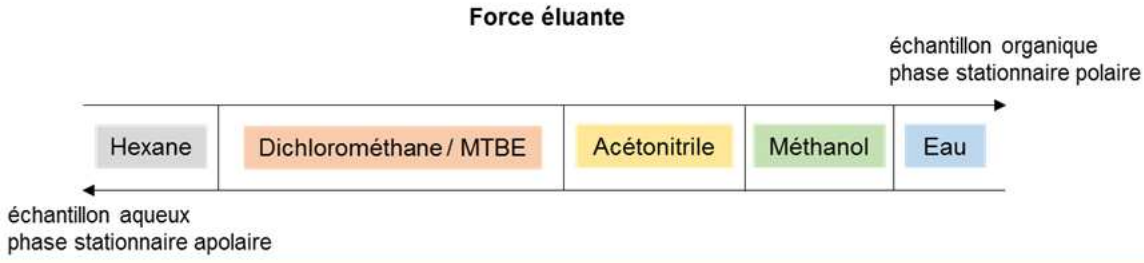



Figure 33 | Force éluante des principaux solvants de SPE

La SPE est une méthode de choix pour l'extraction de molécules hydrophobes, c'est ainsi une méthode qui trouve sa place en analyse lipidomique. A l'inverse de la LLE, la SPE peut être automatisée. La SPE peut s'avérer plus sélective que la LLE et peut être couplée à une LLE afin de purifier l'échantillon et de l'enrichir spécifiquement en certaines classes de lipidiques [198].

En résumé, la LLE permet l'extraction d'un grand nombre de composés de natures lipidiques différentes. C'est une technique facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Elle constitue donc la méthode de choix en analyse lipidomique globale. En revanche, on choisira la SPE en analyse lipidomique ciblée car cette technique est plus sélective [199].

Dans la présente étude, les deux méthodes d'extraction ont été employées : la LLE pour l'analyse lipidomique globale et la SPE (couplée à la LLE) pour l'analyse lipidomique ciblée.

## 2.2. La séparation chromatographique

### *2.2.1. Principe général*

La chromatographie est une technique de séparation de composés en mélange qui repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile (ou éluant) à travers une phase stationnaire (ou phase fixe). Les composés en mélange se distribuent entre la phase stationnaire solide qui retient les composés et la phase mobile qui les entraîne. Comme les composés n'ont pas tous la même affinité pour les deux phases, les vitesses de déplacement des composés diffèrent et les composés peuvent ainsi être séparés.

Les premiers essais de chromatographies ont porté sur la séparation des pigments de plantes par un botaniste russe, M. S. *Tswett* à la fin du XIXe siècle, d'où la racine *chromato*. La phase stationnaire utilisée était une colonne remplie de carbonate de calcium [200]. Par la suite, les techniques de chromatographie ont évolué et se sont grandement diversifiées. Les différents types de chromatographie se distinguent par le type de support (colonne ou planaire) et la nature

de la phase mobile (liquide, gaz, fluide supercritique). Les interactions qui régissent la séparation des composés peuvent être de nature très variées, on distingue la chromatographie d'adsorption/d'affinité, la chromatographie de partage, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie chirale et la chromatographie d'exclusion stérique.

Parmi les techniques chromatographiques sur colonne, on distingue principalement la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC). La GC est utilisée pour séparer les composés volatils, présents à l'état gazeux ou vaporisables par chauffage. Cette technique n'est donc pas adaptée à la séparation de lipides, cependant, il est possible de les rendre volatiles grâce à une réaction de dérivation. La LC est utilisée pour séparer les composés en solution dans une phase mobile liquide. La LC est la technique de choix en analyse lipidomique. En effet, elle permet la séparation de composés thermolabiles et de polarités étendues, grâce notamment à une offre variée de phases stationnaires. De plus, il est possible de coupler la séparation à un grand nombre de méthodes de détection. Lorsque la phase stationnaire est polaire et la phase mobile hydrophobe, on parle de chromatographie liquide à polarité de phase normale (NPLC), ou chromatographie de partage à polarité de phase normale. La phase stationnaire est dans ce cas constituée de silice greffée par des groupements polaires. La phase mobile est constituée d'un solvant de base de type alcane (favorise la rétention) et d'un solvant plus polaire (acétate d'éthyle, dichlorométhane, MTBE) appelé modificateur polaire (favorise l'élution). La séparation est fondée sur des interactions entre les groupements polaires des analytes et ceux de la phase stationnaire et sur la compétition entre l'analyte et le solvant éluant pour occuper les sites d'interaction de la phase stationnaire. L'ordre d'élution des molécules se fait par polarité croissante. Lorsque la phase stationnaire est hydrophobe et la phase mobile hydrophile, on parle de chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC), ou chromatographie de partage à polarité de phase inverse. Les phases stationnaires disponibles sont les silices greffées de chaînes alkyles, les copolymères organiques macroporeux (polystyrène-divinylbenzène) et les carbones graphites poreux. La rétention est basée sur des interactions hydrophobes entre les analytes et les chaînes alkyles de la phase stationnaire. Le solvant de base de la phase mobile est l'eau, alors que le solvant éluant est un solvant organique de type méthanol, acétonitrile ou isopropanol. L'élution est basée sur la rupture des interactions hydrophobes, ainsi, l'ordre d'élution des molécules se fait par polarité décroissante. Les lipides étant des molécules plutôt hydrophobes, la RPLC est la méthode de choix en analyse lipidomique. Cette technique permet de séparer les lipides selon leur caractère hydrophobe. Ceux-ci sont plus ou moins retenus selon la nature de la chaîne hydrocarbonée. Plus la chaîne d'acide gras est longue, plus le lipide est retenu ; à l'inverse, plus le nombre d'instaurations de la chaîne augmente, moins il est retenu. Il existe une relation entre le nombre d'insaturations *n* et le

nombre de carbones de la chaîne, *CN,* et un paramètre appelé *nombre d'équivalent carbone* ECN tel que ECN = CN – 2n.

Dans la présente étude, la méthode chromatographique utilisée est la RPLC avec comme phase stationnaire des silices greffées C18.

### *2.2.2. Paramètres importants en chromatographie et avancées technologiques*

Les performances des colonnes chromatographiques sont exprimées par deux paramètres fondamentaux : **l'efficacité N** ou nombre de plateaux théoriques, et la **sélectivité α**. L'efficacité, est un paramètre cinétique qui exprime la relation entre le temps de rétention $t_R$ et la largeur du pic à mi-hauteur ($w_{1/2}$) ou à la base (w). En réalité, l'efficacité correspond au nombre de *zones* ou de *plateaux* où se produit un équilibre de partage du composé entre phase stationnaire et phase mobile. Plus l'efficacité est importante, plus les pics sont fins. La sélectivité est l'aptitude du système à séparer deux composés, plus la sélectivité est grande, meilleure est la séparation.

L'efficacité de la séparation chromatographique est appréciée par la résolution R. Elle est calculée à partir de la distance séparant deux pics (différence des temps de rétention) et de la largeur à la base. Ce paramètre traduit la qualité de la séparation. La résolution est bonne pour une valeur supérieure ou égale à 1,5. Pour qu'une séparation soit efficace, c'est-à-dire une résolution élevée, l'efficacité et la sélectivité doivent être optimisées simultanément.

L'appareillage de chromatographie liquide a par la suite été amélioré pour augmenter considérablement les performances de cette technique. Ainsi, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a fait son apparition dans les années 1990, cette technique permet d'effectuer la séparation d'un grand nombre de composés, sur un temps relativement court avec une quantité mesurée de solvants employés. Une granulométrie plus faible des particules de la phase stationnaire (de l'ordre du micromètre) et une pression élevée de la phase mobile élevées (jusqu'à 1000 bars) permettent d'obtenir des résolutions accrues. Ainsi, en CLHP, les pics chromatographiques sont fins, le rapport signal/bruit est élevé et la sensibilité est améliorée. Par conséquent, la CLHP permet l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés présents en faible quantité dans un échantillon. La CLHP s'avère donc être la technique de choix pour les analyses de type *omic* et donc la lipidomique[199], [201], [202]. Par ailleurs, il est possible de coupler la CLHP avec des systèmes de détection performants particulièrement bien adaptés à l'analyse *omic* telle que la spectrométrie de masse.

## 2.3.Le système de d'analyse par spectrométrie de masse

### *2.3.1. Principe général*

La spectrométrie de masse (MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse (plus exactement le rapport masse sur charge, m/z). Le principe de cette technique réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules à l'état d'ions. Ces ions sont séparés selon leur rapport *m/*z. Les premiers essais de spectrométrie de masse ont été réalisés par Joseph John Thomson au début du XX$^{ème}$ siècle qui a ainsi montré la présence de deux isotopes du Neon dans un gaz de néon [203]. Par la suite, cette technique a été grandement améliorée et il s'agit aujourd'hui de la technique d'analyse la plus utilisée dans les analyses *omics*.

Un spectromètre de masse comporte une **source d'ionisation** suivie d'un ou plusieurs **analyseurs** qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z, d'un **détecteur** qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un **système d'acquisition informatique** qui traite le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant l'intensité du signal (*i.e.* l'abondance relative de ces ions) en fonction du rapport m/z.

### *2.3.2. La source d'ionisation*

La source d'ionisation est le premier élément du spectromètre de masse, elle permet le passage en phase gazeuse et l'ionisation des molécules qui ne sont généralement pas chargées. L'ionisation se produit soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Par la suite, l'application d'un champ électrique ou d'un champ magnétique permet la séparation des ions formés en fonction de leur rapport *m/z*. Différentes méthodes d'ionisation existent. Lorsque le spectromètre de masse est couplé à une chromatographie liquide, les sources disponibles sont l'électronébulisation (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). En analyse lipidomique, l'ESI reste la méthode d'ionisation la plus courante, aussi, nous avons choisi cette dernière dans les travaux ci-après.

**L'électronébulisation** est une méthode d'ionisation générant des ions moléculaires relativement stables, c'est une méthode dite « *douce* » [204]. L'échantillon est introduit à l'état liquide dans la source d'ionisation L'ESI par l'intermédiaire d'un capillaire très fin. Une tension élevée (plusieurs milliers de volts) est appliquée au niveau du capillaire ce qui induit l'accumulation de charges à l'extrémité de celui-ci formant un cône dit « cône de Taylor » Figure 34 [205]. De fines gouttelettes chargées constituées de molécules de solvant et d'analytes se détachent du cône de Taylor pour former un nébulisat. Les molécules de solvant sont vaporisées progressivement grâce à un flux d'azote chauffé, ce qui réduit la taille des gouttelettes et

augmente la densité de charge. Lorsque la répulsion entre les charges des analytes devient supérieure à la tension de surface des gouttelettes, celles-ci explosent pour au final obtenir des ions en phase gazeuse [204], [206].

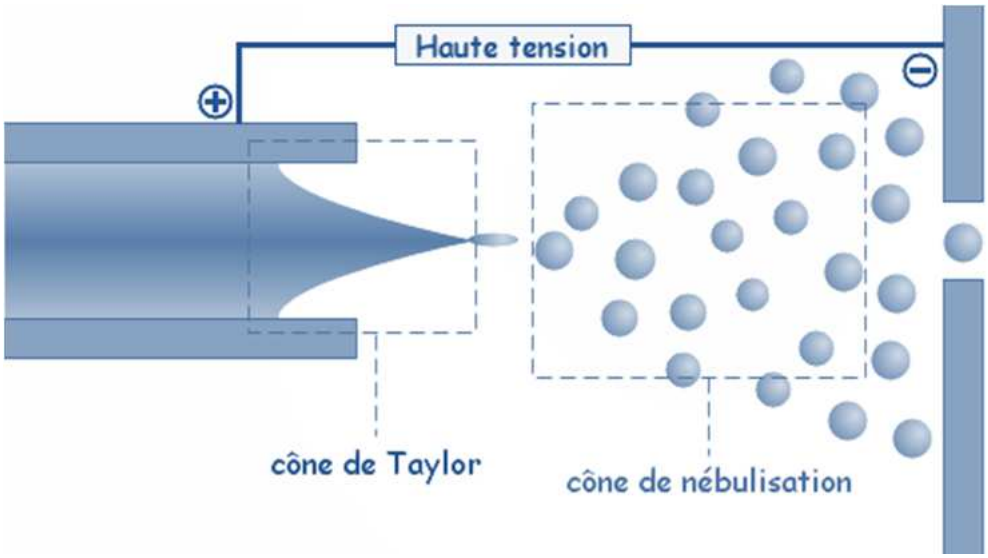



Figure 34| Principe de l'électronébulisation en mode positif

*Les analytes élués de la colonne chromatographique sont infusés dans un capillaire soumis à un fort champ électrique créé par une différence de potentiel entre le capillaire et la contre-électrode. Ce champ électrique oxyde ou réduit les analytes, séparant ceux chargés positivement de ceux chargés négativement. Les molécules de même polarité que le capillaire (anode ou cathode) se retrouvent en excès à son extrémité entraînant une distorsion du liquide appelée cône de Taylor. Ce dernier s'étire jusqu'à se dissocier en petites gouttelettes attirées par la contre-électrode. Durant leur trajet en phase aqueuse, les gouttelettes se déplacent à contre-courant d'un flux d'azote chauffé qui permet l'évaporation des solvants. De fait, la taille des gouttelettes diminue tandis que la densité de charge augmente, entraînant leur explosion en gouttelettes plus petites qui subissent à leur tour le même processus jusqu'à la formation d'ions totalement désolvatés qui entrent dans l'analyseur situé à l'arrière de la contre-électrode.*

La charge des ions dépend de l'affinité de l'analyte pour les protons, les métaux alcalins et les halogènes. Le plus souvent, les ions chargés positivement sont formés par addition d'un proton $[M+H]^+$, d'un ion sodium $[M+Na]^+$, ammonium $[M+NH_4]^+$ ou potassium $[M+K]^+$, tandis que les ions chargés négativement sont formés par perte d'un proton $[M-H]^-$ ou par addition d'un ion chlorure $[M+Cl]^-$. Des ions multichargés $[M+nH]^{n+}$ et $[M-nH]^{n-}$, peuvent également être formés en ESI. Les lipides sont des molécules susceptibles de capter ou perdre facilement un proton ou un métal alcalin. Par exemple, les glycérophospholipides et les sphingolipides sont généralement ionisables dans les deux modes tandis que les glycérolipides sont détectés en mode d'ionisation positif (ESI+) et les acides gras libres en mode d'ionisation négatif (ESI-). Ainsi, l'ESI est une méthode d'ionisation particulièrement bien adaptée à l'analyse lipidomique.

### 2.3.3. L'analyseur

L'analyseur permet la séparation des ions nouvellement générés par la source d'ionisation selon leur rapport m/z. Différents analyseurs ont été développés, ils se différencient par leur principe de mesure du paramètre m/z qui peut être fondée sur la vitesse des ions (TOF), la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (quadripôle), le mouvement périodique dans un champ magnétique (trappes à ions) ou l'énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique).

Ces analyseurs diffèrent suivant leur potentiel résolutif, leur sensibilité, l'étendue de leur gamme de masse et la compatibilité avec les sources d'ionisation. La résolution est définie comme la capacité à distinguer deux signaux voisins. Plus la résolution est élevée, plus la différence entre deux signaux distincts est faible sur le paramètre mesuré [207]. En pratique, la résolution correspond à la finesse des pics. Ce paramètre est évalué par le rapport $m/\Delta m$, où $\Delta m$ correspond soit à la différence m/z minimale entre l'ion d'intérêt et son voisin le plus proche dont il peut être distingué, soit à la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à l'analyte étudié [208]. On distingue ainsi les analyseurs basse résolution, tels que les analyseurs quadripolaires, les trappes à ions et de haute résolution, tels que les temps de vol et les secteurs magnétiques. Il est possible de combiner plusieurs analyseurs dans un même spectromètre de masse : on parle alors d'analyseur en tandem. En lipidomique, des instruments hybrides de type quadripôles-temps de vol (Q-TOF) sont généralement utilisés en raison de leurs performances élevées en résolution et en sensibilité.

**Le quadripôle**

L'analyseur quadripôlaire est un analyseur développé à partir des années 1950 et constitué de quatre électrodes métalliques de section cylindrique ou hyperboliques parallèles deux à deux (Figure 35). Son principe de fonctionnement repose sur la sélection des ions ayant une trajectoire stable dans le champ électrique du quadripôle, la stabilité de la trajectoire dépendant du rapport m/z [209]. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et donc soumises au même potentiel alors que les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels opposés en valeur. Ces différences de potentiel électrique sont constituées d'une composante continue et d'une autre alternative. La polarité des électrodes s'inverse à une fréquence définie afin de conférer un mouvement sinusoïdal aux ions. Lorsque les ions entrent en résonnance, leur trajectoire est stable et ils atteignent le détecteur. A l'inverse, les ions qui n'entrent pas en résonnance ont une trajectoire instable et n'atteignent pas le détecteur [210].

Les analyseurs quadripôlaires ainsi permettent de sélectionner les ions selon leur valeur de *m/z*, ils peuvent jouer un rôle de « filtre ». Ces analyseurs sont sensibles mais peu résolutifs, aussi, ils ne permettent pas une mesure des *m/z* avec une grande exactitude.

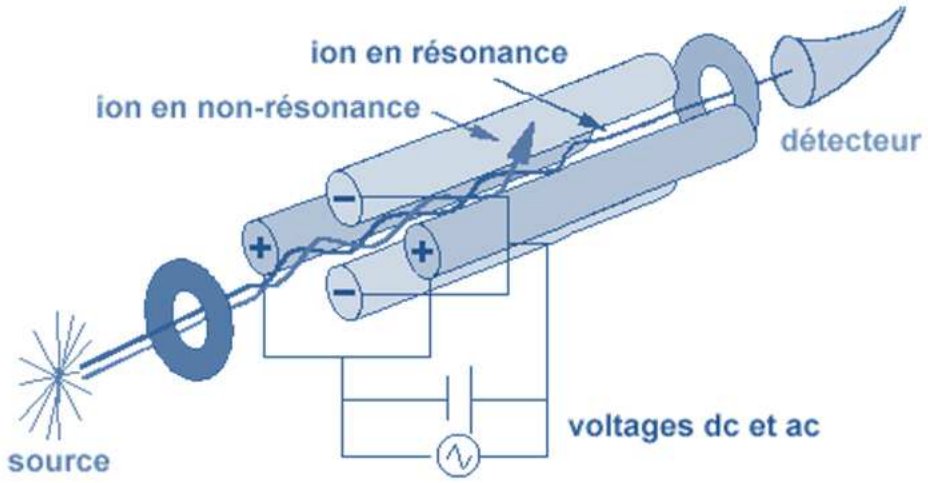



Figure 35| Schéma de l'analyseur quadripôlaire

**L'analyseur à temps de vol**

Les analyseurs à temps de vol (TOF) ont également été développés dans les années 1950. Le principe de fonctionnement est différent de celui de l'analyseur quadripôlaire. Il s'agit de mesurer le temps que met un ion, préalablement accéléré par une tension, pour parcourir une distance donnée dans un tube sous vide et non soumis à un champ électromagnétique. La séparation des ions dépend de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération et le rapport m/z est ensuite mesuré précisément à partir du temps de vol [208], [211]. Les ions de rapport m/z petit sont animés d'une grande vitesse et arrivent les premiers au détecteur. Les analyseurs TOF sont désormais équipés de réflectron, il s'agit d'électrodes jouant le rôle de miroir électrostatique permettant d'une part de doubler la distance que parcourent les ions et d'autre part de focaliser les ions de même m/z. En effet, des ions de même m/z peuvent avoir acquis des énergies cinétiques différentes. Les ions de même m/z qui possèdent une énergie cinétique élevée pénètrent plus loin dans le réflectron, ce qui allonge leur trajectoire et corrige ainsi la dispersion des temps d'arrivée au détecteur (Figure 36). Ce dispositif permet ainsi d'accroître la résolution et donc les performances de l'analyseur [212]. Par conséquent, ce type d'analyseur offre une haute résolution sur une gamme de masse importante.

Chaque analyseur possède ses propres avantages, il convient donc de le sélectionner en fonction de l'analyse que l'on veut effectuer. Il est possible d'utiliser plusieurs analyseurs en tandem dans le but de combiner les avantages de chaque analyseur et ainsi améliorer les performances globales de l'appareil. Ainsi, des analyseurs hybrides de type quadripôle-temps de vol peuvent être utilisés pour combiner la sélectivité du quadripôle à la résolution du TOF.

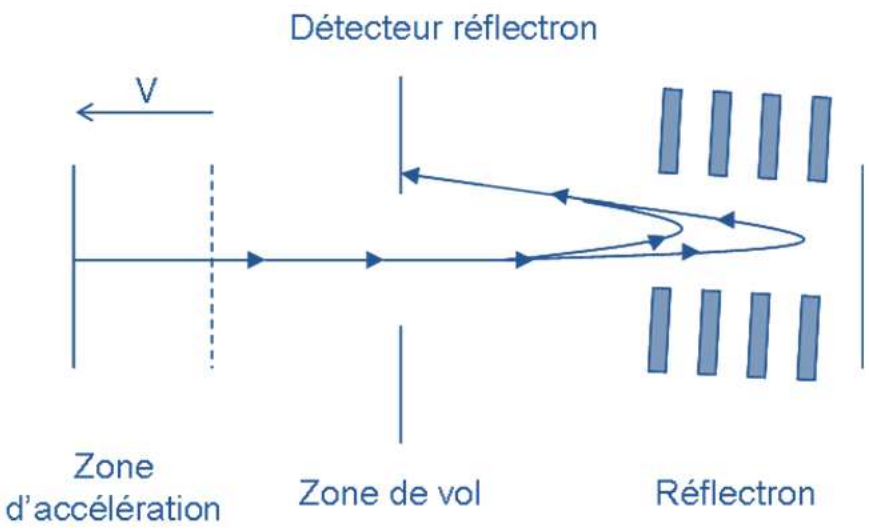



Figure 36 | Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron

**L'hybride quadripôle-temps de vol**

Le Q-TOF est un appareil hybride composé de deux analyseurs : un quadripôle couplé à un analyseur à temps de vol orienté perpendiculairement. Entre les deux analyseurs se trouve une cellule de collision, où règne une pression résiduelle de gaz (en général de l'argon) (Figure 37) [213], [214]. Le gros avantage de ce couplage entre un analyseur quadripolaire et un TOF est l'augmentation de sensibilité et de la résolution en un mode simple (MS) mais également la possibilité de réaliser de la fragmentation (MS/MS). En mode MS simple, le quadripôle laisse passer tous les ions vers le TOF, et aucune fragmentation n'est réalisée dans la cellule de collision. En mode MS/MS (mode fragmentation), les ions sont sélectionnés par le quadripôle puis sont accélérés et fragmentés dans la cellule de collision par chocs avec les molécules de gaz résiduelles.

### *2.3.4. Le détecteur*

Le détecteur permet le comptage des ions issus de l'analyseur et l'amplification du signal généré. Les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs d'électrons [211], [215]. À la sortie du TOF, les ions percutent la cathode du détecteur et entraîne l'émission d'électrons secondaires qui eux-mêmes viendront frapper une deuxième électrode, la dynode, provoquant une nouvelle émission d'électrons. La répétition de ce phénomène avec une succession de dynodes permet l'amplification du signal qui est par la suite acquis informatiquement [216]–[218]. Cette amplification permet d'accroître grandement la sensibilité de la détection.

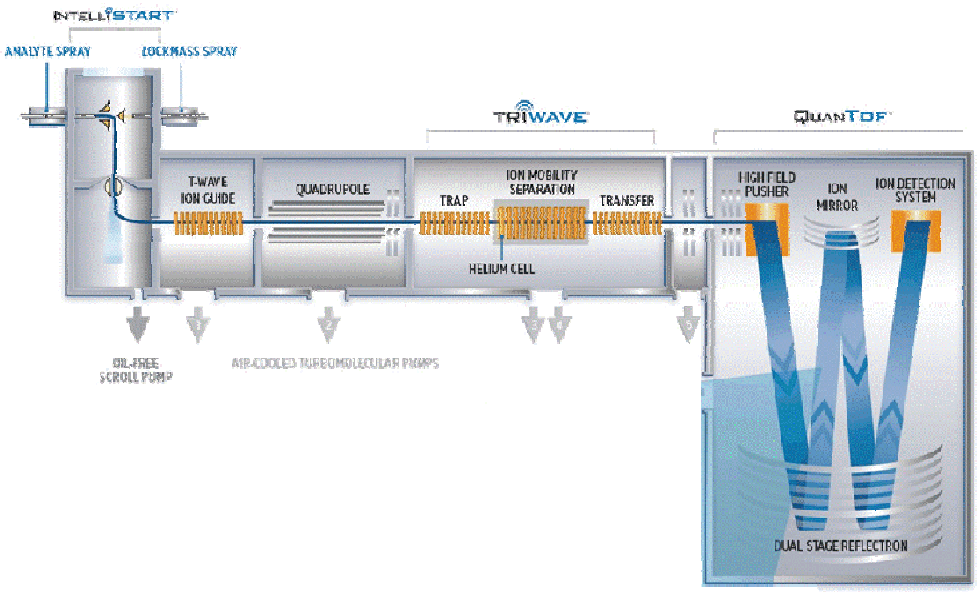



Figure 37|Schéma interne du SYNAPT G2 HDMS.

*Après ionisation par la source ESI, les analytes cheminent à travers le quadripôle où ils sont soumis à un champ électromagnétique alternatif bidimensionnel qui induit une trajectoire sinusoïdale plus ou moins stable. Les ions sont ainsi sélectionnés en fonction de la tension appliquée aux cylindres constituant le quadripôle et donc de la stabilité de leur trajectoire : en balayant l'ensemble des tensions, l'ensemble des ions parents peuvent traverser successivement l'analyseur et être détectés afin de reconstituer un spectre de masse.*

*À l'entrée du tube de vol, les ions sont accélérés grâce à une différence de potentiel et acquièrent une énergie cinétique : les ions se déplacent avec une vitesse dépendant de leur masse. La mesure de leur temps de trajet ou temps de vol permet de calculer la valeur du rapport m/z qui les caractérise. Toutefois, certains des ions appartenant à la même espèce ne sont pas accélérés uniformément. Pour pallier la diminution de résolution qui s'en suit, il a été développé des miroirs électrostatiques (réflectrons) ; plus l'énergie cinétique d'un ion d'une espèce est élevée plus il pénètre profondément dans le réflectron. L'ensemble des ions d'une même espèce sont réfléchis en même temps, ce qui corrige par refocalisation des ions la dispersion cinétique; la résolution s'en trouve donc améliorée.*

En raison de leur sensibilité, résolution et précision élevées, les analyseurs de type Q-TOF sont des analyseurs de choix dans les analyses *omics*. Un tel analyseur a été utilisé dans nos travaux d'analyses lipidomiques. En effet, nous avons travaillé avec un spectromètre de masse hybride quadripôle orthogonal à temps de vol (Synapt®-G2 High Definition MSTM, Waters, Manchester, Royaume-Uni) couplé à une chromatographie liquide haute performance à polarité de phase inversée (Acquity-UPLC®, Waters, Manchester, Royaume-Uni). Cet appareillage est communément abrévié CLHP-HRMS.

## 2.4.Design expérimental de l'analyse lipidomique

Lorsque l'on souhaite étudier le spectre lipidique d'un échantillon, on peut distinguer deux types d'approches selon le but recherché : l'analyse globale et l'analyse ciblée [219], [220].

L'analyse lipidomique globale est employée lorsqu'il s'agit d'établir sans *a priori* la composition lipidique d'un échantillon biologique. Toutes les espèces lipidiques détectables par l'analyseur sont alors recensées [220], [221]. Ce type d'approche permet de détecter sans quantifier un grand nombre d'espèces en une seule expérience. Les études lipidomiques globales sont qualitatives et permettent une première approche exhaustive du lipidome des échantillons [222]. L'analyse ciblée est employée pour l'étude de sous-classes homogènes de lipides [223], [224]. Les instruments de type Q-TOF ne sont pas les mieux adaptés pour cette approche, d'autres appareils tels que le triple quadripôle (QqQ) sont préférés.

### *2.4.1. Principes de l'expérimentation*

Dans nos travaux, nous avons réalisé une analyse lipidomique globale et une analyse lipidomique ciblée pour l'étude des gangliosides avec le même analyseur Q-TOF.

En analyse lipidomique, la méthodologie doit respecter un certain nombre de précautions. Aussi, divers contrôles sont utilisés : contrôles qualité, blancs d'extraction et mélanges de standards lipidiques. L'ordre d'injection des échantillons est également un paramètre important à prendre en compte.

Les **contrôles qualités** (QC) correspondent au mélange équivolumétrique des échantillons biologiques de l'expérimentation. Ces mélanges sont employés tels quels : QC 1/1, et dilués au tiers : QC 1/3 et au sixième : QC 1/6. Ces contrôles qualités permettent de conditionner la colonne chromatographique en début d'analyse (QC 1/1 utilisé), d'éliminer les signaux qui ne correspondent pas à des lipides d'intérêt (absence de relation linéaire entre intensité du signal et taux de dilution ; QC 1/1 ; 1/3 et 1/6 utilisés) et de corriger l'éventuelle baisse d'intensité en raison de l'encrassement de la source (QC 1/1 utilisé).

Les **blancs d'extraction** sont des aliquots d'eau pure traités strictement comme les échantillons biologiques de l'expérimentation. Ils permettent d'identifier des contaminants issus de l'extraction. Les analytes retrouvés dans les blancs d'extraction et les échantillons biologiques ne doivent donc pas être pris en compte lors du retraitement des analyses.

Les **mélanges de standards lipidiques** sont des mélanges de lipides représentatifs des différentes catégories de lipides. Le profil chromatographique de ces mélanges étant connu, ils permettent de s'assurer de la bonne réalisation de l'analyse, notamment la reproductibilité des temps de rétention. Ces mélanges standards sont également utilisés pour établir la relation entre le temps de rétention des lipides et leur ECN.

En raison du phénomène d'encrassement de la source d'ionisation l'intensité du signal tend à diminuer au cours de l'analyse [225]–[227]. Ainsi, les échantillons injectés en fin d'analyse peuvent avoir une intensité plus faible que ceux injectés au début. **L'ordre d'injection** peut ainsi

influencer les résultats. Pour limiter ce phénomène, les échantillons sont orthogonalisés et des QC sont injectés à intervalle régulier de manière à corriger l'intensité des échantillons en fonction de celle des QC.

### *2.4.2. L'obtention de la matrice de données*

**Le pré-traitement des données**

Les données d'une analyse LC-MS sont générées sous forme de chromatogrammes représentant l'intensité du courant ionique total (TIC) en fonction du temps de rétention ($t_R$) et sous forme de spectres de masses qui sont associés à un $t_R$ ou une gamme de $t_R$. A partir de ces données, un traitement informatique de l'ensemble des chromatogrammes et des spectres de masses des échantillons permet d'identifier les variables et de les caractériser sur la base de trois paramètres : le temps de rétention, le rapport *m/z* et l'intensité du signal. Dans notre travail, nous avons utilisé le logiciel XCMS qui traite les données en quatre étapes : filtration et détection des pics, appariement, correction des $t_R$ et intégration [228], [229] (Figure 38).

Figure 38 | Étapes du prétraitement des données LC-MS à l'aide du logiciel XCMS

La première étape du traitement informatique consiste à définir les régions dites *d'intérêt*. Une région d'intérêt correspond à un intervalle de m/z pour lesquels la déviation sur les spectres successifs est inférieure à l'erreur de mesure des *m/z* [201], [203] (Figure 39). Cette déviation est un paramètre défini par l'utilisateur selon les performances de l'appareil, il est en général de l'ordre de 10 à 30 ppm. Une transformée en ondelettes continues permet de constituer le pic chromatographique correspondant.

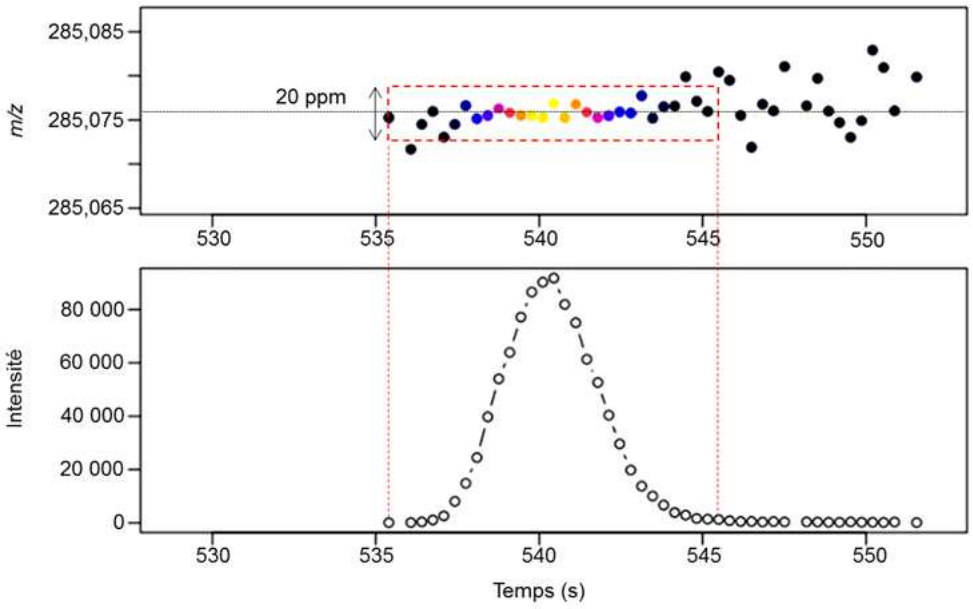



Figure 39 | Principe de la détection des régions d'intérêt

Lorsque tous les chromatogrammes ont été traités, les paramètres de chaque pic sont homogénéisés à travers tous les échantillons. Un algorithme permet de regrouper tous les pics correspondant à une même variable sur la base des $t_R$ et des *m/z* en tenant compte d'une fluctuation définie par l'utilisateur [231]. Ainsi, pour chaque variable, un intervalle de $t_R$ (minimum, médian, maximum) et un intervalle de m/z (minimum, médian, maximum) sont définis. Par ailleurs, dans la mesure où au cours de l'analyse, une légère déviation des $t_R$ peut être observée [229], un algorithme de XCMS réaligne les pics chromatographiques [232], [233]. Enfin, XCMS ne conserve pas les variables qui n'ont pas été retrouvées dans au moins 40 % des échantillons. Enfin, les variables détectées dans au moins 40 % des échantillons qui ont été appariées, et réalignées sont intégrées afin de déterminer leurs intensités dans chaque échantillon.

Le rendu des résultats est sous forme d'une matrice des intensités représentant l'ensemble des variables intégrées pour tous les échantillons. Les variables sont en lignes, les échantillons en colonnes et les intensités sont lues aux croisements.

**La normalisation des données**

De nombreux facteurs analytiques ou biologiques peuvent ajouter de la variabilité et ainsi diminuer la puissance des tests statistiques. Aussi, afin d'atténuer cette variabilité, des étapes de normalisations peuvent être employées.

La première source de variabilité analytique provient de l'encrassement de la source d'ionisation. L'intensité tend à diminuer tout au long de la session d'analyse. Pour corriger cette dérive, une **normalisation inter-échantillons** est effectuée grâce à l'injection d'un QC 1/1 régulièrement au cours de l'analyse. Différentes méthodes peuvent être utilisées, parmi elles, la

méthode de la régression linéaire ou la méthode de la régression locale (lowess, *low order non linear locally estimated smoothing*) qui lui est préférée [234], [235]. En régression linéaire, on considère que la décroissance du signal liée à l'encrassement de la source est linéaire, ce qui n'est pas exacte. Dans le cas de la régression locale, une régression polynomiale est appliquée entre chaque injection du QC 1/1. Une courbe de tendance de la fluctuation du signal du QC 1/1 est tracée en fonction de l'ordre d'injection.

Sur le plan biologique, les espèces peuvent être présentes dans des proportions très variables, avec plusieurs facteurs de 10 de différence. Les espèces les plus abondantes génèrent beaucoup de variabilité et peuvent réduire le poids statistique des espèces présentes en faibles concentrations. Afin de minimiser ces différences d'ordre de grandeur entre les abondances relatives des différents métabolites et de ne pas considérer les variables d'intensité élevée de manière excessive, une **normalisation intra-échantillon** est effectuée. Concrètement, les données sont normalisées en trois étapes : une transformation (*e.g.* logarithme décimal), un centrage et un redimensionnement (*e.g.* redimensionnement Pareto). Le redimensionnement de Pareto est généralement choisi car il permet de diminuer l'importance relative des variables d'intensité élevée et d'augmenter celle des variables moins intenses, tout en conservant la hiérarchisation des variables selon leurs intensités [236], [237].

**La filtration des données**

La filtration des données permet d'éliminer les variables n'ayant pas de signification physico-chimique. Ces variables sont caractérisées par un manque de répétabilité au cours des injections et par une absence de corrélation avec le taux de dilution. L'identification de ces variables non pertinentes peut reposer sur deux méthodes de filtration. Tout d'abord, les variables du QC 1/1 qui ont un coefficient de variation (CV) pour les intensités supérieures à un certain seuil sont éliminées. La valeur de ce seuil recommandé par l'autorité de régulation américaine FDA (*US Food and Drug Administration*) pour la recherche de biomarqueurs est de 30 % [238], [239]. La seconde méthode est d'évaluer le coefficient de corrélation (r) entre l'intensité du signal des variables et le taux de dilution des QC 1/1, 1/3 et 1/6. Les variables dont le coefficient de corrélation est inférieur à 0,7 ne sont pas corrélées avec la dilution et n'ont pas de signification pour l'analyse lipidomique. Elles sont donc éliminées de la matrice [225].

À l'issu de ces différentes étapes de prétraitement, de normalisation et de filtration, la matrice finale de données est prête pour les analyses statistiques. Le but de ces analyses est d'identifier des variables discriminantes entre les échantillons biologiques.

### 2.4.3. Les analyses statistiques

Les analyses de type *omics* génèrent un très grand nombre de variables. Ces jeux de données sont très complexes dans la mesure où certaines variables sont dépendantes entre elles, d'autres correspondent à du bruit de fond ou n'ont pas de réalité physico-chimique. L'enjeu est d'identifier parmi toutes ces variables, les plus pertinentes qui expliquent la discrimination des échantillons. On distingue deux principales approches pour traiter les données issues d'analyses *omics*. Les analyses univariées, qui considèrent que les variables sont indépendantes les unes des autres et les analyses multivariées qui considèrent l'ensemble des variables dans leur globalité en prenant en compte les interactions et les dépendances entre elles. En analyses statistiques multivariées, les comparaisons entre les classes se font variable par variable. Le test non paramétrique de Wilcoxon est préféré dans les analyses *omics* car aucune condition quant à la distribution des échantillons n'est requise [240]. Dans la mesure où des comparaisons multiples univariées sont effectuées il faut tenir compte de l'augmentation du risque, c'est-à-dire de trouver à tort une variable discriminante. Pour corriger ce risque, les *p-values* calculées sont ajustées par une correction FDR (*False Discovery Rate*) [241]. Les *p-values* corrigées, notées désormais *q-values*, estiment alors le taux de faux positifs à un risque α. Une variable avec une valeur de *q-value* inférieure au risque α de 5 % est alors considérée comme significativement différente entre les deux groupes d'échantillons. Les analyses statistiques multivariées permettent quant à elles d'explorer les variables en conservant leurs éventuelles interactions et dépendances. Ce type d'approche statistique est particulièrement intéressant en analyses lipidomiques puisqu'il permet de comparer les profils lipidiques d'échantillons biologiques pour identifier les métabolites discriminants. On distingue deux catégories d'analyses multivariées : les analyses supervisées sans *a priori* qui sont descriptives et les analyses non supervisées, avec *a priori* qui sont prédictives.

Les **analyses non supervisées** étudient la variabilité pour rechercher des groupes à l'intérieur d'un ensemble d'échantillons. Ces méthodes reposent sur une approche géométrique et utilisent des représentations graphiques. Ainsi, les regroupements d'échantillons sont évalués visuellement. Parmi les méthodes non supervisées, l'analyse en composantes principales PCA (*Principal Component Analysis*) est la plus utilisée. La PCA consiste à transformer des variables corrélées entre elles en nouvelles variables décorrélées les unes des autres. Ceci permet de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante. Ces nouvelles variables sont nommées composantes principales et correspondent à des combinaisons linéaires des variables initiales. Celles-ci décrivent les sources de variances entre les échantillons [242]. Les premières composantes représentent ainsi la direction de plus grande variation entre les échantillons. En général, on choisit deux composantes principales. Les échantillons sont projetés dans un espace à autant de dimensions que de composantes : le *score plot* (Figure 40). Les

variables peuvent également être projetées dans cet espace (*loading plot*) afin d'identifier celles à l'origine de la répartition des échantillons (Figure 40).

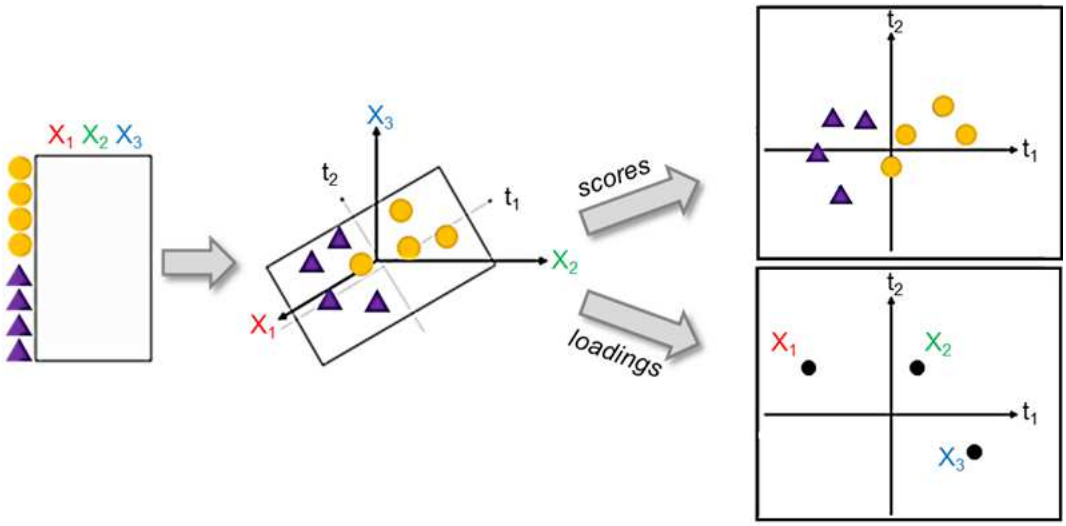



Figure 40 | Principe de construction et de représentation d'une analyse en composantes principales

Le choix du nombre de composantes conditionne la qualité du modèle statistique. Afin de déterminer ce nombre optimal, le degré d'ajustement du modèle aux données et son pouvoir prédictifs sont évalués. Ces deux facteurs peuvent être estimés par les valeurs des paramètres $R^2$ et $Q^2$ traduisant, respectivement, la part de variabilité expliquée et le pouvoir prédictif du modèle. Ces paramètres sont déterminés par une validation croisée : dans un premier temps, un modèle statistique est construit sur une partie des données et dans un second temps, ce modèle est utilisé pour prédire les données restantes qui seront comparées avec les valeurs réelles [243]. Ainsi, plus les valeurs de $R^2$ et $Q^2$ sont élevées et tendent vers 1, plus le modèle est explicatif et prédictif.

Les **analyses statistiques supervisées** considèrent les échantillons selon leur appartenance à une classe définie avec *a priori* par l'utilisateur. L'utilisateur construit une nouvelle matrice des classes à partir de la matrice de données en attribuant des classes d'appartenance aux échantillons [215], [217]. Par la suite, il devient possible d'extraire des variables discriminantes entre les groupes d'échantillons. L'objectif d'une étude lipidomique étant de discriminer différents groupes d'échantillons sur le profil lipidique, les analyses supervisées sont des méthodes incontournables.

La **régression des moindres carrés partiels, PLS-DA** (*Partial Least Squares/Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis*) est fondée sur la maximisation de la covariance entre la matrice de donnée X et la matrice des classes Y. Cet algorithme emprunte sa démarche à la fois à l'analyse en composantes principales (ACP) et à la régression. En pratique, la régression PLS-DA cherche des composantes liées à X et à Y, servant à exprimer la régression de Y sur ces variables et finalement de Y sur X dans le but d'obtenir de discriminer les classes d'appartenance [245], [246]. *In fine*, ce modèle permet de séparer les échantillons de façon optimale sur la base des variables contenues dans la matrice de données X. Comme en PCA, la PLS-DA repose sur des représentations graphiques : les échantillons sont visualisés sur un *score plot* et les variables sur un *loading plot*.

La validation du modèle en PLS-DA repose sur le même principe que celui utilisé pour la PCA. Les paramètres $R^2$ et $Q^2$ qui traduisent respectivement le caractère explicatif et prédictif du modèle généré sont calculés. Deux tests sont utilisés pour estimer la capacité prédictive du modèle statistique : le test du CV-ANOVA ainsi que le test de permutation. Le test de l'analyse de la variance des résidus prédictifs de la validation croisée CV-ANOVA (*Analysis Of Variance testing of Cross-Validated predictive residuals*) est un test permettant d'évaluer la significativité statistique du pouvoir prédictif du modèle [247]. Une *p-value* est associée à ce test, lorsqu'elle est inférieure au risque alpha (1 % ou 5 %), on considère que les échantillons n'appartiennent pas à la même classe et la significativité du modèle est validée. Un test de permutation peut également être effectué (Figure 41). Les classes des échantillons sont permutées de façon aléatoire et un modèle est généré pour chaque permutation (plusieurs centaines de permutations). Les paramètres $R^2$ et $Q^2$ sont recalculés pour chaque permutation et comparés aux valeurs du modèle évalué [247]. Ce modèle est validé si ses valeurs de $R^2$ et $Q^2$ sont supérieures à toutes celles calculées pour les modèles permutés [248].

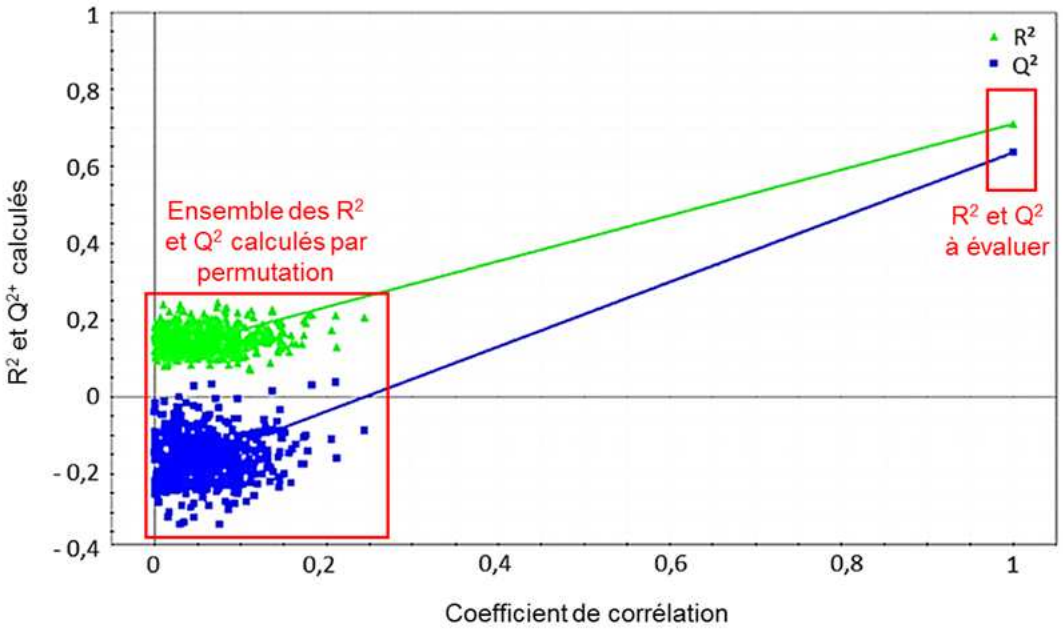



Figure 41 | Représentation graphique d'un test de permutation

Une variante de la PLS-DA a été développée, il s'agit de **la régression des moindres carrés partiels orthogonale OPLS-DA** (*Orthogonal PLS-DA*). La variabilité pertinente entre les échantillons est représentée par la première composante alors que la variabilité non liée à la discrimination des groupes d'échantillons est placée sur la seconde composante. Graphiquement, l'OPLS-DA est réalisée par rotation d'une représentation PLS-DA. Cette nouvelle approche simplifie l'interprétation des modèles et permet d'extraire plus facilement les variables discriminantes[249]. Ainsi, il est possible de générer un graphique *S-plot* représentant l'influence des variables sur la discrimination des échantillons (Figure 42). Il est ainsi possible d'identifier les variables les plus impliquées dans la séparation des groupes d'échantillons. A ce titre, le score VIP (*Variable Importance in the Projection*), reflète l'importance de chacune des variables dans la séparation des groupes [242]. Une variable est considérée comme participant significativement à la discrimination des classes si le score VIP est supérieur ou égal à 1.

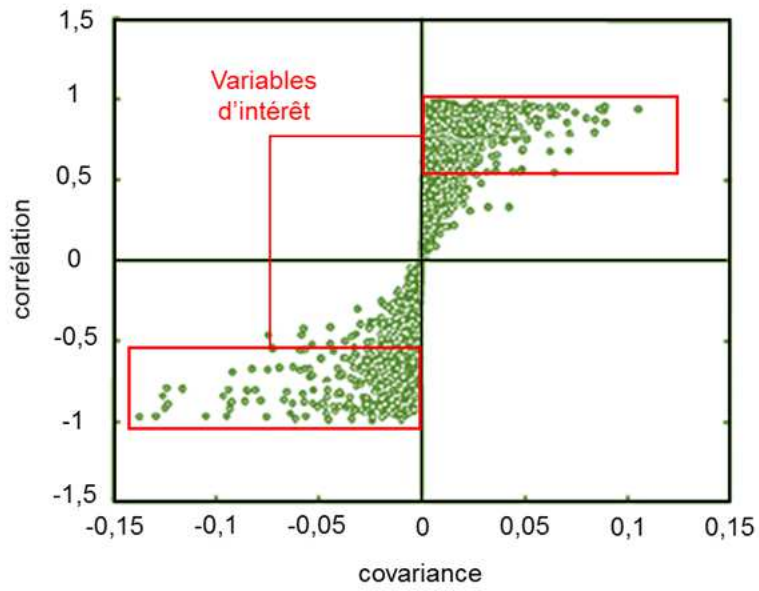



Figure 42 | Représentation S-plot d'un modèle généré en OPLS-DA

### *2.4.4. L'identification des lipides*

Les lipides sont identifiés à partir de leurs *m/z* et du $t_R$. Ces lipides sont caractérisés par leur sous-classe (TG, DG, PE, PS, etc.) et leur formule brute car la structure exacte des lipides ne peut se faire que par des études de fragmentation [250]. L'identification des lipides repose sur l'utilisation de bases de données en ligne telles que METLIN et LIPID MAPS à partir des m/z. Une tolérance de 5 à 10 ppm est en générale appliquée pour identifier les lipides sous forme d'adduits [251], [252]. Par la suite, ces variables annotées comme lipides sont confirmées ou infirmées selon la cohérence de leur temps de rétention. Dans la mesure où le $t_R$ d'un lipide et son ECN sont corrélés, un $t_R$ théorique est calculé et comparé au $t_R$ expérimental. On considère qu'un écart inférieur 15 % confirme le lipide.

# PARTIE EXPERIMENTALE

*Présentation des travaux :*
*étude LIPIDOXA et étude CANALOXA*

# ENONCE DE LA PROBLEMATIQUE

L'**oxaliplatine** est toujours un médicament anticancéreux de **référence dans le traitement des cancers gastro-intestinaux**. Cependant, son utilisation est limitée par le développement de neuropathies périphériques invalidantes dégradant la qualité de vie. Bien que la séméiologie soit bien connue, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont encore imparfaitement compris. De même, la gestion des effets indésirables neurologiques demeure mal maîtrisée.

L'objet de ce travail de thèse est de décrire la neuropathie induite par l'oxaliplatine et de rechercher des marqueurs biologiques de cette atteinte neurologique grâce à différentes approches : **clinique**, **électrochimique et lipidomique**. A cet effet, une étude clinico-biologique translationnelle, l'étude LIPIDOXA et une seconde étude clinique, l'étude CANALOXA ont été conduites à l'hôpital Paris Saint Joseph. Les enjeux finaux de ces deux travaux se rejoignent, il s'agit d'approfondir la **compréhension de la NPIO** et d'apporter de **nouveaux éléments quant à la prise en charge de ces effets indésirables**.

**L'étude clinique LIPIDOXA : étude de la neuropathie à l'oxaliplatine et recherche de biomarqueurs de nature lipidique.**

Il est désormais reconnu que les mécanismes physiopathologiques neurotoxiques sous-jacents de la NPIO sont multiples. Plusieurs hypothèses ont été proposées, parmi elles, l'hypothèse du stress oxydant et de la neuro-inflammation pourrait expliquer les lésions nerveuses et un certain nombre de manifestations neurophysiologiques observées sous traitement par oxaliplatine.

Le rôle du stress oxydant a été décrit par l'équipe du professeur Olivier Laprévote et du docteur France Massicot (Laboratoire de Chimie, Toxicologie Analytique et Cellulaire (C-TAC), faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes) [14]. Cette étude pré-clinique a mis en évidence *in vitro* sur des lignées cellulaires de neuroblastomes et de macrophages mais aussi sur des tissus nerveux de souris, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), une mitotoxicité et une apoptose après traitement du matériel biologique par oxaliplatine. Suite à ces résultats, il a été décidé en 2013 de rechercher et d'étudier ces manifestations biologiques chez l'homme. Dans ce but, nous avons réalisé une étude clinique pilote afin d'étudier l'altération du métabolisme des lipides dans la NPIO mais également le rôle du stress oxydant et de la neuro-inflammation chez une petite cohorte de patients en vue de concevoir une étude translationnelle clinico-biologique à plus grande échelle.

**Le premier objectif de cette étude pilote est d'évaluer et de quantifier la NPIO grâce à l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires validées dans le domaine de la recherche clinique sur les neuropathies.**

**Le second objectif de cette étude est d'identifier des marqueurs plasmatiques de NPIO par une approche lipidomique.**

**L'étude clinique CANALOXA : intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic de la NPIO.**

Le Sudoscan (Impeto Medical, Paris, France) est un dispositif médical employé pour détecter et suivre les neuropathies autonomes périphériques des patients diabétiques. Ce dispositif permet d'évaluer l'intégrité fonctionnelle des petites fibres nerveuses intraépidermiques de façon objective et non invasive. L'examen réalisé est rapide et simple à mettre en œuvre. Le résultat rendu au bout de trois minutes de mesure est facile à interpréter puisqu'il s'agit de deux valeurs numériques à comparer à une valeur seuil pathologique. Le résultat est donc clair et non ambigu : présence ou absence d'une neuropathie périphérique au niveau des membres supérieurs et/ou inférieur.

L'oxaliplatine est connu pour induire des lésions au niveau des petites fibres nerveuses intra-épidermiques, notamment les fibres C innervant les glandes sudoripares sécrétant des ions chlorures sous stimulation sympathique. Ces lésions neurologiques peuvent être objectivées par la mesure de la conductance aux ions chlorures de la sueur grâce au Sudoscan. Dans ce contexte, une équipe française a étudié l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic des neuropathies chimio-induites (oxaliplatine, paclitaxel)[1]. Aussi, **l'objectif de cette seconde étude est de déterminer l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic de la neuropathie induite par l'oxaliplatine**. La NPIO sera mesurée grâce à l'utilisation de deux outils complémentaires : l'administration d'un questionnaire de douleur neuropathique (NPSI) et la mesure de seuil thermique de sensibilité (thermotest). Les mesures obtenues avec le Sudoscan seront comparées aux mesures obtenues avec les techniques de référence.

# Chapitre IV : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche clinico-biologique

## 1. Méthodologie de l'étude clinique LIPIDOXA

### 1.1. Design de l'étude LIPIDOXA

L'étude LIPIDOXA est une étude ouverte prospective monocentrique (service d'oncologie de l'hôpital Paris Saint Joseph). Tous les patients du service d'oncologie candidats à une première cure d'oxaliplatine sont invités à participer à l'étude quel que soit leur type de cancer. Pour valider l'inclusion, un certain nombre de critères doivent être préalablement vérifiés. Tout d'abord, afin de ne pas interférer avec l'objectif premier, les patients ayant des neuropathies déjà déclarées ou ceux présentant des facteurs de risque de neuropathie (traitement préalable par cisplatine ou oxaliplatine, patients dépendants à l'alcool, patients diabétiques) ne sont pas inclus. Par ailleurs, les patients traités par des antalgiques indiqués dans le soulagement de la douleur neuropathique (carbamazépine, gabapentine, prégabaline, clomipramine, amitriptyline, imipramine, duloxétine) ou ceux traités par des molécules ayant prouvé leur efficacité dans la prophylaxie des douleurs neuropathiques induites à l'oxaliplatine (venlafaxine) ne sont également pas inclus. Enfin, les patients atteints de métastases cérébrales et ceux souffrant de troubles psychiatriques ne sont pas inclus (Tableau 4).

| **Critères d'inclusion** |
|---|
| Patient homme ou femme de plus de 18 ans et suivi dans le service d'oncologie. |
| Patient naïf de traitement par oxaliplatine. |
| Tout type de cancer traité par chimiothérapie à base d'oxaliplatine. |
| **Critères de non inclusion** |
| Patient présentant des métastases cérébrales ou leptoméningées. |
| Patient traité préalablement par du cisplatine. |
| Patient dépendant à l'alcool ou ayant de tels antécédents. |
| Patient diabétique présentant des troubles neurologiques périphériques. |
| Patient atteint de neuropathies. |
| Patient atteint de troubles psychiatriques. |
| Patient traité par au moins un des neurotropes suivants : venlafaxine, carbamazépine, gabapentine, prégabaline, clomipramine, amitriptyline, imipramine, duloxétine. |

Tableau 4| Critères d'éligibilité à l'essai clinique LIPIDOXA.

## 1.2. Réglementation de l'étude LIPIDOXA

L'étude LIPIDOXA consiste à pratiquer sur les patients des examens neurologiques en plus de ceux pratiqués dans le cadre des soins courants. Aussi, il s'agit d'un essai clinique selon la réglementation de la Recherche sur la Personne. Il est donc nécessaire d'obtenir les autorisations administratives pour la réaliser.

L'étude pilote LIPIDOXA ne change pas le traitement des patients mais la prise en charge des soins est quelque peu modifiée dans la mesure où des paramètres cliniques et biologiques sont mesurés. Aussi, l'étude pilote LIPIDOXA est classée comme une recherche interventionnelle en soins courants. Comme tout essai clinique, sa mise en œuvre nécessite une inscription auprès de l'ANSM, réalisée en ligne le 13 février 2014 (numéro ID RCB : 2014-A00262-45) et est soumise à autorisation d'un CPP. Par ailleurs, comme l'étude pilote LIPIDOXA nécessite un prélèvement de sang supplémentaire, une assurance est obligatoire. La compagnie d'assurances SHAM (Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles) a été choisie. Nous avons choisi de travailler avec le CPP Ile de France II. Le dossier de demande d'autorisation nécessite de produire un certain nombre de documents (lettre d'intention, le projet rédigé, lettre d'information au patient, document justifiant que l'étude est une recherche en soins courants, CV des investigateurs…). Nous avons également déclaré notre étude sur le site internet *clinicaltrials.gov* qui est une base de données internationale répertoriant les études cliniques publiques et privées menées dans le monde entier ainsi que leurs résultats. Cette inscription n'est pas obligatoire, mais elle est vivement recommandée, notamment pour faciliter la publication de résultats dans des journaux internationaux et garantir la qualité de sa réalisation. L'étude pilote LIPIDOXA est enregistrée sous le numéro NCT02169908.

Les patients inclus ont accepté d'être soumis à des tests de sensibilité thermique et de douleur validés et de répondre à un questionnaire validé de diagnostic des douleurs neuropathiques. Des prélèvements plasmatiques ont été effectués lors des soins habituels du patient : les patients n'ont pas subi d'acte de prélèvement de sang supplémentaire mais le volume de sang prélevé était cependant majoré de quatre millilitres. Les résultats des tests effectués au laboratoire d'analyses de l'Université Paris Descartes n'étaient pas utilisés pour la prise en charge médicale des patients participant à l'étude. Aucune base de données nominative n'a été élaborée, internet n'a pas été utilisé pour des échanges de données et les échantillons plasmatiques n'ont pas été conservés (aucune collection biologique élaborée).

Les patients du service d'oncologie traités par oxaliplatine ont été invités à participer à l'étude au cours d'une consultation après avoir reçu toutes les informations nécessaires de la part de leur oncologue. Les patients ont été informés que leur inclusion n'avait ni de conséquence sur

la nature des soins prodigués, ni d'influence sur l'efficacité de leur prise en charge. Il leur était par ailleurs précisé qu'ils pouvaient se retirer de l'étude à tout moment. A l'issue de cet entretien, la signature en deux exemplaires de la lettre d'information par le patient et l'oncologue permettait de valider l'accord du patient (Annexe 2). Un exemplaire était remis au patient, l'autre conservé par le Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph (GHPSJ) dans le classeur investigateur de LPIDOXA pilote.

## 1.3. Evaluation de la neuropathie induite par l'oxaliplatine

Pour concevoir la méthodologie de l'étude LIPIDOXA, nous nous sommes inspirés des méthodologies publiées. Nous avons identifié quatre principaux outils complémentaires pour explorer les différentes composantes de la NPIO.

1) Les **seuils de sensibilité thermique** ont été évalués grâce au dispositif **Thermotest** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède).
2) La **sensibilité tactile** a été évaluée grâce aux **filaments de Von Frey** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède).
3) La **douleur neuropathique** a été évaluée grâce au questionnaire **Neuropathic Pain Symptom Inventory** (NPSI).
4) La **neuropathie dans son ensemble** a été évaluée cliniquement par les oncologues grâce à l'échelle numérique **NCI-CTCAE**.

Des **protocoles détaillés ont été établis** pour chaque outil de mesure, spécifiant la séquence de mesure, le discours au patient et le contrôle de l'environnement (Annexe 3). Ces tests ont été effectués une fois par mois et ce, juste avant administration de l'oxaliplatine. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitant le dosage de marqueurs biochimiques, des prélèvements sanguins ont été effectués juste avant la perfusion d'oxaliplatine.

### *1.3.1. Evaluation de la sensibilité thermique*

La **sensibilité thermique** a été évaluée avec le **Thermotest** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède). Quatre seuils de sensibilité thermique ont été évalués à chaque visite en plaçant la thermode au niveau de l'éminence thénar :

**Seuil de détection du froid** (CDT, Cold Detection Threshold) : valeur de température la plus élevée à partir de laquelle le patient commence à ressentir une perception de froid.

**Seuil de détection du chaud** (WDT, Warm Detection Threshold) : valeur de température la plus basse à partir de laquelle le patient commence à ressentir une perception de chaud.

**Seuil de douleur au froid** (CPT, Cold Pain Threshold) : valeur de température la plus élevée à partir de laquelle le patient commence à ressentir une perception douloureuse lorsqu'il est soumis à un stimulus froid.

**Seuil de douleur au chaud** (HPT, Heat Pain Threshold) : valeur de température la plus basse à partir de laquelle le patient commence à ressentir une perception douloureuse lorsqu'il est soumis à un stimulus chaud.

Chaque examen d'évaluation d'un seuil constitue un test, l'ensemble de ces tests est appelé séquence. Les stimuli ont été répétés cinq fois de suite au sein de chaque test, un délai aléatoire de quatre à dix secondes était imposé entre chaque stimulus. Le caractère aléatoire permettait de s'affranchir d'un éventuel phénomène d'anticipation du stimulus par apprentissage du rythme de survenue des stimuli [253].

La valeur du seuil de détection du froid (CDT) était déterminée en premier [158]. Son évaluation reposait sur un abaissement régulier de la température de la thermode à partir de 32 °C et à une vitesse de 0,5 °C/s. Dès que le patient ressentait un changement de température de la thermode, il déclenchait un signal ayant pour effet le retour rapide à la température de base (1 °C/s). Ce stimulus était répété cinq fois de suite et seules les trois dernières valeurs étaient prises en compte pour le calcul de la moyenne et de l'écart-type. La valeur du seuil de détection du chaud (WDT) était déterminée de la même manière. Son évaluation reposait sur une élévation régulière de la température de la thermode à partir de 32 °C et à une vitesse de 0,5 °C/s. Dès que le patient ressentait un changement de température de la thermode, il déclenchait un signal ayant pour effet le retour rapide à la température de base (1 °C/s). Ce stimulus était répété cinq fois de suite et seules les trois dernières valeurs étaient prises en compte. Par la suite, les seuils de douleur au froid puis au chaud étaient déterminés. La température baissait à la vitesse de 1 °C/s ou s'élevait à la vitesse de 1 °C/s. Dès que le patient ressentait une douleur, il déclenchait un signal et la température de la thermode revenait à sa température basale à la vitesse de 3 °C/s. De même, ces stimuli étaient répétés cinq fois de suite et seules les trois dernières valeurs étaient prises en compte. Les paramètres de ces tests sont renseignés en Figure 43 et Figure 44.

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables, les **instructions** données aux **patients** ont été **standardisées** (Annexe 3). Les facteurs potentiels de distraction ont été minimisés. Le contact avec la thermode a été standardisé, en effet, la perception du stimulus dépend également de la pression appliquée sur la thermode. Certains opérateurs fixent la thermode à l'aide d'un élastique [253]. Dans notre étude, la thermode était posée sur l'accoudoir du fauteuil à côté du patient et la main était appliquée à plat sur la thermode sans pression, de

façon à recouvrir de façon homogène la surface métallique. Le patient n'était pas autorisé à regarder l'écran qui affichait en clair les paramètres du test et la température de la thermode.

Dans la mesure où les valeurs normales de seuils de sensibilité thermique ne font pas consensus, nous avons établi nos propres valeurs de référence [158]–[160].

| | |
|---|---|
| **Méthode d'évaluation** | Méthode des limites |
| **Température de base de la thermode** | 32 °C |
| **Délai entre deux stimuli d'un même test** | Délai aléatoire entre 4 et 10 secondes |
| **Nombre de stimuli par test** | Cinq stimuli, seules les trois dernières valeurs sont prises en compte |
| **Contact de la peau avec la thermode** | Thermode posée sur une table à côté du patient, la main est appliquée à plat sur la surface métallique de la thermode sans pression de façon à la recouvrir de façon homogène.<br>Le patient est confortablement installé, il ne peut pas voir l'écran qui affiche la température de la thermode. |
| **Séquence** | En unilatéral<br>1) Seuil de détection du froid<br>2) Seuil de détection du chaud<br>3) Seuil de douleur au froid<br>4) Seuil de douleur au chaud |

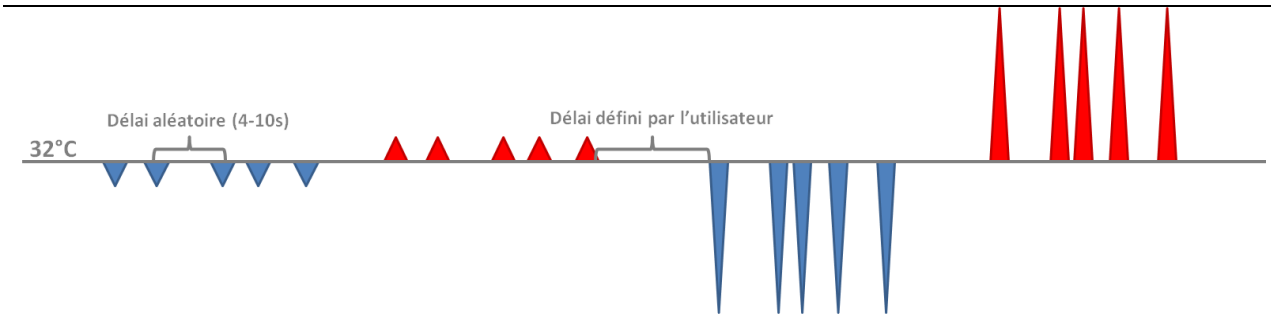



Figure 43 |Résumé des caractéristiques du test de mesure des sensibilités thermiques.

| | |
|---|---|
| **• Seuil de détection du froid (CDT)** | |
| Vitesse d'abaissement en température | -0,5 °C/s |
| Vitesse de retour à la température de base | +1 °C/s |
| **• Seuil de détection du chaud (WDT)** | |
| Vitesse d'élévation en température | +0,5 °C/s |
| Vitesse de retour à la température de base | -1 °C/s |
| **• Seuil de douleur au froid (CPT)** | |
| Vitesse d'abaissement en température | -1 °C/s |
| Vitesse de retour à la température de base | +3 °C/s |
| **• Seuil de douleur au chaud (HPT)** | |
| Vitesse d'abaissement en température | +1 °C/s |
| Vitesse de retour à la température de base | -3 °C/s |

Figure 44 | Configuration des mesures du Thermotest.

### *1.3.2. Evaluation de la sensibilité tactile statique*

Pour quantifier la **sensibilité tactile**, les **filaments de von Frey** ont été utilisés. Notre kit se compose de sept filaments de diamètres différents, chaque filament est donc défini par une valeur de pression nominale (Tableau 5).

La répartition des mécanorécepteurs est irrégulière, il en résulte ainsi une variabilité de réponse à la sensibilité au tact pour des stimuli appliqués dans une même zone. Les séries de mesures ont été répétées cinq fois et ont concerné le dos de la main. Les filaments ont été appliqués dans l'ordre décroissant de leur force et la valeur de la force nominale (en mN) du dernier filament perçu a été retenue pour chacune des cinq séries de mesure (avec les sept filaments). Le seuil de détection mécanique est ensuite déterminé en calculant le logarithme de la moyenne géométrique des cinq valeurs de force (Equation 1) [26], [254].

$$\text{MDT} = \log\left(\sqrt[5]{\left(\prod_{x=1}^{5} Fx\right)}\right)$$

Equation 1 | Formule utilisée pour calculer le seuil de détection mécanique

*Le seuil de détection mécanique correspond au logarithme de la moyenne géométrique des cinq valeurs de force (mN) du dernier filament perçu lors de la série de mesures avec les sept filaments.*

*MDT = Mechanical Detection Threshold, seuil de détection mécanique*

*Fx = valeur de la force nominale (en mN) du dernier filament perçu lors de chaque série de mesure*

Le test était réalisé dans une pièce au calme avec un minimum de distraction pour le sujet. Celui-ci était assis dans une position confortable et ne devait pas voir l'application des filaments sur la peau. Une mesure se déroulait ainsi : le monofilament de nylon était appliqué contre la peau à angle droit sur le dos de sa main. La pression augmentait doucement pendant 1,5 secondes jusqu'à ce que le filament de nylon ploie. Cette position était maintenue pendant 1,5 secondes, puis le dispositif était retiré doucement sur 1,5 secondes également. Il convenait de commencer le test par le filament le plus épais car il était toujours ressenti et servait ainsi d'exemple. Il permettait donc au patient de s'approprier le test et de comprendre quel type de stimulus il devait ressentir.

| **Couleur identifiant le filament** | Blanc | Marron | Orange | Bleu | Noir | Vert | Jaune |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Force nominale (mN)** | **0,63** | **1,37** | **3,14** | **16,7** | **50,0** | **81,4** | **235** |
| **Force nominale (g)** | **0,064** | **0,14** | **0,32** | **1,7** | **5,1** | **8,3** | **24** |
| Diamètre du filament (µm) | 128 | 153 | 177 | 306 | 403 | 409 | 508 |
| Longueur du filament (mm) | 40 | 40 | 42 | 42 | 43 | 33 | 30 |

Tableau 5 | Caractéristiques des filaments de Von Frey utilisés pour l'étude LIPIDOXA.

*Caractéristiques des sept filaments composant notre kit*
*Source : Somedic AB*

### *1.3.3. Evaluation de la douleur neuropathique*

Pour évaluer la **composante douloureuse de NPIO**, nous avons utilisé le questionnaire **Neuropathic Pain Symptom Inventory** (NPSI) (Annexe 4). Ce dernier a été développé pour caractériser la nature et l'intensité des douleurs neuropathiques. C'est un questionnaire largement utilisé dans ce domaine et validé [130]. C'est un outil fiable et reconnu qui a déjà fait l'objet d'études portant sur l'évaluation des douleurs neuropathiques induites par l'oxaliplatine [82]. Le score total sur 100 ainsi que les cinq sous-scores ont été relevés à chaque visite.

### *1.3.4. Evaluation globale de la neuropathie grâce au NCI-CTCAE*

Pour évaluer la NPIO des patients traités par chimiothérapie, les oncologues ont utilisé l'échelle Common Terminology Criteria for Adverse Events du National Cancer Institute (NCI-CTCAE) Version 4.0. Le grade de neurotoxicité a été évalué à chaque visite.

## 1.4. Evaluation des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation

### *1.4.1. Rationnel de la recherche de marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation*

L'étude LIPIDOXA fait suite aux travaux menés par le laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire de l'Université Paris Descartes (CNRS - UMR 8638) s'intéressant à l'effet de l'oxaliplatine sur des cultures cellulaires de neuroblastomes (lignée cellulaire SH-SY5Y) et de macrophages (lignée cellulaire RAW 264.7) ainsi que de tissus nerveux de souris traitées. Sur ce matériel biologique traité par oxaliplatine, des phénomènes de stress oxydant ont été mis en évidence à travers l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ainsi que la peroxydation lipidique. De plus, il a également été observé une activation du récepteur $P2X_7$ dépendant de la concentration d'oxaliplatine, associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'interleukine 6 ainsi que la libération de prostaglandines E2 (PGE2). Dans la suite de ces travaux, les évolutions au cours du traitement du niveau de stress oxydant, ainsi que les concentrations en cytokine pro-inflammatoire IL6 et en prostaglandines E2 ont été mesurées dans les échantillons de plasma des patients de l'étude LIPIDOXA.

### *1.4.2. Évaluation du niveau de stress oxydant*

L'évaluation du niveau de stress oxydant est basée sur la mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), plus particulièrement de **peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$**. Cette production d'$H_2O_2$ est détectée par spectrofluorescence moléculaire en utilisant le 2',7'-diacétate de dichlorodihydrofluorescéine (H2DCF-DA) comme sonde fluorescente (Figure 45). En pratique, chaque échantillon de plasma a été placé, en duplicats, dans une plaque de 96 puits et additionné de 100 µL d'une solution de H2DCF-DA diluée dans du tampon PBS (concentration finale de 1,58 µg/mL). Après 20 minutes d'agitation à l'abri de la lumière, le niveau de stress oxydant est évalué par la mesure de la fluorescence (λex = 485 nm, λem = 535 nm) à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFIRE (TECAN, Suisse).

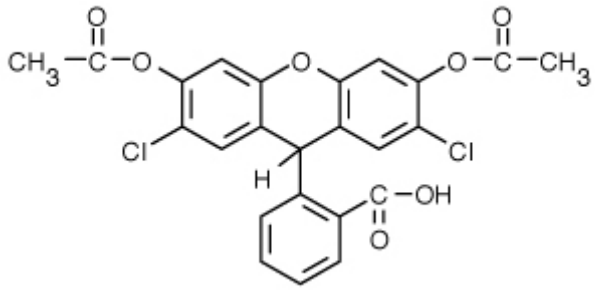



Figure 45 | Formule du 2',7'-diacétate de dichlorodihydrofluorescéine, sonde fluorescente utilisée dans la détection d'espèces réactives de l'oxygène.

*Le 2',7'-diacétate de dichlorodihydrofluorescéine est hydrolysé par des estérases permettant à la molécule de fluorescer lorsqu'elle est oxydée par des espèces réactives de l'oxygène, en particulier le peroxyde d'hydrogène.*

### *1.4.3. - Dosage de l'interleukine 6*

Les taux plasmatiques d'interleukine 6 (IL6) ont été mesurés à l'aide d'un test ELISA (R&D Systems™, Minneapolis, Etats-Unis). A cette fin, une gamme d'étalonnage (3,13 pg/mL à 100 pg/mL) a été constituée à partir d'une solution standard d'IL6. En pratique, 100 µL de chaque échantillon ont été déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits coatée par un anticorps anti-IL6 puis incubés pendant deux heures. Les puits sont par la suite additionnés de 200 µL d'une solution contenant l'anticorps conjugué anti-IL6 puis le tout est mis à incubé pendant deux heures. Enfin, 200 µL d'une solution-substrat ont été ajoutés. Après 20 minutes d'incubation, la réaction a été interrompue par addition d'une solution-stop (50 µL). La concentration d'IL6 est déterminée par mesure de l'absorbance (λ = 450 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre SAFIRE (TECAN, Suisse).

### *1.4.4. Dosage de la prostaglandine $E_2$*

Le taux plasmatique de prostaglandine $E_2$ ($PGE_2$) a été évalué à l'aide d'un test ELISA (Abcam®, Cambridge, Royaume-Uni). A cette fin, une gamme d'étalonnage (7,81 à 250 pg/mL) a été constituée à partir d'une solution standard de $PGE_2$. Chaque échantillon a été placé dans un puits (plaque de 96 puits) et additionné de 50 µL d'anticorps conjugué anti-$PGE_2$. Après 120 minutes d'agitation, 200 µL d'une solution-substrat ont été ajoutés. Après une heure supplémentaire d'incubation, la réaction a été interrompue par addition d'une solution-stop (50 µL). La concentration en $PGE_2$ a été déterminée par mesure de l'absorbance (λ = 405nm) à l'aide d'un spectrophotomètre SAFIRE (TECAN, Suisse).

### *1.4.5. Evaluation de l'activation du récepteur $P2X_7$*

Afin d'évaluer la faisabilité de l'étude du récepteur $P2X_7$ chez le patient traité par oxaliplatine pour une éventuelle étude future, il a été décidé, au cours de l'étude LIPIDOXA d'isoler et de conserver, chez quelques patients de l'étude, les cellules mononucléées du sang (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell). Le but de ce travail annexe était de mettre au point la méthode et de tester l'intérêt d'étudier ce paramètre chez les patients traités par oxaliplatine.

La méthode mise au point pour isoler les PBMC s'est inspirée de celle publiée par Fuss *et al* [255]. Le prélèvement de sang ainsi autorisé dans l'étude LIPIDOXA est de 4 mL. Ce prélèvement est destiné à l'étude plasmatique de certains marqueurs biochimiques ainsi que des lipides. Aussi, dès le prélèvement, et pour les derniers patients de l'étude, le sang total a été immédiatement séparé en deux fractions : plasma (aliquoté et conservé sur place immédiatement à -80 °C avec les autres échantillons de l'étude) et les éléments figurés. Cette dernière fraction, qui contient les PBMC, a été transférée de l'hôpital Saint Joseph au laboratoire C-TAC pour y être traitée sur place. Ce volume d'environ 2 mL est dilué au ½ dans du tampon PBS puis le tout est transféré dans un tube contenant 4,5 mL de Ficoll. Le dépôt de la suspension de cellules est réalisé de façon très douce afin de ne pas mélanger les deux phases, à ce stade, la suspension de cellules se situe au-dessus de la solution de Ficoll (Figure 46). Par la suite, le tout est mis à centrifuger à la vitesse 2 000 tours/min à une température de 20 °C pendant 20 min et sans frein. A l'issue de cette étape, le sang a été fractionné et les PBMC ont été récupérées en prélevant l'anneau blanchâtre à l'interface Ficoll/PBS. Les PBMC sont par la suite lavés par du PBS (15 mL) afin d'éliminer les éventuelles traces de Ficoll. Cette suspension est centrifugée à 1 200 tours/min à une température de 20 °C pendant cinq min (avec frein). Le culot de PMBC est enfin suspendu dans 1,5 mL d'une solution contant 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) puis congelé.

Cinq échantillons de sang de patients de l'étude (patients 25, 26, 29, 32 et 35, correspondant à des t12) ainsi qu'un échantillon de sang de volontaire sain ont été utilisés pour réaliser ce travail annexe.

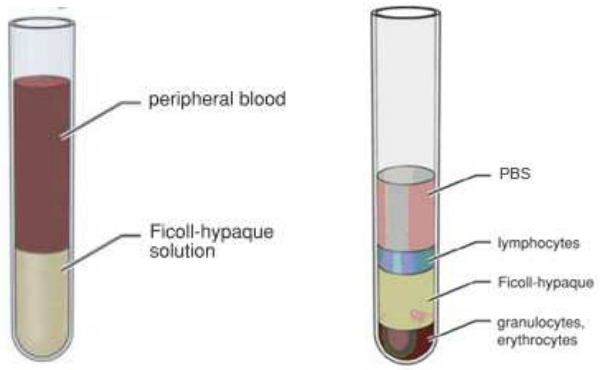



Figure 46 | Principe de l'isolement des cellules mononuclées du sang par gradient de Ficoll

*Le sang total prélevé chez les patients est séparé en deux fractions : plasma et éléments figurés. Cette dernière fraction est diluée au ½ dans du PBS et déposée sur une solution de Ficoll. Le tout est mis à centrifuger à la vitesse 2 000 tours/min à une température de 20 °C pendant 20 min et sans frein. A l'issue de cette étape, quatre fractions distinctes apparaissent : le PBS en surnageant, puis un anneau de PBMC à l'interface PBS/Ficoll et enfin un culot de globules rouges.*

*Adapté de Fuss et al.*

Le dosage de l'activation du récepteur $P2X_7$ est réalisé directement sur cellules intactes en utilisant la sonde YO-PRO-1 (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). La sonde YO-PRO-1 est une sonde ADN habituellement utilisée pour discriminer la mort cellulaire par apoptose de la mort cellulaire par nécrose [256], [257]. La sonde YO-PRO-1 pénètre dans les cellules apoptotiques après la formation de pores induite par l'activation du récepteur $P2X_7$. Les mesures d'activation du récepteur $P2X_7$ ont été réalisées en utilisant la cytofluorométrie sur microplaques qui permet l'utilisation de sondes fluorescentes directement sur des cellules vivantes. En pratique, 90 µL de suspension de PBMC ont été mises à incuber 10 minutes à l'abri de la lumière avec 200 µL de solution de YO-PRO-1 à 2 µM diluée dans du PBS. Par la suite, le signal de fluorescence a été détecté à $\lambda_{exc}$ = 491 nm et $\lambda_{em}$ = 509 nm. Par ailleurs, dans la mesure où la quantité de cellules déposées dans les puits n'a pas été uniformisée par comptage en cellules de Malassez, les protéines ont été dosées pour normaliser les résultats de dosage de l'activation du récepteur $P2X_7$. Les protéines ont été dosées en utilisant la méthode de dosage colorimétrique par l'acide bicinchonique. L'absorbance lue à 562 nm au spectrophotomètre SAFIRE est proportionnelle à la concentration en protéines. Une droite d'étalonnage a été réalisée.

### *1.4.6. Analyses statistiques*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sd. Les comparaisons des moyennes sont basées sur des tests non paramétriques : Kruskal-Wallis et Wilcoxon-Mann-Whitney. Les effets de variables catégorielles (sexe, temps – t0, t3, t6, t12 –, grade de neuropathie…) sur les variables continues quantitatives (niveau de stress oxydant, concentrations en IL6 et $PGE_2$) ont été évalués par des

tests de régressions logistiques. Le risque d'erreur de première espèce consenti pour l'ensemble des tests est de 5 % (seuil de significativité : $p < 0,05$). Le logiciel R (version 64 bits 3.4.1) a été utilisé pour réaliser les tests statistiques.

## 2. Description de la population de l'étude LIPIDOXA

De mai 2014 à juin 2015, **35 patients** ont été inclus (16 femmes et 19 hommes). Les caractéristiques des patients sont présentées dans le Tableau 6. L'âge moyen est de 66,3 ans ± 10,7 ans (46-89 ans). La plupart des patients souffraient de cancers colorectaux (n = 19 ; 54 %) et étaient au stade métastatique (stade IV) (n = 20 ; 57 %).

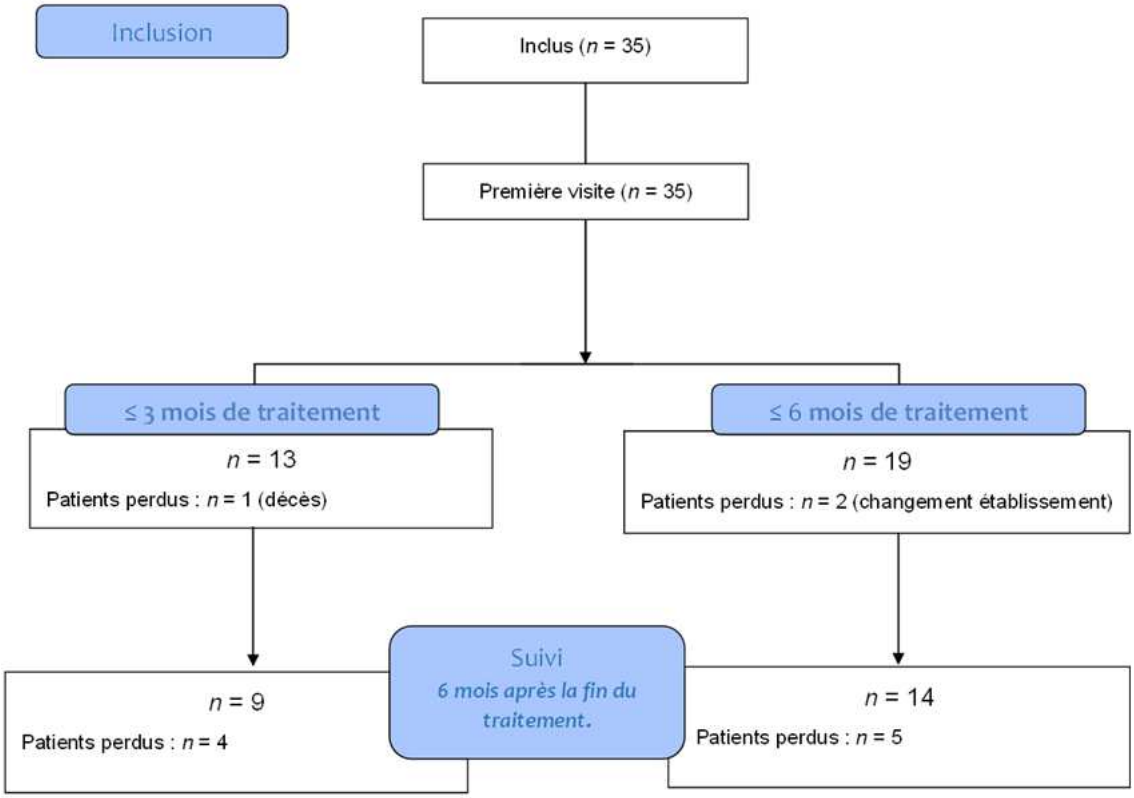



Figure 47| Evolution de l'effectif de la population dans l'étude.

Sur les 35 patients, 13 ont reçu de l'oxaliplatine pendant une période d'au plus trois mois, 19 ont reçu de l'oxaliplatine pendant une période comprise entre trois et six mois (Figure 47). Un patient est décédé et deux autres patients ont déménagé en cours de traitement. A la visite de suivi (environ six mois après la fin du traitement), 23 patients ont été mesurés, soit un total de neuf patients perdus entre la fin du traitement et la visite de suivi.

| | n | *(%)* |
|---|---|---|
| **Genre** | | |
| Femme | 16 | *(46)* |
| Homme | 19 | *(54)* |
| **Age (années)** | | |
| <60 | 8 | *(23)* |
| [60– 66[ | 8 | *(23)* |
| [67-73[ | 10 | *(28)* |
| ≥73 | 9 | *(26)* |
| **Localisation de la tumeur** | | |
| Colon | 14 | *(40)* |
| Duodénum | 1 | *(3)* |
| Estomac | 7 | *(20)* |
| Foie | 1 | *(3)* |
| Ovaire | 1 | *(3)* |
| Pancréas | 6 | *(17)* |
| Rectum | 5 | *(14)* |
| **Stade du cancer** | | |
| I | 3 | *(9)* |
| II | 5 | *(14)* |
| III | 7 | *(20)* |
| IV | 20 | *(57)* |
| **Protocole de chimiothérapie** | | |
| FOLFOX | 29 | *(82)* |
| FOLFIRINOX | 3 | *(9)* |
| EOX | 1 | *(3)* |
| XELOX | 1 | *(3)* |
| GEMOX | 1 | *(3)* |

Tableau 6| Caractéristiques de la population de l'étude LIPIDOXA

A chaque cycle, les oncologues évaluaient la tolérance neurologique au traitement selon l'échelle NCI-CTCAE. Le grade 0 correspond à une absence d'effets indésirables, le grade 1 à des effets indésirables légers de type paresthésies réversibles, le grade 2 à des effets indésirables limitant les activités de la vie courante. Nous nous sommes intéressés au **grade de neuropathie** mesuré **six mois** après le début du traitement (Figure 48). A ce stade, trois patients avaient été perdus (un décès et deux changements d'établissement), ce qui faisait un total de 32 patients analysables. La plupart des patients avaient une neurotoxicité de grade 1 (n = 23), trois n'avaient pas de neuropathie objectivable cliniquement et six avaient une neuropathie invalidante de grade 2. Il n'a **pas** été mis en évidence **de relation positive entre l'intensité de la NPIO et la dose cumulée d'oxaliplatine reçue** contrairement à ce qui est décrit dans la littérature [258]. En effet,

les patients souffrant d'une **neuropathie de grade 2** avaient **reçu** en moyenne **moins d'oxaliplatine** que ceux souffrant d'une **neuropathie de grade 1** (950 mg contre 1350 mg respectivement, $p$ = 0,03 ; test non paramétrique de Wilcoxon). De même, les trois patients ne souffrant pas de neuropathie avaient reçu en moyenne moins d'oxaliplatine que ceux souffrant d'une neuropathie de grade 1 (485 mg contre 950 mg respectivement, $p$ = 0,001 ; test non paramétrique de Wilcoxon).

Il convient de noter que cette évaluation par le NCI-CTCAE tient compte à la fois de la neuropathie aiguë et chronique.

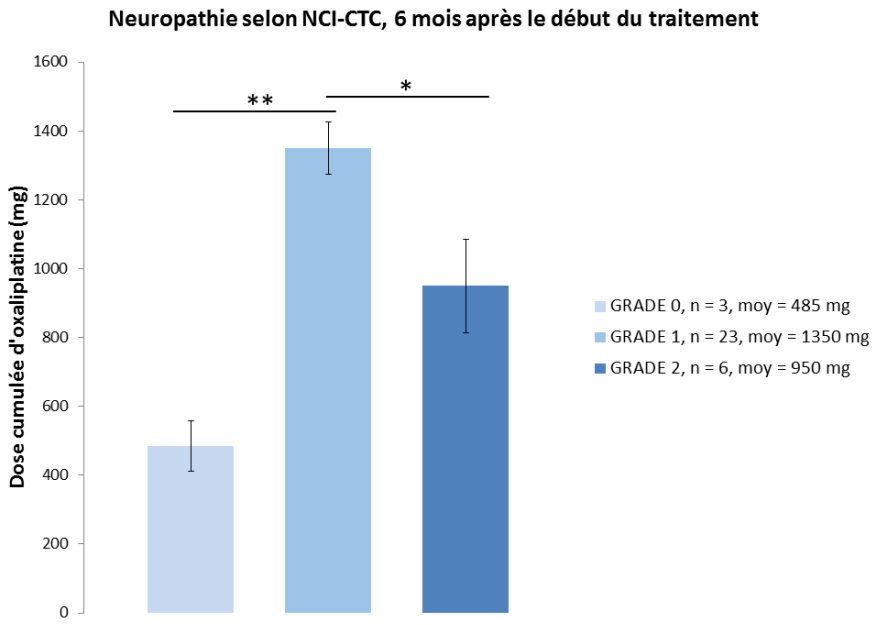



Figure 48| Moyennes des doses cumulées d'oxaliplatine selon le grade de neuropathie à 6 mois.

*La neuropathie est évaluée selon l'échelle NCI-CTCAE, 6 mois après le début du traitement.*

Afin d'étudier la **relation entre les différentes variables descriptives** de la population (grade de neuropathie, modification posologique, genre, stade du cancer, âge, IMC), des tests d'indépendance du $\chi^2$ ou, à défaut, des **tests exacts de Fisher** ont été réalisés avec le logiciel R (version 3.2.0). La population d'étude choisie est la population à six mois après le début du traitement (n = 32 patients). Les tableaux de contingence ont été dressés, les valeurs théoriques ont été notées entre parenthèses à côté des valeurs observées.

Dans un premier temps, la relation entre le grade de neuropathie (échelle NCI-CTCAE) et la modification posologique en cours de traitement a été étudiée (Tableau 7). Les deux variables qualitatives d'intérêt ont chacune été divisées en trois classes : grades 0 ; 1 ; 2 d'une part et,

d'autre part, adaptation posologique avant le cycle 6 ; strictement après le cycle 6 ; pas de modification. Les deux variables ne sont pas indépendantes, il existe un **lien entre le grade de neuropathie et la notion de modification de traitement (*p* = 0,028).** Le nombre de patients souffrant d'une neuropathie de grade 2 est statistiquement plus élevé dans le groupe *adaptation posologique avant le cycle 6*. Inversement, dans le groupe *pas d'adaptation posologique*, aucun patient ne souffre de neuropathie de grade 2. Ce résultat vient conforter le résultat précédent, les patients souffrant de grade 2 ont reçu moins d'oxaliplatine car ils ont subi une diminution de leur posologie plus précocement.

| Adaptation posologique / Grade (NCI-CTC) | Avant C6 ou à C6 | Strictement après C6 | Sans objet |
|---|---|---|---|
| Grade 0 | 0 (0,8) | 0 (0,8) | 3 (1,3) |
| Grade 1 | 5 (6,5) | 7(6,5) | 11 (10) |
| Grade 2 | **4 (1,7)** | 2 (1,7) | **0 (2,6)** |

Tableau 7 | Contingence croisant l'adaptation posologique avec le grade de NPIO.

*Cette présentation des données permet d'estimer la dépendance entre la variable 'adaptation posologique' et la variable 'grade de neuropathie selon l'échelle NCI-CTCAE'. Les deux variables ne sont pas indépendantes, il existe un lien entre le délai d'adaptation posologique et le grade de neuropathie à 6 mois, p = 0,028.*

*Les valeurs théoriques sous l'hypothèse nulle sont notées entre parenthèses.*

Dans un second temps, les relations entre les variables stade du cancer et neuropathie (grade NCI-CTCAE ou notion de modification de dose) ont été étudiées (Tableau 8). Ces deux variables ne sont pas indépendantes. Il existe un **lien entre le grade de neuropathie et le grade du cancer (*p* = 0,029).** Le nombre de patients souffrant d'une neuropathie de grade 2 est statistiquement plus élevé dans le groupe *cancer de grade III*. Inversement, dans le groupe *cancer de grade I ou II*, aucun patient ne souffre de neuropathie de grade 2. Il convient de préciser que les trois groupes (grade I et II : m = 1384 mg ; grade III : m = 1143 mg ; garde IV : m = 1055 mg) ont reçu en moyenne des doses cumulées d'oxaliplatine non statistiquement différentes entre elles (test ANOVA, $p > 0,05$).

| Neuropathie / Stade du cancer | Grade selon NCI-CTC | | | Adaptation posologique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | ≤ C6 | > C6 | Sans objet |
| I ou II | 0 (0,8) | 8 (5,8) | **0 (1,5)** | 1 (2) | 3 (2) | 3 (2,9) |
| III | 0 (0,7) | 3 (5) | **4 (1,3)** | 3 (2) | 3 (2) | 1 (2,9) |
| IV | 3 (1,6) | 12 (12,2) | 2 (3,2) | 5 (4,9) | 3 (4,9) | 9 (7,1) |

Tableau 8 | Contingence croisant le stade du cancer avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part.

*Il existe un lien entre le stade du cancer et le grade de neuropathie à 6 mois, les deux variables ne sont pas indépendantes, p = 0,029.*

*Il n'y a pas de lien entre le stade du cancer et le délai d'adaptation posologique, les deux variables sont indépendantes p = 0,3.*

*Les valeurs théoriques sous l'hypothèse nulle sont notées entre parenthèses.*

Enfin, les relations entre les variables genre, âge, IMC et la neuropathie (grade NCI-CTCAE ou notion de modification de dose) ont été étudiées (Tableau 9, Tableau 10 et Tableau 11). Il **n'y a pas de lien entre la neuropathie et le genre, l'âge, l'IMC (*p > 0,05*).**

| Neuropathie / Age | Grade selon NCI-CTC | | | Adaptation posologique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | ≤ C6 | > C6 | Sans objet |
| ≤ 57 ans | 0 (0,7) | 6 (5,7) | 2 (1,5) | 5 (2,2) | 1 (2,2) | 2 (3,5) |
| ≤ 67 ans | 1 (0,8) | 7 (6,5) | 1 (1,7) | 3 (2,5) | 2 (2,5) | 4 (3,9) |
| ≤ 72 ans | 1 (0,7) | 5 (5) | 1 (1,3) | 0 (2) | 3 (2) | 4 (3,1) |
| > 72 ans | 1 (0,8) | 5 (5,8) | 2 (1,5) | 1 (2,3) | 3 (2,2) | 4 (3,5) |

Tableau 9 | Contingence croisant l'âge avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part.

*Il n'y a pas de lien entre l'âge et le grade de neuropathie à 6 mois, les deux variables sont indépendantes p = 0,93.*

*Il n'y a pas de lien entre l'âge et le délai d'adaptation posologique, les deux variables sont indépendantes p = 0,19.*

*Les valeurs théoriques sous l'hypothèse nulle sont notées entre parenthèses.*

| IMC \ Neuropathie | Grade selon NCI-CTC | | | Adaptation posologique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | ≤ C6 | > C6 | Sans objet |
| < 19 | 1 (0,6) | 2 (4,3) | 3 (1,1) | 3 (1,7) | 2 (1,7) | 1 (2,5) |
| [19 – 25] | 2 (1,7) | 15 (12,9) | 1 (3,4) | 4 (4,9) | 5 (4,9) | 8 (7,1) |
| > 25 | 0 (0,7) | 6 (5,8) | 2 (1,5) | 2 (2,3) | 2 (2,3) | 4 (3,3) |

Tableau 10 | Contingence croisant l'IMC avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part.

*Il n'y a pas de lien entre l'IMC et le grade de neuropathie à 6 mois, les deux variables sont indépendantes p = 0,10.*

*Il n'y a pas de lien entre l'IMC et le délai d'adaptation posologique, les deux variables sont indépendantes p = 0,67.*

*Les valeurs théoriques sous l'hypothèse nulle sont notées entre parenthèses.*

| Genre \ Neuropathie | Grade selon NCI-CTC | | | Adaptation posologique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | ≤ C6 | > C6 | Sans objet |
| Femme | 1 (1,4) | 10 (10,8) | 4 (2,8) | 6 (4,2) | 3 (4,2) | 6 (6,6) |
| Homme | 2 (1,6) | 13 (12,2) | 2 (3,2) | 3 (4,8) | 6 (4,8) | 8 (7,4) |

Tableau 11 | Contingence croisant le genre avec le grade de NPIO d'une part et l'adaptation posologique d'autre part.

*Il n'y a pas de lien entre le genre et le grade de neuropathie à 6 mois, les deux variables sont indépendantes p = 0,53.*

*Il n'y a pas de lien entre le genre et le délai d'adaptation posologique, les deux variables sont indépendantes p = 0,44.*

*Les valeurs théoriques sous l'hypothèse nulle sont notées entre parenthèses.*

## 3. Evolution des seuils de sensibilité

Les résultats du travail présenté ci-après ont fait l'objet d'une publication au Journal *Cancer Treatment and Research Communications* (Annexe 10).

## 3.1.Evolution des seuils de détection thermique

Les seuils de sensibilité ont été mesurés à chaque visite grâce au thermotest (sensibilité thermique : CDT, WDT) et aux filaments de Von Frey (score numérique au test). Pour résumer les résultats, seules trois visites charnières ont été présentées : **la première visite** (avant mise sous traitement) qui fait office de référence (patients naïfs d'oxaliplatine), **la visite du dernier cycle du traitement** (visite où la neuropathie aiguë est *a priori* la plus intense) et enfin **la visite de suivi** (environ six mois après la fin du traitement) où les troubles neurologiques sont révélateurs d'une neuropathie chronique. Les seuils de détection (variation de température par rapport à 32 °C ou score numérique au test de Von Frey) sont présentés sous forme de moyenne +/- erreur type (SEM, standard error of the mean). Des **tests de Student appariés** ont été réalisés pour comparer les moyennes entre elles.

Les **seuils de détection thermique augmentent au cours du temps (Figure 49). En effet**, la moyenne des seuils de détection du froid (CDT) mesurés à la visite de suivi est supérieure (en valeur absolue) à la moyenne des CDT mesurés à la première visite (-3,7 °C vs -2,1 °C ; $p$ = 0,002). De même, la moyenne des seuils de détection du chaud (WDT) mesurés à la visite de suivi est supérieure à la moyenne des WDT mesurés à la première visite (3,6 °C vs 2,0 °C ; $p$ = 0,004). Il n'y a pas de différence significative entre la première visite et la fin du traitement pour CDT et WDT. Il en est de même pour la comparaison entre la fin du traitement et le suivi. La forte variabilité des mesures (écart-type élevé) explique le fait que les comparaisons intermédiaires n'aboutissent pas à des résultats significatifs.

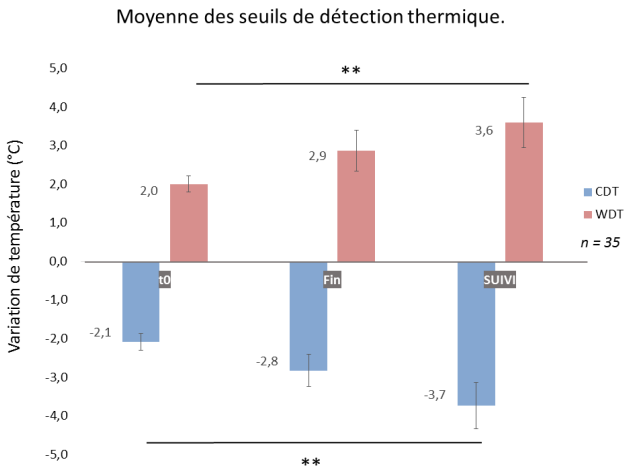



Figure 49| Evolution des seuils de détection thermique pour l'ensemble de la population de l'étude.

*Le CDT mesuré à la visite de suivi est supérieur au CDT mesuré en début de traitement, visite t0 (p = 0,002). De même, le WDT mesuré à la visite de suivi est supérieur au WDT mesuré en début de traitement (p = 0,004).*

*** p < 0,01*

Les mêmes comparaisons ont été effectuées en sous-groupes. Tout d'abord, les patients ayant reçu moins de trois mois de traitement ont été séparés de ceux qui ont reçu plus de trois mois (Figure 50). Aucune différence n'a été mise en évidence pour les moyennes de CDT et WDT entre les deux groupes quelle que soit la visite. En revanche, la moyenne des **CDT** mesurés à la visite de **suivi** (en valeur absolue) est supérieure à la moyenne des CDT mesurés à la **première visite** pour le groupe **traitement supérieur à trois mois** (-3,6 °C vs -1,8 °C ; *p* = 0,03). Pour ce même groupe, la moyenne des **WDT** mesurés à la visite de **suivi** est **supérieure** à la moyenne des **WDT** mesurés à la **première visite** (4,2 °C vs 1,8 °C ; *p* = 0,01).

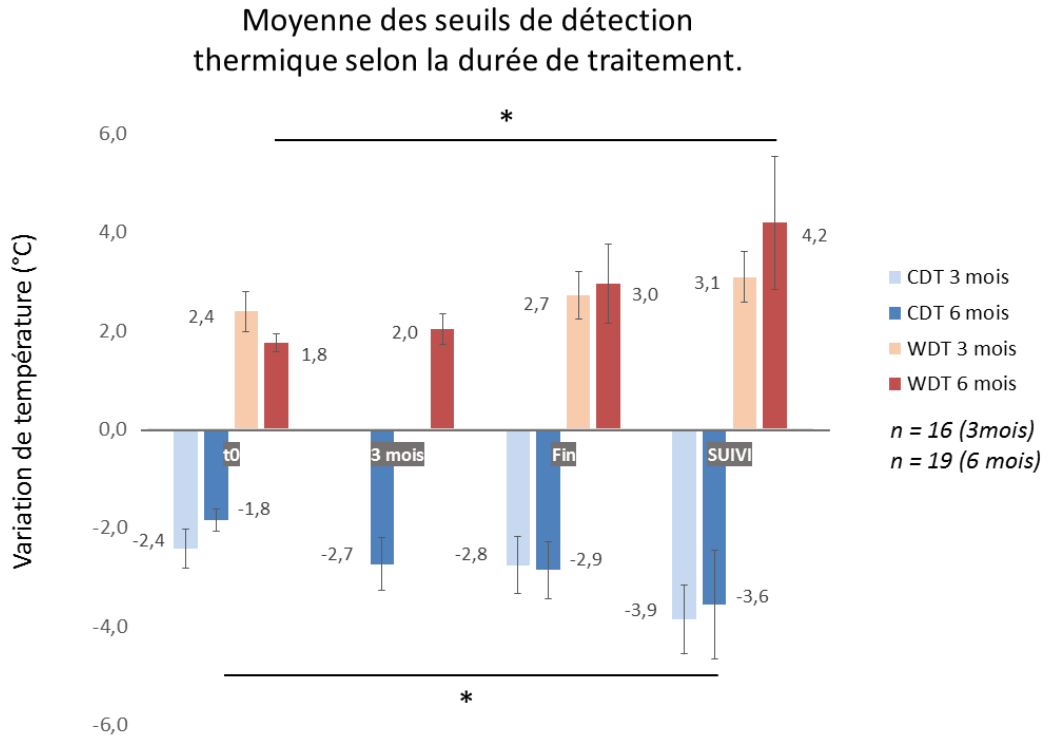



Figure 50| Evolution des seuils de détection thermique selon la durée du traitement.

*Pour le groupe traité pendant plus de 3 mois, le CDT mesuré à la visite de suivi est supérieur au CDT mesuré en début de traitement, visite t0 (p = 0,03). De même, le WDT mesuré à la visite de suivi est supérieur au WDT mesuré en début de traitement (p = 0,01). Cette différence n'a pas été mise en évidence chez le groupe traité moins de 3 mois.*

*Traitement inférieur à 3 mois, n = 16*
*Traitement supérieur à 3 mois, n = 19*

*CDT = Cold Detection Threshold ; WDT = Warm Detection Threshold*

** p < 0,05*

Dans un deuxième temps, les patients ayant développé une neuropathie de grade 1 à six mois (n = 23) sont séparés de ceux ayant développé une neuropathie de grade 2 (n = 6) (Figure 51). Par manque de données, les patients neuropathiques de grade 0 n'ont pas été inclus dans l'analyse (certaines visites étaient manquantes chez les trois patients neuropathiques de grade 0). Aucune différence n'a été mise en évidence pour les moyennes de CDT et WDT entre les deux groupes

quelle que soit la visite. En revanche, les moyennes des **CDT** mesurés aux visites de **fin de traitement** et de **suivi** sont **supérieures** à la moyenne des CDT mesurés à la **première visite** pour le groupe ***neuropathie de grade 1*** (-2,9 °C et -3,9 °C vs -1,9 °C ; *p* = 0,045 et *p* = 0,006 respectivement). De même, pour ce groupe, la moyenne des **WDT** mesurés à la visite de **suivi** est supérieure à la moyenne des **WDT** mesurés à la **première visite** (3,9 °C vs 1,7 °C ; *p* = 0,004). Aucune différence significative n'a été observée pour le groupe neuropathique de grade 2.

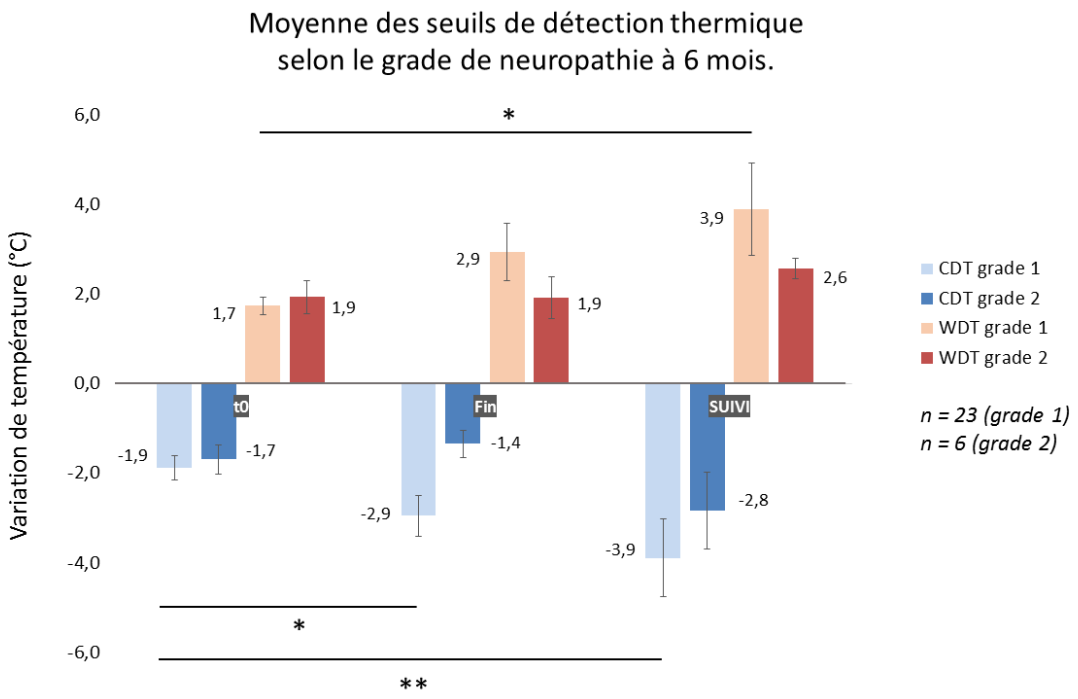



Figure 51| Evolution des seuils de détection thermique selon le grade de neuropathie.

*Pour le groupe neuropathie de grade 1, les CDT mesurés à la visite de fin et suivi sont supérieurs au CDT mesuré en début de traitement, visite t0 (p = 0,045 et p = 0,006, respectivement). De même, le WDT mesuré à la visite de suivi est supérieur au WDT mesuré en début de traitement (p = 0,004). Cette différence n'a pas été mise en évidence chez le groupe neuropathie de grade 2.*

*Neuropathie de grade 1, n = 23*
*Neuropathie de grade 2, n = 6*

*CDT = Cold Detection Threshold ; WDT = Warm Detection Threshold*

** p < 0,05 ** p < 0,01*

Avec un nombre de seulement six patients neuropathiques de grade 2, la puissance (1-β) est très faible et estimée à 0,12 pour la différence entre la visite de suivi et le début du traitement (en prenant une différence de 0,8 °C ; un écart-type de 1,7 °C et un risque α de 5 %). Le déséquilibre d'effectifs entre les groupes rend l'interprétation délicate. C'est pourquoi, dans un dernier temps, les patients ont été séparés en trois sous-groupes selon le délai d'adaptation de la dose de l'oxaliplatine : *modification de la dose avant/au cycle 6* (n = 9), *après le cycle 6* (n = 9) et *pas de modification* (n = 14) (Figure 52). Les trois groupes sont plus homogènes en termes d'effectifs.

Aucune différence n'a été mise en évidence pour les moyennes de CDT et WDT entre les deux groupes quelle que soit la visite. Cependant, la moyenne des **CDT** mesurés à la visite de **suivi** est **supérieure** à la moyenne des **CDT** mesurés en **début** (-5,1 °C vs -2,3 °C ; *p* = 0,005) pour le groupe *pas de modification posologique d'oxaliplatine*. En première analyse, les seuils de détection thermiques semblent d'autant plus faibles que le patient a subi un arrêt précoce dans le traitement. Un test de corrélation de Spearman est pratiqué afin d'étudier l'éventuelle corrélation entre le seuil de détection thermique mesuré au début du traitement et le risque de modifier le traitement pour neurotoxicité. Pour le CDT, la valeur de ρ obtenue est négative mais est très faible : ρ = - 0,33 pour une *p-value* de 0,065 ; concernant le WDT, la valeur de ρ est faiblement positive ρ = 0,27 pour une *p-value* de 0,13. En résumé, il n'existe pas de corrélation significative mais les valeurs de ρ sont cohérentes avec ce que l'on observe. A ce stade, on est en droit de se demander si les patients ayant des seuils plus faibles et donc une sensibilité plus élevée en début de traitement ne sont pas plus sujets à exprimer et/ou développer la NPIO ? Un effectif plus important permettrait d'étudier cet éventuel lien.

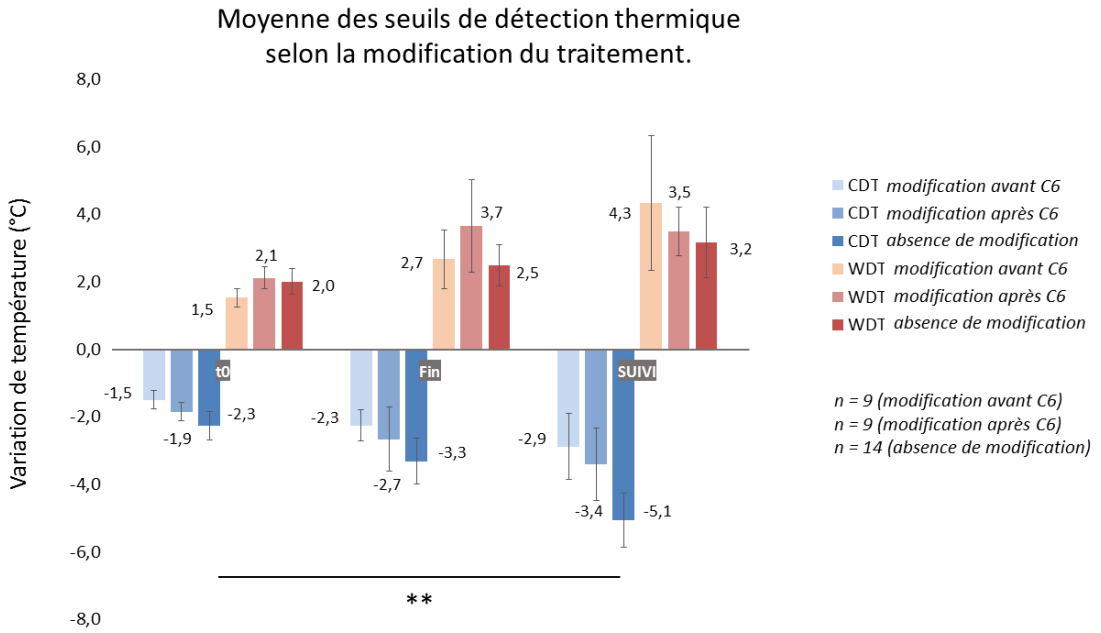



Figure 52| Evolution des seuils de détection thermique selon le délai d'adaptation posologique.

*Pour le groupe "pas d'adaptation posologique", les CDT mesurés à la visite de fin et suivi sont supérieurs aux CDT mesurés en début de traitement (p = 0,005). Aucune autre différence n'a été mise en évidence chez les autres groupes.*

*Adaptation posologique avant le cycle 6, n = 9*
*Adaptation posologique après le cycle 6, n = 9*
*Pas d'adaptation posologique, n = 14*

*CDT = Cold Detection Threshold ; WDT = Warm Detection Threshold*

*** p < 0,01*

## 3.2.Evolution des seuils de détection mécanique

La même analyse que précédemment est appliquée à l'étude de la détection mécanique. **Les moyennes des scores de détection mécanique pour l'ensemble de la population ne diffèrent pas selon les visites** (2,3 ; 2,2 ; 2,1 respectivement pour les visites t0, fin et suivi) (Figure 53). Les mêmes comparaisons ont été effectuées en sous-groupes. Tout d'abord, les patients ayant reçu moins de trois mois de traitement ont été séparés de ceux ayant reçu plus de trois mois (Figure 54). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux groupes quelle que soit la visite et entre les visites. Dans un deuxième temps, les patients ayant développé une neuropathie de grade 1 à six mois (n = 23) sont séparés de ceux ayant développé une neuropathie de grade 2 (n = 6) (Figure 55). Aucune différence n'a été mise en évidence. Enfin, les patients ont été séparés en trois sous-groupes selon le délai d'adaptation posologique : modification de la dose avant/au cycle 6 (n = 9), après le cycle 6 (n = 9) et pas de modification (n = 14). Là encore, aucune différence n'a été mise en évidence (Figure 56). Cependant, on peut noter qu'à la visite t0 (la première visite), les patients ayant développé une neuropathie de grade 2 à six mois semblaient avoir une sensibilité tactile plus élevée que ceux qui avaient développé une neuropathie de type 1 (résultat non significatif). Par ailleurs, le score de sensibilité tactile semblait d'autant plus élevé (sensibilité élevée) que le traitement a été modifié précocement. Un test de corrélation de Spearman est pratiqué pour étudier l'éventuelle corrélation entre le seuil de détection thermique mesuré au début du traitement et le risque de modifier le traitement pour neurotoxicité. La valeur de ρ obtenue est négative ρ = -0,31 pour une *p-value* de 0,07. Ce résultat est non significatif mais est en accord avec celui trouvé pour les seuils de détection thermique. Les patients ayant des sensibilités thermiques ou tactiles plus élevées en début de traitement sont-ils plus sujets à exprimer et/ou développer une NPIO ?

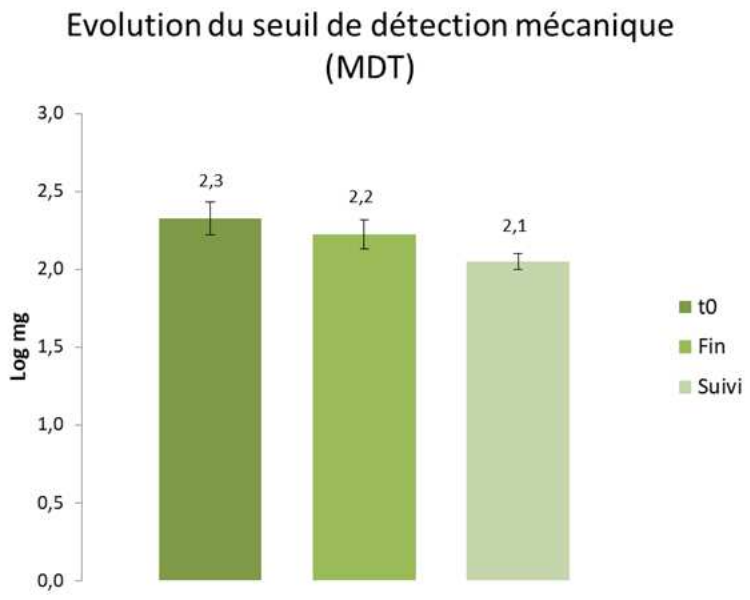



Figure 53| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey pour l'ensemble de la population.

*n = 35 patients*

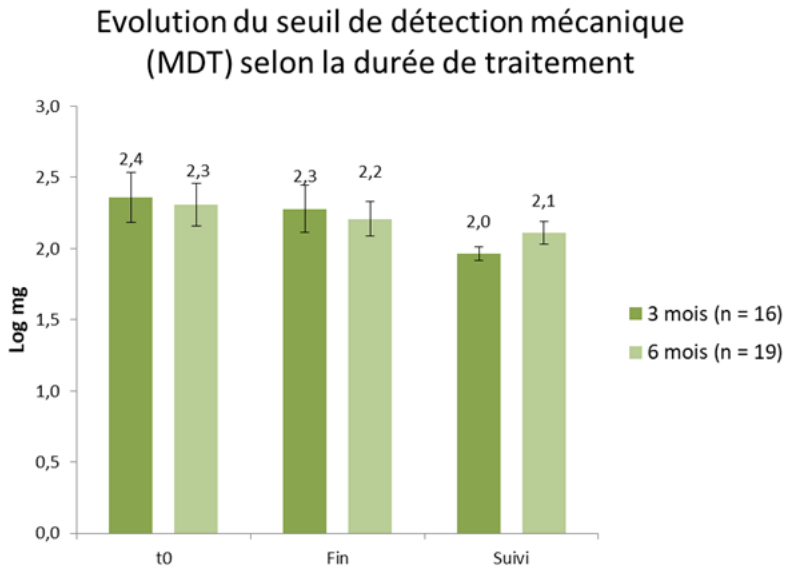



Figure 54| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon la durée du traitement.

*Traitement inférieur à 3 mois, n = 16*
*Traitement supérieur à 3 mois, n = 19*

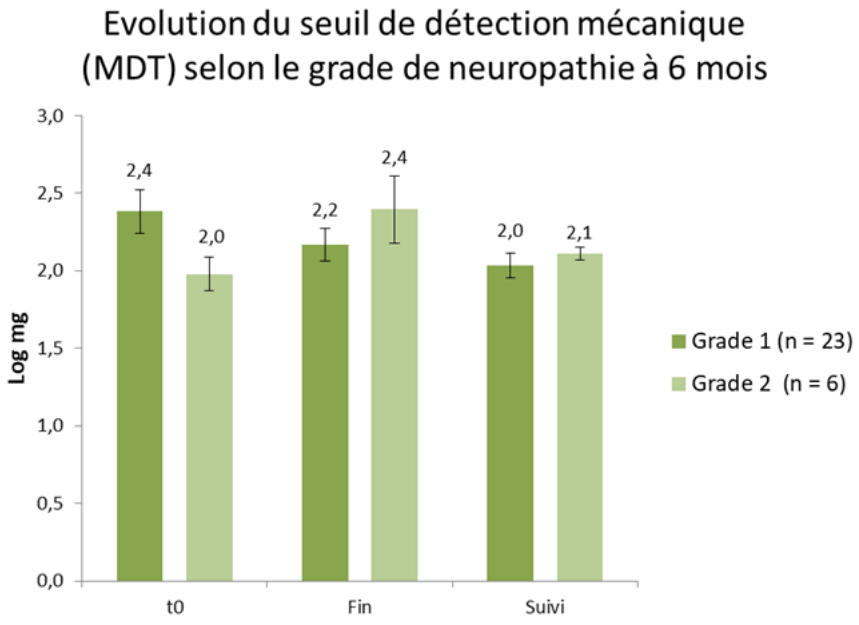



Figure 55| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon le grade de neuropathie.

*Neuropathie de garde 1, n = 23*
*Neuropathie de garde 2, n = 6*

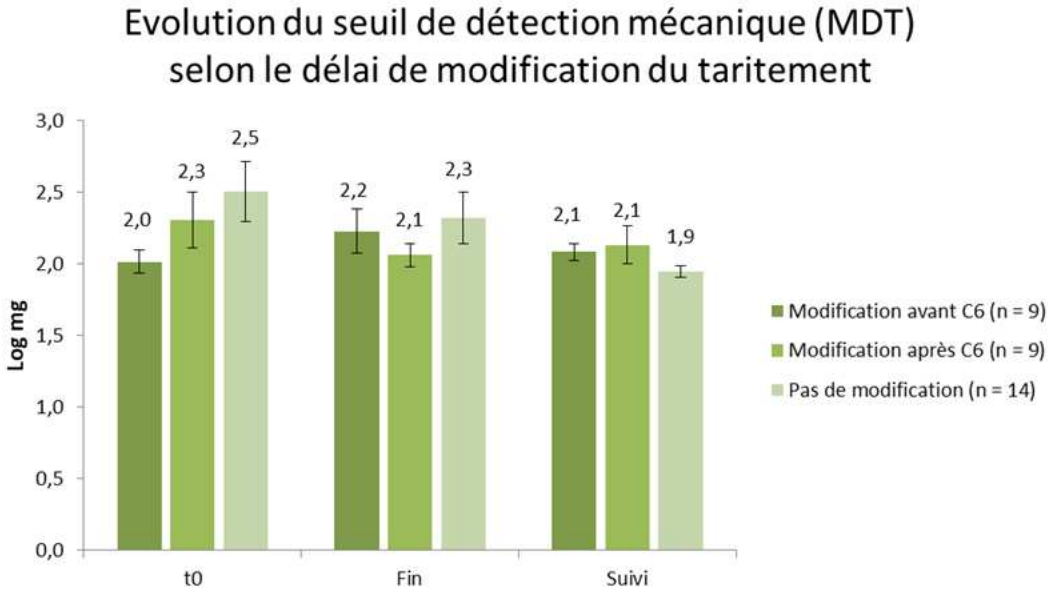



Figure 56| Evolution des scores de sensibilité tactile au test du Von Frey selon le délai d'adaptation posologique.

*Adaptation posologique avant le cycle 6, n = 9*
*Adaptation posologique après le cycle 6, n = 6*
*Pas d'adaptation posologique, n = 14*

## 3.3.Evolution de la douleur neuropathique

La douleur neuropathique a été évaluée grâce au thermotest (seuils de douleur thermique CPT, HPT) et au questionnaire NPSI (score numérique au questionnaire). Les seuils de douleur thermique (valeurs absolues) sont présentés sous forme de moyenne +/- erreur type (SEM, standard error of the mean). Des tests de Student appariés ont été réalisés pour comparer les moyennes entre elles. La proportion de patients ayant déclaré une douleur neuropathique (patients ayant obtenu un score strictement positif au NPSI) est consignée dans le tableau.

**Les moyennes des CPT et HPT ne diffèrent pas pour l'ensemble de la population selon les visites** (CPT = 13,5 °C ; 15,3 °C ; 12,1 °C ; HPT = 46,6 °C ; 46,3 °C ; 47,2 °C respectivement pour les visites t0, fin et suivi) (Figure 57). Les mêmes comparaisons ont été effectuées en sous-groupes. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes moins de trois mois et plus de trois mois à aucune visite. Enfin, aucune différence n'a été mise en évidence entre les sous-groupes élaborés selon le grade de neuropathie à six mois et le délai d'adaptation posologique (Figure 58 et Figure 59).

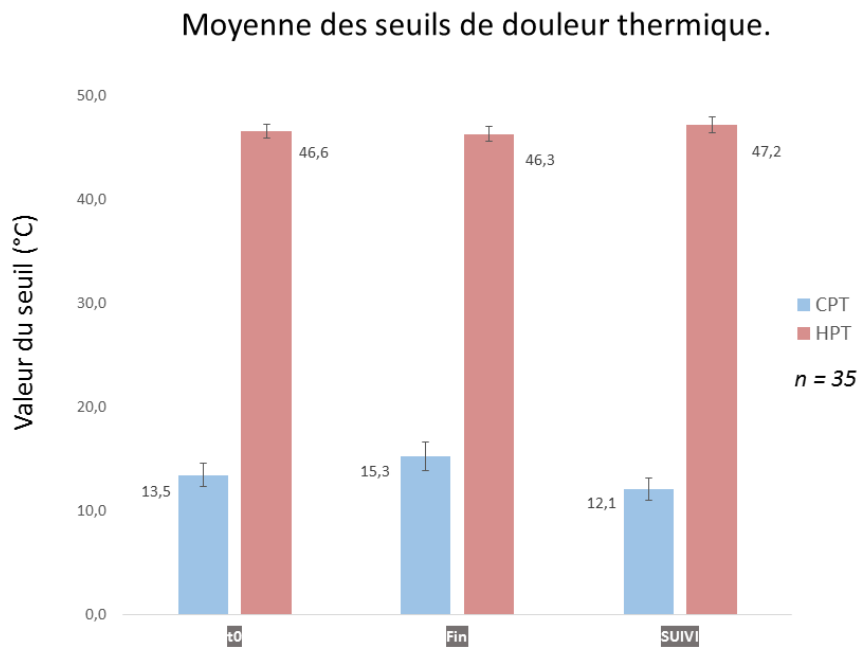



Figure 57| Evolution des seuils de douleur thermique pour l'ensemble de la population de l'étude.

*CPT = Cold Pain Threshold ; HPT = Heat Pain Threshold*

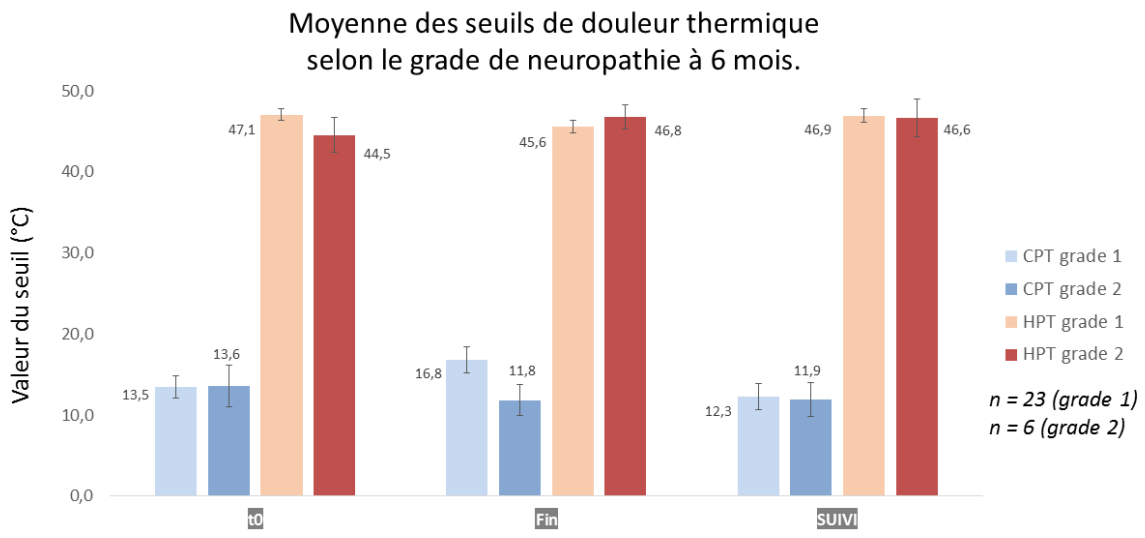



Figure 58| Evolution des seuils de douleur thermique selon le grade de neuropathie.

*Neuropathie de grade 1, n = 23*
*Neuropathie de grade 2, n = 6*

*CPT = Cold Pain Threshold ; HPT = Heat Pain Threshold*

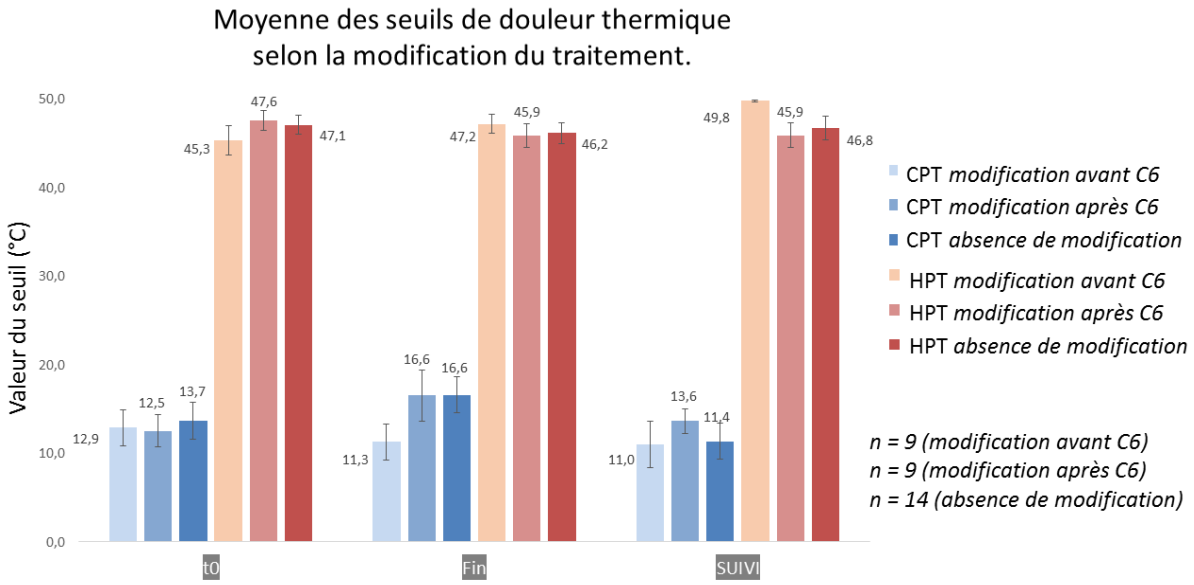



Figure 59| Evolution des seuils de douleur thermique selon le délai d'adaptation posologique.

*Adaptation posologique avant le cycle 6, n = 9*
*Adaptation posologique après le cycle 6, n = 6*
*Pas d'adaptation posologique, n = 14*

*CPT = Cold Pain Threshold ; HPT = Heat Pain Threshold*

**Le questionnaire NPSI** a été administré à chaque visite. En début de traitement, aucun patient ne présente de douleur neuropathique. **A la fin du traitement, 44 %** (12/27) des patients obtiennent un score strictement positif au NPSI, c'est-à-dire qu'à peu près la moitié des patients présentent une neuropathie douloureuse (Tableau 12). **En suivi, ils ne sont plus que 26 %** (5/19). Parmi les patients ayant développé une neuropathie de grade 1, 47 % (9/19) sont douloureux à la fin de leur traitement alors qu'ils ne sont plus que 8 % (1/12) à être douloureux en suivi. Concernant les patients de grade 2, ils sont 60 % (3/5) à être douloureux en fin de traitement comme en suivi. Cependant, il ne s'agit pas exactement des mêmes patients. Enfin, parmi les patients ayant subi une modification précoce de la posologie, 37,5 % (3/8) sont douloureux en fin de traitement, et 60 % (3/5) sont douloureux en suivi. Concernant les patients ayant subi une modification de traitement après le cycle 6, 57 % (4/7) sont douloureux et 17 % (1/6) sont douloureux en suivi. Enfin, parmi les patients n'ayant pas suivi de modification de traitement, 42 % (5/12) sont douloureux en fin de traitement et 12,5 % (1/8) sont douloureux en suivi.

A ce stade, le lien entre le grade de neuropathie et la présence d'une douleur neuropathique a été étudié par un test du $\chi^2$ d'indépendance ou à défaut, un test exact de Fisher. A la visite de fin de traitement, 47 % (9/19) de patients neuropathiques de grade 1 étaient douloureux alors que 60 % (3/5) de patients neuropathiques de grade 2 l'étaient. Il n'y a pas de différence entre les deux groupes, les deux variables sont indépendantes ($p$ = 0,61). A la visite de suivi, 8 % (1/12) de patients neuropathiques de grade 1 étaient douloureux alors que 60 % (3/5) de patients neuropathiques de grade 2 l'étaient. Cette différence est significative, **il y a un lien entre le grade de neuropathie et la présence d'une douleur à la visite de suivi** ($p$ = 0,05). Les patients neuropathiques de grade 2 sont plus sujets à développer une neuropathie douloureuse. De même, le lien entre le délai d'adaptation posologique de l'oxaliplatine et la présence d'une douleur neuropathique a été étudiée par un test du $\chi^2$. A la visite de fin de traitement, 37,5 % (3/8) ; 57 % (4/7) et 42 % (5/12) sont douloureux pour les groupes *modification posologique avant C6*, *modification posologique après C6* et groupe *aucune modification*, respectivement. Il n'y a pas de différence entre ces trois groupes, les deux variables sont indépendantes ($p$ = 0,72). A la visite de suivi, 60 % (3/5) ; 17 % (1/6) et 12,5 % (1/8) sont douloureux pour les groupes modification posologique avant C6, après C6 et aucune modification, respectivement. Il n'y a pas de différence entre ces trois groupes, les deux variables sont indépendantes ($p$ = 0,13).

Parmi les patients douloureux, **39 %** ont déclaré ressentir des **douleurs provoquées par un objet froid** (question 10, moyenne = 4,3/10) et **44 % ont déclaré des douleurs se présentant comme des picotements ou des fourmillements** (questions 11 et 12, moyenne = 4,4/10).

| | Population entière | Neuropathie (NIC-CTCAE) | | | Modification posologique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Grade 0 | Grade 1 | Grade 2 | ≤ C6 | > C6 | Sans objet |
| | *n = 35* | *n = 3* | *n = 23* | *n = 6* | *n = 9* | *n = 9* | *n = 14* |
| t0 ; *n = 35* | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| Fin ; *n = 27* | 44 % | 0 % | 47 % | 60 % | 37,5 % | 57 % | 42 % |
| Suivi ; *n = 19* | 26 % | 50 % | 8 % | 60 % | 60 % | 17 % | 12,5 % |

Tableau 12 | Proportion de patients ayant un score positif au questionnaire NPSI.

*Population entière, n = 35*

*Patients neuropathiques de grade 1, n = 23*
*Patients neuropathiques de grade 2, n = 6*

*Adaptation posologique avant le cycle 6, n = 9*
*Adaptation posologique après le cycle 6, n = 6*
*Pas d'adaptation posologique, n = 14*

## 3.4. Etude annexe : comparaison des seuils de sensibilité thermique au niveau de deux régions de la main

En pratiquant les tests, je me suis aperçu que la **plainte des patients concernait davantage le bout des doigts** que la **région de l'éminence thénar sur laquelle j'appliquais la thermode**, région habituellement utilisée pour quantifier la NPIO dans les essais cliniques. Il a donc été décidé de réaliser une étude annexe au sein de LIPIDOXA qui avait pour but de caractériser la région de la main la plus affectée par la NPIO. En d'autres termes, identifier la région de la main la plus appropriée pour mettre en évidence l'hypoesthésie induite par l'oxaliplatine. Il s'agissait de **comparer les seuils de sensibilité thermique au niveau de deux régions de la main** : **l'éminence thénar et le bout des doigts** (index, majeur et annulaire).

Les patients inclus dans cette étude ancillaire sont ceux précédemment inclus dans LIPIDOXA et en cours de traitement (au-delà du cycle C6, *i.e.* trois mois de traitement). Ils ont été inclus sur une période de deux mois à l'été 2015. En complément de la batterie de tests pratiquée dans le cadre de l'étude LIPIDOXA, une évaluation bilatérale des seuils de sensibilité thermique a été pratiquée selon les mêmes paramètres que décrits précédemment. En effet, CDT, WDT, CPT et HPT ont été mesurés sur l'éminence thénar puis sur le bout des doigts (index, majeur et annulaire) de la main opposée, ainsi recommandé dans la littérature scientifique [259]. Les comparaisons ont reposé sur des tests non paramétriques de Wilcoxon au moyen du logiciel libre R (version 3.2.2). Dans un premier temps, nous avons comparé la moyenne des seuils de

sensibilité thermique de l'échantillon de patients puis dans un second temps, nous avons comparé individuellement les seuils de sensibilité thermique de chaque patient.

Du 13 juillet au 4 septembre, **12 patients** ont été inclus dans l'étude ancillaire. La moyenne des **CDT** des patients était significativement **2,5 fois plus élevée** au niveau des **bouts des doigts** qu'au niveau de **l'éminence thénar** (8,3 °C ± 5,1 °C ; 3,4 °C ± 2,5 °C respectivement $p = 2,8 \times 10^{-5}$). Pris individuellement, la variation des CDT excédait 200 % pour cinq patients sur 12 (patients n°2 ; 3 ; 5 ; 8 ; 11). Les CDT étaient dans l'intervalle [3,2 °C (patient 9) – 14,4 °C (patient 8)] et [0,5 °C (patient 5) – 7,7 °C (patient 10)] respectivement pour bout des doigts et éminence thénar. En résumé, neuf patients sur 12 avaient un seuil de détection du froid plus élevé au niveau du bout des doigts qu'au niveau de l'éminence thénar.

Concernant les seuils de détection du chaud, de même, la moyenne des **WDT** des patients était significativement **2,1 fois plus élevée** au niveau des **bouts des doigts** qu'au niveau de **l'éminence thénar** (7,6 °C ± 3,7 °C ; 3,7 °C ± 3,1 °C respectivement $p = 10^{-5}$). Pris individuellement, la variation des WDT excédait 200 % pour quatre patients sur 12 (patients n°2 ; 3 ; 5 ; 7). Les WDT étaient dans l'intervalle [2,4 °C (patient 12) – 15,6 °C (patient 11)] et [0,8 °C (patient 5) – 11 °C (patient 11)] respectivement pour le bout des doigts et l'éminence thénar. En résumé, huit patients sur 12 avaient un seuil de détection du chaud plus élevé au niveau du bout des doigts qu'au niveau de l'éminence thénar.

En matière de seuils de douleur, la moyenne des CPT était 12 % plus élevée au niveau du bout des doigts qu'au niveau de l'éminence thénar (21,8 °C vs 19,5 °C ; $p = 0,039$). La moyenne des HPT n'était pas significativement différente entre le bout des doigts et l'éminence thénar. Les résultats de cette étude montrent que l'hypoesthésie qui survient sous traitement est très distale puisque qu'elle est davantage prononcée dans le bout du doigt qu'au niveau de la paume. Il pourrait être pertinent de confirmer ce résultat par une seconde étude palliant les faiblesses de cette étude ancillaire, c'est-à-dire mesure des seuils de sensibilité thermique en début de traitement, inclusion de plus de patients et éventuellement évaluation de la sensibilité tactile. Ce résultat est utile pour optimiser la méthodologie de quantification de la NPIO pour des éventuelles études ultérieures.

Les résultats de l'étude ancillaire ont fait l'objet d'une publication au *Journal of Clinical Neurophysiology* (Annexe 11).

# 4. Evaluation des marqueurs biochimiques de l'inflammation et du stress oxydant

## 4.1. Évaluation du niveau plasmatique de stress oxydant

### *4.1.1. Population entière de l'étude*

L'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps pour l'ensemble des patients de l'étude est présentée Figure 60. Les moyennes des niveaux plasmatiques de stress oxydant déterminés à partir des échantillons prélevés avant traitement, à trois mois (t3), six mois (t6) et 12 mois après le début du traitement sont respectivement de (unité arbitraire) : 708 ± 218 ; 730 ± 224 ; 756 ± 282 et 825 ± 269. Même si une tendance à l'augmentation régulière du stress oxydant au cours du temps peut être observée, celle-ci n'est pas significative ($p$ = 0,43 pour l'ensemble des temps,) avec une augmentation de 16,5 % entre t0 et t12, non significative ($p$ = 0,098).

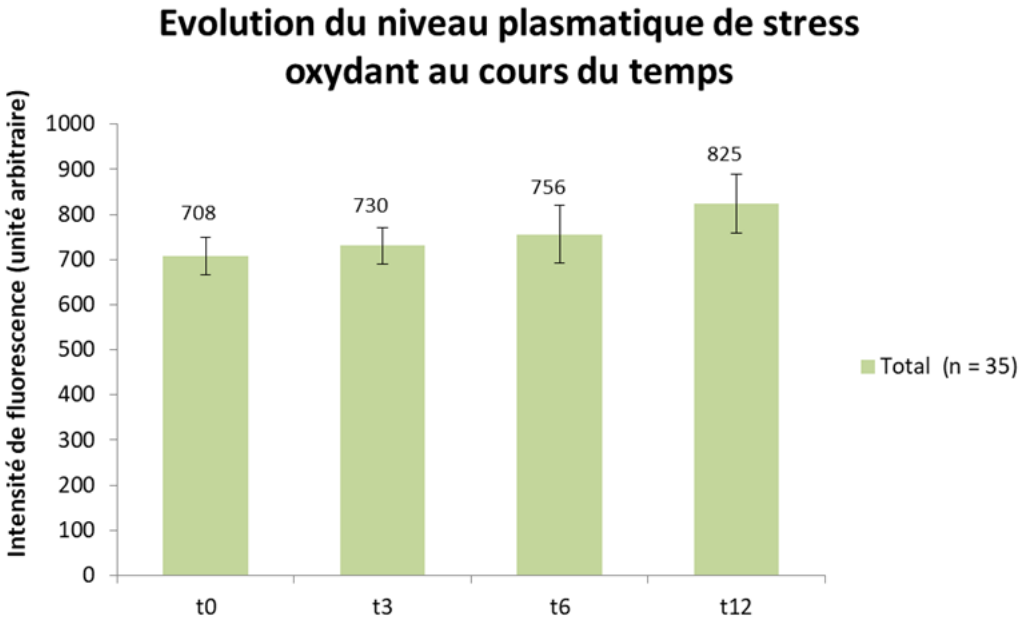



Figure 60| Evolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps pour l'ensemble des patients

*Des échantillons de plasma ont été prélevés avant la première injection d'oxaliplatine (t0) puis aux 3e et 6e mois de traitement (respectivement t3 et t6) ainsi que 6 mois après l'arrêt du traitement (t12). Le niveau plasmatique de stress oxydant i.e. la quantité d'espèces réactives de l'oxygène a été mesuré grâce à la sonde fluorescente H2DCF-DA (λex = 485 nm, λem = 535 nm).*

*Le stress oxydant n'évolue au cours du temps p = 0,43.*

*n = 35 patients*

### 4.1.2. Etude de l'influence des caractères biométriques sur le stress oxydant

L'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps a été étudiée en différenciant les hommes des femmes (Figure 61). En effet, les hommes sont connus pour avoir un taux physiologique de stress oxydant plus élevé que les femmes [260]. Le niveau plasmatique de stress oxydant n'évolue pas au cours du temps aussi bien chez les hommes ($p$ = 0,22) que les femmes ($p$ = 0,99). De même il n'y a pas de différence entre ces deux groupes ($p$ = 0,37).

L'influence des autres caractères biométriques sur le niveau plasmatique de stress oxydant ont été étudiés. Il n'y a pas de lien entre l'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps et l'âge ($p$ = 0,19), ou l'IMC ($p$ = 0,54).

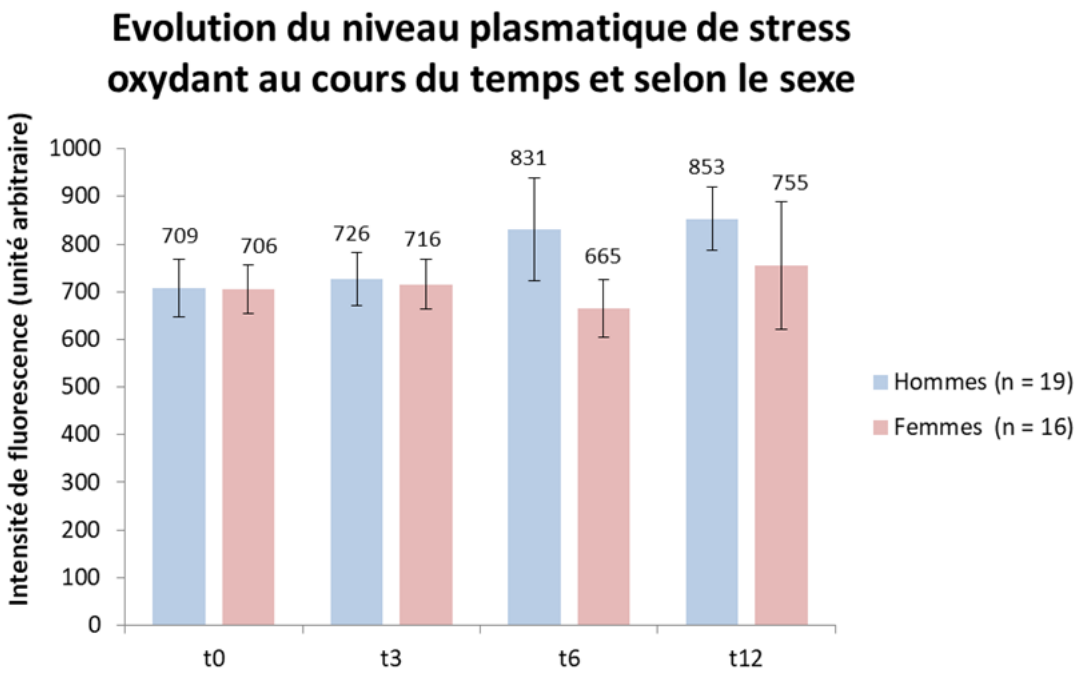



Figure 61| Evolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps et selon le sexe

*Le stress oxydant chez les hommes ne diffère pas selon le temps p = 0,22.*
*Le stress oxydant chez les femmes ne diffère pas selon le temps p = 0,99.*
*Il n'y a pas de différence entre hommes et femmes p = 0,37.*

*n = 19 hommes*
*n' = 16 femmes*

### 4.1.3. Etude du lien entre neuropathie et stress oxydant

L'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps a été étudiée en différenciant les patients ayant développé une neuropathie de grade 1 de ceux ayant développé une neuropathie de grade 2 (Figure 62) afin de déterminer s'il existe un lien entre l'intensité du stress oxydant et l'intensité de l'atteinte nerveuse. Le niveau plasmatique de stress oxydant

n'évolue pas au cours du temps aussi bien chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ($p$ = 0,52) que chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ($p$ = 0,45). En revanche, il y a une différence entre les deux groupes ($p$ = 0,005) : les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 présentent un niveau plasmatique de stress oxydant plus faible que ceux souffrants d'une neuropathie de grade 1 si l'on considère l'ensemble des temps pris simultanément. En revanche, pour chaque temps pris séparément, on ne retrouve pas de différence significative entre grade 1 et grade 2 (t0, t3, t6 ou t12).

L'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps ne diffère pas selon le délai de modification du traitement ($p$ = 0,32). De même, l'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps n'est pas lié au protocole de chimiothérapie, ni à la dose cumulée, ni à la localisation de la tumeur ($p$ = 0,74 ; $p$ = 0,52 ; $p$ = 0,49 respectivement).

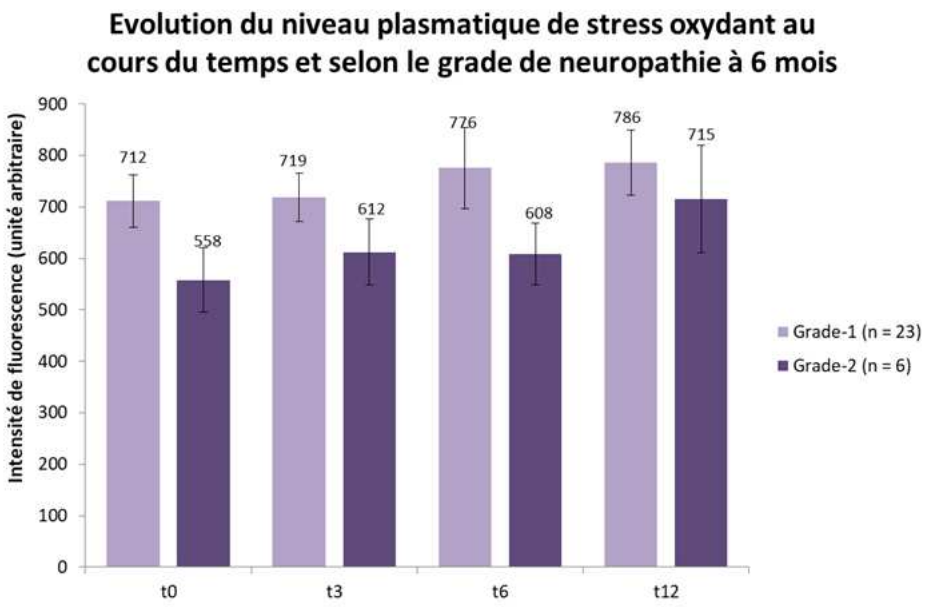



Figure 62 | Evolution du stress oxydant au cours du temps et selon le grade de neuropathie à 6 mois.

*Le stress oxydant chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,52.*
*Les stress oxydant chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,45.*

*Il y a une différence entre les deux groupes, au cours du temps, le stress oxydant est moindre chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2, p = 0,005.*

*n = 23 patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 à 6 mois*
*n' = 6 patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 à 6 mois*

## 4.2. Dosage plasmatique de la prostaglandine $E_2$

### *4.2.1. Population entière de l'étude*

L'évolution de la concentration plasmatique en prostaglandine $E_2$ ($PGE_2$) au cours du temps pour l'ensemble des patients de l'étude est présentée Figure 63. Les moyennes des concentrations plasmatiques de $PGE_2$ déterminées à partir des échantillons prélevés avant traitement, à trois mois (t3), six mois (t6) et 12 mois après le début du traitement sont respectivement de 238,5 ± 54,2 ; 257,7 ± 60,3 ; 275,5 ± 55,0 et 253,6 ± 57,0 pg/mL. La concentration plasmatique en $PGE_2$ est significativement plus élevée à t6 comparé à t0 ($p$ = 0,011). Les autres concentrations mesurées à t3 et t12 ne diffèrent pas de t0.

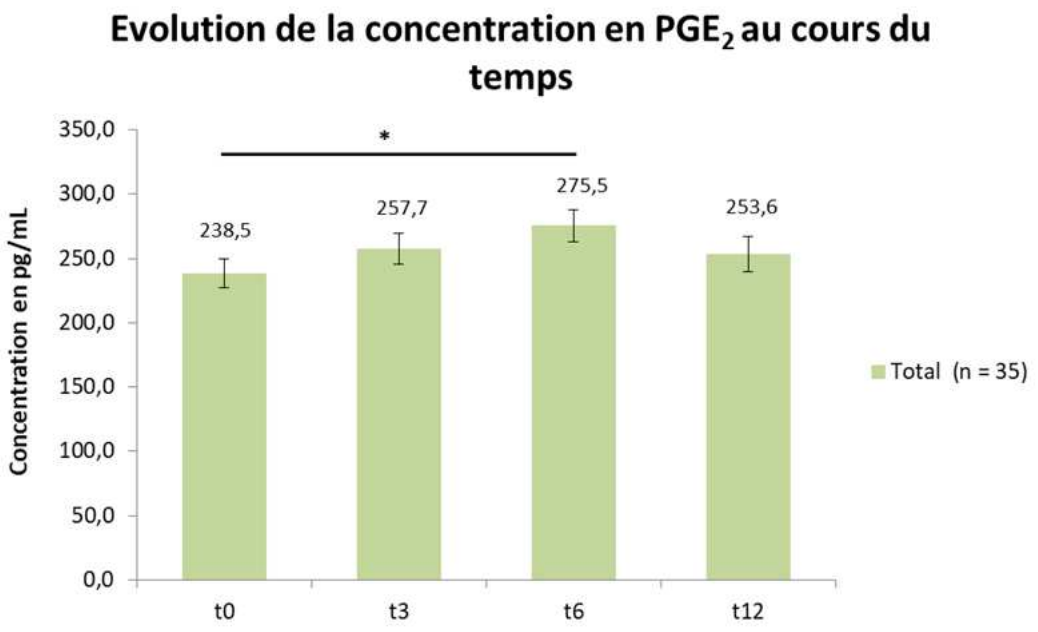



Figure 63| Evolution de la concentration plasmatique en $PGE_2$ au cours du temps pour l'ensemble des patients

*Des échantillons de plasma ont été prélevés avant la première injection d'oxaliplatine (t0) puis aux 3e et 6e mois de traitement (respectivement t3 et t6) ainsi que 6 mois après l'arrêt du traitement (t12). La quantité de $PGE_2$ libérée dans le plasma a été mesurée par technique ELISA.*

*La concentration plasmatique en $PGE_2$ est significativement supérieure à t6 comparé à t0 (p = 0,011).*

*n = 35 patients*

** p < 0,05*

### *4.2.2. Etude de l'influence des caractères biométriques sur la concentration en $PGE_2$*

L'évolution de la concentration plasmatique en $PGE_2$ au cours du temps a été étudiée en différenciant les hommes des femmes afin de s'intéresser à l'éventuelle influence du sexe comme

précédemment (Figure 64). Les concentrations plasmatiques en $PGE_2$ chez les femmes diffèrent selon le temps $p$ = 0,045 et cette différence est maximale à t6 où une augmentation significative de la concentration en $PGE_2$ à six mois est mise en évidence $p$ = 0,0012. En revanche, les concentrations plasmatiques en $PGE_2$ chez les hommes ne diffèrent pas selon le temps $p$ = 0,85. De même, Il n'y a pas de différence entre hommes et femmes $p$ = 0,26.

L'influence des autres caractères biométriques sur la concentration plasmatique en $PGE_2$ ont été étudiés. Il n'y a pas de lien entre l'évolution des concentrations plasmatiques en $PGE_2$ au cours du temps et l'âge ($p$ = 0,13), ou l'IMC ($p$ = 0,21).

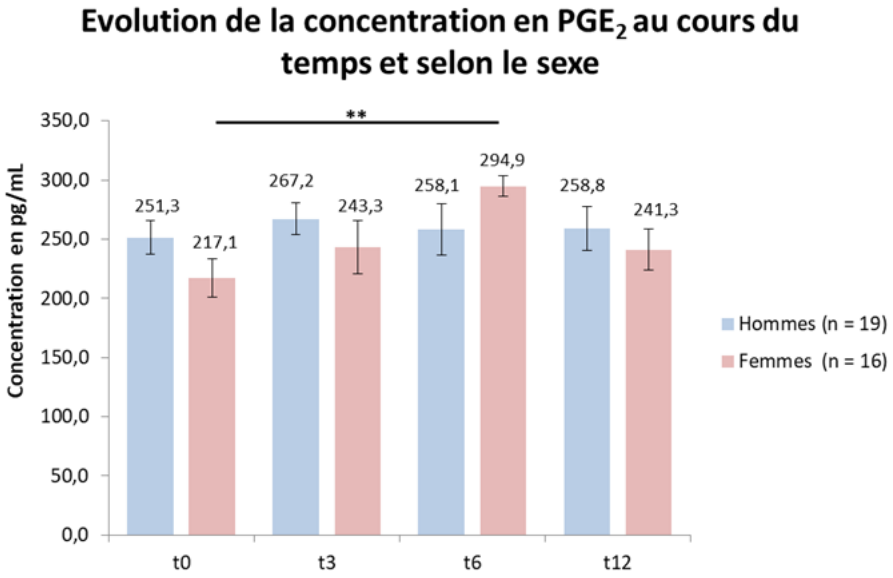



Figure 64| Evolution de la concentration plasmatique en prostaglandines $E_2$ au cours du temps et selon le sexe

*Les concentrations plasmatiques en $PGE_2$ chez les hommes ne diffèrent pas selon le temps p = 0,85.*
*Les concentrations plasmatiques en PGE2 chez les femmes diffèrent selon le temps p = 0,045 et cette différence est maximale à t6 où une augmentation significative de la concentration en PGE2 à six mois est mise en évidence p = 0,0012.*

*Il n'y a pas de différence entre hommes et femmes p = 0,26.*

*n = 19 hommes*
*n' = 16 femmes*

*** p < 0,01*

### *4.2.3. Etude du lien entre neuropathie et concentration en $PGE_2$*

L'évolution de la concentration plasmatique en $PGE_2$ au cours du temps a été étudiée en différenciant les patients ayant développé une neuropathie de grade 1 de ceux ayant développé une neuropathie de grade 2 comme précédemment (Figure 65). Les concentrations en $PGE_2$ chez

les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ne diffèrent pas selon le temps $p$ = 0,52. Les concentrations en $PGE_2$ chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ne diffèrent pas selon le temps $p$ = 0,45. De même, il n'y a pas de différence entre ces deux groupes, au cours du temps, $p$ = 0,35.

L'évolution de la concentration plasmatique en $PGE_2$ au cours du temps ne diffère pas selon le délai de modification du traitement ($p$ = 0,49). De même, l'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant au cours du temps n'est pas liée au protocole de chimiothérapie, ni à la dose cumulée, ni à la localisation de la tumeur ($p$ = 0,50 ; $p$ = 0,19 ; $p$ = 0,31 respectivement).

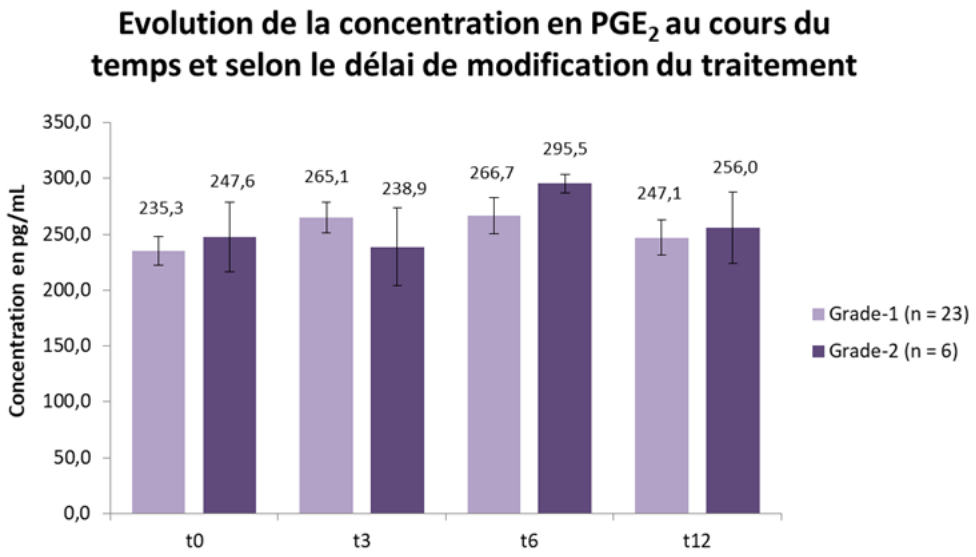



Figure 65 | Evolution de la concentration en prostaglandines $E_2$ au cours du temps et selon le grade de neuropathie à six mois.

*Les concentrations en $PGE_2$ chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,52.*
*Les concentrations en $PGE_2$ chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,45.*

*Il n'y a pas de différence entre les deux groupes, au cours du temps, p = 0,35.*

*n = 23 patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 à 6 mois*
*n' = 6 patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 à 6 mois*

## 4.3. Dosage plasmatique de l'interleukine 6

### *4.3.1. Population entière de l'étude*

L'évolution de la concentration plasmatique en interleukine 6 (IL6) au cours du temps pour l'ensemble des patients de l'étude est présentée Figure 66. Les moyennes des concentrations plasmatiques en IL6 déterminées à partir des échantillons prélevés avant traitement, à trois mois (t3), six mois (t6) et 12 mois après le début du traitement sont respectivement de 7,80 ± 8,34 ; 8,82 ± 11,48 ; 8,62 ± 4,82 et 7,65 ± 8,78 pg/mL. Les concentrations plasmatiques en IL6 ne diffèrent pas au cours du temps.

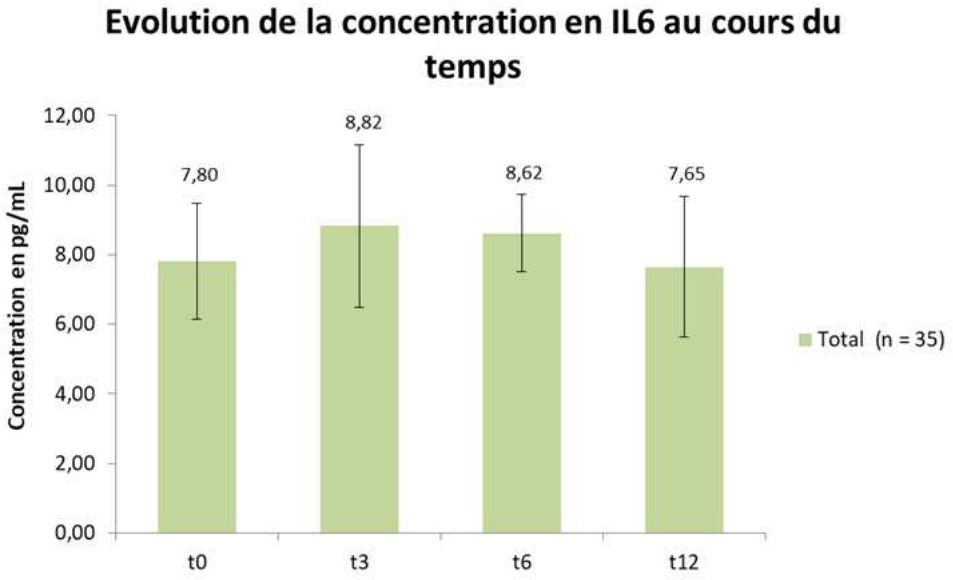



Figure 66| Evolution de la concentration plasmatique en IL6 au cours du temps pour l'ensemble des patients

*Des échantillons de plasma ont été prélevés avant la première injection d'oxaliplatine (t0) puis aux troisième et sixième mois de traitement (respectivement t3 et t6) ainsi que six mois après l'arrêt du traitement (t12). La quantité d'IL6 libérée dans le plasma a été mesurée par technique ELISA.*

*Les concentrations plasmatiques en IL6 ne diffèrent pas au cours du temps (p = 0,24).*

*n = 35 patients*

### *4.3.2. Etude de l'influence des caractères biométriques sur la concentration en IL6*

L'évolution de la concentration plasmatique en IL6 au cours du temps a été étudiée en différenciant les hommes des femmes afin de s'intéresser à l'éventuelle influence du sexe comme précédemment (Figure 67). Les concentrations en IL6 ne diffèrent pas au cours du temps aussi bien chez les hommes que chez les femmes ($p$ = 0,21 et $p$ = 0,24 respectivement). De plus, il n'y a pas de différence entre hommes et femmes ($p$ = 0,69).

L'influence des autres caractères biométriques sur concentration plasmatique en IL6 ont été étudiés. Il n'y a pas de lien entre l'évolution des concentrations plasmatiques en IL6 au cours du temps et l'âge ($p$ = 0,61), ou l'IMC ($p$ = 0,50).

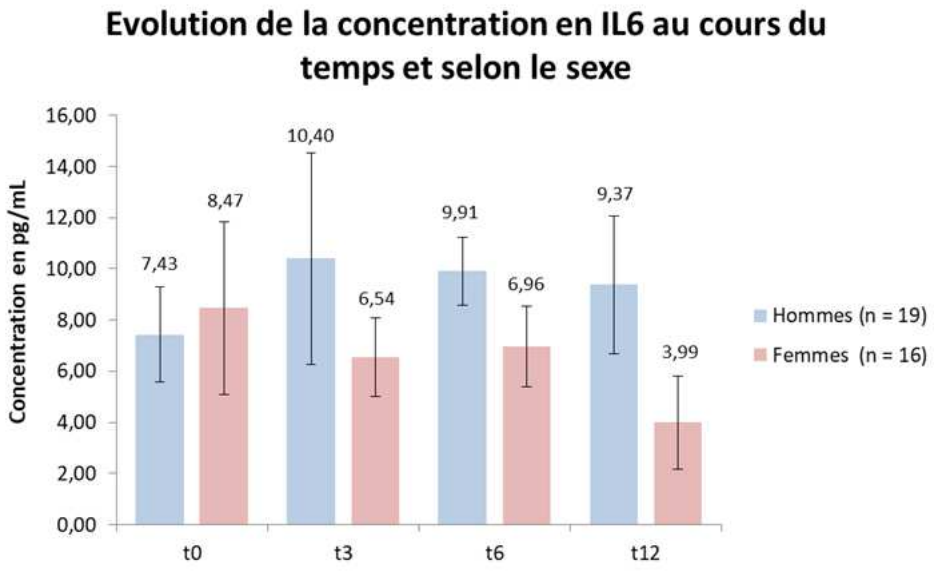



Figure 67| Evolution de la concentration plasmatique en interleukine 6 au cours du temps et selon le sexe.

*Les concentrations en IL6 chez les hommes ne diffèrent pas selon le temps p = 0,21.*
*Les concentrations en IL6 chez les femmes ne diffèrent pas selon le temps p = 0,24.*

*Il n'y a pas de différence entre hommes et femmes p = 0,69.*

*n = 19 hommes*
*n' = 16 femmes*

### *4.3.3. Etude du lien entre neuropathie et concentration en IL6*

L'évolution de la concentration plasmatique en IL6 au cours du temps a été étudiée en différenciant les patients ayant développé une neuropathie de grade 1 de ceux ayant développé une neuropathie de grade 2 comme précédemment (Figure 68). Les concentrations en IL6 chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ne diffèrent pas selon le temps $p$ = 0,11. Les concentrations en IL6 chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ne diffèrent pas selon le temps $p$ = 0,71. De plus, il n'y a pas de différence entre les deux groupes, $p$ = 0,16. Cependant, on observe une tendance, les concentrations plasmatiques en IL6 semblent moindre chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2, comparé aux concentrations plasmatiques en IL6 des patients souffrants d'une neuropathie de grade 1.

L'évolution de la concentration plasmatique en IL6 au cours du temps ne diffère pas selon le délai de modification du traitement ($p$ = 0,36). De même, l'évolution du niveau plasmatique de

stress oxydant au cours du temps n'est pas lié au protocole de chimiothérapie, ni à la dose cumulée, ni à la localisation de la tumeur ($p$ = 0,73 ; $p$ = 0,78 ; $p$ = 0,96 respectivement).

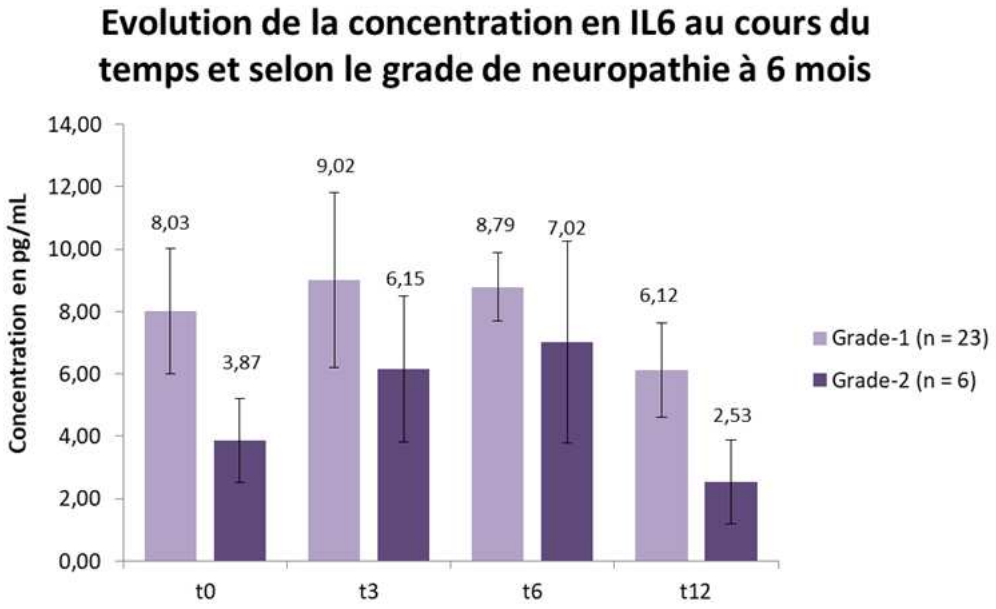



Figure 68 | Evolution de la concentration en interleukine 6 au cours du temps et selon le grade de neuropathie à six mois.

*Les concentrations en IL6 chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,11.*
*Les concentrations en IL6 chez les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 ne diffèrent pas selon le temps p = 0,71.*

*Il n'y a pas de différence entre les deux groupes, au cours du temps, p = 0,16.*

*n = 23 patients souffrants d'une neuropathie de grade 1 à six mois*
*n' = 6 patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 à six mois*

## 4.4. Evaluation de l'activation du récepteur $P2X_7$

Le dosage de l'activation du récepteur $P2X_7$ a été basé sur la mesure par fluorométrie de la pénétration de la sonde YO-PRO-1 dans les PBMC en apoptose, paramètre directement lié à l'activation du récepteur $P2X_7$.

Le signal fluorimétrique mesuré pour les cinq patients et normalisé à la quantité de protéines est (moyenne ± sd) : 6 255 ± 2 523 unités arbitraires. Le signal fluorimétrique mesuré pour le volontaire sain est : 971 ± 11. En considérant cette dernière valeur comme la valeur théorique d'un test de Student de comparaison d'une moyenne expérimentale à une valeur théorique, on

obtient une significativité du test de comparaison : l'activation du récepteur $P2X_7$ est plus élevée chez les patients traités par oxaliplatine que les patients non traités, $p$ = 0,025.

# 5. Discussion générale de l'étude LIPIDOXA

## 5.1. Discussion des résultats cliniques

Ce premier travail nous a permis de quantifier l'évolution de la neuropathie sous traitement par oxaliplatine et d'évaluer l'intérêt d'utiliser les tests sensoriels quantitatifs dans le diagnostic et le suivi de la NPIO. A cette fin, la mesure des seuils de sensibilité thermique, la mesure des seuils de sensibilité mécanique, l'évaluation de la douleur neuropathique et la gradation des effets indésirables (NCI-CTC) ont été effectuées pendant le traitement et six mois après son arrêt chez 35 patients traités par oxaliplatine.

### *5.1.1. Seuils de sensibilité thermiques*

Concernant l'étude des seuils de sensibilité thermique, cette première analyse met en évidence le **développement d'une hypoesthésie aux stimuli thermiques six mois après l'arrêt de l'oxaliplatine**, ce qui est révélateur d'un processus neurotoxique qui se poursuit même après l'arrêt du traitement [261]. Les variations des seuils de détection du froid (entre -3 °C et -4 °C) et les variations du seuil de détection du chaud (entre +2,5 °C et +3,5 °C) mesurées en cours de traitement sont en accord avec ceux publiés dans des études antérieures [27]. Cependant, peu d'études s'intéressent à l'évolution de ces seuils après arrêt du traitement et suivent les patients sur des durées plus longues [128]. L'équipe de Park a montré que la perte de sensibilité subsistait deux ans après l'arrêt de l'oxaliplatine ce qui est en accord avec le développement de l'hypoesthésie thermique mise en évidence dans la population de LIPIDOXA [262]. Brouwers a estimé la demi-vie de récupération de la neuropathie dans les mains à 6,8 (+/- 3,1) ans au niveau des mains [261].

Des auteurs ont publié des valeurs de référence des seuils de sensibilité thermique physiologiques [158]–[160]. Néanmoins, dans la mesure où la méthodologie de mesure des seuils de sensibilité thermique diffère d'une étude à une autre, l'interprétation de la comparaison des données entre nos données et celles de la littérature peut s'avérer délicate. Ainsi, nous avons ici réalisé l'estimation des valeurs physiologiques de la sensibilité thermique dans un premier groupe de 20 volontaires sains. En avril 2014, 20 volontaires sains (12 hommes, 8 femmes) issus du personnel du service d'oncologie et du service de la pharmacie sont inclus dans cette étude annexe. La méthodologie standardisée de l'étude LIPIDOXA a été utilisée pour mesurer chez ces volontaires les seuils de détection thermique (CDT, WDT) et les seuils de douleur thermique (CPT,

HPT). L'âge et le sexe de chaque sujet sont renseignés dans la base de données. La moyenne des CDT obtenue est de 1,9 °C (+/- 1,6 °C), la moyenne des WDT est de 1,8 °C (+/- 1,0 °C). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes selon le genre et l'âge. La variabilité intraindividuelle est faible, les moyennes des écart-types individuels sont de 0,3 °C pour le froid et de 0,2 °C pour le chaud. Cela signifie que les mesures sont répétables chez un même individu. En revanche, la variabilité interindividuelle est plus élevée, l'écart-type global est de 1,6 °C pour le seuil de détection du froid et 1,0 °C pour le seuil de détection du chaud.

Concernant la population de LIPIDOXA, à la visite du début de traitement, la moyenne des CDT est de -2,1 °C, la moyenne des WDT est de 2,0 °C. Il n'y a pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe LIPIDOXA ($p$ = 0,67 et $p$ = 0,6 respectivement pour CDT et WDT). Les écarts-types des mesures sont de 1,2 °C et 1,1 °C pour CDT et WDT respectivement, ce qui n'est statistiquement pas différent des écart-types de la population contrôle (test de Fisher pratiqué, $p$ = 0,1 et $p$ = 0,5 pour CDT et WDT respectivement). A la visite de fin de traitement, la moyenne des CDT est de -2,8 °C, la moyenne des WDT est de 2,9 °C. Il n'y a pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe LIPIDOXA ($p$ = 0,11 et $p$ = 0,10 respectivement pour CDT et WDT). L'écart-type global des mesures est plus élevé que précédemment : 2,0 °C et 2,8 °C pour CDT et WDT respectivement. Les écarts-types des moyennes des CDT ne sont pas différents entre les deux groupes ($p$ = 0,36) mais les écarts-types des moyennes des WDT sont différents ($p$ < 0,0001). La variabilité interindividuelle est plus élevée à la fin du traitement qu'au début. Les moyennes des écarts-types individuels sont de 1,0 °C et 0,7 °C pour CDT et WDT respectivement. Enfin, à la visite de suivi, la moyenne des CDT est de -3,8 °C, la moyenne des WDT est de 3,6 °C. Les moyennes des seuils de détection sont significativement plus élevés pour le groupe LIPIDOXA que pour le groupe contrôle ($p$ = 0,01 et $p$ = 0,006 respectivement pour CDT et WDT). L'écart-type global des mesures est plus élevé que précédemment : 2,2 °C et 2,4 °C pour CDT et WDT respectivement. De même, les écarts-types des moyennes des CDT ne sont pas différents entre les deux groupes ($p$ = 0,22) mais les écarts-types des moyennes des WDT sont différents ($p$ = 0,0003). La variabilité interindividuelle reste plus élevée six mois après arrêt du traitement qu'en début de traitement. Les moyennes des écarts-types individuels sont de 0,8 °C et 0,4 °C pour CDT et WDT respectivement.

Par ailleurs, la **reproductibilité** du Thermotest, mesures réalisées chez un même individu mais sur deux jours différents, n'a pas été étudiée. Or, les résultats préliminaires obtenus chez les patients traités par oxaliplatine laissent suggérer **que la réponse aux stimuli délivrés par le Thermotest fluctue de façon importante d'un jour à l'autre**. C'est la raison pour laquelle l'étude de l'évolution des seuils thermiques de façon individuelle, *i.e.* réalisée patient par patient, n'a finalement pas été retenue. En effet, la réalisation de tests de corrélation sur les données de

chaque individu n'a pas permis d'identifier de patients avec une élévation significative des seuils thermiques au cours du temps et ce, probablement en raison d'une importante dispersion des résultats en intra-individuel. Il conviendrait d'évaluer cette reproductibilité sur une cohorte de volontaires sains pour s'assurer de la stabilité des mesures des seuils à plusieurs jours d'intervalles.

Les seuils de douleur thermique n'ont pas été moyennés, en effet, 11/20 volontaires avaient un CPT inférieur à +8 °C (limite basse) et 10/20 volontaires avaient un HPT supérieur à +50 °C (limite haute), mesures en dehors du domaine de validité du thermotest.

La mesure des seuils de détection du froid et du chaud est suffisamment sensible pour mettre en évidence une neuropathie. En revanche, les résultats des mesures des seuils de douleur au froid et au chaud sont trop variables et manquent de sensibilité pour discriminer les patients atteints de neuropathies des sujets sains [259]. En considérant la sensibilité thermique (détection et douleur), seule la modification des seuils de détection du froid et au chaud permet de différencier les patients atteints de neuropathies des sujets sains et donc présente un intérêt dans la mise en évidence d'une neuropathie. La sensibilité thermique est un paramètre très subjectif qui dépend de beaucoup de facteurs aussi bien psychologiques que physiologiques innés et acquis. Les facteurs influençant les résultats peuvent être également les conditions environnementales extérieures, les instructions données par le manipulateur, la taille de la thermode, la partie du corps, la motivation du patient, son origine ethnique [127].

### *5.1.2. Autres tests*

En ce qui concerne l'évaluation des seuils de sensibilité mécanique, aucune différence n'a été constatée entre les différentes visites. Les valeurs moyennes de MDT mesurés pendant le traitement étaient cohérents avec celles publiées dans des études antérieures [26].

De manière intéressante, les CDT et les MDT mesurés à t0 semblaient être plus bas chez les patients dont le traitement avait été modifié plus tôt que chez ceux qui n'avaient pas connu de changement de dose. Cela pourrait suggérer une plus grande sensibilité thermique et mécanique des patients dont le traitement avait été modifié plus tôt en raison d'une neuropathie d'expression plus précoce. Cependant, ces différences n'étaient pas significatives et il n'y avait pas de relation entre les CDT et MDT mesurés au début du traitement et le délai d'ajustement de la dose (régression logistique réalisée). Aussi, il n'est pas possible de conclure si les patients avec une sensibilité plus élevée en début du traitement sont plus susceptibles de développer une NPIO sévère. Une revue de la littérature n'a trouvé aucun élément traitant de ce sujet. Un plus grand nombre de patients et une meilleure sélection de patients sont nécessaires pour étudier cette

éventuelle relation. Il pourrait être judicieux de limiter la population étudiée à celle traitée par FOLFOX dans une étude future. En effet, cela réduirait la variabilité causée par la toxicité des médicaments anticancéreux des autres protocoles thérapeutiques et augmenterait ainsi la puissance des tests statistiques. En outre, le potentiel de recrutement élevé des patients FOLFOX ne compromettrait pas le recrutement futur des patients.

En ce qui concerne l'évaluation de la douleur neuropathique avec l'échelle NPSI, 44 % des patients ont expérimenté une douleur neuropathique à la fin du traitement. Parmi eux, 39 % ont signalé une douleur provoquée par un objet froid et 44 %, une douleur sous forme de picotement et de fourmillements. Ceci est cohérent avec les données de l'étude d'Attal *et al* [26].

### *5.1.3. Influence de la dose cumulée d'oxaliplatine*

Concernant le lien entre les variables stade du cancer et neuropathie (grade NCI-CTCAE ou délai de modification de dose), le nombre de patients souffrant d'une neuropathie de grade 2 est statistiquement plus élevé dans le groupe *cancer de grade III*. Inversement, dans le groupe *cancer de grade I ou II*, aucun patient ne souffre de neuropathie de grade 2. Il convient de préciser que les trois groupes (grade I et II : m = 1 384 mg ; grade III : m = 1 143 mg ; garde IV : m = 1 055 mg) ont reçu en moyenne des doses cumulées d'oxaliplatine non statistiquement différentes entre elles (test ANOVA, $p > 0{,}05$). Ceci vient suggérer le fait que la **maladie cancéreuse prédispose** au développement des **neuropathies**. En effet, les patients atteints d'un cancer présentent généralement un déficit sensorimoteur, souvent infraclinique, avant même de débuter le traitement anticancéreux [54], [55].

La gestion des effets secondaires neurologiques semble être bien contrôlée dans l'étude LIPIDOXA avec la pratique actuelle de prise en charge. Par exemple, dans une étude publiée par André *et al*, 31,6 % et 12,4 % des patients présentaient une neurotoxicité de grade 2 et 3 respectivement, alors que dans l'étude LIPIDOXA, 19 % et 0 % des patients présentaient une neurotoxicité de grade 2 et 3, respectivement [20]. Dans l'étude LIPIDOXA, les patients présentant une neurotoxicité de grade 2 ont reçu une dose moyenne d'oxaliplatine inférieure aux patients présentant une neurotoxicité de grade 1. De même, les trois patients sans neuropathie ont reçu moins d'oxaliplatine que ceux présentant une neuropathie de grade 1. LIPIDOXA est une étude en soins courants et nous pouvons supposer que ces résultats sont dus à une diminution précoce de la posologie de l'oncologue lorsque la NPIO survient rapidement et intensément. Cela révèle une tentative d'adaptation de la dose d'oxaliplatine par l'oncologue pour réduire la sévérité de la NPIO basée sur l'utilisation du NCI-CTC [64]. Par conséquent, **la gestion de la neurotoxicité basée sur des échelles cliniques, telle qu'actuellement réalisée en pratique courante, demeure bien adaptée**. Ainsi, un champ d'action prometteur à développer pourrait être l'éducation des patients

pour améliorer la pertinence du NCI-CTC en augmentant **l'implication du patient dans la prise en charge**. En outre, ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans une revue qui a examiné la relation entre la dose cumulée d'oxaliplatine et le grade de NPIO [258]. Cette méta-analyse reposait sur 14 études correspondant à un total de 3 869 patients traités par oxaliplatine pour un cancer colorectal. Le critère d'évaluation clinique était le score NCI-CTC et le degré de neuropathie allait de 0 à 3. Parmi les 14 études, seules six évaluaient la relation entre le degré de neuropathie et la dose cumulée, et une seule ne démontrait aucune relation. Cette étude incluait 45 patients traités par oxaliplatine (20) ou cisplatine (25) [261]. Comme dans l'étude LIPIDOXA, la neuropathie induite par l'oxaliplatine n'a pas semblé être liée à la dose. Même si les méthodes statistiques étaient différentes entre les deux études, les conclusions sont cohérentes. Ceci suggère que d'autres facteurs tels que le polymorphisme génétique, la comorbidité ou le cancer peuvent expliquer cette variabilité [263]–[265].

## 5.2. Discussion des résultats des tests biochimiques

### *5.2.1. Effet de l'oxaliplatine sur la production d'ERO*

Le niveau plasmatique de stress oxydant n'évolue pas significativement au cours du temps. Cependant, une tendance à l'augmentation régulière peut être observée avec un écart maximal à 12 mois de 16,5 % entre t0 et t12 ($p$ = 0,098). Le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de la NPIO a été clairement établi *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. L'oxaliplatine est notamment connu pour entraîner une augmentation de la production d'anion superoxide et de peroxyde d'hydrogène, une augmentation de la lipoperoxydation ainsi qu'une augmentation des phénomènes d'oxydation protéique et nucléique [14], [266]. Par ailleurs, l'administration à des rongeurs de molécules antioxydantes telles que le mangafodipir, la silibinine ou certains flavonoïdes permet de réduire ou d'inhiber la NPIO [98], [267], [268]. L'étude de l'effet pro-oxydant de l'oxaliplatine chez l'homme a également été étudié, avec des résultats plus nuancés que chez l'animal. Ainsi, il a été montré que les taux urinaires de dérivés oxydés de la guanine (8-oxo-7,8-déshydro-2-désoxyguanosine et 8-oxo-7,8-déshydro-guanosine) étaient augmentés chez les patients traités par oxaliplatine [269]. Cependant, Ribeiro *et al* n'ont pas mis en évidence d'augmentation significative des activités des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase ni des taux plasmatiques de certains marqueurs du stress oxydants tels que le malonialdéhyde ou le 8-isoprostane chez les patients traités par oxaliplatine [270]. Par ailleurs, plusieurs essais visant à tester l'effet du mangafodipir, un agent de contraste utilisé en IRM et ayant des propriétés antioxydantes, dans la prophylaxie de la NPIO a montré des effets intéressants tout d'abord dans une cohorte de patients puis lors d'un essai contrôlé par

placebo [268], [271]. Dans ces études, l'effet prophylactique a été mis en évidence sur des critères de jugement clinique tels que le grade de neuropathie ou l'intensité de certains effets indésirables neurologiques, l'étude du stress oxydant chez ces patients a été peu informative. Les résultats obtenus dans l'étude LIPIDOXA ne semblent donc pas en contradiction avec ceux de la littérature scientifique.

On note que les résultats obtenus sont caractérisés par une grande dispersion des valeurs, en effet, les coefficients de variation sont de l'ordre de 31 % à 38 % pour les niveaux plasmatiques de stress oxydant. Cette importante variation réduit la puissance des tests statistiques. Elle pourrait être expliquée par l'existence de facteurs confondants ayant une influence sur le stress oxydant telles que les pathologies cardio-vasculaires, l'alimentation, le polymorphisme génétique des enzymes impliquées dans la réponse antioxydante, ou encore le sexe [260], [272]–[274]. Sur ce dernier point, dans la population de l'étude LIIDOXA, la tendance à l'augmentation du stress oxydant décrite précédemment semble davantage prononcée chez les hommes que chez les femmes. En effet, les niveaux plasmatiques de stress oxydant mesurés à t6 et t12 sont de 831 ± 342 et 853 ± 248, respectivement, chez les hommes et de 665 ± 208 et 755 ± 329, respectivement chez les femmes. Ces écarts ne sont cependant pas significatifs aussi bien inter-sexe qu'intra-sexe. La différence physiologique du taux de stress oxydant entre hommes et femmes n'est donc pas retrouvée ici [260].

Le stress oxydant est un processus physiologique complexe indispensable à l'homéostasie cellulaire et qui repose sur un équilibre dynamique entre production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et élimination de ces composés hautement réactifs. Il est clairement reconnu qu'un déséquilibre de cette balance peut aussi bien favoriser la survenue de cancer que constituer un facteur protecteur contre la tumorigénèse [275], [276]. Par ailleurs, la maladie cancéreuse est associée à une augmentation des phénomènes oxydatifs, en effet, les cellules cancéreuses expriment des taux élevés d'espèces réactives de l'oxygène comparé aux cellules saines [276]. Dans la population étudiée, l'évolution du niveau plasmatique de stress oxydant n'est liée ni à la localisation de la tumeur, ni au stade de cancer. Cependant, il a été montré que les patients souffrants d'une neuropathie de grade 2 présentaient un niveau plasmatique de stress oxydant significativement plus faible que ceux souffrants d'une neuropathie de grade 1, et ceux, pour l'ensemble des temps ($p = 0{,}005$). Ce dernier résultat peut être rapproché de la relation inverse mise en évidence précédemment entre le grade de neuropathie et la dose cumulée d'oxaliplatine. Les patients de l'étude LIPIDOXA souffrant d'une neuropathie de grade 2 ont en effet reçu moins d'oxaliplatine que ceux souffrant d'une neuropathie de grade 1. Par conséquent, on pourrait supposer que les patients ayant reçu moins d'oxaliplatine présentent un

niveau plasmatique de stress oxydant moins élevé. Ce raisonnement viendrait appuyer le rôle pro-oxydant de l'oxaliplatine. Cependant, aucune corrélation statistique significative (test de Spearman) n'est mise en évidence entre le niveau plasmatique de stress oxydant et la dose cumulée d'oxaliplatine et d'autre part, le niveau de stress oxydant reste toujours élevé, même après arrêt du traitement (t12). Le stress oxydant ne peut être expliqué uniquement par l'effet du traitement, d'autres paramètres doivent intervenir.

### *5.2.2. Effets de l'oxaliplatine sur la libération de médiateurs de l'inflammation*

La concentration plasmatique en prostaglandine $E_2$ ($PGE_2$) est 15 % plus élevée à six mois de traitement qu'en début de traitement ($p$ = 0,011) et cette différence semble essentiellement due à une plus forte augmentation chez les femmes (augmentation de 36 %, $p$ = 0,0012). Ce résultat est en accord avec les précédents travaux du laboratoire menés *in vitro* sur macrophages et mettant en évidence une augmentation de 14 à 32 % de la libération de $PGE_2$[14]. La $PGE_2$ est un médiateur lipidique de la classe des prostaglandines jouant un rôle important dans la douleur d'origine inflammatoire ainsi que dans la douleur neuropathique [277]. Le temps t6 correspond au temps où la neuropathie aiguë, caractérisée par de l'allodynies au froid et des hyperesthésies – *i.e.* neuropathie douloureuse - est maximale. Aussi, la libération maximale de $PGE_2$ à ce temps semble bien en accord avec la sémiologie décrite de la NPIO. Cependant l'étude de l'évolution de la concentration en $PGE_2$ en fonction du temps et selon le grade de neuropathie ne permet pas de mettre en évidence de différences entre les deux groupes. Les patients de grade 2 ne présentent pas un taux plus élevé en PGE2 que les patients de grade 1 même si à six mois, cette différence est à la limite de la significativité ($p$ = 0,13).

Concernant le dosage de l'IL6, aucune différence n'a été mise en évidence quel que soit le temps étudié ou les caractères liés au patient, au traitement ou à la neuropathie. L'interleukine-6 est une cytokine pro-inflammatoire de la phase aiguë de l'inflammation. De nombreuses études ont mis en évidence aussi bien in vitro que chez le patient traité, que l'oxaliplatine induisait une libération d'IL6 [14], [103], [278], [279]. Les concentrations en IL-6 sont de l'ordre de 4 à 10 pg/mL et sont caractérisées par une très grande dispersion des valeurs. Celles-ci s'étendent de 1,22 à 58,7 pg/mL avec un écart-type total de 8,60 pour une moyenne de 8,1 pg/mL. Ce chiffre parait faible comparé aux concentrations en IL6 de patients traités par oxaliplatine qui sont de l'ordre de 20 à 30 pg/mL [103], [278]. La demi-vie de l'interleukine 6 dans le sang est très courte, de 2 à 4 heures [280]. Une dégradation entre le moment du prélèvement et le stockage à -80 °C pourrait être supposée. En effet, le prélèvement était effectué en début de visite, avant la réalisation des tests cliniques puis, le ou les échantillons étaient centrifugés et aliquotés avant d'être stockés à -

80 °C. Entre le moment du prélèvement et son stockage à -80 °C, on peut estimer un délai variable d'attente du traitement de l'échantillon de une à quatre heures selon les jours.

Le dosage de l'activation du récepteur $P2X_7$ a été effectué sur cinq échantillons de PBMC de patients (prélèvement t12). Le signal fluorimétrique mesuré était près de 6,5 fois plus élevé chez ces patients que chez le volontaire sain ($p$ = 0,025). Ce résultat semble en accord avec les travaux menés précédemment au laboratoire qui mettaient en évidence *in vitro* sur des cultures cellulaires de neuroblastomes et *in vivo* chez la souris traitée, une activation du récepteur $P2X_7$ par l'oxaliplatine [14]. Le récepteur $P2X_7$ est un récepteur transmembranaire impliqué dans les voies de mort cellulaire et de libération de cytokines pro-inflammatoires tels que le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) et l'interleukine-6 (IL6). Par ailleurs, ce récepteur joue un rôle dans le développement de neuropathies d'origine inflammatoire [58], [59]. Ainsi, le niveau d'activation élevé des récepteurs $P2X_7$ chez les patients, tous neuropathiques, de l'étude LIPIDOXA reste cohérent avec le raisonnement selon lequel ce récepteur est suractivé dans la NPIO. Cependant, dans la mesure où le nombre d'échantillons de patients est très faible et où le niveau d'activation du récepteur $P2X_7$ reste inconnu chez les patients à t0, *i.e.* avant traitement, il est délicat de relier le niveau élevé d'activation du récepteur $P2X_7$ à l'effet de l'oxaliplatine et donc à la NPIO. Par ailleurs, les différences observées ici sont bien supérieures à celles observées sur les cultures cellulaires et les souris qui sont de l'ordre de 20 – 25 % par rapport au contrôle [14]. Même si les résultats obtenus sur cellules et chez le petit animal ne sont pas strictement comparables à ceux obtenus chez l'homme, on peut supposer que d'autres facteurs interviennent dans la régulation de l'activation du récepteur $P2X_7$ parmi lesquels la maladie cancéreuse [281].

## 5.3. Pistes d'amélioration de la méthodologie de LIPIDOXA

L'étude pilote LIPIDOXA est une étude de faisabilité qui vise à préparer une éventuelle étude clinique de plus grande ampleur. L'enjeu était par conséquent de développer une méthodologie fiable et robuste pour des études ultérieures. Il s'agit également de conforter et préciser notre problématique de recherche et de constituer des arguments scientifiques pour évaluer les moyens nécessaires à la réalisation des recherches. La méthodologie ainsi développée pour LIPIDOXA pilote est destinée à évoluer et se renforcer.

Concernant le **Thermotest**, l'amplitude de mesure pour les seuils de douleur semble mal adaptée puisqu'un certain nombre de patients présentent des seuils de douleur en dehors du domaine de validité du Thermotest. En effet, sur les 194 mesures réalisées avec le Thermotest, 74 seuils de douleur au froid n'ont pas pu être mesurés quantitativement (CPT < 8 °C) et 45 seuils de douleur au chaud n'ont pas pu être mesurés quantitativement (HPT > 50 °C). Il convient donc

d'élargir le domaine de mesure du Thermotest. Ce dernier a été calibré en 2016 pour mesurer des seuils allant de 5 °C à 50 °C et une nouvelle séquence a été paramétrée pour intégrer cette évolution. Elle a été mise en pratique dans l'étude CANALOXA, exploration de la douleur neuropathique induite à l'oxaliplatine par une approche électrochimique, une étude du GHPSJ qui fait suite à l'étude LIPIDOXA. Par ailleurs, selon Ng Wing Tin, l'étude des **seuils de douleur au froid et au chaud** n'est pas adaptée pour **différencier les patients atteints de neuropathies des sujets *a priori* sains dans la mesure où** les seuils de douleur au froid et au chaud sont trop variables.

Concernant le test aux filaments de Von Frey, il n'a pas donné de résultats satisfaisants. Or, des équipes ont utilisé ce test pour étudier la NPIO. Notre méthode de mesure de la sensibilité tactile est donc sans doute à revoir. La zone de pression des filaments était peut-être mal appropriée, la mesure étant effectuée au niveau du dos de la main.

Concernant le questionnaire de douleur neuropathique NPSI, il a été utilisé dans plusieurs études évaluant la NPIO [26], [82]. Cependant, les informations que l'on a pu extraire dans l'étude à partir des réponses du questionnaire sont pauvres. De nombreux autres questionnaires sont utilisés dans l'évaluation de la NPIO.

Il pourrait être judicieux d'utiliser le **vibromètre** : c'est un dispositif médical permettant de mesurer la sensibilité vibratoire. L'évaluation des seuils vibratoires est déterminée selon la méthode des limites. Des stimulations d'intensité croissante sont appliquées et le sujet doit signaler verbalement l'apparition d'une sensibilité vibratoire permettant d'obtenir un seuil vibratoire. Ce dispositif a déjà été utilisé dans l'étude de la NPIO [128].

Il pourrait être judicieux d'utiliser d'autres questionnaires tels que le **Total Neuropathy Score** (TNS) ou le questionnaire **QLQ-CIPN20**. Le questionnaire TNS est un questionnaire initialement développé pour évaluer les neuropathies diabétiques [129]. Il a par la suite été adapté pour l'étude des neuropathies se développant sous chimiothérapies en TNS-chemotherapy [1], [103]. Le questionnaire QLQ-CIPN20 a été spécialement développé pour évaluer la qualité de vie chez les patients traités par chimiothérapie neurotoxique. A ce jour, plusieurs études explorant la NPIO ont intégré ce questionnaire de qualité de vie [133], [134].

Le Thermotest, le vibromètre, les filaments de Von Frey et les questionnaires sont considérés comme étant des examens semi-objectifs, voire subjectifs. Ainsi, la sensibilité des mesures est tributaire de la **coopération du patient** et de la **configuration de son environnement**. Il existe des examens capables d'évaluer de façon totalement objective les atteintes neuropathiques telle que la biopsie cutanée, technique de référence permettant de mesurer la densité en IENF. Une diminution est le signe d'une neuropathie à petites fibres [282]. Il existe des tests non invasifs qui permettent d'évaluer l'intégrité des IENF. Il s'agit du **Sudoscan** (Impeto Medical, Paris, France) [1].

Concernant les explorations biochimiques, nous pouvons nous interroger sur la méthode employée dans LIPIDOXA pour évaluer le niveau plasmatique de stress oxydant. Celle-ci repose sur l'utilisation de la sonde $H_2$DCF-DA, méthode habituellement utilisée pour évaluer le niveau de stress oxydant cellulaire. En effet, la sonde $H_2$DCF-DA pénètre dans les cellules puis est clivée par des estérases cytosoliques et enfin oxydée par les ROS, essentiellement le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$. La sonde clivée et oxydée devient alors fluorescente. Dans le plasma, la sonde $H_2$DCF-DA est clivée par les estérases plasmatiques. Cette méthode a été adoptée pour évaluer le niveau de stress oxydant dans les prélèvements de plasma des patients pour s'inscrire dans la continuité des travaux précédents du laboratoire [14]. Il existe d'autres méthodes d'évaluation du stress oxydant dans le plasma parmi lesquels le dosage du 8-isoprostane ou des produits d'oxydation des protéines ou encore le dosage plasmatique du malonialdéhyde, marqueur de la peroxydation lipidique [270]. L'utilisation de ces marqueurs dans une étude clinico-biologique ultérieure est à discuter en raison de leur faible spécificité pour la NPIO.

Concernant l'étude du récepteur $P2X_7$, les premiers résultats obtenus chez quelques patients traités ont permis d'apporter la preuve du concept de la réalisation de cette exploration et ont validé l'opportunité d'approfondir l'étude du récepteur $P2X_7$ sur les PBMC par une étude longitudinale avec davantage de patients.

Enfin, une des difficultés majeures de l'étude a été de **mobiliser les ressources humaines nécessaires pour assurer les visites**. Des visites initialement prévues à chaque cycle (*i.e.* tous les 14 jours dans les protocoles FOLFOX, FOLFIRINOX) ont rapidement complexifié la logistique pour les opérateurs et s'est également montré lourd pour les patients. Il conviendrait donc de réduire le nombre de visites. Effectuer des visites rapprochées peut présenter un intérêt dans l'évaluation de troubles d'évolution rapide comme la neuropathie aiguë. En revanche, la neuropathie chronique est un processus lentement évolutif et un nombre limité de visites correctement espacées peut être suffisant. Par ailleurs, un suivi total d'un an peut paraître court au regard de l'évolution lente sur plusieurs années après traitement [262]. Ainsi, l'équipe de Kokotis a suivi pendant trois ans des patients traités par oxaliplatine en jalonnant l'étude de six visites : une visite *baseline* (avant de démarrer le traitement), une visite cinq jours après le début du traitement par oxaliplatine, une visite au cycle 3 ou 4, une visite dans le mois avant la fin du traitement une visite 12 à 21 mois après la fin du traitement et enfin une visite 28 à 39 mois après la fin du traitement [128]. Un suivi long présente un intérêt dans l'étude et la compréhension de l'évolution de la neuropathie chronique. L'inconvénient est que plus l'étude est longue, plus le risque de *perdu de vue* et de décès est important. Par ailleurs, la bonne gestion des moyens humains dans les études longues est importante.

**L'étude pilote LIPIDOXA** est une **étude de faisabilité** qui vise à préparer l'étude clinique LIPIDOXA en terme de **développement méthodologique**. L'enjeu était d'une part d'approuver la faisabilité du projet LIPIDOXA et d'autre part d'établir la preuve du concept de l'étude du lipidome dans la NPIO. Les premiers résultats de l'étude pilote ont permis d'élaborer de nouveaux arguments scientifiques pour prétendre répondre à des appels d'offres tels que les Programmes de Recherche Translationnelle en Cancérologie (PRT-K) de l'INCa-DGOS ou les Programmes Hospitaliers de Recherche Clinique (PH-RC) du Ministère de la Santé. D'autre part, grâce aux récents résultats, nous avons fait évoluer notre thème de recherche vers l'étude des perturbations métaboliques associées au cancer et le lien entre métabolisme lipidique et douleur neuropathique.

# Chapitre V : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche électrochimique

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Rationnel de l'étude

Il a été montré précédemment que l'utilisation du Thermotest nous permettait de détecter la NPIO à travers l'apparition d'une hypoesthésie thermique distale des membres supérieurs. Cependant, la détection tardive de cette hypoesthésie (*i.e.* après l'arrêt du traitement) et les caractéristiques inhérentes à cette méthode (examen long, manque de consensus et de valeurs seuils pathologiques, mauvaise reproductibilité, subjectivité des résultats) sont autant d'éléments qui limitent sa potentielle utilisation pour la pratique courante. Aussi, nous proposons d'étudier à présent l'intérêt de disposer d'une méthode électrochimique rapide et non invasive afin de détecter de manière précoce et de quantifier l'état des petites fibres nerveuses chez les patients traités par oxaliplatine, reflet de la NPIO. Le Sudoscan®, un dispositif validé dans le diagnostic des neuropathies autonomes périphériques des patients diabétiques, pourrait être un nouvel outil candidat pour assurer le suivi, la détection et la quantification des NPIO. Dans ce contexte, nous avons conçu l'étude clinique CANALOXA.

L'hypothèse de travail proposée est que le sudoscan est capable de détecter la NPIO en cours de traitement par oxaliplatine. Selon cette hypothèse, l'intensité de la perte en fibres nerveuses intraépidermiques survenant sous traitement par oxaliplatine peut être mesurée par le SUDOSCAN.

Les objectifs de ce second travail sont d'évaluer l'intérêt d'utiliser le Sudoscan® dans le diagnostic de la NPIO et d'étudier la relation entre paramètres électrochimiques du Sudoscan® et paramètres cliniques.

### 1.2. Aspect réglementaire et enregistrements

L'étude CANALOXA est une étude prospective monocentrique en soins courants (service d'oncologie de l'hôpital Paris Saint Joseph). Le promoteur de l'étude est le Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph.

L'étude CANALOXA ne change pas le traitement des patients mais la prise en charge des soins est quelque peu modifiée dans la mesure où des paramètres cliniques et électrochimiques sont

mesurés. Aussi, l'étude CANALOXA est classée comme une recherche interventionnelle en soins courants. L'étude CANALOXA a été enregistrée auprès de l'Agence Nationale de Sécurité de Médicament (numéro ID RCB : 2015-A01995-44) et a obtenu un avis favorable du CPP Ile de France II en avril 2016.

L'étude CANALOXA a été déclarée et enregistrée sur *clinicaltrial.gov* sous le numéro d'identification NCT02827916.

## 1.3.Patients

La sélection des patients reprend les critères de l'étude LIPIDOXA avec quelques différences (Tableau 13). L'étude LIPIDOXA était une étude de suivi des patients sur un an (avant traitement, pendant et 6 mois après l'arrêt), à l'inverse, l'étude CANALOXA concerne une évaluation unique des patients. Tous les patients du service d'oncologie **en cours de traitement** par oxaliplatine sont invités à participer à l'étude à partir du 6$^{e}$ cycle de chimiothérapie. Tout type de cancer est accepté. Le consentement éclairé est recueilli lors de la première visite d'inclusion et une lettre d'information est remise au patient (Annexe 5). Sur la base des critères d'inclusion de LIPIDOXA, les patients ayant des neuropathies déjà déclarées ou ceux présentant des facteurs de risque de neuropathie (traitement préalable par cisplatine ou oxaliplatine, patients dépendants à l'alcool, patients diabétiques) ne sont pas inclus. Par ailleurs, les patients traités par des antalgiques indiqués dans le soulagement de la douleur neuropathique (carbamazépine, gabapentine, prégabaline, clomipramine, amitriptyline, imipramine, duloxétine) ou ceux traités par des molécules ayant prouvé leur efficacité dans la prophylaxie des douleurs neuropathiques induites à l'oxaliplatine (venlafaxine) ne sont également pas inclus. Les patients atteints de métastases cérébrales et ceux souffrant de troubles psychiatriques ne sont pas inclus. Enfin, en raison de l'utilisation du Sudoscan, les patients porteurs de dispositifs implantables (pacemaker, défibrillateur implantable) ne sont également pas inclus (contre-indication à l'utilisation du Sudoscan).

| **Critères d'inclusion** |
|---|
| Patient homme ou femme de plus de 18 ans et suivi dans le service d'oncologie. |
| Patient en cours de traitement par oxaliplatine et ayant réalisé au moins 5 cycles d'un protocole à base d'oxaliplatine. |
| Patient présentant une neuropathie cliniquement objectivée (à partir du grade 1 selon l'échelle CTCAE v4.0) |
| **Critères de non inclusion** |
| Patient présentant des métastases cérébrales ou leptoméningées. |
| Patient traité préalablement par du cisplatine. |
| Patient dépendant à l'alcool ou ayant de tels antécédents. |
| Patient diabétique présentant des troubles neurologiques périphériques. |
| Patient atteint de neuropathies. |
| Patient atteint de troubles psychiatriques. |
| Patient porteur de dispositifs implantables (pacemaker, défibrillateur implantable) |
| Patient actuellement traité par au moins un des neurotropes suivants : venlafaxine, carbamazépine, gabapentine, prégabaline, clomipramine, amitriptyline, imipramine, duloxétine. |

Tableau 13| Critères d'éligibilité à l'essai clinique CANALOXA.

## 1.4. Méthodes

### *1.4.1. Matériel de mesure employé*

La méthodologie de l'étude CANALOXA a été basée sur la méthodologie de l'étude LIPIDOXA. Nous avons identifié quatre principaux outils complémentaires pour explorer les différentes composantes de la NPIO.

1) Les **conductances électrochimiques de la peau** (ESC) ont été mesurées grâce au dispositif Sudoscan (IMPETO, Paris, France).
2) Les **seuils de sensibilité thermique** ont été évalués grâce au dispositif **Thermotest** (SOMEDIC AB, Hörby, Suède).
3) La **douleur neuropathique** a été évaluée grâce au questionnaire **Neuropathic Pain Symptom Inventory** (NPSI).
4) La **neuropathie dans son ensemble** a été évaluée cliniquement par les oncologues grâce à l'échelle numérique **NCI-CTCAE**.

Des **protocoles détaillés ont été établis** pour chaque outil de mesure, spécifiant la séquence de mesure, le discours au patient et le contrôle de l'environnement (Annexe 3). Ces tests ont été effectués **une seule fois** pour chaque patient inclus et ce, juste avant administration de l'oxaliplatine.

### *1.4.2. Statistiques*

Les résultats sont donnés sous la forme moyenne ± écart-type [min – max] en valeur numérique ou moyenne ± erreur-type dans les graphiques. Des tests non paramétriques : tests de comparaison de moyennes : test de Wilcoxon et test de Kruskal-Wallis et test de corrélation de Spearman ont été employés. Des régressions logistiques de type ANCOVA ont également été employé afin d'étudier les relations entre des variables quantitatives expliquées et des variables qualitatives et/ou quantitatives explicatives.

### *1.4.3. Evaluation des performances des tests*

Les performances d'une technique peuvent être évaluées par la sensibilité, la spécificité et l'exactitude. La sensibilité correspond au taux de vrais positifs alors que la spécificité correspond au taux de vrais négatifs. Afin de déterminer et de comparer les performances diagnostiques de différentes techniques, on utilise la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Il s'agit d'une représentation graphique de la relation entre la sensibilité et la spécificité du test en question calculée pour toutes les valeurs seuils possibles [155]. Le taux de faux positifs est reporté en abscisse (1-spécificité) et le taux de vrai positifs en ordonné (sensibilité) (Figure 69). La courbe ROC est une approche non paramétrique permettant de mesurer l'association entre une variable continue X (*e.g.* la mesure d'un appareil) et une variable binaire Y (*e.g.* un état pathologique ou non). La performance de la technique est alors déterminée par le calcul de l'aire sous la courbe AUC (*Area Under the Curve*) [156], [157]. Une AUC à 0,5 traduit une probabilité de faux positifs de 50 %, soit un apport nul. Une AUC à 1 correspond à une probabilité de vrais positifs de 100 %, ce qui signifie que les échantillons sont correctement classés dans 100 % des cas. On considère qu'une AUC est acceptable à partir de 0,7 ; bonne entre 0,8 et 0,9 et excellente à partir de 0,9 [283].

Les courbes ROC ont été initialement inventées pendant la Seconde Guerre mondiale pour pouvoir détecter les objets ennemis en séparant les signaux radar d'intérêt du bruit de fond. Aujourd'hui, les courbes ROC sont largement utilisées en statistiques dans des domaines très variés (médecine, radiologie, biométrie, prévision des risques naturels, météorologie…) [158], [159].

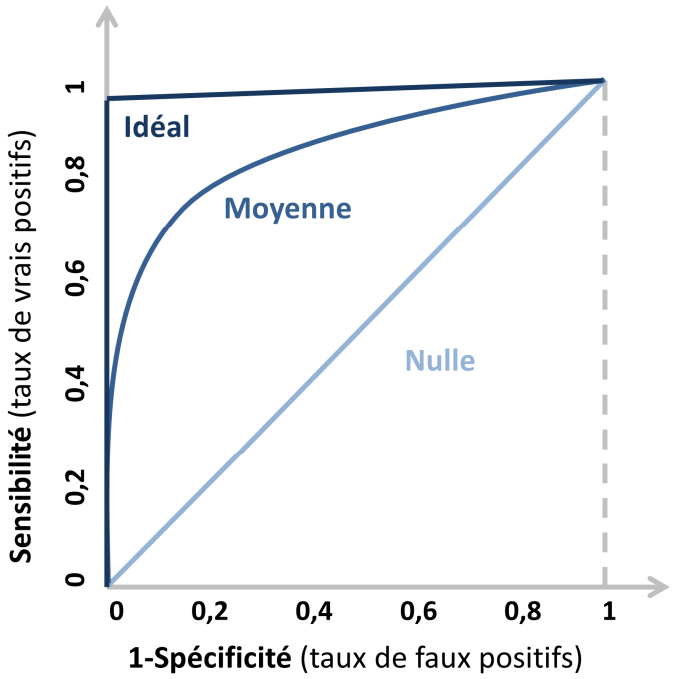



Figure 69| Représentation schématique de trois courbes ROC avec différentes valeurs d'AUC

## 2. Résultats de l'étude CANALOXA

Les résultats du travail présenté ci-après ont fait l'objet d'une publication au Journal *Neurology Research International* (Annexe 12).

### 2.1.Description de la population incluse

Du mois d'avril 2016 à mars 2017, **36 patients** ont été inclus (18 femmes et 18 hommes). Les caractéristiques des patients sont présentées dans le Tableau 14. L'âge moyen est de 64 ± 11 ans (26-84 ans). Les patients souffraient essentiellement de cancers colorectaux (n= 19 ; 53 %) et étaient au stade métastatique (stade IV) (n= 20 ; 56 %). Au moment de la visite, ils présentaient principalement une neuropathie de grade I (92 %) selon le questionnaire CTCAEv.4.

| | n | *(%)* |
|---|---|---|
| **Genre** | | |
| Femme | 18 | *(50)* |
| Homme | 18 | *(50)* |
| **Age (années)** | | |
| <60 | 10 | *(28)* |
| [60– 66[ | 8 | *(22)* |
| [67-72[ | 9 | *(25)* |
| ≥72 | 9 | *(25)* |
| **Localisation de la tumeur** | | |
| Colon | 12 | *(33)* |
| Estomac | 6 | *(17)* |
| Foie | 1 | *(3)* |
| Pancréas | 9 | *(25)* |
| Rectum | 7 | *(19)* |
| Péritoine | 1 | *(3)* |
| **Stade du cancer** | | |
| I | 0 | *(0)* |
| II | 1 | *(3)* |
| III | 15 | *(42)* |
| IV | 20 | *(55)* |
| **Protocoles de chimiothérapie** | | |
| FOLFOX | 26 | *(72)* |
| FOLFIRINOX | 9 | *(25)* |
| GEMOX | 1 | *(3)* |
| **Grades de neuropathie selon CTCAE v4.0** | | |
| I | 33 | *(92)* |
| II | 3 | *(8)* |
| **Cycle de chimiothérapie** | | |
| C6 | 19 | *(53)* |
| C7 – C9 | 14 | *(39)* |
| C10 – C12 | 3 | *(8)* |

Tableau 14| Caractéristiques de la population de l'étude CANALOXA

## 2.2.Conductances électrochimiques de la peau

Les conductances électrochimiques ont été mesurées bilatéralement au niveau des membres inférieurs et des membres supérieurs, générant deux couples de valeurs d'ESC par patient : main droite, main gauche et pied droit, pied gauche. Cependant, ces couples de valeurs ne sont pas indépendants. En effet, il existe une forte corrélation au sein de chaque couple de valeurs. Vinik et collaborateurs ont évalué une corrélation droite/gauche de 0,96 pour les mains

et de 0,97 pour les pieds ($p < 0,0001$) sur une cohorte de 1350 individus en bonne santé [284]. Une telle relation est retrouvée pour la cohorte des patients de CANALOXA avec une corrélation (Spearman) droite/gauche de 0,97 pour les mains et 0,82 pour les pieds ($p < 0,0001$). Par ailleurs, les moyennes des ESC entre droite et gauche ne sont pas différentes : $p = 0,64$ pour les mains et $p = 0,69$ pour les pieds (test de Wilcoxon). Pour ces raisons, nous proposons de créer deux nouvelles variables en faisant la moyenne entre droite et gauche des valeurs pour les mains d'une part et les pieds d'autre part puisqu'il existe une certaine symétrie.

Les valeurs moyennes des ESC (moyenne ± écart-type [min – max]) sont : **65,3 ± 19,0 µS** [9,5 – 90] pour les **mains** et **65,3 ± 16,6 µS** [24,5 – 88,5] pour les **pieds**. Il n'y a pas de différence entre ces deux moyennes, $p = 0,79$ (test de Wilcoxon apparié), cependant, les valeurs des mains et des pieds ne sont pas parfaitement corrélées entre elles ($\rho = 0,54$, $p = 0,0006$). Ceci signifie que bien que les valeurs d'ESC soient proches, il existe un certain degré d'indépendance entre les valeurs des mains et celles des pieds. Aussi, il est nécessaire de distinguer ces deux mesures dans les analyses ultérieures.

Avant d'étudier les éventuelles relations entre les conductances électrochimiques et les variables relatives à la pathologie ou au traitement ; les influences du genre, de l'âge et de l'IMC sur les conductances électrochimiques des mains et des pieds sont étudiées. Ces trois variables explicatives étant quantitatives et qualitatives, une régression multiple de type analyse de la covariance (ANCOVA) est réalisée pour modéliser leurs effets sur les conductances électrochimiques. Ni l'âge, ni le genre, ni l'IMC n'ont d'effet sur les valeurs des conductances électrochimiques des mains ($p = 0,51$ ; $p = 0,32$ ; $p = 0,50$ respectivement) et des pieds ($p = 0,25$ ; $p = 0,75$ ; $p = 0,53$ respectivement). Par conséquent les conductances électrochimiques sont indépendantes de ces variables et il n'est pas nécessaire de les analyser en sous-groupes selon l'âge, le genre ou l'IMC.

Les distributions des valeurs d'ESC sont présentées par les histogrammes de la Figure 70 pour les mains et de la Figure 71 pour les pieds. Cette variable n'est pas distribuée normalement et semble suivre une autre loi statistique (loi $\beta$ de paramètres $\alpha = 4,5$ et $\beta = 2$). La normalité des distributions a été testée par un test de Shapiro-Wilk permettant de rejeter l'hypothèse selon laquelle les distributions des valeurs d'ESC sont normales pour les mains et les pieds ($p = 0,01$ et $p = 0,008$ respectivement). Par conséquent, nous choisirons pour la suite de l'étude statistique des tests non paramétriques de type Wilcoxon ou Kruskal Wallis pour la comparaison de moyennes ou de Spearman pour la corrélation.

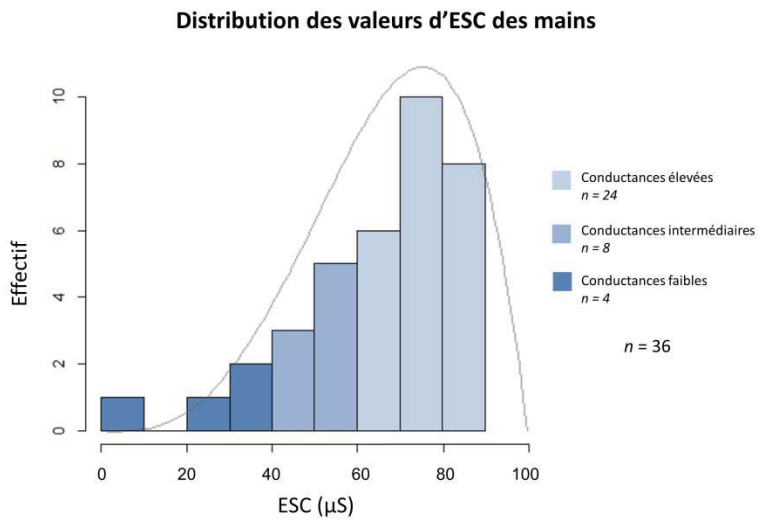



Figure 70| Distribution des valeurs d'ESC mesurées au niveau des mains chez les 36 patients.

*ESC > 60 µS : Sujet à conductances élevées : pas de dysfonctionnement de la fonction sudorale, n = 24.*

*40 < ESC <60 µS : Sujet à conductances intermédiaires : premiers signes possibles d'une neuropathie autonome périphérique, n = 8.*

*ESC < 40 µS : Sujet à conductances faibles : dysfonctionnement de la fonction sudorale et neuropathie périphérique avancée, n = 4.*

*La courbe grisée représente la densité de probabilité de la loi $\beta$ de paramètres $\alpha = 4,5$ et $\beta = 2$.*

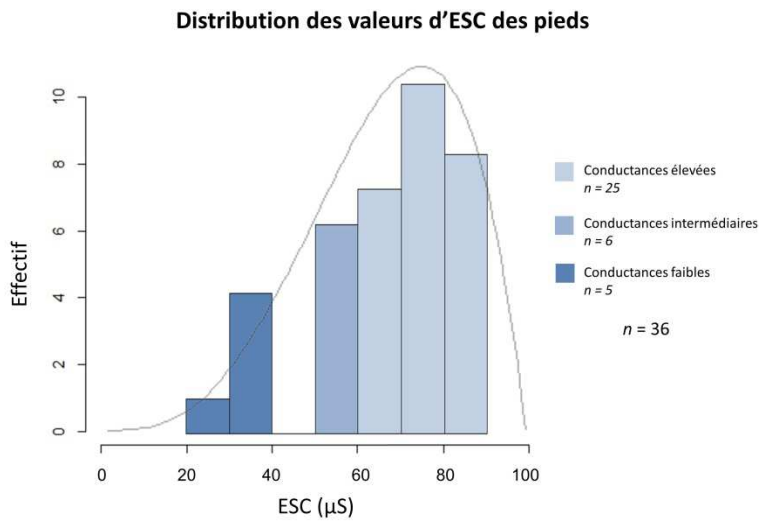



Figure 71| Distribution des valeurs d'ESC mesurées au niveau des mains chez les 36 patients.

*ESC > 60 µS : Sujet à conductances élevées : pas de dysfonctionnement de la fonction sudorale, n = 25.*

*40 < ESC <60 µS : Sujet à conductances intermédiaires : premiers signes possibles d'une neuropathie autonome périphérique, n = 6.*

*ESC < 40 µS : Sujet à conductances faibles : dysfonctionnement de la fonction sudorale et neuropathie périphérique avancée, n = 5.*

*La courbe grisée représente la densité de probabilité de la loi $\beta$ de paramètres $\alpha = 4,5$ et $\beta = 2$.*

Les conductances électrochimiques des mains et des pieds sont présentées selon différentes modalités : le grade de neuropathie évalué le jour de la visite (selon le score NCI-CTCAE) (Figure 72), le stade de cancer (Figure 73), la localisation primitive de la tumeur (Figure 74), le caractère douloureux ou non de la neuropathie (Figure 75), le protocole (Figure 76) et le délai de modification de traitement (Figure 77). De simples tests de Wilcoxon (variable qualitative à deux modalités) ou de Kruskal-Wallis (variable qualitative à *n* modalités) sont effectués. Aucune différence entre les moyennes d'ESC n'est mise en évidence pour les variables *Grades de neuropathie* (66,2 µS *vs* 54,7 µS ; $p = 0,44$ pour les mains et 65,5 µS *vs* 62,8 µS ; $p = 0,37$) ; *Stades (T3 et T4)* de la tumeur (65 µS *vs* 65,3 µS ; $p = 0,59$ pour les mains et 64,4 µS *vs* 65,1 µS ; $p = 0,46$ pour les pieds) ; *Localisation primitive de la tumeur* ($p = 0,15$ pour les mains et $p = 0,08$ pour les pieds) ; *Protocoles* (FOLFOX et FOLFIRINOX) ($p = 0,79$ pour les mains et $p = 0,68$ pour les pieds) ; *Délai de modification de traitement* ($p = 0,72$ pour les mains et $p = 0,20$ pour les pieds). Cependant, on remarque que les patients qui souffrent d'un cancer du côlon ont des conductances électrochimiques plus élevées que les patients qui souffrent d'un cancer de l'estomac (74,7 µS *vs* 50,8 µS ; $p = 0,015$ pour les mains et 75,2 µS *vs* 52,4 µS ; $p = 0,015$ pour les pieds).

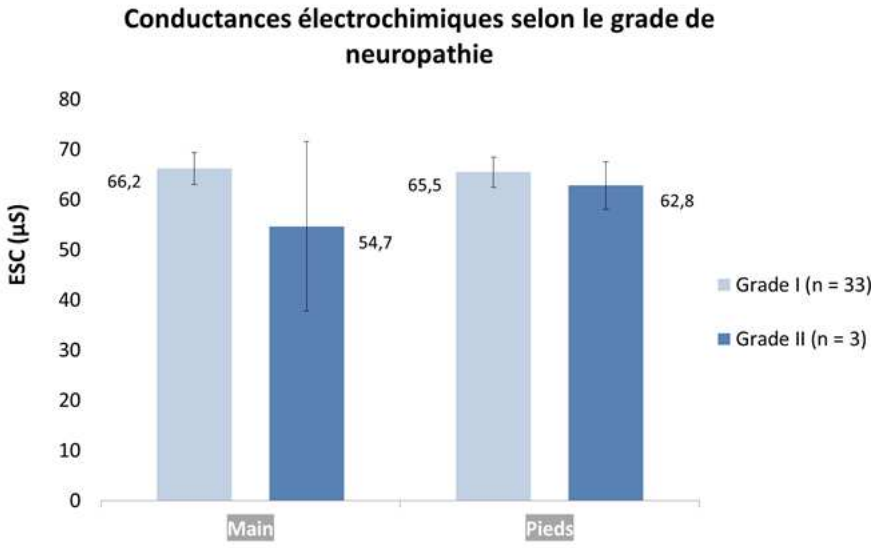



Figure 72| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le grade de neuropathie mesurée selon l'échelle CTCAE.

*Les conductances électrochimiques ne diffèrent pas selon le grade de neuropathie p = 0,44 pour les mains et p = 0,37 pour les pieds.*

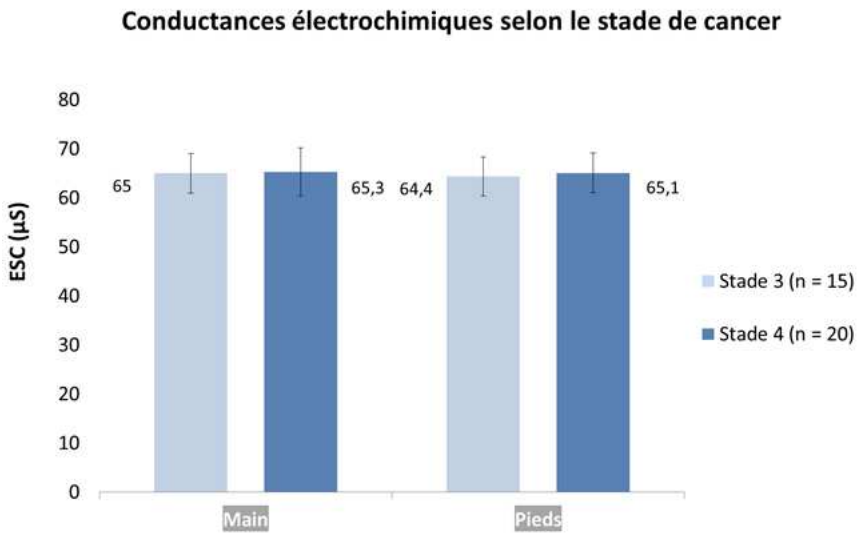



Figure 73| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le stade du cancer.

*Les conductances électrochimiques ne diffèrent pas selon le stade du cancer p = 0,59 pour les mains et p = 0,46 pour les pieds.*

*NB : un seul patient souffrant d'un cancer au stade 2, non pris en compte dans l'analyse.*

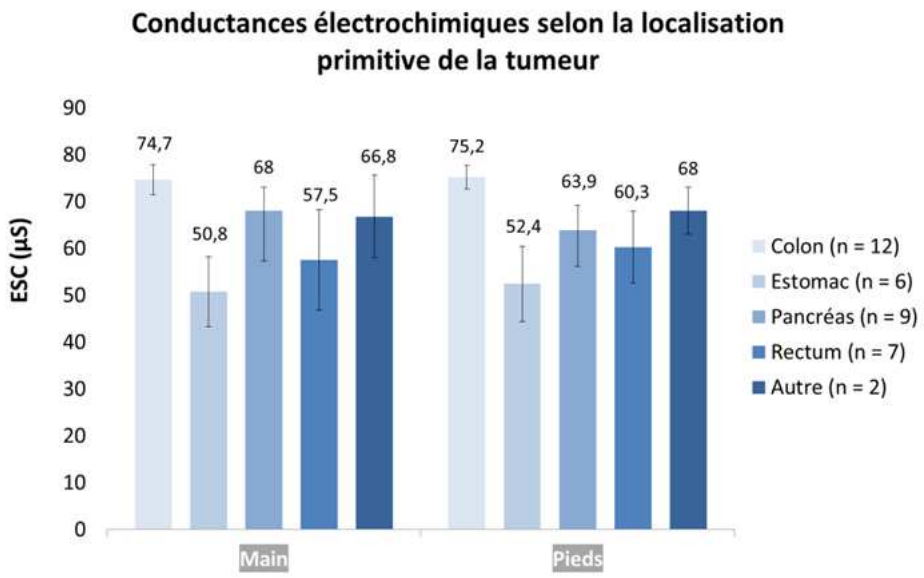



Figure 74| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon la localisation de la tumeur.

*Les conductances électrochimiques ne diffèrent pas selon la localisation primitive de la tumeur p = 0,15 pour les mains et p = 0,08 pour les pieds.*

*NB : les autres localisations correspondent à un cancer du péritoine et à un cancer du foie.*

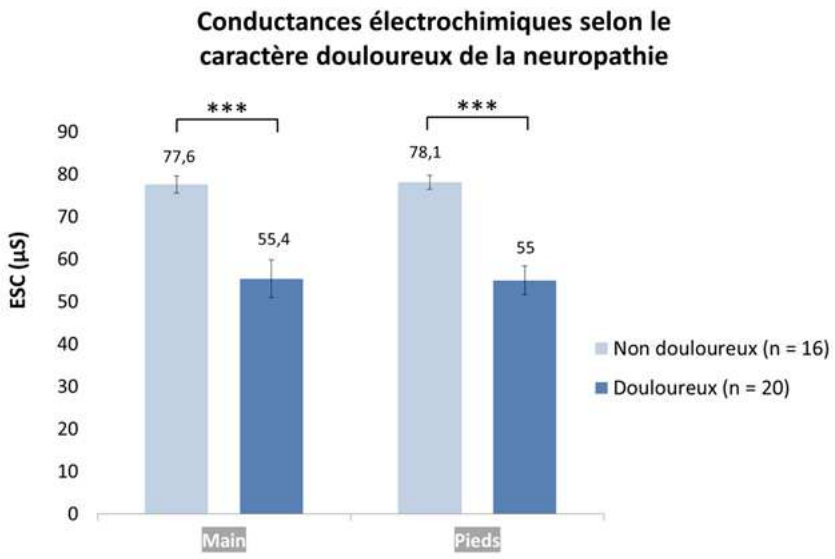



Figure 75| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le caractère douloureux ou non de la neuropathie évalué avec le questionnaire NPSI.

*Les conductances électrochimiques diffèrent selon le caractère douloureux de la neuropathie, les conductances électrochimiques sont plus élevées chez les patients non douloureux que chez les patients douloureux, aussi bien pour les mains, $p = 0,0003$ que les pieds $p < 0,0001$.*

*Patient avec un score nul au questionnaire NPSI : n = 16*

*Patient avec un score strictement positif au NPSI : n = 20*

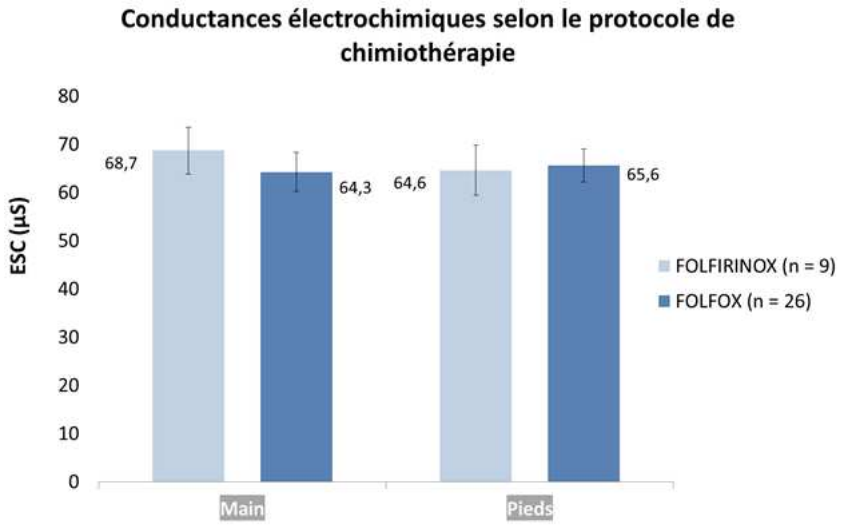



Figure 76| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le protocole de neuropathie.

*Les conductances électrochimiques ne diffèrent pas selon le protocole de chimiothérapie $p = 0,79$ pour les mains et $p = 0,81$ pour les pieds.*

*NB : un seul patient dans le protocole GEMOX, non pris en compte dans les analyses.*

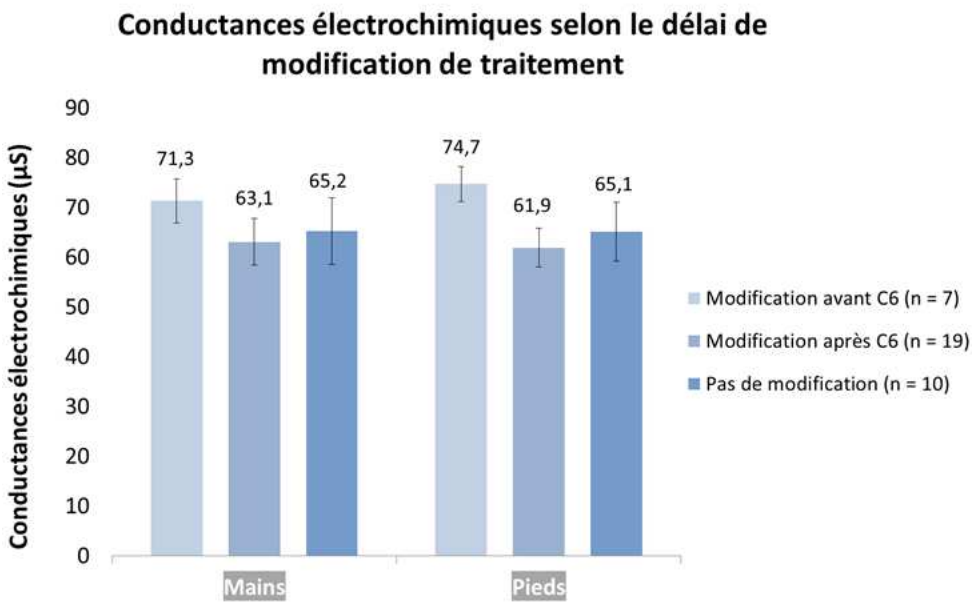



Figure 77| Conductances électrochimiques des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement.

*Les conductances électrochimiques ne diffèrent pas selon le délai de modification du traitement p = 0,73 pour les mains et p = 0,21 pour les pieds.*

En revanche, les moyennes d'**ESC** sont **plus élevées** chez les **patients non douloureux** que chez les **patients douloureux** (77,6 µS *vs* 55,4 µS, $p$ = 0,00028 pour les mains et 78,1 µS *vs* 55 µS, $p$ < 0,0001 pour les pieds). De plus, les valeurs d'**ESC** sont bien **corrélées** avec le **score NPSI** : ρ = -0,69 pour les mains, $p$ < 0,0001 et ρ = -0,79, $p$ < 0,0001), Figure 78 et Figure 79.

Les doses cumulées d'oxaliplatine sont présentées selon les conductances électrochimiques mesurées au niveau des mains et des pieds en respectant la classification en trois catégories : sujets à conductances élevées (ESC > 60 µS), sujets à conductances intermédiaires (40 µS < ESC < 60 µS), et sujets à conductances faibles (ESC < 40 µS) (Figure 80). Il n'y a pas de différence entre les moyennes des doses cumulées d'oxaliplatine reçues estimées pour les trois catégories de conductances électrochimiques ($p$ = 0,21 pour les mains et $p$ = 0,55 pour les pieds). Il apparait cependant une tendance, les patients ayant des conductances faibles (ESC < 40 µS) semblent avoir reçu moins d'oxaliplatine que les patients ayant des conductances supérieures à 40 µS, mais cette observation n'est pas significative (746 mg *vs* 886 mg, $p$ = 0,2 pour les mains et 802 mg *vs* 881 mg, $p$ = 0,36 pour les pieds).

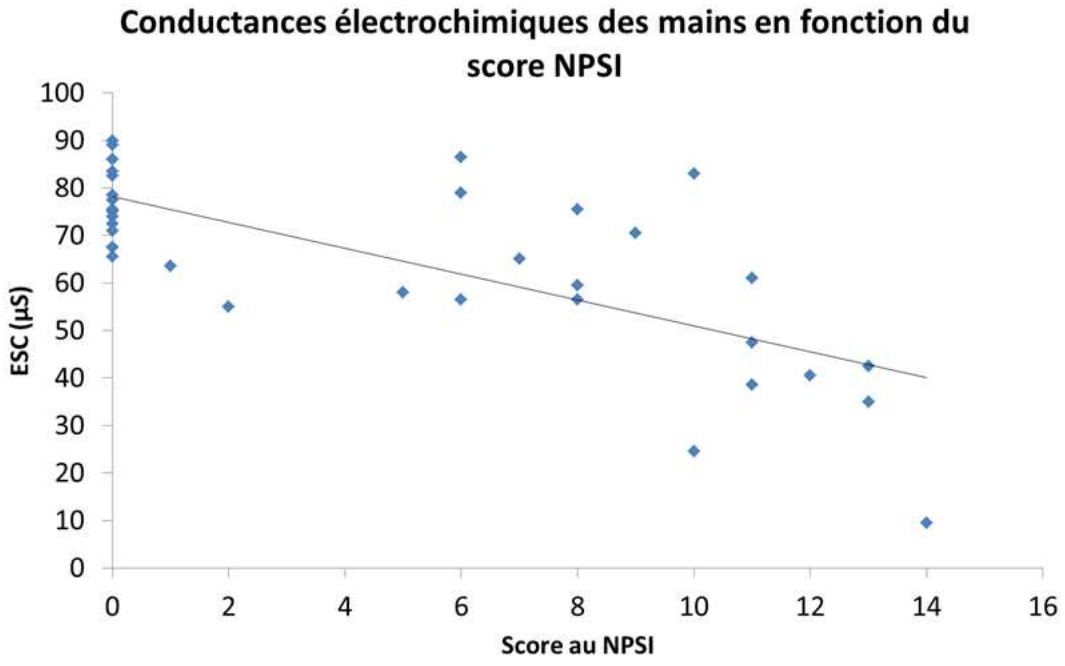



Figure 78| Conductances électrochimiques des mains en fonction du score de neuropathie obtenu avec le questionnaire NPSI.

*Les valeurs d'ESC sont corrélées avec le score NPSI : ρ = -0,69 pour les mains, p < 0,0001*

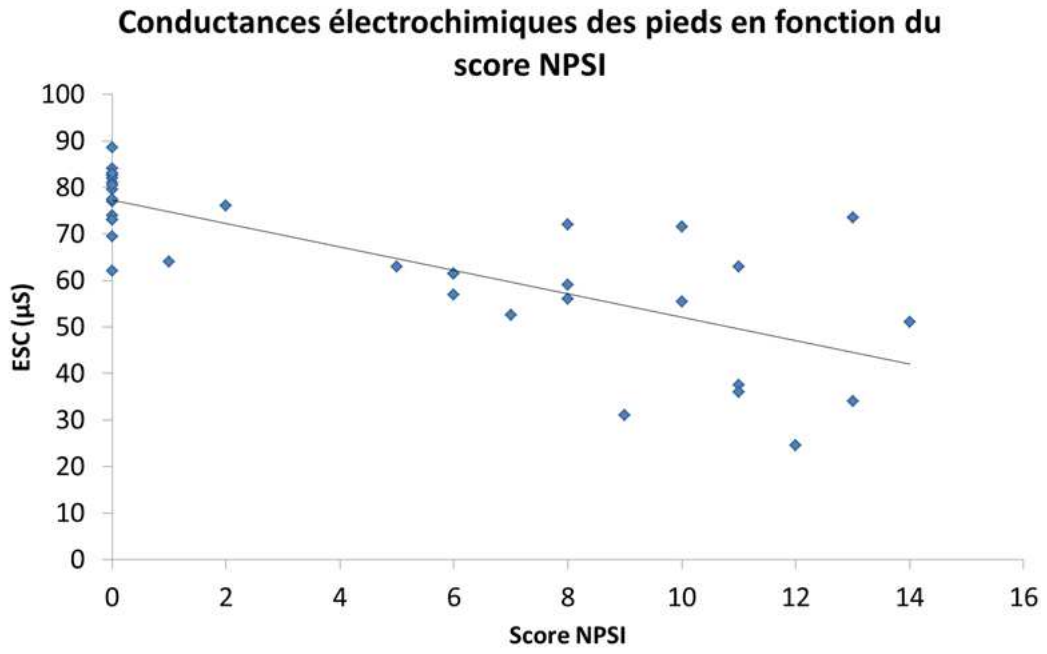



Figure 79| Conductances électrochimiques des pieds en fonction du score de neuropathie obtenu avec le questionnaire NPSI.

*Les valeurs d'ESC sont corrélées avec le score NPSI : ρ = -0,79, p < 0,0001.*

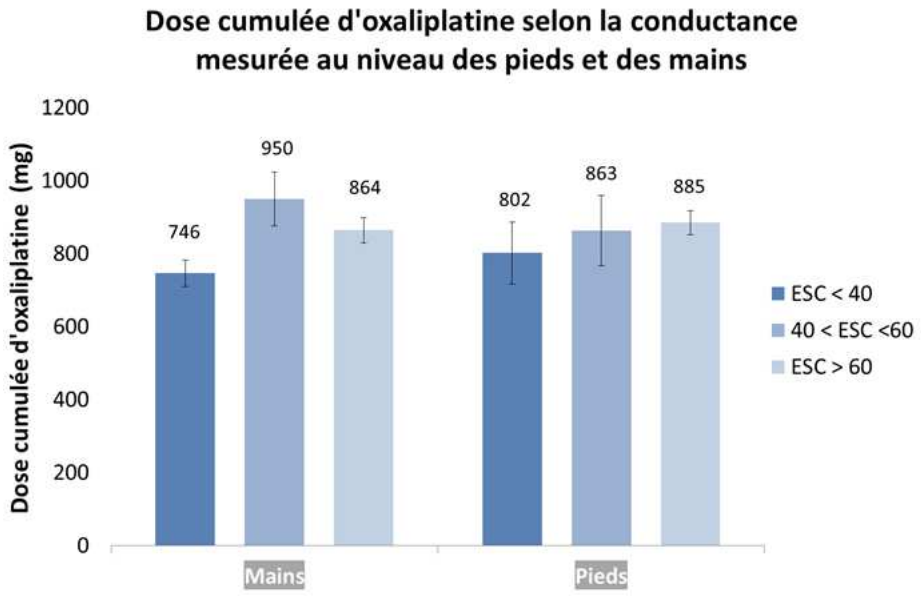



Figure 80| Dose cumulée d'oxaliplatine selon la conductance mesurée au niveau des mains et des pieds.

*Les doses cumulées d'oxaliplatine ne diffèrent pas selon les conductances électrochimiques.*

*ESC > 60 µS : Sujets à conductances élevées : pas de dysfonctionnement de la fonction sudorale, n = 24 (mains) et n = 25 (pieds).*
*40 < ESC <60 µS : Sujets à conductances intermédiaires : premiers signes possibles d'une neuropathie autonome périphérique, n = 8 (mains) et n = 6 (pieds).*
*ESC < 40 µS : Sujets à conductances faibles : dysfonctionnement de la fonction sudorale et neuropathie périphérique avancée, n = 4 (mains) et n = 5 (pieds).*

## 2.3.Seuils de sensibilité thermique

Les seuils de sensibilité thermique ont été mesurées bilatéralement au niveau des membres inférieurs et des membres supérieurs, générant quatre couples de valeurs de seuils thermiques par patient pour les mains (droite et gauche) : CDT, WDT, CPT et HPT et quatre autres couples pour les pieds (droite et gauche) : CDT, WDT, CPT et HPT.

Les moyennes des seuils de détection thermique mesurées à droite et à gauche sont parfois différentes entre elles, aussi bien pour les mains ($p$ = 0,32 ; $p$ = 0,05 ; $p$ = 0,03 et $p$ = 0,63 pour CDT, WDT, CPT, HPT respectivement) que pour les pieds ($p$ = 0,18 ; $p$ = 0,19 ; $p$ = 0,08 et $p$ = 0,40 pour CDT, WDT, CPT, HPT respectivement). De même, les valeurs de seuils thermiques mesurées à droite ne sont pas toujours corrélées à celles mesurées à gauche aussi bien pour les mains (ρ = 0,25 ; ρ = 0,52 ; ρ = 0,77 ; ρ = 0,87 pour CDT, WDT, CPT, HPT respectivement) que pour les pieds (ρ = 0,61 ; ρ = 0,71 ; ρ = 0,68 ; ρ = 0,30 pour CDT, WDT, CPT, HPT respectivement). Il existe donc une certaine hétérogénéité dans ces mesures avec des dysmétries entre droite et gauche pour les seuils de détection du chaud et de douleur au froid pour les pieds. Les valeurs

moyennes des seuils de détection thermique sont présentées dans la Figure 81 et les valeurs moyennes des seuils de douleur thermique dans la Figure 82.

Dans la suite, nous faisons la moyenne entre droite et gauche pour les différents seuils afin de simplifier la description des données.

Les seuils de détection et de douleur thermique des mains sont différents de ceux des pieds, sauf pour la douleur au froid ($p < 0,0001$ ; $p < 0,0001$ ; $p = 0,28$ ; $p < 0,0001$ pour les seuils de détection du froid, au chaud, les seuils de douleur au froid, au chaud, respectivement, test de Wilcoxon apparié). Par ailleurs, les valeurs des seuils thermiques des mains et des pieds ne sont pas parfaitement corrélées entre elles ($\rho = 0,55$, $p = 0,0005$ ; $\rho = 0,48$, $p = 0,004$ ; $\rho = 0,66$, $p < 0,0001$ ; $\rho = 0,38$, $p = 0,02$). Ceci signifie que bien que les seuils thermiques des mains et des pieds sont différents et indépendants. Aussi, il est nécessaire de bien distinguer les seuils des mains des seuils des pieds.

Avant d'étudier les éventuelles relations entre les seuils de détection/douleur thermique et les variables relatives à la pathologie ou au traitement ; les influences du genre, de l'âge et de l'IMC sur les seuils thermiques des mains et des pieds sont étudiées. Comme précédemment, une régression multiple de type analyse de la covariance (ANCOVA) est réalisée pour modéliser leurs effets sur les seuils thermiques. Ni l'âge, ni le genre, ni l'IMC n'ont d'effet sur les seuils de détection du froid des mains ($p = 0,36$ ; $p = 0,93$ ; $p = 0,26$ respectivement) et des pieds ($p = 0,14$ ; $p = 0,73$ ; $p = 0,22$ respectivement). Il en est de même pour les seuils de détection du chaud, de douleur au froid et de douleur au chaud des mains (WDT : $p = 0,84$ ; $p = 0,90$ ; $p = 0,39$ ; CPT : $p = 0,19$ ; $p = 0,68$ ; $p = 0,64$ ; HPT : $p = 0,58$ ; $p = 0,41$ ; $p = 0,12$ respectivement) et des pieds (WDT : $p = 0,72$ ; $p = 0,47$ ; $p = 0,18$ ; CPT : $p = 0,29$ ; $p = 0,43$ ; $p = 0,08$ ; HPT : $p = 0,46$ ; $p = 0,71$ ; $p = 0,29$ respectivement). Par conséquent les seuils de détection et de douleur thermique sont indépendants de ces variables et il n'est pas nécessaire de les analyser en sous-groupes selon l'âge, le genre ou l'IMC.

La Figure 81 présente les valeurs moyennes des seuils de détection thermique. La Figure 82 présente les valeurs moyennes des seuils de douleur thermique.

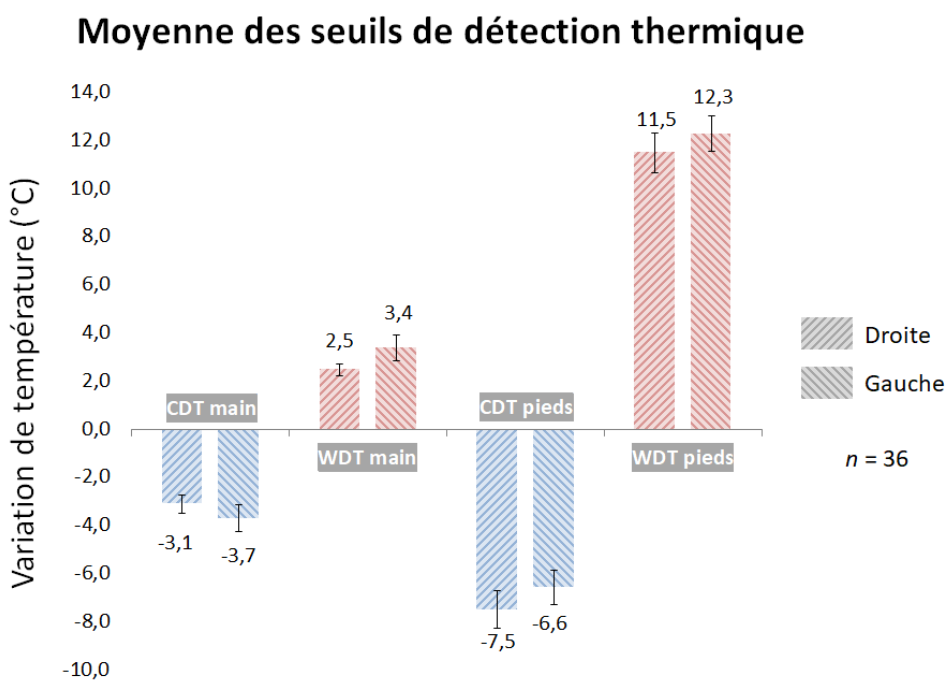



Figure 81| Moyenne des seuils de détection du froid et du chaud mesurés au niveau des mains et des pieds chez les 36 patients de l'étude.

*CDT = Cold Detection Threshold ; WDT = Warm Detection Threshold*

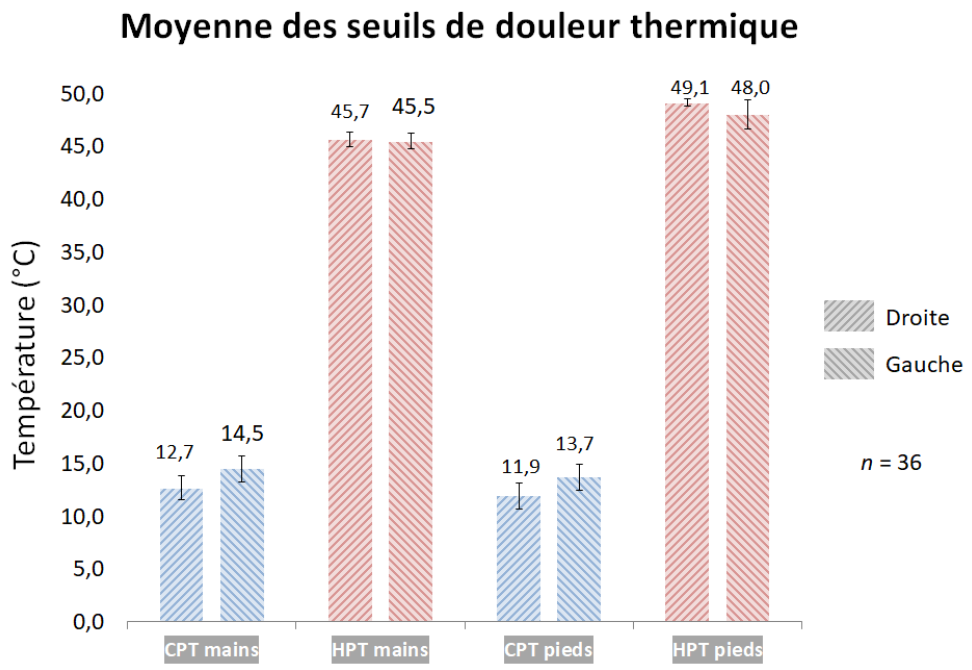



Figure 82| Moyenne des seuils de détection du froid et du chaud mesurés au niveau des mains et des pieds chez les 36 patients de l'étude.

*CPT = Cold Pain Threshold ; HPT = Heat Pain Threshold*

Les distributions des valeurs de seuils de détection thermique au froid et au chaud (CDT, WDT) sont présentées par les histogrammes de la Figure 101 (Annexe 6) pour les mains et de la Figure 102 (Annexe 6) pour les pieds. Les distributions des valeurs de seuils de douleur thermique au froid et au chaud (CPT, HPT) sont présentées par les histogrammes de la Figure 103 (Annexe 6) pour les mains et de la Figure 104 (Annexe 6) pour les pieds. A première vue, ces variables ne semblent pas distribuées selon une loi statistique évidente. La normalité des distributions a cependant été testée par des tests de Shapiro-Wilk. Les distributions des valeurs de seuils de détection thermique ne sont pas normales pour les mains et les pieds sauf pour la distribution des seuils de détection du chaud qui reste compatible avec une distribution gaussienne ($p$ = 0,001 ; $p$ = 0,004 ; $p$ < 0,0001 ; $p$ = 0,14 pour CDT mains ; CDT pieds ; WDT mains ; WDT pieds respectivement). De même, les distributions des valeurs de seuils de douleur thermique ne sont pas normales pour les mains et les pieds ($p$ = 0,006 ; $p$ = 0,003 ; $p$ = 0,0009 ; $p$ < 0,0001 pour CPT mains ; CPT pieds ; HPT mains ; HPT pieds respectivement). Par conséquent, nous choisirons pour la suite de l'étude statistique des tests non paramétriques de type Wilcoxon ou Kruskal Wallis pour la comparaison de moyennes ou de Spearman pour la corrélation.

Les seuils de détection thermique des mains et des pieds sont présentées selon différentes modalités : le grade de neuropathie évalué le jour de la visite (selon le score NCI-CTCAE) (Figure 105, Annexe 6), le stade de cancer (Figure 106, Annexe 6), la localisation primitive de la tumeur (Figure 107, Annexe 6), le caractère douloureux ou non de la neuropathie (Figure 108, Annexe 6), le protocole (Figure 109, Annexe 6) et le délai de modification de traitement (Figure 110, Annexe 6).

Les seuils de douleur thermique des mains et des pieds sont présentées selon différentes modalités : le grade de neuropathie évalué le jour de la visite (selon le score NCI-CTCAE) (Figure 111, Annexe 6), le stade de cancer (Figure 112, Annexe 6), la localisation primitive de la tumeur (Figure 113, Annexe 6), le caractère douloureux ou non de la neuropathie (Figure 114, Annexe 6), le protocole (Figure 115, Annexe 6) et le délai de modification de traitement (Figure 116, Annexe 6).

## 2.4. Douleur neuropathique

Sur les 36 patients de l'étude, **20 patients** (56 %) ont déclaré ressentir une **douleur neuropathique** (score strictement positif au NPSI) et 16 patients (44 %) ont déclaré ne ressentir aucune douleur neuropathique (score nulle au questionnaire NPSI). Les 20 patients ayant eu une neuropathie douloureuse ont obtenu un score total moyen de 8,6. Parmi ces patients, 90 % (18/20) ont déclaré ressentir des douleurs provoquées par un objet froid (question 10,

moyenne = 4,3/10) et 85 % (17/20) ont déclaré des douleurs se présentant comme des picotements ou des fourmillements (questions 11 et 12, moyenne = 4,3/10).

Le lien entre le grade de neuropathie et la présence d'une douleur neuropathique a été étudié par un test exact de Fisher. Les trois patients de grade 2 (100 %) étaient douloureux alors que 52 % (17/33) des patients de grade 1 l'étaient. Les effectifs étant très faibles, cette différence n'est pas significative ($p$ = 0,24).

De même, le lien entre le délai de modification posologique d'oxaliplatine et la présence d'une douleur neuropathique a été étudiée par un test de Fisher exact. A la visite, 28,6 % (2/7) ; 74,7 % (14/19) et 40 % (4/10) sont douloureux dans les groupes *modification posologique avant C6*, *modification posologique après C6* et groupe *aucune modification*, respectivement. Il n'y a pas de différence entre ces trois groupes, les deux variables sont indépendantes ($p$ = 0,08).

## 2.5.Performance du Sudoscan dans la détection de la NPIO

Dans une première analyse, la performance du Sudoscan dans la détection de la **NPIO douloureuse** a été estimée à l'aide de courbes ROC (Figure 83). Les variables à tester étaient les ESC des mains et des pieds. Le score NPSI positif, *i.e.* présence d'une neuropathie douloureuse a été utilisée comme référence pour l'analyse. L'aire sous la courbe ROC a été utilisée pour évaluer les performances du dispositif en termes de sensibilité et de spécificité. Les aires sous la courbe étaient de 0,86 et 0,95 ; respectivement pour les mains et les pieds, valeurs supérieures à 0,7 ; montrant ainsi une bonne sensibilité et spécificité.

Dans une seconde analyse, la performance du Sudoscan dans la détection de la **NPIO** a été également estimée à l'aide de courbes ROC (Figure 84). Les variables à tester étaient les ESC des mains et des pieds. Le score NCI-CTC positif, *i.e.* présence d'une neurotoxicité, a été utilisé comme référence pour l'analyse (les données d'ESC des 20 volontaires sains ont été injectées dans le modèle). L'aire sous la courbe étaient de 0,78 et 0,92 ; respectivement pour les mains et les pieds, valeurs supérieures à 0,7 ; montrant également une bonne sensibilité et spécificité.

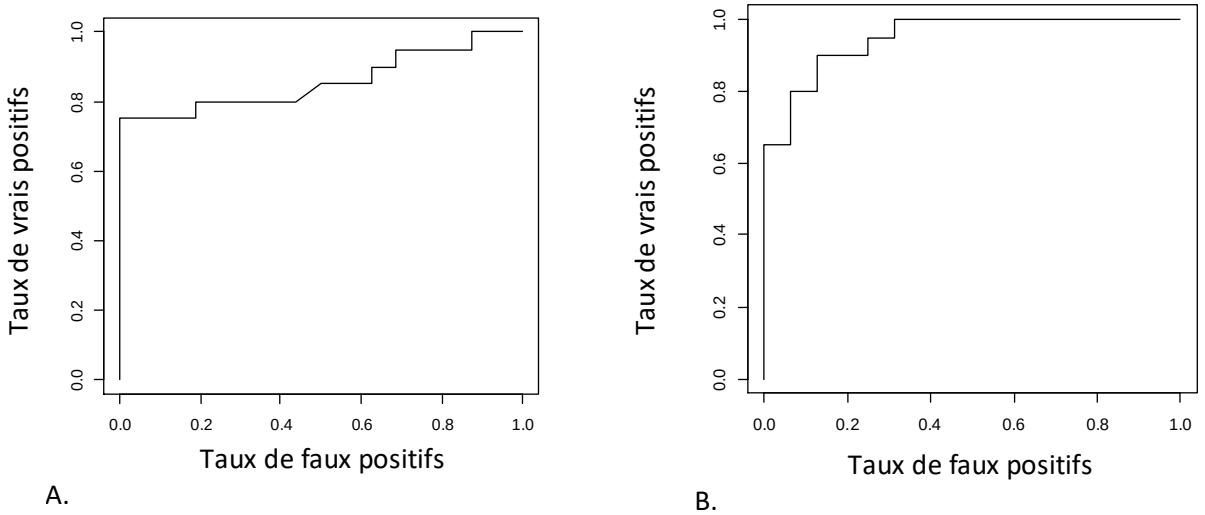



Figure 83| Courbes ROC testant la performance du Sudoscan à détecter une neuropathie douloureuse à partir de la mesure des conductances électrochimiques au niveau des mains (A) et des pieds (B).

*AUC = 0,86 pour les mains et AUC = 0,95 pour les pieds*

*n = 20 patients douloureux*

*n' = 16 patients non douloureux*

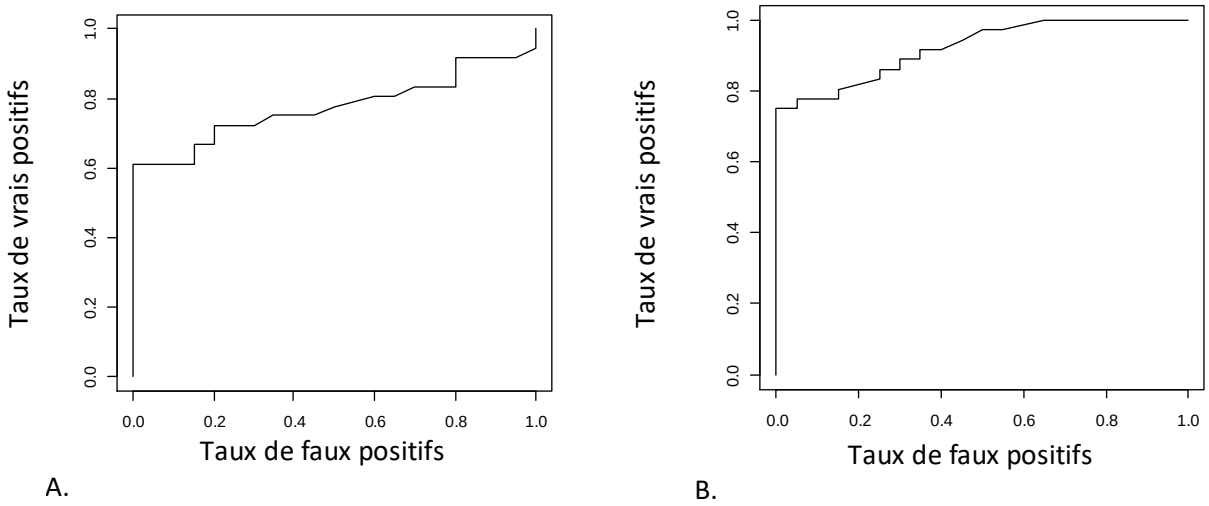



Figure 84| Courbes ROC testant la performance du Sudoscan à détecter une neuropathie à partir de la mesure des conductances électrochimiques au niveau des mains (A) et des pieds (B).

*AUC = 0,78 pour les mains et AUC = 0,92 pour les pieds*

*n = 36 patients atteints de NPIO*

*n' = 20 volontaires sains*

Concernant l'étude des corrélations entre les seuils thermiques (CDT, WDT, CPT, HPT) et l'ESC, aucun lien statistique n'a été mis en évidence (Tableau 15).

| | ESC des mains | | ESC des pieds | |
|---|---|---|---|---|
| | ρ | *p* | ρ | *p* |
| CDT (mains, pieds) | -0,007 | 0,97 | 0,18 | 0,28 |
| WDT (mains, pieds) | 0,20 | 0,25 | -0,14 | 0,40 |
| CPT (mains, pieds) | 0,00 | 0,99 | -0,07 | 0,69 |
| HPT_M (mains, pieds) | 0,14 | 0,42 | -0,13 | 0,47 |
| NPSI | **-0,69** | **<0,0001** | **-0,79** | **<0,0001** |

Tableau 15 | Matrice de corrélation croisant les conductances électrochimiques aux seuils thermiques et à la douleur neuropathique.

*ESC : Conductance électrochimique de la peau ; CDT : Seuil de détection du Froid ; WDT : Seuil de détection du Chaud ; CPT : Seuil de douleur au Froid ; HPT : Seuil de douleur au Chaud ; NPSI : Neuropathic Symptom Inventory*

## Discussion des résultats de l'étude CANALOXA

Le but de ce travail était **d'explorer la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine** par une **approche électrochimique** innovante : l'étude des conductances électrochimiques de la peau. Celles-ci ont été mesurées grâce au **Sudoscan**, un dispositif de mesure des ESC actuellement **validé** et utilisé uniquement dans le **diagnostic** des **neuropathies périphériques diabétiques**. Récemment, son champ d'application tend à s'étendre à d'autres neuropathies d'étiologies autres que métaboliques telles que les neuropathies iatrogènes aux anticancéreux [1]. Les difficultés rencontrées pour diagnostiquer précocement la NPIO soulèvent la nécessité de **développer de nouvelles approches** pour **détecter et prévenir** plus efficacement cet effet indésirable. Par ailleurs, l'apport de nouvelles perspectives d'études de la NPIO renforcerait et approfondirait la **compréhension de sa physiopathologie**. Ainsi, l'opportunité d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic de la NPIO a été évaluée dans ce travail.

Dans l'étude CANALOXA, des **ESC pathologiques** ont été mis en évidence chez environ **un tiers des patients neuropathiques** avec des valeurs moyennes de 65,3 ± 19,0 µS pour les mains et de 65,3 ± 16,6 µS pour les pieds. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment publiés chez les patients traités par oxaliplatine. Dans l'étude de *Saad et al,* les ESC mesurées chez les patients traités par oxaliplatine étaient de 63 ± 2 µS pour les mains et de 66 ± 3 µS pour les pieds.

Dans la mesure où les valeurs d'ESC ne suivent pas une distribution normale, confirmé un test de Shapiro-Wilk, des tests non paramétriques tels que le test de corrélation de Spearman et le test de Wilcoxon ont été employés. Novak affirme que les valeurs d'ESC peuvent être normalisées avec le poids [285]. Dans le traitement des données, la standardisation est utilisée pour éliminer les effets de certaines variables d'influence et ainsi augmenter la pertinence des analyses statistiques. De façon intéressante, lorsque les valeurs de l'étude CANALOXA sont normalisées avec le poids, ces dernières suivent une distribution normale ($p$ = 0,942 pour les mains et $p$ = 0,14 pour les pieds, test de Shapiro-Wilk). Ainsi, l'ESC semble être influencée par le poids des sujets : plus le patient est lourd, plus l'ESC tend à augmenter. Selon Novak, cette dépendance de l'ESC au poids pourrait être due à la variation de la pression appliquée sur les électrodes, pression qui serait proportionnelle au poids. Cependant, cette relation entre le poids et l'ESC n'est pas significative [284]. Par ailleurs ce raisonnement ne s'appliquerait qu'aux ESC des pieds et non aux ESC des mains. En conclusion, si une influence discrète du poids sur l'ESC existe, une étude contrôlée avec un groupe témoin de patients appariés au poids et un effectif plus important pourrait apporter une réponse à cette question. En pratique, comme recommandé par le fabricant et suivi par un très grand nombre d'auteurs, les valeurs brutes d'ESC, non ajustées au poids ont été utilisées dans le présent travail.

La **corrélation** significative entre les **valeurs d'ESC des mains et des pieds** et la **douleur neuropathique**, évaluée par le score NPSI, constitue le principal résultat de cette étude. Les valeurs **d'ESC** sont **diminuées** chez les patients neuropathiques présentant des **symptômes douloureux** par rapport à ceux qui ne présentent pas de symptômes douloureux. Cette relation était associée à une performance élevée du Sudoscan pour diagnostiquer une NPIO douloureuse : l'analyse des courbes ROC associées a montré des résultats significatifs pour les mains et les pieds. Il est intéressant de noter que l'ESC est un paramètre totalement **objectif** alors que le score NPSI est un paramètre totalement **subjectif**. De façon similaire, l'équipe de Saad *et al.* a mis en évidence, chez des patients traités par l'oxaliplatine, une relation entre l'ESC et le score TNSc, un score **subjectif** d'évaluation de la neuropathie [1]. Dans l'étude de Novak *et al*, les valeurs d'ESC n'étaient pas corrélées au score NPSI [285]. Cependant, dans cette étude, l'ESC avait été ajustée au poids et la population était différente puisque non traitée par des anticancéreux neurotoxiques. Il est intéressant de noter que, lorsque les valeurs d'ESC de l'étude CANALOXA sont normalisées avec le poids, les données ne sont plus corrélées, aussi bien avec le score NPSI ($\rho$ = -0,36 et -0,42 respectivement pour les mains et les pieds) que pour les seuils thermiques CDT, WDT, CPT et HPT ($|\rho| < 0,32$).

Les dérivés du platine induisent des lésions nerveuses et altèrent la croissance neuronale [14], [54], [56]. Une étude mettant en jeu des biopsies cutanées a mis en évidence que les valeurs

d'**ESC** étaient **diminuées** chez les patients présentant une **densité réduite en petites fibres nerveuses intra-épidermiques**. Cette réduction était proportionnelle à la densité en petites fibres nerveuses intra-épidermiques [285]. Comparé aux biopsies cutanées, le dispositif Sudoscan présente l'intérêt d'être non invasif. Dans la mesure où l'ESC est diminuée chez les patients douloureux de l'étude CANALOXA, on peut supposer que ce sous-groupe de patients **présente des atteintes nerveuses**, notamment des petites fibres nerveuses intra-épidermiques. Il est envisageable de penser que ces **lésions causées par l'oxaliplatine seraient responsables de la douleur neuropathique** observée chez les patients traités et présentant des ESC diminuées. Cependant, en l'absence de groupe contrôle et de valeurs d'ESC avant traitement, il n'est pas possible d'imputer la réduction des valeurs d'ESC à la neurotoxicité de l'oxaliplatine. En effet, d'autres causes pourraient l'expliquer, la maladie cancéreuse ou bien les carences en vitamines peuvent provoquer des neuropathies infracliniques [54], [55].

Il convient de noter que les **deux tiers des patients neuropathiques** avaient une **ESC normal**. On peut se demander si (1) l'ESC n'est **pas assez sensible** pour diagnostiquer la NPIO ou si (2) l'ESC ne peut **diagnostiquer que des NPIO douloureuses**. (1) En ce qui concerne la sensibilité du dispositif Sudoscan dans la détection de la NPIO, rappelons que, dans de nombreux processus neurotoxiques telles que la neuropathie diabétique, les troubles végétatifs apparaissent tardivement. Par analogie, une ESC normale chez des patients neuropathiques pourrait être expliquée par l'apparition retardée de la composante végétative de la NPIO [262]. Cela peut indiquer que le processus neurotoxique évoluant au cours des trois premiers mois de traitement ne serait pas suffisant pour induire une altération de la fonction sudorale, mesurable par le Sudoscan, bien que tous les patients aient une neuropathie clinique, selon le NCI-CTCAE. Il existe potentiellement une faible sensibilité de cette méthode dans la détection de la NPIO. Une récente méta-analyse traitant de la performance de l'ESC dans l'évaluation des fonctions sudorales et sensitives a revu à la baisse la sensibilité et la spécificité de cette méthode. En outre, les seuils pathologiques de l'ESC pourraient dépendre de paramètres physiopathologiques et d'appartenance ethnique [286]. (2) Concernant la détection des neuropathies douloureuses, des ESC réduites ont été mesurées essentiellement chez les patients souffrant de neuropathie douloureuse. Chez Saad *et al.* les ESC réduites étaient plus généralement mesurées chez les patients neuropathiques, douloureux ou non [1]. On peut se demander si ce sont les bonnes fibres neurologiques qui ont été explorées dans l'étude CANALOXA. En effet, le dispositif Sudoscan n'explore pas les fibres de gros calibre. Il pourrait être pertinent d'effectuer une étude de conduction nerveuse pour mesurer la conduction nerveuse des grandes fibres et ainsi mieux comprendre si l'ESC peut être influencée par un dysfonctionnement de ces grosses fibres chez les

patients traités par l'oxaliplatine. En effet, chez les sujets diabétiques, l'ESC est corrélée avec la vitesse de conduction nerveuse [287].

Les **seuils thermiques** mesurés étaient cohérents avec ceux publiés dans des études antérieures portant sur la NPIO [27]. Les seuils thermiques chez les patients traités par oxaliplatine de l'étude CANALOXA semblaient être plus élevés que ceux mesurés chez des patients non traités et précédemment publiés. Ceci pourrait être révélateur d'une neuropathie chez ces patients traités par oxaliplatine et notamment signer l'apparition d'une hypoesthésie aux stimuli thermiques [262], [288]. Aucune corrélation n'a été observée entre les valeurs d'ESC et les seuils de détection thermique ou de douleur. Ceci suggère que le dispositif Sudoscan et le Thermotest mesurent des paramètres différents, et évaluent donc des fibres nerveuses différentes. Le Sudoscan évalue les fibres C sympathiques non myélinisées qui innervent les glandes sudoripares tandis que le thermotest évalue les fibres Aδ myélinisées et les fibres C non myélinisées. Plus précisément, les thermorécepteurs sensibles au chaud sont des fibres C non myélinisées, tandis que ceux sensibles au froid sont à la fois des fibres C et des fibres Aδ faiblement myélinisées [289]. Un stimulus thermique douloureux est transmis par les fibres C. La faible sensibilité des seuils thermiques pour diagnostiquer la neuropathie des petites fibres a déjà été précédemment rapportée [290], [291]. La reproductibilité est faible et les seuils de douleur sont encore plus dispersés que les seuils de détection, d'où une interprétation délicate [259]. Les seuils thermiques dépendent de nombreux facteurs psychologiques et physiologiques, innés et acquis. Les conditions environnementales, les instructions données par le manipulateur, la motivation du patient et l'origine ethnique peuvent également contribuer à la variabilité des résultats [127]. Ainsi, certains éléments physiologiques, comme la variation de l'épaisseur du stratum corneum, aurait pu introduire des biais de mesure dans l'évaluation des seuils thermiques, ce qui pourrait expliquer l'absence de corrélation entre les différents tests. L'étude CANALOXA était une étude préliminaire avec un nombre limité de patients et avec une évaluation unique, sur un jour. Cette étude pilote a été menée pour étudier l'opportunité et la faisabilité d'utiliser le Sudoscan dans la détection de la NPIO avant de réaliser une étude longitudinale et contrôlée avec un plus grand nombre de patients. Les valeurs d'ESC recueillies dans cette étude ont fourni des informations sur la distribution des ESC et l'écart type, informations essentielles pour la conception de l'étude future. La réalisation d'une étude longitudinale (ESC mesurée avant traitement et tout au long du traitement) et contrôlée (groupe témoin de patients non traités par oxaliplatine) permettrait d'attribuer la réduction de l'ESC à l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine. En ce qui concerne les critères de non-inclusion, il pourrait être pertinent de procéder à un dépistage des symptômes de neuropathie autonome et de doser les folates et la vitamine B12 lors de l'inclusion.

En conclusion, cette étude suggère que la **NPIO douloureuse pourrait être détectée à l'aide du dispositif Sudoscan**. La mesure électrochimique de la conductance cutanée est un test facile à réaliser et non invasif qui pourrait être effectué en pratique courante pour aider le clinicien à gérer la NPIO. Par ailleurs, cette étude renforce la **compréhension de la physiopathologie de la NPIO dans le domaine de la neuropathie à petites fibres**. Toutefois, rappelons que CANALOXA étant une étude de faisabilité, ces résultats doivent être confirmés par une étude longitudinale et contrôlée portant sur un plus grand nombre de patients.

# Chapitre VI : Etude de la neuropathie à l'oxaliplatine par une approche lipidomique

## 1. Analyse lipidomique globale : étude du lipidome des patients traités par oxaliplatine

Le présent travail consiste à adapter une méthode d'analyse lipidomique globale existante à du matériel biologique humain (du plasma) dans un premier temps [292]. Dans un second temps, il s'agit d'étudier les variations qualitatives et semi-quantitatives (relatives) des lipides dans le plasma des patients traités par oxaliplatine (patients de l'étude LIPIDOXA) afin d'identifier de potentiels biomarqueurs lipidiques de NPIO.

### 1.1. Matériel et méthodes

Les patients ont été régulièrement prélevés tout au long du traitement. Quatre millilitres de sang étaient récupérés sur tube EDTA. Après centrifugation à 3 000 tours par minute pendant 10 min, le plasma était isolé et séparé en trois aliquots d'au moins 500 µL. Ces aliquots étaient congelés à -80 °C, l'un servant à l'analyse du lipidome, l'autre au dosage des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation.

#### *1.1.1. Appareillages et solvants*

Le méthyl-tert-butyle éther (MTBE) (Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France), l'hexane, le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, États-Unis) ainsi que le chloroforme (Merk, Darmstadt, Allemagne) de qualité LC-MS ont été utilisés afin de préparer les solutions d'extraction des lipides plasmatiques ainsi que les phases mobiles pour l'analyse chromatographique à polarité de phase inverse. De l'eau ultra-pure (18,2 µS/cm) fournie par un système de purification Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) a été utilisée pour l'ensemble des procédures. Les solvants utilisés pour l'extraction ont été additionnés de 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT) à 0,01 % (m/v). Les mélanges de solvants constituant les phases mobiles utilisées en chromatographie liquide contiennent de l'acétate d'ammonium (10 mM).

Les échantillons des patients, maintenus à 10 °C, ont été analysés par chromatographie liquide haute performance à polarité de phase inversée couplée à un spectromètre de masse hybride quadripôle orthogonal à temps de vol haute résolution (UPLC-HRMS) équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) (Acquity-UPLC® et Synapt®-G2 High Definition MSTM,

Waters, Manchester, Royaume-Uni). L'ionisation des molécules a été réalisée en mode positif (ESI+) et en mode négatif (ESI-) pour couvrir la détection de toutes les classes de lipides. L'annotation de ces molécules a reposé sur l'utilisation de bases de données en ligne METLIN (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, Californie, États-Unis). Les analyses statistiques multivariées non supervisées et supervisées ont été réalisées grâce au logiciel SIMCA-P+ version 13.0.3 (Umetrics, Umeå, Suède). Les données ont subi une transformation Pareto préalablement à leurs analyses non supervisées en composante principale (PCA) et supervisées par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA). Une analyse de variance (CV-ANOVA) et un test de permutation ont été utilisés afin de tester la validité de chacun des modèles supervisés créés.

### *1.1.2. Extraction des lipides pour l'analyse lipidomique globale*

Cinquante µL de plasma de chaque échantillon dilués à l'aide d'eau ultra-pure (q.s.p 400 µL), additionnés de méthanol refroidi (1,2 mL) puis de MTBE (4 mL) ont été agités par retournement pendant une heure. Après addition d'eau (2,5 volumes) et agitation (10 min), chaque échantillon a été centrifugé à 2.800 rpm (10 min). Après décantation, la phase organique a été prélevée à partir de chaque échantillon et les phases aqueuses ont été à nouveau extraites (agitation de 40 min) par un mélange hexane-méthanol (3-1, v/v).

Après rassemblement des phases organiques, évaporation du solvant sous pression réduite à 45 °C (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), les extraits lipidiques ont été repris dans un mélange chloroforme/acétonitrile/isopropanol/eau (35:35:20:10, v/v/v/v).

### *1.1.3. Constitution des contrôles qualités*

Afin de contrôler le bon déroulement des analyses UPLC-HRMS, un contrôle qualité (CQ) a été préparé en mélangeant un volume équimoléculaire (11 µL) de chaque extrait lipidique reconstitué ; des CQ dilués au 1/3 (CQ 1/3) et au 1/6 (CQ 1/6) ont été préparés.

### *1.1.4. Analyse par UPLC-HRMS*

Les extraits lipidiques ont été chromatographiés sur une colonne CSH-C18 (1,7 µm, 2,1x100 mm, Waters, Manchester, Royaume-Uni) thermostatée à 50 °C. L'élution des lipides est obtenue en gradient de solvants (débit de 0,4 $mL.min^{-1}$) constitué d'une phase A (acétonitrile/eau 4:6 v/v) et d'une phase B (acétonitrile/isopropanol 1:9 v/v). Le volume d'injection est de 5 µL pour chaque échantillon.

Les échantillons ont été analysés en modes d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-). Les paramètres de la source d'ionisation sont les suivants : température de la source de 120 °C, température de désolvatation de 550 °C, les flux de gaz du cône et de désolvatation de 20 $L.h^{-1}$ et

1 000 $L.h^{-1}$ respectivement, le voltage du capillaire de 3 000 V en ESI+ et 2 500 V en ESI-, le voltage du cône de 30 V en ESI+ et 45 V en ESI-. L'acquisition des données est effectuée en mode résolutif. Les spectres de masses, données centrées, ont été acquis entre 50 et 1 500 m/z avec un temps de balayage de 0,1 seconde et un délai inter-balayage de 0,01 seconde en utilisant une résolution de masse de 21 500. Les valeurs mesurées de m/z sont corrigées en cours d'acquisition par l'utilisation d'une référence externe (Lockspray) constituée d'une solution de leucine-enképhaline (2 $ng.\mu L^{-1}$) dans de l'acétonitrile/eau 50:50 (v/v).

En début d'analyse, 10 injections du CQ ont été effectuées pour conditionner la colonne chromatographique afin d'améliorer la robustesse en termes de temps de rétention et d'aires sous la courbe des pics chromatographiques. L'ordre d'injection des échantillons a été orthogonalisé, *i.e.* rendue indépendant en fonction de la nature des échantillons de façon à prévenir tout biais lié à la contamination de la source au cours du temps.

Les données de chromatographie et de spectrométrie de masse sont enregistrées sous forme de fichier raw.

### *1.1.5. Pré-traitement des données*

Les fichiers raw sont convertis au format mzdata sous R, en vue de l'extraction des données m/z, $t_R$ et intensité et de leur organisation sous forme de matrice par l'application XCMS (1) (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, Californie, États-Unis). L'intensité de chaque variable a été corrélée avec son taux de dilution dans les CQ non dilués et dilués aux 1/3 et 1/6. Seules les variables présentant un coefficient de corrélation supérieur à 0,7 ont été retenues. Une étape de normalisation (Lowess) a également été effectuée.

### *1.1.6. Analyses statistiques multivariées*

Les analyses statistiques multivariées non supervisées et supervisées ont été réalisées grâce au logiciel SIMCA-P+ version 13.0.3 (Umetrics, Umeå, Suède). Les données ont subi une transformation Pareto préalablement à leurs analyses non supervisées en composante principale (PCA) et supervisée par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA). Une analyse de variance (CV-ANOVA) et un test de permutation ont été utilisés afin de tester la validité de chacun des modèles supervisés créés.

### *1.1.7. Annotation des composés*

Les variables extraites des chromatogrammes par XCMS ont été annotées en se fondant sur les valeurs de m/z à l'aide de la base de données accessible en ligne METLIN (2) (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, Californie, États-Unis) en utilisant une tolérance de 5 ppm. Le temps

de rétention a également été utilisé pour confirmer l'annotation proposée par comparaison aux temps de rétention obtenus pour les lipides standards également injectés au cours de l'analyse.

## 1.2. Résultats

### *1.2.1. Vérification de la validité des données obtenues en UPLC-MS*

Le score plot du modèle issu de l'analyse en composante principale fait apparaitre un fort regroupement des CQ en fonction de leur taux de dilution ($p$ = 2,52.10$^{-14}$), ce qui valide la qualité des données obtenues UPLC-HRMS (Figure 85).

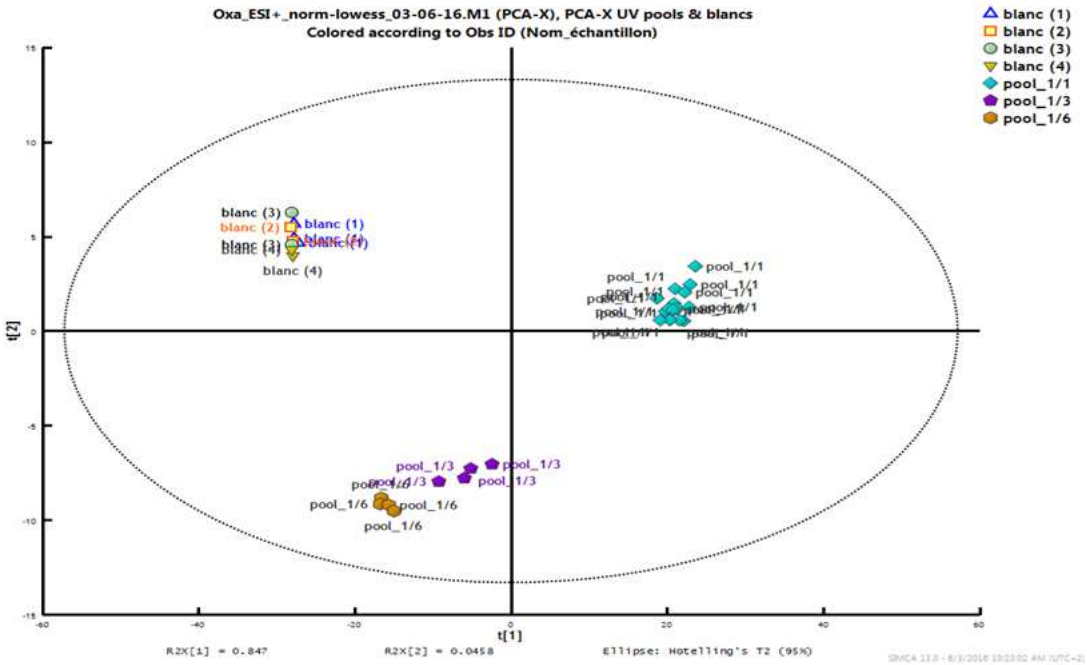



Figure 85 | Score scatter plot de la PCA-X univariée des CQ (pools) et des blancs de l'analyse en ESI+

*L'ensemble des réplicats de chaque taux de dilution des CQ sont regroupés, chaque regroupement étant séparé horizontalement par une composante dite principale qui est donc la concentration.*

### *1.2.2. Analyse des échantillons biologiques*

La matrice générée par l'application XCMS à partir des données obtenues en ESI+ contient 1 019 variables et celle en ESI- 1 132 variables. A l'issue de l'étape de sélection des variables sur le coefficient de corrélation ($r_{corr} > 0,7$), 565 variables en ESI+ et 802 variables en en ESI- sont finalement retenues. Les variables retenues ont été utilisées pour créer et évaluer différents modèles d'analyses statistiques multivariées non supervisées et supervisées.

Plusieurs modèles d'analyse en composante principale ont été générés en vue de comparer deux à deux les descripteurs des patients selon : le genre, la localisation de la tumeur, le stade tumoral, la survenue de neuropathies chroniques, l'indice de masse corporel et les prélèvements. Les scores plots correspondants ne font apparaitre aucune séparation quel que soit le descripteur testé. Ainsi, le score plot relatif au genre ne fait pas apparaître de séparation entre les hommes et les femmes (Figure 86); celui relatif à la localisation de la tumeur ne fait pas apparaître de séparation entre les différents organes (Figure 87); celui concernant la survenue d'une neuropathie chronique ne met pas en évidence de distinction entre les patients atteints et ceux qui ne le sont pas (Figure 88).

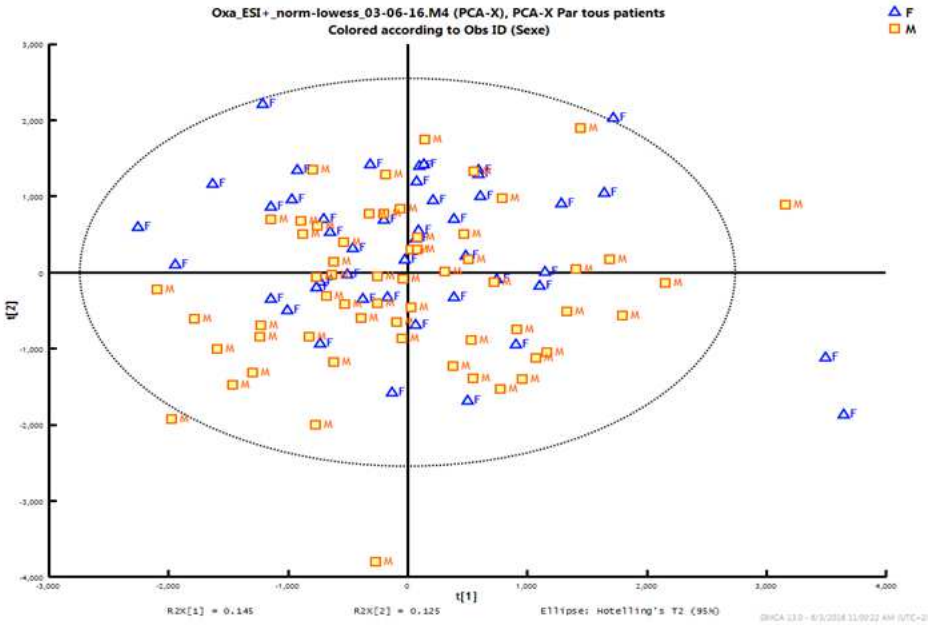



Figure 86 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif au genre des patients

*Il n'existe pas d'effet du genre sur le profil lipidique plasmatique des patients traités avec oxaliplatine, les échantillons prélevés chez les hommes n'étant pas séparés de ceux prélevés chez les femmes dans le présent modèle PCA analysant tous les échantillons.*

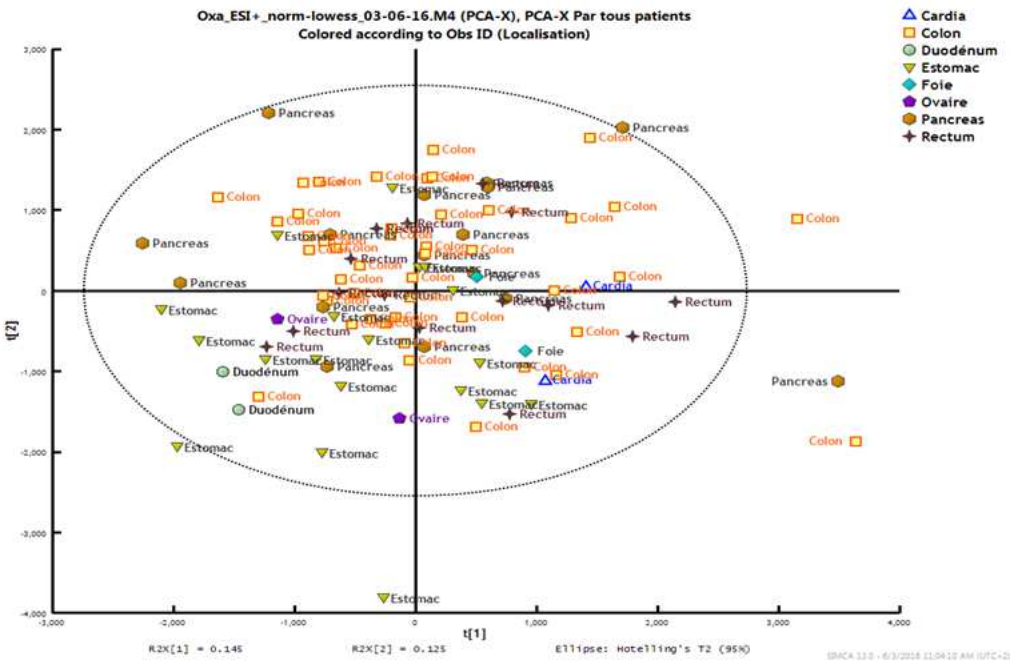



Figure 87 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif à la localisation de la tumeur

*La localisation de la tumeur n'a pas d'effet sur le profil lipidique plasmatique des patients traités à l'oxaliplatine : la PCA ne sépare pas les échantillons en fonction des organes.*

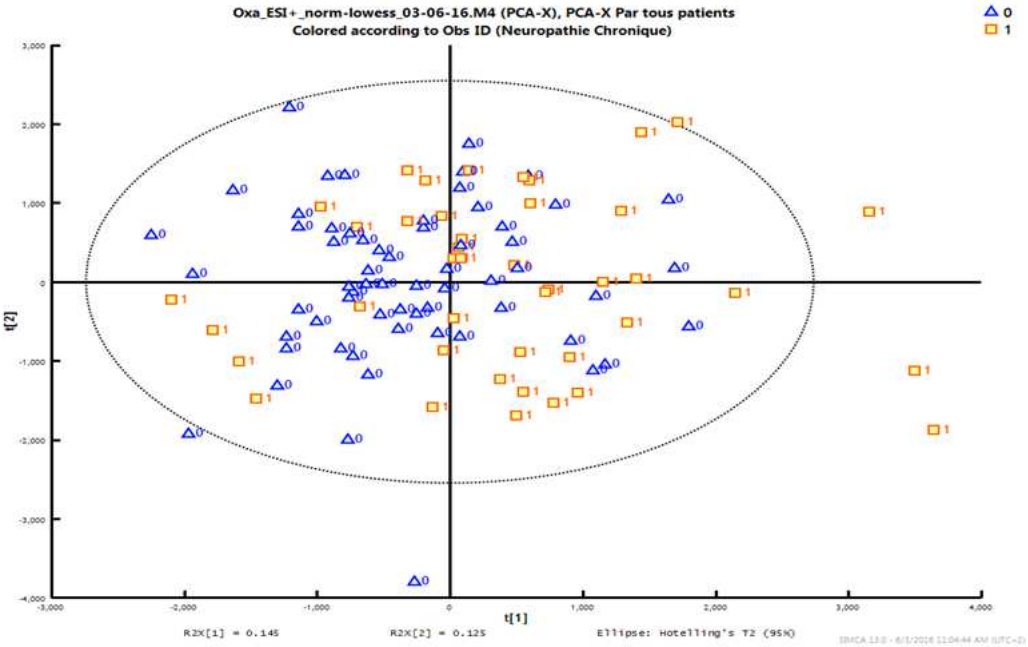



Figure 88 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons relatif à la survenue d'une neuropathie chronique

*La survenue d'une NPIO chronique (1) n'induit pas de différence du profil lipidique plasmatique des patients par rapport à celui des patients ne développant pas de NPIO chronique (0).*

Par conséquent, la recherche d'un effet sur le profil lipidique plasmatique dû au traitement avec l'oxaliplatine a pu être effectuée indépendamment des autres descripteurs cités ci-dessus. Les modèles d'analyse en composante principale en vue de comparer par paire le profil lipidique plasmatique des échantillons prélevés immédiatement avant l'instauration du traitement (échantillon t0), avec ceux prélevés à trois mois (t3), six mois (t6) et 12 mois (t12) à l'issu de celui-ci ont été générés. Ils ne révèlent aucune séparation des échantillons en fonction du moment auquel est effectué le prélèvement (Figure 89, Figure 90, Figure 91).

Les changements dans le profil lipidique plasmatique consécutifs au traitement avec l'oxaliplatine ont également été explorés à l'aide d'analyses statistiques univariées. A cette fin, les lipides présents dans les échantillons plasmatiques analysés ont été annotés à partir des variables retenues par XCMS à l'aide de la base de données METLIN.

Ainsi, sur les 565 variables retenues en ESI+, 214 ont été annotées comme lipides. Parmi ces lipides, on retrouve de nombreux phospholipides [54 phosphatidyléthanolamines (PE), 30 phosphatidylcholines (PC), 10 Phosphatidylinositols (PI), neuf Phosphatidylglycérols (PG), six phosphatidylsérines (PS) et 12 acides phosphatidiques (PA)]. À ceux-ci s'ajoutent 52 triacylglycérols (TG) et 10 diacylglycérols (DG) ainsi que 17 sphingomyélines (SM), 4 dérivés du cholestérol et 10 céramides (Cer).

En mode négatif, sur les 802 variables, 303 ont été annotées comme lipides. Parmi ces lipides, on détecte notamment 26 céramides, 13 glucosylcéramides, 11 PA, 77 PE, 16 PG, 22 PI et 60 PS, 13 SM, 14TG et 31 acides gras libres. Parmi ces lipides, on retrouve 4 éïcosanoïdes.

Les lipides annotés en ESI+ d'une part et en ESI- d'autre part ont été regroupés selon leurs catégories. Des tests de Student appariés ont été effectués de façon répétée sur chacune des variables lipidiques afin de comparer deux à deux t0 à t3 ; t0 à t6 et t0 à t12. La correction FDR (False Discovery Rate) a été appliquée (0,05 %) au sein de chaque catégorie de lipides. Les résultats obtenus en ESI+ sont présentés Tableau 19 (Annexe 7).

L'analyse des phospholipides en ESI+ met en évidence une augmentation de six phospholipides (+45 % en moyenne) et une diminution de trois phospholipides (-24 % en moyenne) entre t0 et t3. L'analyse des céramides en ESI+ met en évidence une augmentation d'un céramide (+244 %) et une diminution de trois céramides (-25 % en moyenne) entre t0 et t3. L'analyse des sphingomyélines en ESI+ met en évidence une augmentation de trois sphingomyélines (+64 %) et une diminution de deux sphingomyélines (-27 % en moyenne) entre t0 et t3. L'analyse des cholestérols en ESI+ met en évidence une diminution d'un cholestérol (-35 %) entre t0 et t6. L'analyse des diglycérides en ESI+ met en évidence une diminution d'un diglycérides (-25 %) entre t0 et t3 et une augmentation d'un diglycérides (+24 %) entre t0 et t6.

L'analyse des triglycérides en ESI+ met en évidence une augmentation de 17 triglycérides (moyenne : +160 %) entre t0 et t3 et une diminution de neuf triglycérides (moyenne : -47 %) entre t0 et t6 dont six d'entre eux sont déjà diminués entre t0 et t3 (-21 %). Les triglycérides concernés par cette baisse sont tous hautement insaturés, le nombre total d'insaturations variant de 7 à 13. Les variations de ces neuf triglycérides entre t0 et t12 sont présentés Figure 92.

L'analyse effectuée en ESI- ne permet pas de mettre en évidence de lipides dont le taux est modifié au cours du temps. En revanche, si l'on s'intéresse à la catégorie des acides gras, on remarque une tendance à l'augmentation de certains acides gras libres polyinsaturés tels que l'acide éicosapentaénoïque (+72 %, NS entre t0 et t6 et +38 %, NS entre t0 et t12), l'acide arachidonique (+48 %, NS entre t0 et t6) ainsi que certains acides gras hydroxylés : HETE (+89 %, NS entre t0 et t6), HEDE (+60 %, NS entre t0 et t6) et l'acide hydroxy-tetradécanoïque (+143 %, NS entre t0 et t6 et +134 %, NS entre t0 et t12). Les résultats des tests appariés de Student sont présentés, à titre indicatif, sans la correction FDR dans le Tableau 20 (Annexe 7).

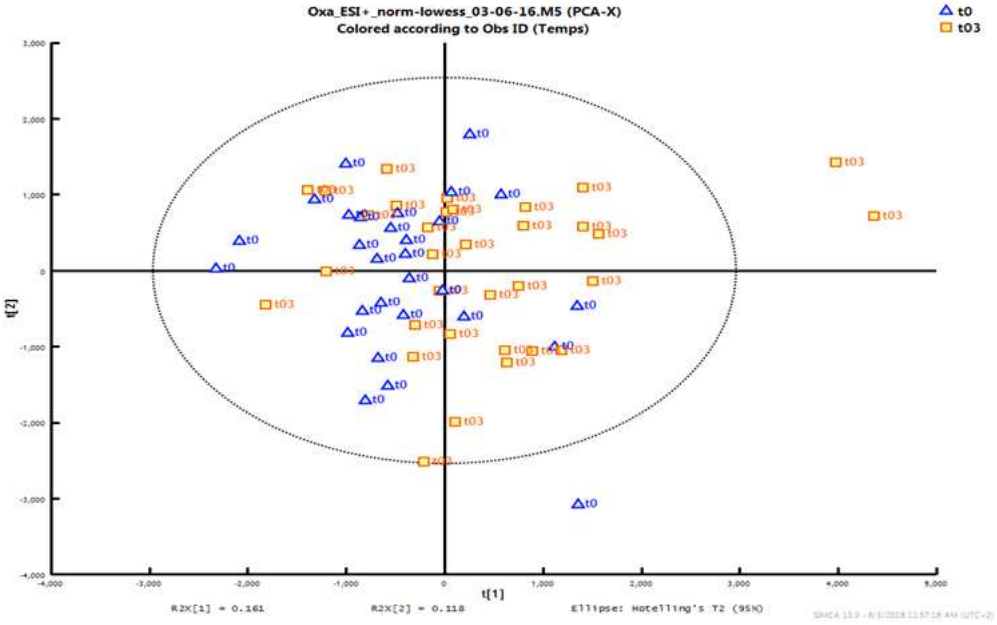



Figure 89 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t3

L'oxaliplatine n'induit pas de modification du profil lipidique plasmatique au troisième mois de traitement en comparaison de l'instant avant initiation du traitement.

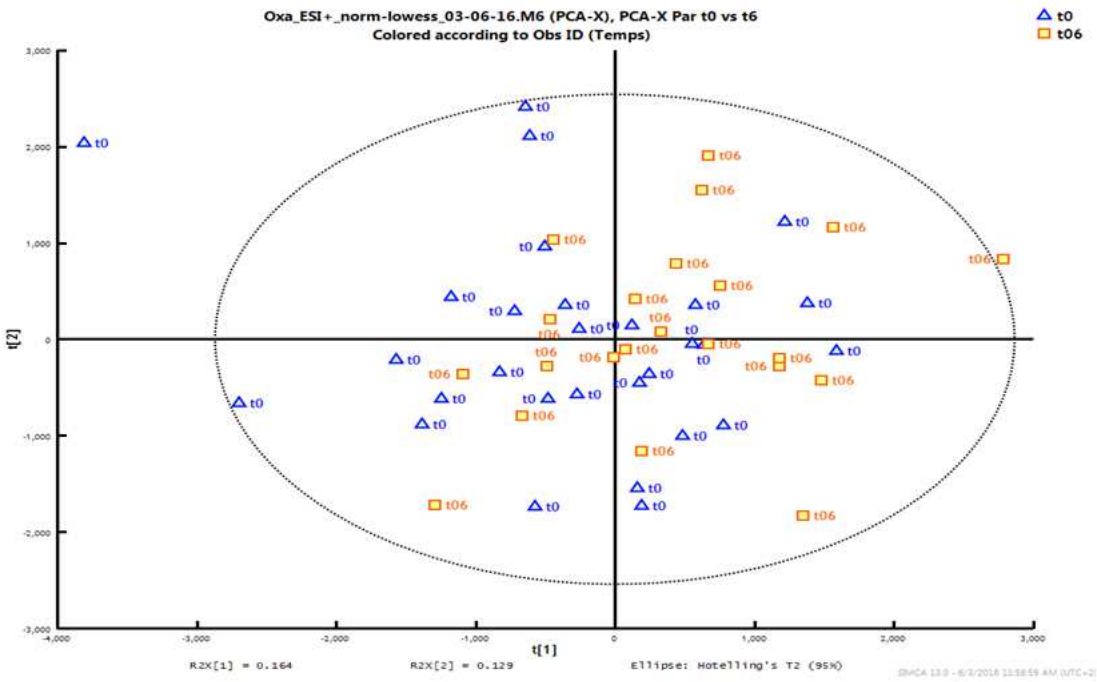



Figure 90 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t6

*L'oxaliplatine n'induit pas de modification du profil lipidique plasmatique au sixième mois de traitement en comparaison de l'instant avant initiation du traitement.*

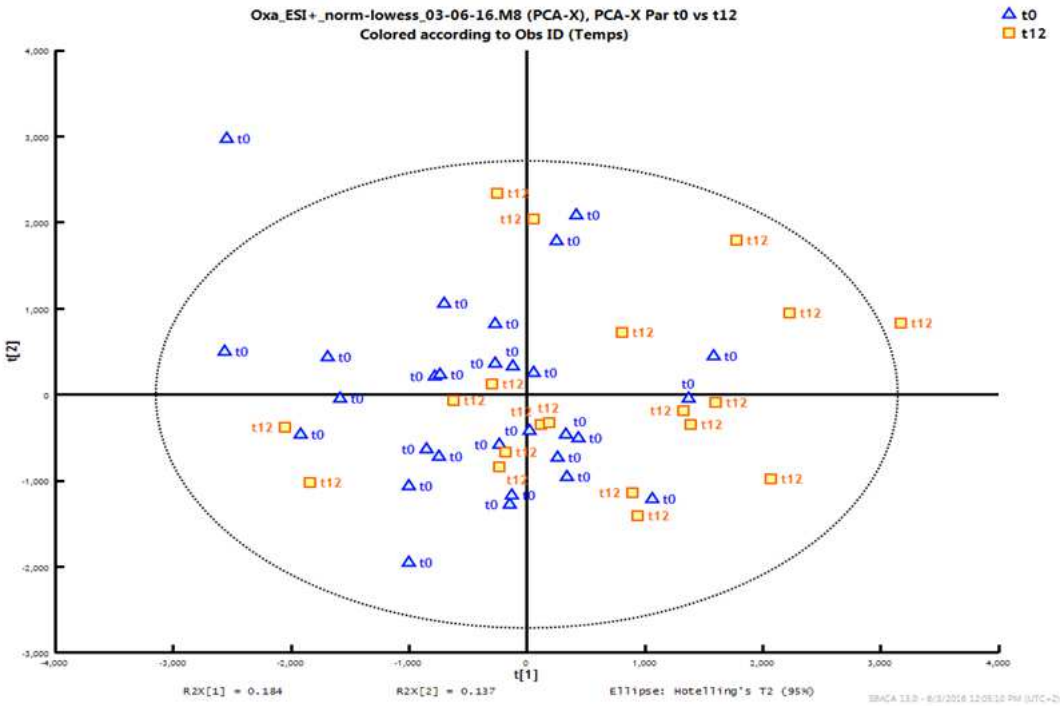



Figure 91 | Score scatter plot de la PCA-X (variables transformées par Pareto) des échantillons à t0 et t12

*L'oxaliplatine n'induit pas de modification du profil lipidique plasmatique au cours du suivi après l'arrêt du traitement en comparaison avec t0.*

**Evolution des taux plasmatiques des neuf triglycérides insaturés présentant une baisse significative entre le début et la fin (six mois) du traitement.**

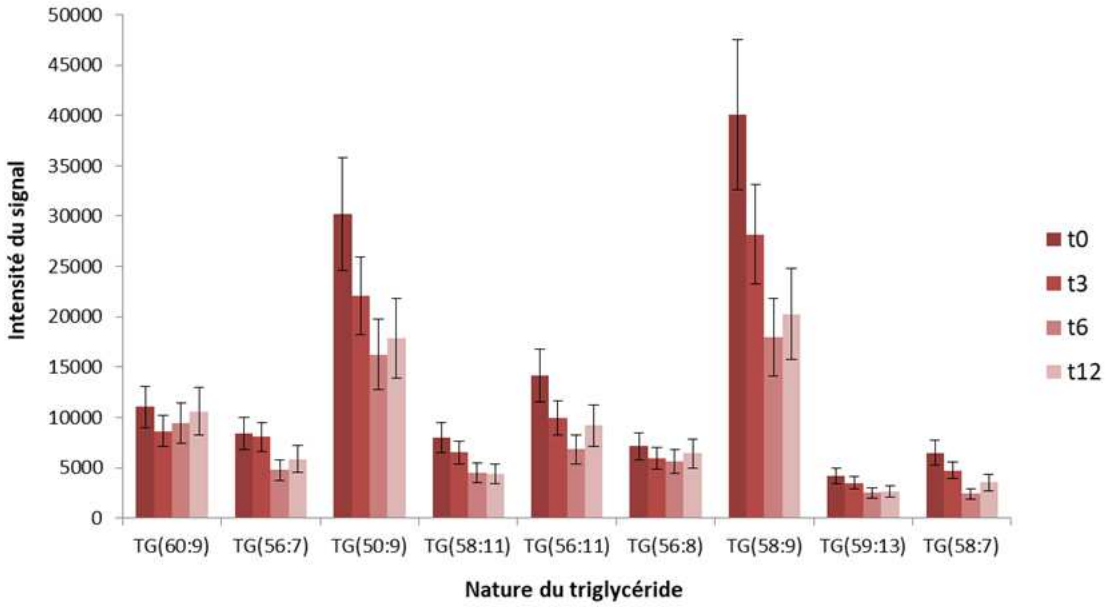



Figure 92 | Evolution (T0 à t12) des taux plasmatiques des neuf TG insaturés présentant une baisse significative entre t0 et t6.

## 2. Analyse lipidomique ciblée : mise au point de la méthode d'étude des gangliosides

Les structures nerveuses sont particulièrement riches en gangliosides. Ernst Klenk, un chimiste allemand fut le premier à isoler des gangliosides à partir d'extraits de cerveaux humains en 1942 [293]. Ces derniers interviennent dans la régénération des nerfs périphériques, la croissance neuronale ainsi que dans la formation de la jonction neuro-musculaire [294]. Le profil plasmatique des gangliosides est modifié dans certaines pathologies neurologiques, c'est le cas de la sclérose en plaque, de la maladie de Parkinson ou encore de traumatismes cérébraux [295]–[298]. Aussi, nous formulons l'hypothèse qu'une atteinte nerveuse (neuropathie) pourrait se traduire par une altération de la composition en gangliosides des structures nerveuses lésées. Par conséquent, en raison des échanges dynamiques de lipides entre le plasma et le tissu nerveux, nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une atteinte nerveuse se traduirait par une modification du profil plasmatique des gangliosides. Aussi, nous nous intéresserons à rechercher les gangliosides sur les échantillons de plasma des patients de LPIDOXA et étudier leurs variations en fonction de paramètres cliniques.

Le présent travail consiste à mettre au point une méthode d'analyse des gangliosides plasmatiques (extraction et détection quantitative) et à étudier les variations qualitatives et semi-quantitatives (relatives) des gangliosides dans le plasma des patients traités par oxaliplatine.

## 2.1.L'infusion directe des standards commerciaux

La première étape de la mise au point de la méthode d'analyse par HRMS des gangliosides correspond à l'infusion directe des solutions commerciales de gangliosides. Il s'agit d'identifier les meilleurs paramètres analytiques pour pourvoir détecter les gangliosides en HRMS.

Des standards commerciaux de gangliosides ont été utilisés. Il s'agit de solution méthanolique (méthanol/eau 90:10) de gangliosides dosés à 100 µM de la société Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, États-Unis). Deux standards ont été choisis pour les expériences : une solution de gangliosides en mélange et une solution de gangliosides GD3. Après dilution au 1/100e, soit une solution de concentration de 1 µM au final, les solutions commerciales de gangliosides en mélange et de gangliosides GD3 ont été injectées directement dans le spectromètre de masse. Le débit d'infusion de la solution était de 25 µL/min et l'acquisition était réalisée sur une minute. Le spectromètre de masse employé est un spectromètre de masse hybride quadripôle orthogonal à temps de vol haute résolution (HRMS) équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) (Synapt®-G2 High Definition MSTM, Waters, Manchester, Royaume-Uni). Le spectromètre de masse a été calibré pour enregistrer des m/z entre 100 et 2 000 m/z. Les deux modes d'ionisation : ESI+ et ESI- ont été pratiqués. Comme les gangliosides sont des espèces négativement chargées, ceux-ci ont été injectés avec des cations pour l'analyse en ESI +. Les cations utilisés étaient des alcalins : lithium, sodium, potassium et césium sous forme de sels : hydroxyde de lithium, acétate de sodium, acétate de potassium, iodure de potassium et chlorure de césium.

Le mode ESI- est le mode qui a permis d'identifier le plus de variables avec une intensité maximale de l'ordre de $10^5$. Les spectres de masse obtenus sont présentés ci-après (Figure 93 pour l'échantillon de gangliosides totaux et Figure 94 pour l'échantillon de GD3). La liste des variables de l'échantillon de gangliosides totaux identifiés comme étant des gangliosides grâce à la base de données en ligne METLIN est présentée en Annexe 8.

Concernant l'acquisition en mode ESI+, on note un bruit de fond important et un nombre très faible de variables identifiables (Annexe 9). L'infusion de sels d'alcalins avec les gangliosides n'a aucune influence sur l'intensité du signal et sur la richesse en pics du signal.

En conclusion, le mode d'ionisation ESI- permet de détecter les gangliosides à des concentrations de 1 µM. En revanche, le mode d'ionisation ESI+ ne permet pas de détecter les

gangliosides, qu'ils soient infusés avec ou sans cations. Aussi, dans la suite de la mise au point de la méthode, le mode ESI- sera adopté.

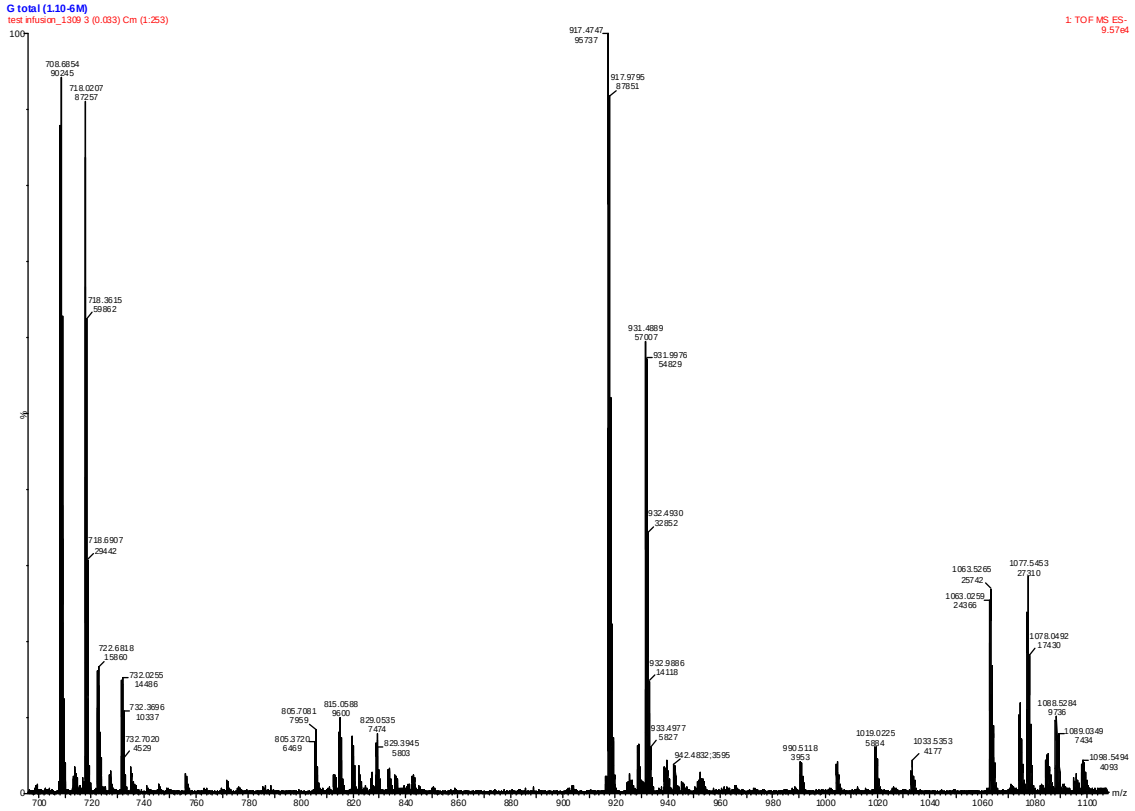



Figure 93 | Spectre de masse de l'échantillon de gangliosides totaux acquis en mode ESI-.

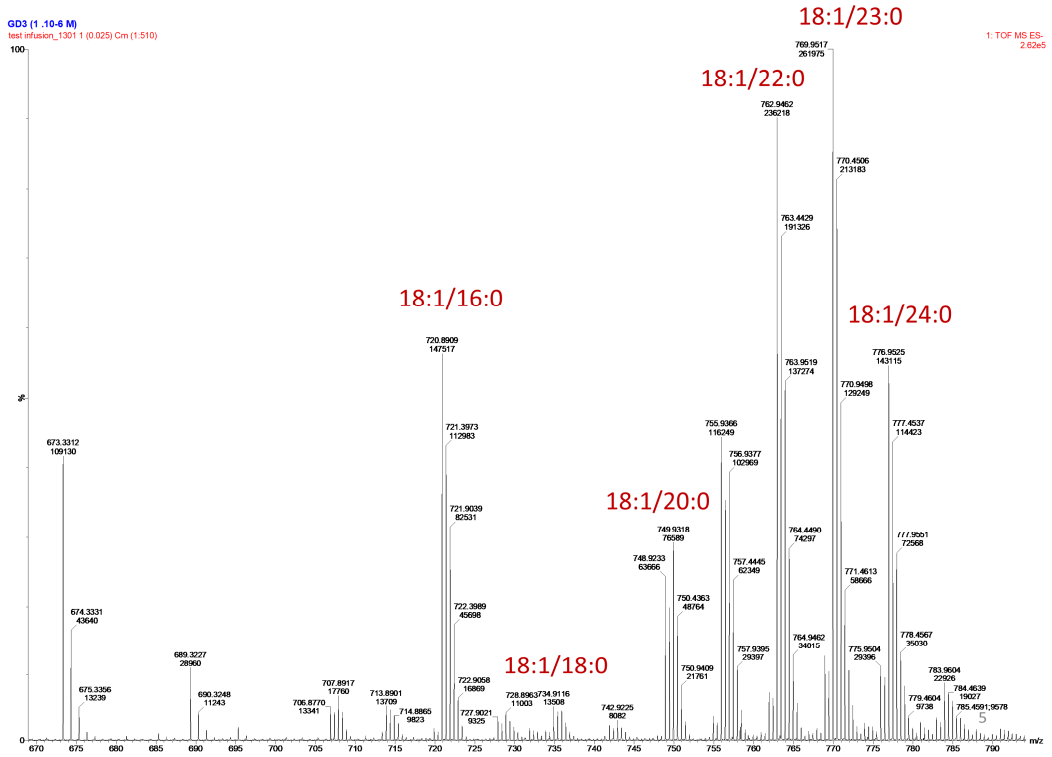



Figure 94 | Spectre de masse de l'échantillon GD3 ($10^{-6}$ M) acquis en mode ESI-.

## 2.2.Mise au point de l'analyse chromatographique

Afin de mettre au point la méthode de séparation par CLHP des gangliosides, les solutions commerciales de gangliosides ont été injectées dans le système CLHP-HRMS.

Le système CLHP employé est une chromatographie liquide ultra-haute performance® à polarité de phase inversée Acquity-UPLC® (Waters, Manchester, Royaume-Uni). Les échantillons et contrôles qualités étaient maintenus à 10 °C dans un passeur d'échantillon. La colonne chromatographique est une CSH-C18 (1,7 µm, 2,1x100 mm, Waters, Manchester, Royaume-Uni) thermostatée à 50 °C. L'élution des gangliosides est obtenue en gradient de solvants (débit de 0,4 mL.min$^{-1}$) constitué d'une phase A (acétonitrile/eau 4:6 v/v) et d'une phase B (acétonitrile/isopropanol 1:9 v/v). Le volume d'injection était de 5 µL pour chaque échantillon. L'acétonitrile et l'isopropanol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, États-Unis) de qualité LC-MS ont été utilisés pour préparer les phases mobiles pour l'analyse chromatographique à polarité de phase inversée. De l'eau osmosée (18,2 µΩ cm) fournie par un système de purification Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) a été utilisée pour l'ensemble des procédures.

Le gradient d'élution est renseigné en Figure 95. Le spectromètre de masse a été calibré pour enregistrer des m/z entre 100 et 2 000 m/z.

Les solutions commerciales ont été diluées dans une solution de MeOH/$H_2O$ (90:10) à 100 µM, 10 µM et 1 µM. Le mode d'ionisation utilisé était l'ESI-.

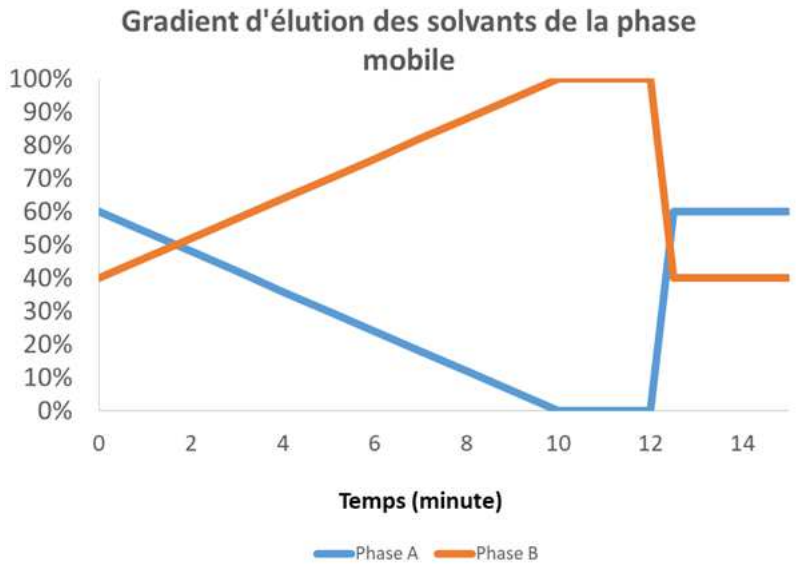



Figure 95 |Gradient d'élution des solvants de la phase mobile

Concernant l'échantillon GD3, 384 variables ont été détectées, parmi lesquelles, 10 gangliosides GD3 ont été identifiés (Tableau 16 et Figure 96). Les gangliosides GD3 ont un temps de rétention compris entre 4,2 minutes et 6,4 minutes.

Concernant l'échantillon de gangliosides totaux, 594 variables ont été détectées, parmi lesquels 68 gangliosides et apparentés ont été identifiés. Les gangliosides sortent entre 4,2 minutes et 5,8 minutes (Figure 98).

Pour des échantillons dosés à 1 µM, les intensités sont de l'ordre de 101 à 102 fois l'intensité du bruit de fond, ce qui est acceptable pour la suite de l'analyse.

| tR | m/z | Identification | Moyenne des intensités | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Blanc | $10^{-4}$ M | $10^{-5}$M | $10^{-6}$M |
| 4,2 | 720,8958 | GD3 (d18:1/16:0) | 9 | 215845 | 20450 | 3528 |
| 5,95 | 762,9432 | GD3 (d18:1/22:0) | 40 | 252979 | 33722 | 6796 |
| 5,95 | 762,9432 | GD3 (d18:0/22:1) | 40 | 252979 | 33722 | 6796 |
| 5,43 | 748,9278 | GD3 (d18:1/20:0) | 26 | 115821 | 12276 | 1962 |
| 6,42 | 776,959 | GD3 (d18:1/24:0) | 63 | 273321 | 26237 | 3158 |
| 6,19 | 769,9512 | GD3 (d18:1/23:0) | 76 | 320422 | 40258 | 7374 |
| 5,95 | 763,9487 | GD3 (d18:0/22:0) | 63 | 102926 | 14240 | 2366 |
| 6,43 | 777,9622 | GD3 (d18:0/24:0) | 83 | 115203 | 11145 | 1705 |
| 4,83 | 734,9112 | GD3 (d18:0/18:1) | 25 | 23140 | 1532 | 292 |
| 4,83 | 734,9112 | GD3 (d18:1/18:0) | 25 | 23140 | 1532 | 292 |

Tableau 16 | Liste des gangliosides identifiés dans l'échantillon GD3

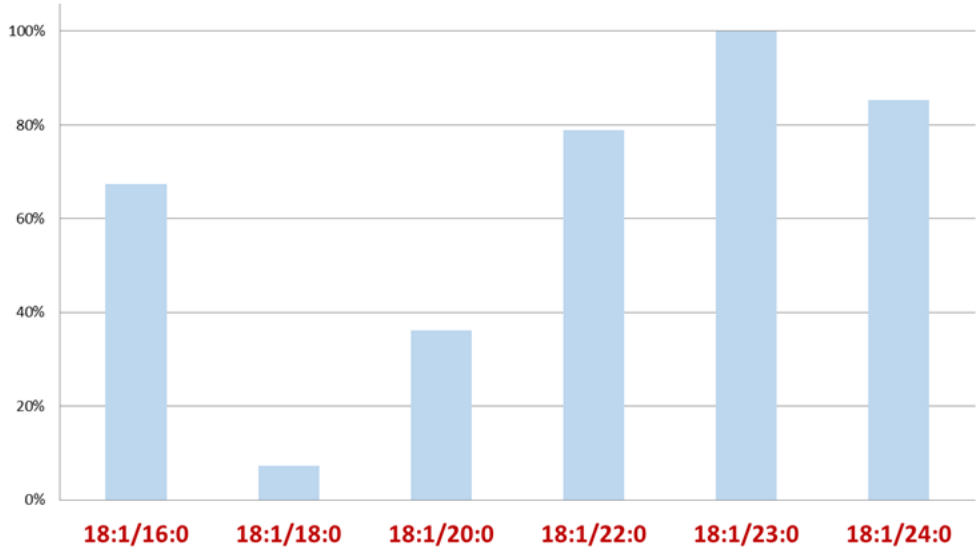



Figure 96 | Profil de l'échantillon GD3 analysé par CLHP-HRMS

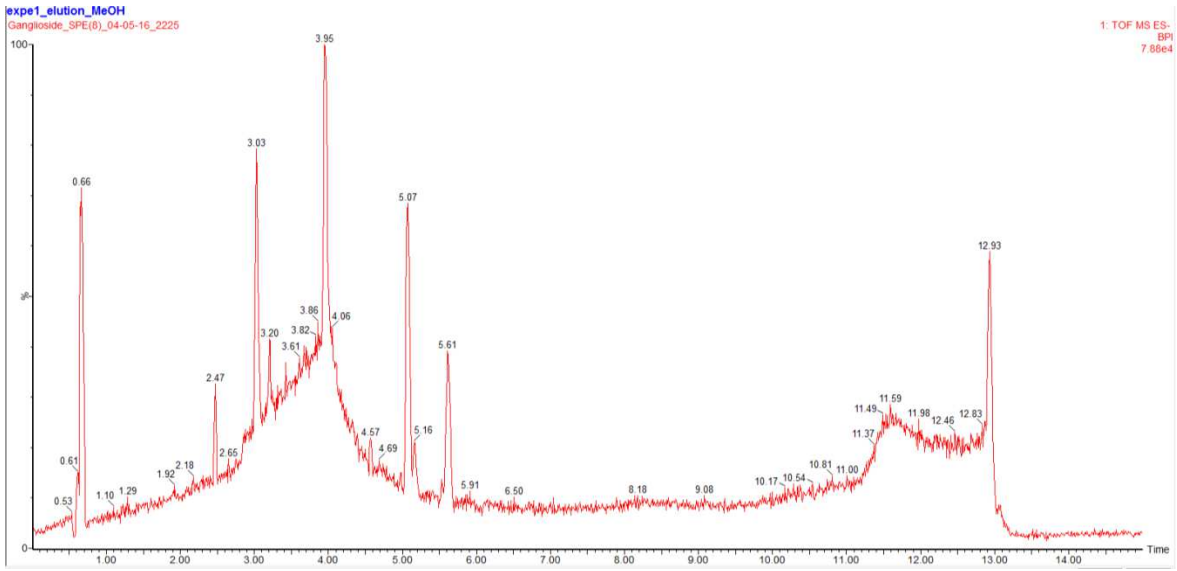



Figure 97 | Chromatogramme en mode ESI- de l'analyse d'un échantillon de gangliosides purifiés après extraction en phase solide.

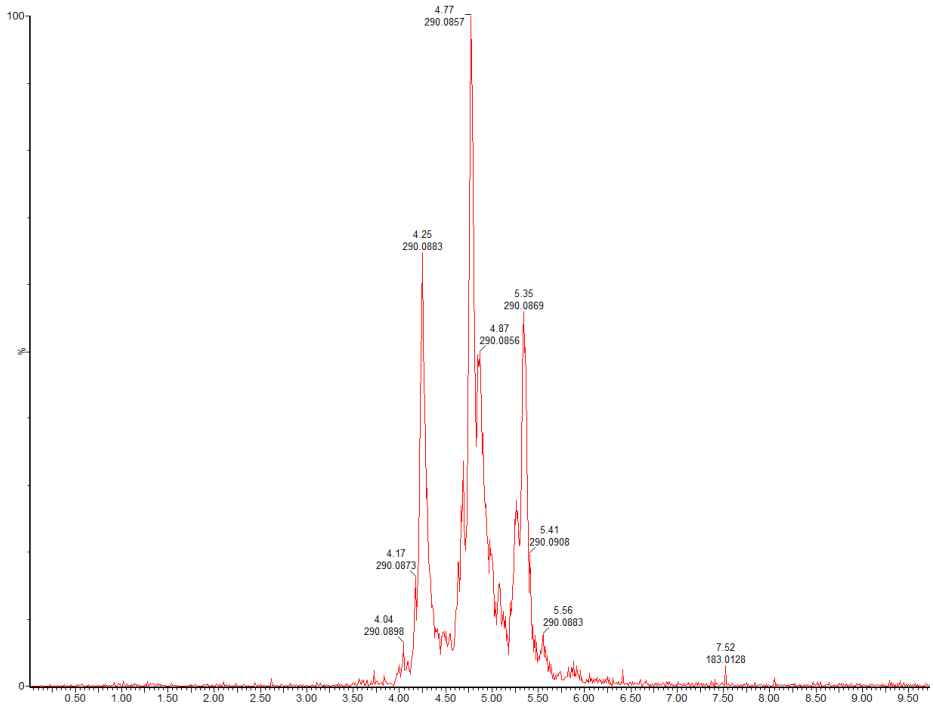



Figure 98 | Chromatogramme reconstitué à 290,08 m/z de l'analyse d'un échantillon de gangliosides en mélange.

*Lors de l'analyse en spectrométrie de masse, une partie des molécules est fragmentée en ions fils, l'ensemble de ces derniers étant détecté et enregistré pour constituer un spectre chromatographique MSE. L'acide sialique est un sucre constitutif des gangliosides et spécifique de cette famille de lipides. De ce fait, la détection de cet ion dont le m/z est de 290,08 coïncide avec la détection d'un ganglioside. Les gangliosides de ce mélange ont un tR compris entre quatre minutes et cinq minutes 30.*

## 2.3. Mise au point de l'extraction des gangliosides

Plusieurs méthodes d'extraction des gangliosides à partir de matrices biologiques ont été proposées. les échantillons biologiques subissent tout d'abord une double extraction L/L, puis les phases aqueuses subissent une extraction de type SPE au moyen de cartouches hydrophobes [299]–[301]. La méthode d'extraction des gangliosides mise au point dans le présent travail reprend ce principe d'extraction combinée.

La méthode d'extraction des gangliosides a été développée à partir de deux extraits dilués dans de l'eau pure : un extrait de gangliosides GD3 et un extrait de gangliosides totaux. Le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, États-Unis) et le chloroforme (Merk, Darmstadt, Allemagne) de qualité LC-MS ont été utilisés pour préparer les solutions d'extraction des lipides plasmatiques ainsi que les phases mobiles pour l'analyse chromatographique à polarité de phase inversée. De l'eau osmosée (18,2 $\mu\Omega.cm^{-1}$) fournie par un système de purification Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) a été utilisée pour l'ensemble des procédures.

L'extraction liquide-liquide a nécessité l'emploi d'un agitateur par retournement (Stuart, D. Dutcher Brumath, France) d'une centrifugeuse (Beckman Coulter, Nion, Suisse) et d'un évaporateur SpeedVacTM (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Les paramètres suivants ont été testés :

1. Nature et volume de la phase stationnaire, deux types de cartouches ont été testés (cartouches hydrophobes HR-X et cartouches mixte HR-XA, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) ainsi que deux volumes de phase stationnaire (30 mg et 60 mg).
2. pH de la solution de dépôt, pH (milieu non tamponné et milieu tamponné alcalin).
3. Composition (chloroforme/méthanol 2:1 et méthanol pur ou contenant de l'acide formique à 10 % v/v) et volume du solvant d'élution.

A l'issu de cette étape d'optimisation, les paramètres choisis sont ceux maximisant le rendement d'extraction. Le protocole retenu pour la suite est détaillé ci-après.

L'échantillon subit dans un premier temps une extraction L/L selon la méthode de Bligh & Dyer (Figure 99). La phase aqueuse est conservée, cette étape permet d'éliminer les lipides apolaires et de ne garder que les composés les plus polaires parmi lesquels figurent les gangliosides. Cette phase aqueuse est par la suite tamponnée grâce à une solution d'hydrogénophosphate de sodium (30 mM, pH 8-9). Le pKa de l'acide sialique étant de 2,6 ; les gangliosides se trouvent par conséquent sous leur forme ionisée. Cette phase aqueuse est par la

suite déposée sur les cartouches hydrophobes HR-X (3 mL, 30 mg) préalablement conditionnées à l'aide de méthanol (2 x 5 mL) et d'eau (5 mL) (Figure 99). Après percolation de la phase aqueuse, les cartouches ont été lavées par un mélange méthanol-eau 1:9 (v/v) (5 mL). L'élution des gangliosides a été réalisée par 2,5 mL de méthanol puis 2,5 mL de chloroforme-méthanol 2:1 (v/v). Après évaporation du solvant sous pression réduite (45 °C), le culot lipidique a été repris par un mélange de méthanol-eau 9:1 (v/v) (400 µL).

Extraction L/L

1) Matériel de départ : 400 µL de solution
2) Ajout de 3V de $CHCl_3$/MeOH (1:2) soit 1,2 mL (400 µL de $CHCl_3$ et 800 µL de MeOH)
3) Agitation par retournement 20 min
4) Ajout de 1 V de $CHCl_3$ soit 400 µL et vortex 30 s
5) Ajout de 1 V d'eau soit 400 µL *(séparation des phases)* et agitation par retournement 10 min
6) Centrifugation 15 min à 2 600 TPM
7) Ajout de 100 µL de $Na_2HPO_4$ à 30 mM
8) Récupération de la phase aqueuse

Extraction SPE

9) Conditionnement de la cartouche : 2 x 5 mL de MeOH puis 5 mL d'eau
10) Dépôt de l'échantillon
11) Lavage : 2,5 mL de MeOH/$H_2O$ (1:9)
12) Elution avec 2,5 mL de MeOH puis 2,5 mL de $CHCl_3$/MeOH (2:1)
13) Evaporation des solvants
14) Reprise des composés dans 400 µL de MeOH/$H_2O$ (9:1)

Figure 99 | Protocole d'extraction des gangliosides retenus

Cette extraction présente un rendement d'extraction de 90 %. Le calcul du rendement a pris pour référence un standard de gangliosides dilué dans une solution identique à la solution d'élution de l'étape de l'extraction SPE. Le rendement de l'extraction L/L a été estimé à 97 %, celui de l'extraction en phase solide à 93 %. Le rendement d'extraction avec les cartouches mixtes HR-XA est proche de zéro, il est médiocre avec les cartouches hydrophobes HR-X de 60 mg (15 à 25 %). Il existe une corrélation entre le caractère hydrophobe du ganglioside, estimé par le LogP et le rendement d'extraction : les composés les plus lipophiles sont les mieux extraits ($\rho$ = 0,89).

Le calcul du *breakthrough volume* a permis d'estimer que plus de 95 % des gangliosides étaient élués dans la première fraction de 2,5 mL de MeOH (Figure 100). Cette expérience

consiste à fractionner le volume d'éluat en autant de fractions séquentielles de 0,5 mL et à estimer la quantité de composés récupérés dans chaque fraction.

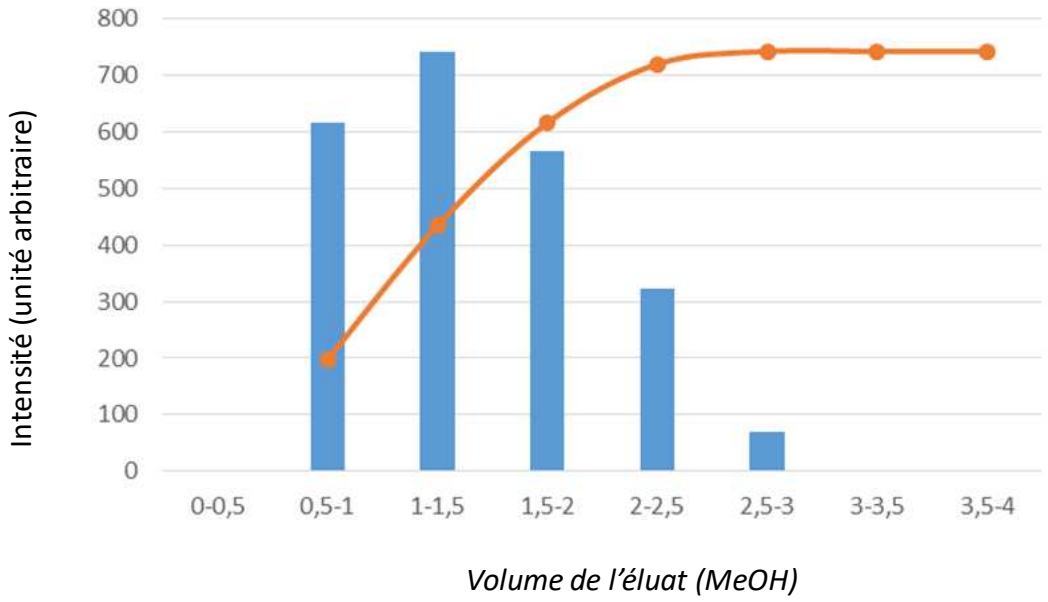



Figure 100 | Répartition des gangliosides selon les fractions d'élution

*Les histogrammes bleus représentent la quantité extraite dans chaque fraction, la courbe en orange représente la quantité cumulée de gangliosides élués.*

### 2.4. Analyse sur plasma

Des échantillons de plasma de patients inclus dans l'étude LIPIDOXA ont été utilisés comme matériel biologique d'essai pour confirmer la méthode d'extraction et d'analyse des gangliosides précédemment développée.

Trois volumes de plasma ont été testés : 50 µL ; 100 µL et 200 µL dilués dans un volume d'eau osmosée pour obtenir un volume final de 400 µL. Certains échantillons de plasma ont été additionnés de standards commerciaux de gangliosides GM3 à différentes concentrations : 1 µM ; 10 µM ; 50 µM. Ces échantillons ont été injectés en triplicat.

Des dilutions des solutions standards de GM3 ont été réalisées pour être analysées avec les échantillons de plasma : 1 µM ; 5 µM ; 10 µM ; 50 µM ; 100 µM. Ces standards ont été préparés chacun en un exemplaire et injectés une seule fois.

Le protocole d'extraction liquide-liquide employé respectait les étapes suivantes :

Un volume de plasma (50 ; 100 ou 200 µL) était dilué avec de l'eau osmosée (QSP 400 µL), additionné d'un mélange chloroforme-méthanol au ratio 1:2 (soit 1,2mL) puis agité par retournement pendant 20 minutes. La solution était ensuite complétée par du chloroforme

(400 µL) et de l'eau (400 µL) et à nouveau agitée (10 min). Après centrifugation à 3 000 tours par minute (15 min), les phases aqueuses de chaque échantillon ont été collectées puis additionnées d'une solution d'hydrogénophosphate 30 mM (100 µL). La phase organique contenant les lipides apolaires a été rejetée. Les phases aqueuses ont été extraites en phase solide sur cartouches hydrophobes HR-X (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) préalablement conditionnées à l'aide de méthanol (5 mL) puis d'eau (5 mL). Après percolation de la phase aqueuse, les cartouches ont été lavées par un mélange méthanol-eau 1:9 (v/v) (5mL). L'élution des gangliosides a été réalisée par 2,5 mL de méthanol puis 2,5 mL de chloroforme-méthanol 2:1 (v/v). Après évaporation du solvant sous pression réduite (45 °C), le culot lipidique a été repris par un mélange de méthanol-eau 9:1 (v/v) (100 µL).

Les échantillons repris dans la solution méthanolique ont ensuite été analysés par CLHP-HRMS. Le mode d'ionisation utilisé est l'ESI-. Le spectromètre de masse a été calibré pour enregistrer des m/z entre 100 et 2 000 m/z.

Après traitement informatique des résultats par l'application XCMS, une matrice de données brutes comportant 868 variables a été obtenue. Les variables pour lesquelles l'intensité de réponse n'était pas corrélée à la dilution des contrôles qualité ont été éliminées. Après ce premier filtre, 665 variables ont été retenues. Puis, les variables ont été filtrées selon leur temps de rétention en prenant comme fenêtre l'intervalle 4-7 minutes. Après ce filtre, il restait 69 variables. La base de données en ligne METLIN a été interrogée sur la base de ces 69 variables et 10 variables ont été identifiées comme des gangliosides (Tableau 17).

| Identification | m/z | Adduits | Δppm |
|---|---|---|---|
| Ganglioside GD3 (d18:1/16:0) | 720,8961 | [M-2H]2- | 1 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/16:0) | 1151,7056 | [M-H]- | 0 |
| Ganglioside GM1 (18:1/16:0) | 757,9155 | [M-2H]2- | 0 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/18:0) | 1179,7348 | [M-H]- | 2 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/20:0) | 1207,766 | [M-H]- | 2 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/24:1(15Z)) | 1261,8152 | [M-H]- | 0 |
| Ganglioside GA2 (d18:1/26:1(17Z)) | 1237,8065 | [M+Cl]- | 0 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/22:0) | 1235,7985 | [M-H]- | 1 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/23:0) | 1249,8145 | [M-H]- | 0 |
| Ganglioside GM3 (d18:1/24:0) | 1263,8294 | [M-H]- | 1 |

Tableau 17 | Liste des gangliosides retrouvés dans le plasma de quelques patients

Grâce aux standards de gangliosides injectés seuls ou avec les échantillons de plasma, il est possible d'estimer la concentration naturelle en GM3 du plasma. Deux approches ont été suivies : la méthode de l'étalonnage externe et la méthode des ajouts dosés.

**L'étalonnage externe** : le principe de cette méthode et de tracer une droite d'étalonnage à partir de standards commerciaux : intensité obtenue en fonction de la concentration en

gangliosides dans le standard. Le coefficient de corrélation est assez proche de 1, la courbe est donc exploitable. L'équation de la droite est de la forme $I=ac+b$ ; I étant l'intensité et c la concentration. La concentration en gangliosides GM3 du plasma peut donc être estimée à partir de l'intensité y relevée pour l'échantillon de plasma. Le coefficient directeur $a$ calculé est de $a = 2{,}28.10^{9}$ $L.mol^{-1}$.

**La méthode des ajouts dosés** : le principe de cette méthode est de tracer une droite d'étalonnage à partir de standards commerciaux dilués dans une matrice biologique : intensité obtenue en fonction de la concentration en gangliosides des standards dilués. Cette méthode est à privilégier lorsque la matrice biologique est responsable d'un effet matrice. La droite d'étalonnage représentant les intensités des gangliosides dans les plasmas surchargés en GM3 en fonction de la concentration en GM3 des standards est tracée sous Excel. Le coefficient de corrélation obtenu est supérieur à 0,9, cette courbe est donc exploitable. Le coefficient directeur de la droite est de : $a = 1{,}17.10^{9}$ $L.mol^{-1}$. L'équation de la droite est donc : $y = 1{,}17.10^{9}c + 1{,}4.10^{5}$.

Par la suite, la concentration en chacun des différents gangliosides GM3 est estimée à partir de la concentration totale en gangliosides précédemment calculée et à partir des proportions relatives en gangliosides GM3. Ces concentrations sont renseignées Tableau 18.

| Identification | Intensité plasma | Concentrations Méthode étalonnage externe | Concentrations Méthode ajout dosés |
|---|---|---|---|
| Ganglioside GM3 (d18:1/16:0) | 3863 | 1,69 µM +/- 0,36 µM | 4,51 µM +/-0,96 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/18:0) | 1104 | 0,48 µM +/- 0,03 µM | 1,29 µM +/-0,02 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/20:0) | 381 | 0,17 µM +/- 0 µM | 0,45 µM +/-0,02 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/24:1(15Z)) | 2252 | 0,99 µM +/- 0,27 µM | 2,63 µM +/-0,5 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/22:0) | 1359 | 0,6 µM +/- 0,14 µM | 1,59 µM +/-0,26 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/23:0) | 527 | 0,23 µM +/- 0,05 µM | 0,62 µM +/-0,1 µM |
| Ganglioside GM3 (d18:1/24:0) | 843 | 0,37 µM +/- 0,13 µM | 0,98 µM +/-0,32 µM |
| **Concentration totale en GM3** | | **4,53 µM +/- 0,53 µM** | **12,07 µM+/- 1,42 µM** |

Tableau 18 | Estimation des concentrations de gangliosides

Des gangliosides ont été détectés dans le plasma à une concentration micromolaire. Les concentrations estimées par les deux techniques sont différentes avec un rapport de 2,7. Cela peut s'expliquer par un effet matrice. Les concentrations estimées étant plus élevées avec la méthode des ajouts dosés.

Les échantillons des patients ont été analysés, selon la méthode mise au point. Seulement 146 variables ont été identifiées, parmi lesquelles aucun ganglioside.

# 3. Discussion

## 3.1.Analyse lipidomique globale

La première approche employée dans cette analyse lipidomique globale pour identifier les variables lipidiques d'intérêt sont les analyses statistiques multivariées, d'abord non supervisées, *i.e.* analyse en composantes principales puis supervisées, *i.e.* analyse PLS. Cette approche n'a pas permis d'identifier des variables ou des groupes de variables dépendantes de caractéristiques liées au traitement telles que la persistance de la neuropathie entre deux administrations ou le moment de prélèvement. Cette absence de résultats significatifs pourrait s'expliquer soit par une inexistence de biomarqueurs lipidiques, soit par une méthode statistique inadaptée. L'analyse en composantes principales est une technique linéaire qui ne tient pas compte des éventuelles relations non linéaires et qui par ailleurs est sensible aux valeurs extrêmes. Pour les systèmes non linéaires, plusieurs méthodes d'analyse en composantes principales non linéaires (ACPNL) ont été proposées, notamment l'Analyse en Composantes Principales à Noyaux [302]. Quant aux valeurs extrêmes, celles-ci augmentent la variance des variables, perturbent les corrélations et ainsi réduisent la puissance. Il est possible de considérer les valeurs extrêmes comme *outliers* grâce à des tests tel que le test de Grubbs [303].

La seconde approche employée dans cette analyse lipidomique globale pour identifier les variables lipidiques d'intérêt sont les analyses statistiques univariées classiques. Ainsi, des tests de Student appariés ont été effectués de façon répétée sur chacune des variables lipidiques afin de comparer deux à deux t0 à t3 ; t0 à t6 et t0 à t12. La correction FDR (False Discovery Rate) a été appliquée (0,05 %) au sein de chaque catégorie de lipides. Le principal résultat de cette analyse univariée est la diminution significative de plusieurs triglycérides polyinsaturés dans le plasma de patients traités par oxaliplatine entre le début et la fin du traitement. Pendant cette période, les triglycérides polyinsaturés diminuent de 17 % pour le TG (50:9) à 63 % pour le TG (58:7) avec une diminution moyenne de 47 %. Le nombre total d'insaturations de ces lipides est élevé et varie de 7 à 11. Parallèlement à cette diminution, certains acides gras libres polyinsaturés (AGPI) semblent augmenter. Il n'est pas possible d'attribuer en l'état de lien entre ces AGPI et les triglycérides polyinsaturés mentionnés précédemment. Afin de déterminer l'origine de l'augmentation des AGPI et de le relier éventuellement au catabolisme des triglycérides polyinsaturés, il conviendrait tout d'abord de préciser la nature des chaînes d'acides gras portés par ces triglycérides par spectrométrie de masse en tandem MS/MS et par ailleurs de doser l'activité de lipases impliquées dans le catabolisme des triglycérides telles que l'endothélial lipase ou la lipoprotéine lipase, laquelle pourrait jouer un rôle dans le développement de la neuropathie diabétique. En effet, il a

été mis en évidence chez le rat neuropathique diabétique une corrélation entre la diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase et la diminution de la vitesse de conduction nerveuse [304].

Toutefois, cette relation inverse - diminution des triglycérides polyinsaturés associée à une augmentation des AGPI - reste cohérente avec le rôle que jouent les AGPI dans la régulation de la douleur et de l'inflammation [107]. L'acide arachidonique (AA; 20:4, n-6) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA; C20:5, n-3) sont des précurseurs des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes, médiateurs de l'inflammation et de la douleur. L'augmentation dans le plasma d'EPA, d'AA mais aussi des métabolites intermédiaires de synthèse des leucotriènes, l'acide hydroxyéicosatétraénoïque (HETE) et l'acide hydroxyéicosadiénoïque (HEDE) suggère une activation de la voie de l'acide arachidonique. Les AGPI omega-3 sont connus pour avoir des effets anti-inflammatoires et antioxydants [305]. Ainsi, de nombreuses études ont rapporté ce rôle anti-inflammatoire et antalgique dans de nombreuses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la dysménorrhée, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [306]–[308]. Les AGPI n-3 réduisent la production de cytokines et d'eicosanoïdes [309], [310]. L'acide $\alpha$-linolénique inhibe la production d'acide lysophosphatidique, un phospholipide impliqué dans la douleur neuropathique [311]. Il a été montré que l'acide docosahexaénoïque (DHA) possédait un effet antalgique dose-dépendant chez la souris et un effet anti-nociceptif sur la douleur neuropathique [312]. Les mécanismes moléculaires qui peuvent expliquer cet effet sont nombreux, parmi lesquels un effet anti-inflammatoire via la suppression de la cascade de l'acide arachidonique, une action agonistique vis-à-vis du récepteur TRPV1, ainsi qu'une inhibition des canaux sodiques voltage-dépendant et de canaux calciques [107]. Les effets antalgiques et anti-inflammatoires des AGPI n-3 s'expliquent également par l'action antagoniste sur la cascade de l'acide arachidonique [313], [314]. Lorsque EPA et DHA sont métabolisés par la cyclooxygénase et la lipoxygénase, ces derniers sont transformés en de puissantes molécules anti-inflammatoires resolvins, docosatriènes, et protectins [315]. Ces médiateurs possèdent également des effets antalgiques sur la douleur d'origine inflammatoire [316], [317]. Dans ce contexte, plusieurs études ont mis en évidence le rôle protecteur de la supplémentation en oméga-3 dans les pathologies cardiovasculaires ainsi que dans les maladies neurologiques (maladie d'Alzheimer) et psychiatriques (dépression, hyperactivité) [305], [318]–[321]. Cet effet neuroprotecteur a également été montré spécifiquement dans la prophylaxie de la NPIO où la supplémentation en AGPI oméga-3 pendant le traitement par oxaliplatine réduit l'incidence et la sévérité de la NPIO par rapport à des patients non supplémentés [103]. A l'inverse, les AGPI oméga-6 sont généralement considérés comme mauvais pour la santé dans la mesure où ils sont à l'origine d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, de prostaglandines et autres métabolites pro-inflammatoires et pro-nociceptifs tel que l'acide 9-hydroxyoctadecadiénoïque (9-HODE) issu de l'acide linoléique.

D'autre part, certains métabolites dérivés des AGPI de la série n-6 sont capables d'activer les récepteurs TRPV1 et déclencher ainsi un stimulus douloureux [322]. Cependant, des études ont reporté que certains métabolites AGPI de la série n-6 tels que l'acide epoxyeicosatrienoïque avaient un effet antalgique [323]. En résumé, les métabolites dérivés de l'EPA sont considérés comme jouant un rôle antinociceptif, tandis que les métabolites dérivés d'AA sont considérés comme jouant un rôle essentiellement pro-nociceptif. Dans l'étude LIPIDOXA, à t6, le taux d'AA et d'EPA présentent une tendance à l'augmentation, par ailleurs, 44 % des patients présentent une neuropathie douloureuse (NPSI positif). Une régression logistique n'a pas permis d'établir de relation entre le taux d'EPA et/ou d'AA et la survenue de la neuropathie douloureuse ni l'intensité de la neuropathie (grade NCI-CTC). La production des métabolites dérivés de l'EPA et de l'AA repose sur un équilibre dynamique dépendant de nombreux paramètres, lesquels sont les apports alimentaires, l'oxydation en métabolites ou l'incorporation dans des phospholipides ou glycérides, autant de paramètres susceptibles d'ajouter de la variabilité dans les résultats [324]. D'autre part, une tendance à une forte augmentation d'acide hydroxytetradécanoïque a été mise en évidence entre t0 et t6 et entre t0 et t12. Cette acide gras hydroxylé est retrouvé augmenté dans certaines maladies neurologiques et constitue également un marqueur de stress oxydant [325].

En 2017, l'équipe du C-TAC a étudié l'effet de l'oxaliplatine *in vitro* sur le processus de myélinisation en caractérisant les changements lipidiques induits par l'exposition d'un modèle de cellules de Schwann, la lignée MSC80. Les cellules de Schwann sont les cellules du système nerveux périphérique responsables de la synthèse de la myéline. Il a été mis en évidence des changements importants au niveau de certains phospho- et glycérophospholipides, constituants de la myéline ainsi qu'une diminution importante de certains triglycérides polyinsaturés, notamment le TG (62:15), contenant deux chaines latérales de DHA (un dérivé de l'EPA). Il est intéressant de noter cette similitude avec l'étude LIPIDOXA.

Ces perturbations lipidiques observées dans le plasma peuvent également être consécutives à des modifications de la composition lipidique des structures nerveuses et plus particulièrement des gaines de myélines, très riches en lipides ou des terminaisons nerveuses, riches en acides gras polyinsaturés. En effet, des lésions nerveuses peuvent se manifester par des modifications du profil lipidique plasmatique, c'est le cas notamment de certains sphingolipides qui sont augmentés dans le plasma du rongeur suite à un traumatisme crânien [326]. Les structures nerveuses sont riches en acides gras saturés (C16:0 ; C18:0) et monoinsaturés (C16:1 ; C18:1) qui participent à la bonne isolation électrique. Des acides gras à longues chaînes sont également présents, parmi ceux-ci, l'AA, l'EPA et le DHA sont parmi les plus représentés [327]. Ce dernier semble jouer un rôle important dans la conduction nerveuse, le processus de myélinisation, et l'extension des terminaisons nerveuses [328]. En effet, la supplémentation de rats diabétiques en

acide gamma-linolénique (C18:3) et en EPA, lesquels sont des acides gras pouvant être transformés en DHA, permet de restaurer les vitesses de conduction nerveuse altérées dans la neuropathie diabétique [329], [330]. Enfin, une supplémentation en EPA et DHA chez des patients traités par oxaliplatine permet de diminuer la prévalence et l'intensité de la NPIO [103]. Les patients de l'étude LIPIDOXA présentent des taux augmentés dans le sang d'AA et d'EPA, alors que les TG portant ces AGPI sont diminués. Ceci pourrait être en accord avec une activité métabolique de remaniement de la composition lipidique des tissus nerveux. D'autre part, les terminaisons nerveuses sont riches en acides gras polyinsaturés, notamment AA et DHA [331]. Or, l'oxaliplatine est connu pour léser les terminaisons des petites fibres nerveuses intraépidermiques. Il est alors probable qu'une dégénérescence de ces IENF se traduise par une libération des lipides entrant dans la composition de ces terminaisons nerveuses, à savoir l'AA et le DHA. Afin de relier la perturbation du profil lipidique plasmatique à celle du profil lipidique des structures nerveuses, il pourrait être judicieux d'étudier le lipidome de fibres nerveuses intra-épidermiques humaines ou de ganglions nerveux de la corne dorsale chez le rat.

Les patients inclus dans l'étude LIPIDOXA sont principalement des patients atteints de cancer colorectal, or il est connu que le profil lipidique est modifié chez de tels patients. En effet, chez les patients souffrants d'un cancer colorectal les concentrations plasmatiques en dérivés saturés, monoinsaturés et polyinsaturés sont significativement plus faibles que chez des témoins sains. Par ailleurs, lorsque les taux sont exprimés en pourcentages, les patients cancéreux présentent des proportions beaucoup plus élevées d'acides gras saturés et monoinsaturés et des taux d'acides gras polyinsaturés plus faibles que les témoins [332]. Par conséquent, l'interprétation des résultats doit tenir compte de ce paramètre : la maladie cancéreuse influe sur le métabolisme des lipides et il conviendrait d'avoir un groupe contrôle composé de malades atteints de cancer colorectal mais non traités par oxaliplatine pour pouvoir attribuer avec plus de certitudes le rôle de l'oxaliplatine dans la perturbation lipidique.

## 3.1.Analyse lipidomique ciblée

Une analyse lipidomique ciblée sur les gangliosides a été réalisée. Le choix de cette sous-classe de lipides est justifié d'une part par les rôles majeurs qu'ils jouent dans l'homéostasie des fonctions neurologiques et d'autre part pour leur implication dans certaines maladies neurologiques [294]. En formulant l'hypothèse que la NPIO se traduit par une altération du profil lipidique des gangliosides. Ainsi, nous avons mis au point une méthode d'analyse des gangliosides plasmatiques (extraction et détection quantitative) et avons tenté d'étudier les variations

qualitatives et semi-quantitatives des gangliosides dans le plasma des patients traités par oxaliplatine.

La méthode d'extraction consiste tout d'abord en une extraction L/L selon la méthode de Bligh & Dyer. La phase aqueuse, contenant les lipides les plus polaires, est conservée. Cette phase aqueuse est par la suite tamponnée à pH alcalin afin de solubiliser les gangliosides sous leur forme d'ions. Cette phase aqueuse subie par la suite une extraction SPE sur cartouches hydrophobes HR-X (3 mL, 30 mg) et les gangliosides extraits sont solubilisés dans un mélange méthanol-eau 9:1 (v/v) (400 µL). Cette méthode d'extraction double utilisant des cartouches **hydrophobes** est très largement employée dans ce champ d'étude [295], [333], [334]. Les gangliosides sont retenus grâce aux interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras des gangliosides et la matrice apolaire de la cartouche. Des cartouches mixtes mettant en jeu à la fois des interactions hydrophobes et des interactions ioniques (ammonium quaternaire) ont donné des rendements médiocres en élution basique (NaOH à 0,1 M suivi de MeOH). Celles-ci avaient été proposées dans la mesure où elles pouvaient se montrer davantage spécifiques dans la mesure où deux types d'interactions étaient mis en jeu. Il est possible que les interactions hydrophobes jouent un rôle majeur dans la rétention ou que la solution décimolaire de soude employée pour rendre neutre la matrice de la cartouche dégrade et saponifie les gangliosides. Offrant de meilleur résultat, le mode hydrophobe, plus rapide et moins couteux a donc été retenu.

La méthode de séparation chromatographique a repris la méthode utilisée dans l'analyse lipidomique non ciblée : utilisation d'une colonne chromatographique CSH-C18 thermostatée à 50 °C et élution en gradient de solvants (phase A : acétonitrile/eau 4:6 v/v et phase B acétonitrile/isopropanol 1:9 v/v). La proportion des différentes phases démarre à 40 % de phase B pour atteindre 100 % de phase B au bout de 10 minutes. L'élution en gradient de solvant (l'un plus polaire, l'autre plus apolaire) ainsi que l'utilisation d'une colonne greffé par des chaînes alkyles sont classiquement employés dans ce type d'analyse [300]. Les gangliosides sont élués entre 4 et 7 minutes, soit pour une phase mobile composée de 33 % de phase A, 67 % de phase B à 20 % de phase A, 80 % de phase B. Il serait possible d'optimiser ce gradient pour réduire le temps d'analyse, *e.g.* démarrer à 50 % de phase B et revenir à l'état basal à 90 % de phase B.

Les gangliosides portant une charge négative, la détection par HRMS a reposé sur l'utilisation du mode ESI-. De nombreuses espèces de gangliosides ont été détectées dans le plasma des patients, parmi lesquelles le GM1, GM3, GA2 et GD3 avec des adduits du type [M-2H]2- et [M-H]- essentiellement. Ces gangliosides n'ont pas été détectés en mode ESI+. Les concentrations plasmatiques en gangliosides GM3 estimées sur quelques plasmas tests sont de l'ordre du micromolaire, concentrations cohérentes avec les concentrations plasmatiques physiologiques

humaines du GM3 [151], [335]. La méthode d'extraction et de détection des gangliosides semble ainsi être au point.

L'analyse des échantillons de plasma des patients de l'étude LIPIDOXA n'a produit que très peu de variables dont aucun ganglioside alors que la méthode est restée inchangée. L'étude des chromatogrammes permet de retrouver des pics de gangliosides mais d'intensité très faible. Ce défaut de détection pourrait provenir d'un **défaut d'acquisition** de la source du spectromètre de masse ou d'une **mauvaise solubilisation** des gangliosides, notamment à long terme, les extractions ayant été conservées plusieurs mois à -80 °C avant analyse. En effet, la stabilité à long terme des gangliosides dans une solution de MeOH/$H_2$0, 90:10 n'est pas connue et il pourrait être judicieux de l'étudier en réalisant une étude de stabilité. Les gangliosides sont des molécules amphiphiles pouvant se comporter comme des tensioactifs. Aussi, selon le pourcentage d'eau du milieu et la concentration en gangliosides, ces derniers peuvent s'agréger former des micelles [336], [337]. Dans ce cas de figure, l'analyse s'avère compromise dans la mesure où les gangliosides ne sont plus correctement solubilisés.

# DISCUSSION GENERALE

Le présent manuscrit de thèse expose deux travaux originaux qui ont tenté d'explorer et d'expliquer la neuropathie induite par l'oxaliplatine. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de différentes approches : clinique, biologique, lipidomique et électrochimique. Pour identifier et étudier des marqueurs cliniques, biochimiques, lipidiques et électrochimiques de NPIO, deux études cliniques (l'étude LIPIDOXA, NCT02169908 et l'étude CANALOXA, NCT02827916) ont été réalisées au sein du service d'oncologie du Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph en collaboration avec le laboratoire C-TAC de l'UFR de Pharmacie de l'Université Paris Descartes. Ces travaux ont été possibles grâce à l'obtention de deux financements de la fondation APICIL

Les objectifs de l'étude LIPIDOXA étaient (1) la quantification de la NPIO grâce à l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires validées dans le domaine de la recherche clinique sur les neuropathies et (2) l'identification de marqueurs plasmatiques de NPIO.

L'objectif de l'étude CANALOXA était de déterminer l'intérêt d'utiliser le Sudoscan dans le diagnostic de la neuropathie induite par l'oxaliplatine.

**Les marqueurs de neuropathie à l'oxaliplatine**

La première étude a consisté en une exploration clinico-biologique de la NPIO. Les patients de l'étude LIPIDOXA ont été inclus avant traitement par oxaliplatine et ont été évalués avant traitement, tout au long du traitement et six mois après l'arrêt. Entre mai 2014 et juin 2016, 35 patients ont été inclus. Le développement d'une hypoesthésie thermique distale a été mis en évidence six mois après arrêt de l'oxaliplatine. Au bout de six mois de traitement, 19 % des patients présentaient une neurotoxicité de grade 2, 71 % une neurotoxicité de grade 1 et 10 % ne présentait pas de neurotoxicité (grade 0). Les patients présentant une neurotoxicité de grade 2 ont reçu une dose moyenne d'oxaliplatine inférieure comparée aux patients présentant une neurotoxicité de grade 1. Par ailleurs, il a été montré un lien entre grade de neuropathie mesuré à six mois et le délai d'adaptation posologique d'une part et le stade du cancer d'autre part. L'étude des marqueurs plasmatiques a révélé, en fin de traitement, une augmentation de la production de prostaglandines E2, un niveau moins élevé de stress oxydant chez les patients souffrant d'une neuropathie de grade 2 ainsi qu'une diminution de la concentration des triglycérides polyinsaturés associée à une tendance à l'augmentation des acides gras libres polyinsaturés. Les résultats de ce travail ont fait l'objet de deux publications, l'une dans *Journal Cancer Treatment and Research Communications : Is quantitative sensory testing helpful in the management of oxaliplatin neuropathy? A two-year clinical study* (article 1) et la seconde dans *Journal of Clinical Neurophysiology : Quantification of Chronic Oxaliplatin-Induced Hypesthesia in Two Areas of the Hand* (article 2).

La seconde étude a consisté en une exploration électrochimique de la NPIO. Les patients de l'étude CANALOXA, tous neuropathiques, ont été inclus en cours de traitement par oxaliplatine et évalués une seule fois. Entre avril 2016 et mars 2017, 36 patients ont été inclus. Les valeurs des conductances électrochimiques de la peau étaient pathologiques pour un tiers des patients. Les valeurs d'ESC étaient corrélées avec le score de douleur neuropathique et cette étude suggère que la NPIO douloureuse pourrait être détectée à l'aide du dispositif Sudoscan. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans le Journal *Neurology Research International : Electrochemical Skin Conductance as a Marker of Painful Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy* (article 3).

Il est intéressant de remarquer la cohérence des résultats des deux études LIPIDOXA et CANALOXA en termes de seuils de sensibilité thermique et de score de douleur neuropathique. Les variations des seuils de détection du froid (entre -3 °C et -4 °C) et les variations du seuil de détection du chaud (entre +2,5 °C et +3,5 °C) mesurées en cours de traitement chez les patients des deux études étaient cohérents entre eux et avec ceux publiés dans des études antérieures [27]. Les résultats du score NPSI pour les deux études étaient aussi cohérents entre eux. En effet, 44 % des patients de l'étude LIPIDOXA ont déclaré ressentir une douleur neuropathique, ils étaient 56 % dans l'étude CANALOXA. Les réponses aux questions étaient très similaires. Les questions les plus représentées étaient la question 10 (douleurs provoquées par un objet froid) et les questions 11 et 12 (douleurs se présentant comme des picotements ou des fourmillements). Les moyennes des scores de la question 10 étaient de 4,3/10 pour les études LIPIDOXA et CANALOXA et les moyennes des scores de la question 11 et 12 étaient de 4,4/10 et 4,3/10 pour les études LIPIDOXA et CANALOXA, respectivement. Ces résultats étaient en accord avec ceux précedemment publiés [26].

Cependant, ces marqueurs sont peu spécifiques et d'apparition plus tardive que les signes cliniques évalué par l'échelle NCI-CTCAE. Aussi, ils sont difficilement utilisables en pratique clinique pour un éventuel suivi de la tolérance neurologique au traitement.

**Physiopathologie de la neuropathie à l'oxaliplatine**

Au-delà de l'intérêt modéré d'utiliser ces marqueurs dans la prise en charge du patient traité par oxaliplatine, ce travail renforce la compréhension de la physiopathologie de la NPIO dans différents champs d'études. Ces derniers sont la neuropathie à petites fibres, les processus inflammatoires associés et la perturbation du métabolisme lipidique chez le patient neuropathique.

Il est bien décrit que les dérivés du platine induisent des lésions nerveuses et altèrent la croissance neuronale des petites fibres nerveuses [14], [54], [56]. Pour rappel, les fibres Aδ sont

des fibres faiblement myélinisées qui conduisent des informations sur le toucher léger, la stimulation thermique froide non douloureuse et sur la douleur aiguë rapide de type "piqûre". Les fibres C sont des fibres non myélinisées qui conduisent des informations sur la stimulation thermique chaude non douloureuse et sur la douleur aiguë de type brûlure et innervent les glandes sudoripares. Aussi, le thermotest évalue les fibres Aδ et les fibres C tandis que le Sudoscan évalue les fibres C. Cependant, les fibres C évaluées par ces deux appareils ne sont pas forcément les mêmes, l'une appartenant au système nerveux sensitif, l'autre au système nerveux végétatif. Il existe une corrélation entre les seuils de détection du chaud et du froid et la densité en fibres nerveuses intra-épidermiques [338]. De même, il existe une corrélation entre les valeurs d'ESC et la densité en IENF [285]. Lorsque celle-ci est réduite, les seuils de détection thermiques augmentent et l'ESC diminue. Dans la mesure où ces paramètres sont en partie pathologiques chez les patients des études LIPIDOXA et CANALOXA, on peut supposer que ces patients présentent des atteintes nerveuses des IENF. Il est envisageable de penser que ces lésions causées par l'oxaliplatine seraient responsables de la douleur neuropathique observée chez les patients présentant des valeurs d'ESC diminuées. Cependant, en l'absence de groupe contrôle, il n'est pas possible d'imputer l'altération de ces paramètres à la neurotoxicité de l'oxaliplatine. En effet, d'autres causes pourraient l'expliquer telles que la maladie cancéreuse ou bien les carences en vitamines [54], [55].

Concernant l'étude des marqueurs plasmatiques, il a été montré en fin de traitement une augmentation des concentrations en prostaglandines E2 et une tendance à l'augmentation des acides arachidoniques et eicosapentaénoïques grâce à deux techniques différentes, l'une biochimique (test ELISA), l'autre lipidomique. Ces deux résultats semblent cohérents, en effet l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque sont des précurseurs des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes, eux-mêmes médiateurs de l'inflammation et de la douleur. Or, près de la moitié des patients des études étaient douloureux. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de relation entre les taux de PGE2, AA, ou EPA et le score de douleur neuropathique. Il est probable que ce résultat non significatif soit dû à un **manque de puissance** de l'étude.

**L'hétérogénéité des données**

Les résultats des tests cliniques, biologiques et lipidomiques sont caractérisés par une grande dispersion des valeurs. Les coefficients de variations sont souvent élevés, dépassant parfois 100 % pour certains tests. Cette variabilité importante est responsable d'une diminution de la puissance des tests statistiques et pourrait expliquer le nombre important de résultats rendus non significatifs alors que des tendances se dessinaient clairement. Les études LIPIDOXA et CANALOXA sont des études cliniques en **soins courants** caractérisées par l'absence de maîtrise d'un certain

nombre de paramètres thérapeutiques, cliniques, biologiques ou encore génétiques. Il en résulte une importante hétérogénéité dans les données et ce, à tous les niveaux. A l'inverse des études chez l'animal où il est facile de maîtriser les paramètres environnementaux, thérapeutiques, génétiques… il est plus difficile de les maîtriser chez la personne humaine. Chez les patients des deux études pilotes, de nombreux facteurs ont pu introduire des biais et donc de la variabilité dans les mesures parmi lesquels on peut citer le traitement (anticancéreux associé à l'oxaliplatine et le traitement chronique), le type de cancer [54], le stade du cancer, l'alimentation [103] ou encore le polymorphisme génétique [265]. Afin de réduire cette variabilité, il est indispensable de bien sélectionner les patients afin d'obtenir une population d'étude la moins hétérogène possible.

**Perspectives et suite à donner aux études**

Les études LIPIDOXA et CANALOXA sont des études de faisabilité qui visent à préparer d'éventuelles études futures. Les enjeux de ces études pilotes étaient d'approuver la faisabilité des projets, de mettre au point les méthodes des études et d'établir les preuves du concept de l'étude de certains marqueurs clinico-biologiques, du lipidome et des conductances électrochimiques dans la NPIO. Ces études pilotes ont donc permis de fournir des informations importantes sur la distribution des différents paramètres étudiés (seuils de sensibilité, marqueurs plasmatiques, ESC…), informations essentielles pour la conception de futures études. Par ailleurs, ces études pilotes fournissent de nouveaux arguments scientifiques pour prétendre répondre à des appels d'offres tels que les Programmes de Recherche Translationnelle en Cancérologie (PRT-K) de l'INCa-DGOS ou les Programmes Hospitaliers de Recherche Clinique (PH-RC) du Ministère de la Santé.

Les premiers résultats de ces deux études pilotes sont à confirmer par des études de plus grande ampleur. La réalisation de futures études reprenant les méthodologies de LIPIDOXA et CANALOXA serait la suite logique à donner à ce projet. Ces futures études devront être longitudinales et contrôlées (groupe témoin de patients malades non traités par oxaliplatine), afin de pouvoir attribuer la perturbation des paramètres observés à l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine. La mise en place de l'aveugle devra être respectée afin de ne pas introduire de biais d'évaluation. Il sera nécessaire d'inclure davantage de patients pour augmenter la puissance des tests statistiques et ainsi espérer obtenir des résultats significatifs qui n'étaient, jusqu'alors dans ces études pilotes, que des tendances. Le calcul du nombre de sujet nécessaire pourra se faire grâce aux données des études pilotes. D'autre part, il pourrait être judicieux de limiter la population étudiée à celle traitée par FOLFOX. En effet, cela réduirait la variabilité causée par la toxicité des médicaments anticancéreux des autres protocoles thérapeutiques et augmenterait ainsi la puissance des tests statistiques. En outre, le potentiel de recrutement élevé des patients

FOLFOX ne compromettrait pas le recrutement futur des patients. Enfin, la maladie cancéreuse pouvant être à l'origine de neuropathies infracliniques [54], il serait judicieux également de n'inclure que des patients atteints de cancer colorectal. De même, le fort potentiel de recrutement de ce type de cancer ne compromettrait pas le recrutement.

**Le patient, un partenaire de l'équipe soignante au service de sa prise en charge**

La gestion de la neurotoxicité de l'oxaliplatine chez les patients des deux études pilotes a été réalisée selon les pratiques cliniques en vigueur dans le service. La réalisation des études pilotes qui sont des études en soins courants, n'a donc pas interféré sur la prise en charge de la NPIO. La gestion de la NPIO s'est basée sur une échelle clinique simple à mettre en œuvre, sensible et qui nécessite la collaboration du patient : le NCI-CTCAE. Il est intéressant de noter que son utilisation dans l'étude LPIDOXA a montré une adaptation efficace des doses d'oxaliplatine. En effet, dans une étude similaire à LIPIDOXA, 31,6 % et 12,4 % des patients ont présenté une neurotoxicité de grade 2 et 3 respectivement, alors que dans l'étude LIPIDOXA, 19 % et 0 % des patients ont présenté une neurotoxicité de grade 2 et 3, respectivement [20]. Dans l'étude LIPIDOXA, les patients présentant une neurotoxicité de grade 2 ont reçu une dose moyenne d'oxaliplatine inférieure à celle reçue par les patients présentant une neurotoxicité de grade 1, signe d'une tentative d'adaptation des doses d'oxaliplatine pour maîtriser les effets indésirables neurologiques. Les autres paramètres étudiés dans l'étude LIPIDOXA sont d'apparition relativement tardive (hypoesthésie, marqueurs plasmatiques) et la gestion de la neurotoxicité basée sur le NCI-CTCAE, telle qu'actuellement réalisée en pratique courante, demeure très bien adaptée. De même, dans l'étude CANALOXA, seulement un tiers des patients présentaient un ESC pathologique alors qu'ils étaient tous neuropathiques selon le NCI-CTCAE. Par ailleurs le score NPSI de douleur neuropathique semble particulièrement utile. En effet, bien que le Sudoscan soit capable de détecter une neuropathie douloureuse avec une bonne performance diagnostique, la mesure de l'ESC demeure davantage fastidieuse que l'évaluation clinique de la douleur neuropathique par un simple questionnaire. Par conséquent, un**e prise en charge basée sur la coopération du patient** constitue une pratique à **encourager et à développer**.

C'est pourquoi, dans le but d'accompagner ces patients traités par chimiothérapie neurotoxique, une séance d'éducation thérapeutique a été conçue parallèlement à ce travail universitaire (programme d'éducation thérapeutique IMMPaCT des Hôpitaux Universitaires Paris Sud) et a constitué le sujet de mon mémoire de DES de Pharmacie Hospitalière. L'objectif de cette séance mêlant ateliers pédagogiques et ateliers d'ergothérapie est de rendre les patients capables d'informer plus précocement l'équipe soignante pour anticiper le développement des atteintes

neurologiques d'une part et d'autre part de donner aux patients les compétences pour mieux vivre avec ce traitement neurotoxique.

# CONCLUSION

Des marqueurs de neuropathie à l'oxaliplatine ont été identifiés et étudiés. Ces derniers sont de différentes natures : cliniques (hypoesthésie thermique, douleur neuropathique), plasmatiques (certains marqueurs de l'inflammation -prostaglandines E2- et du stress oxydant, ainsi que certains triglycérides et acides gras libres polyinsaturés) et enfin électrochimiques (baisse des conductances électrochimiques de la peau). Ces marqueurs sont cependant peu spécifiques et semblent d'apparition tardive. Aussi, ils sont difficilement utilisables en pratique clinique pour un éventuel suivi de la tolérance neurologique au traitement.

Au-delà de l'apport clinique et thérapeutique modéré, ce travail renforce la compréhension de la physiopathologie de la NPIO dans le domaine de la neuropathie à petites fibres (hypoesthésie thermique et baisse des conductances électrochimiques), dans les processus inflammatoires associés et dans la perturbation du métabolisme lipidique chez le patient neuropathique.

Les études LIPIDOXA et CANALOXA étant des études préliminaires de faisabilité, celles-ci visent à préparer la méthodologie d'études de plus grande ampleur et à tester les hypothèses formulées en début de projet. Sur la base des premiers résultats obtenus, les perspectives de ces études sont nombreuses. Les enseignements retenus et les données recueillis lors de ces études pilotes pourront servir de base à des études futures afin d'approfondir ces travaux, notamment en termes de meilleure caractérisation de l'hypoethésie, de l'altération des conductances électrochimiques et de la modification du métabolisme des lipides polyinsaturés.

La complémentarité et les similarités de ces travaux rappellent que la prise en charge du patient doit être globale et conjuguer des éléments variés au sein desquels le patient doit rester au cœur de la gestion de la NPIO. S'intéresser à la neuropathie iatrogène du patient traité par oxaliplatine à des fins de recherche ou à des fins thérapeutiques suppose donc de replacer le patient au cœur de la problématique.

Ce projet de recherche translationnel, au carrefour de plusieurs disciplines, s'inscrit dans une dynamique d'amélioration continue et de nombreuses perspectives de recherche s'offrent à ce projet.

# BIBLIOGRAPHIE

[1] M. Saad *et al.*, « Quick, non-invasive and quantitative assessment of small fiber neuropathy in patients receiving chemotherapy », *J. Neurooncol.*, vol. 127, n° 2, p. 373-380, janv. 2016.
[2] Société Nationale Française de Gastro-Entérologie., « Recommandations SNFGE. Prise en charge du cancer colorectal (juin 2016). » [En ligne]. Disponible sur: http://www.snfge.org/content/4-cancer-colorectal-metastatique#ancre5042. [Consulté le: 01-sept-2016].
[3] B. Rosenberg et L. VanCamp, « The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds », *Cancer Res.*, vol. 30, n° 6, p. 1799-1802, juin 1970.
[4] B. Rosenberg, L. Van Camp, et T. Krigas, « Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode », *Nature*, vol. 205, n° 4972, p. 698-699, févr. 1965.
[5] M. Peyrone, « Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür », *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 51, n° 1, p. 1-29, janv. 1844.
[6] E. Wiltshaw, « Cisplatin in the treatment of cancer. », *Platin. Met. Rev.*, vol. 23, n° 3, p. 90-98, 1979.
[7] B. Desoize, « Cancer and Metals and Metal Compounds:: Part II—Cancer treatment », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 42, n° 3, p. 213-215, juin 2002.
[8] R. F. Ozols *et al.*, « Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 21, n° 17, p. 3194-3200, sept. 2003.
[9] S. Dilruba et G. V. Kalayda, « Platinum-based drugs: past, present and future », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 77, n° 6, p. 1103-1124, févr. 2016.
[10] T. A. Dunn, H. J. Schmoll, V. Grünwald, C. Bokemeyer, et J. Casper, « Comparative cytotoxicity of oxaliplatin and cisplatin in non-seminomatous germ cell cancer cell lines », *Invest. New Drugs*, vol. 15, n° 2, p. 109-114, 1997.
[11] B. Desoize et C. Madoulet, « Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 42, n° 3, p. 317-325, juin 2002.
[12] R. K. Mehmood, « Review of Cisplatin and Oxaliplatin in Current Immunogenic and Monoclonal Antibody Treatments », *Oncol. Rev.*, vol. 8, n° 2, sept. 2014.
[13] D. B. Zamble et S. J. Lippard, « Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 20, n° 10, p. 435-439, oct. 1995.
[14] F. Massicot *et al.*, « P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach », *PloS One*, vol. 8, n° 6, p. e66830, 2013.
[15] M. Boisdron-Celle, A. Lebouil, P. Allain, et E. Gamelin, « Pharmacocinétique clinique comparative des dérivés du platine », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 88, n° 7, p. 14-9, sept. 2001.
[16] « Résumé des caractéristiques du produit de l'ELOXATINE ® 5 mg/mL, solution à diluer pour perfusion (oxaliplatine). », févr. 2012.
[17] X. J. Xiang *et al.*, « A phase II trial of epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine (EOX) as first-line chemotherapy in advanced gastric cancer: a Chinese single-center experience », *Chemotherapy*, vol. 56, n° 3, p. 171-177, 2010.
[18] M. Ychou *et al.*, « Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 62, n° 2, p. 195-201, juill. 2008.
[19] T. Conroy *et al.*, « FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, n° 19, p. 1817-1825, mai 2011.
[20] T. André *et al.*, « Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, n° 23, p. 2343-2351, juin 2004.

[21] H. I. Hurwitz *et al.*, « Bevacizumab in Combination With Fluorouracil and Leucovorin: An Active Regimen for First-Line Metastatic Colorectal Cancer », *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 15, p. 3502-3508, mai 2005.
[22] R. G. Amado *et al.*, « Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 10, p. 1626-1634, avr. 2008.
[23] D. Cunningham *et al.*, « Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, n° 4, p. 337-345, juill. 2004.
[24] C. Louvet *et al.*, « Gemcitabine combined with oxaliplatin in advanced pancreatic adenocarcinoma: final results of a GERCOR multicenter phase II study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 6, p. 1512-1518, mars 2002.
[25] J. Cassidy *et al.*, « XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 22, n° 11, p. 2084-2091, juin 2004.
[26] N. Attal *et al.*, « Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study », *Pain*, vol. 144, n° 3, p. 245-252, août 2009.
[27] A. Binder *et al.*, « Pain in oxaliplatin-induced neuropathy--sensitisation in the peripheral and central nociceptive system », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 43, n° 18, p. 2658-2663, déc. 2007.
[28] L. Gamelin, M. Boisdron-Celle, A. Morel, et E. Gamelin, « Oxaliplatin neurotoxicity », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 93 Suppl 1, p. 17-22, 2006 2006.
[29] L. E. Ta, L. Espeset, J. Podratz, et A. J. Windebank, « Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum–DNA binding », *NeuroToxicology*, vol. 27, n° 6, p. 992-1002, déc. 2006.
[30] G. Filliatreau, « Les moteurs moleculaires du transport axonal », 1988.
[31] A. J. Sumner et A. K. Asbury, « PHYSIOLOGICAL STUDIES OF THE DYING-BACK PHENOMENONMUSCLE STRETCH AFFERENTS IN ACRYLAMIDE NEUROPATHY », *Brain*, vol. 98, n° 1, p. 91-100, janv. 1975.
[32] A. Mélissopoulos, C. Levacher, et R. Ballotti, *La peau : Structure et physiologie*, 2e édition. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2012.
[33] M. Pruniéras, *Précis de cosmétiologie dermatologique*. Paris: Masson, 1990.
[34] P. Agache, *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2000.
[35] M. E. Ahmed et P. M. L. Quesne, « Quantitative sweat test in diabetics with neuropathic foot lesions. », *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 49, n° 9, p. 1059-1062, sept. 1986.
[36] Y. Liu *et al.*, « Factors influencing sweat gland innervation in diabetes », *Neurology*, vol. 84, n° 16, p. 1652-1659, avr. 2015.
[37] V. Saint-Criq et M. A. Gray, « Role of CFTR in epithelial physiology », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 74, n° 1, p. 93-115, 2017.
[38] J. Revuz, *Traité EMC : cosmétologie et dermatologie esthétique*. Elsevier Masson, 2009.
[39] F. Mols, T. Beijers, G. Vreugdenhil, et L. van de Poll-Franse, « Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review », *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer*, vol. 22, n° 8, p. 2261-2269, août 2014.
[40] S. M. F. Jamieson, J. Liu, B. Connor, et M. J. McKeage, « Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 56, n° 4, p. 391-399, oct. 2005.
[41] S. B. Park, C. S.-Y. Lin, A. V. Krishnan, D. Goldstein, M. L. Friedlander, et M. C. Kiernan, « Utilizing natural activity to dissect the pathophysiology of acute oxaliplatin-induced neuropathy », *Exp. Neurol.*, vol. 227, n° 1, p. 120-127, janv. 2011.

[42] R. Sittl *et al.*, « Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, n° 17, p. 6704-6709, avr. 2012.
[43] S. Lolignier, « Rôle du canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine », phdthesis, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011.
[44] J. R. Deuis *et al.*, « An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways », *Pain*, vol. 154, n° 9, p. 1749-1757, sept. 2013.
[45] E. Benoit, S. Brienza, et J. M. Dubois, « Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na+ and K+ channels in frog peripheral myelinated axons », *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 25, n° 3, p. 263-276, sept. 2006.
[46] K. Thibault *et al.*, « Cortical effect of oxaliplatin associated with sustained neuropathic pain: exacerbation of cortical activity and down-regulation of potassium channel expression in somatosensory cortex », *Pain*, vol. 153, n° 8, p. 1636-1647, août 2012.
[47] D. M. Bautista *et al.*, « The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold », *Nature*, vol. 448, n° 7150, p. 204-208, juill. 2007.
[48] A. Pedretti, C. Marconi, I. Bettinelli, et G. Vistoli, « Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1788, n° 5, p. 973-982, mai 2009.
[49] P. Gauchan, T. Andoh, A. Kato, et Y. Kuraishi, « Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice », *Neurosci. Lett.*, vol. 458, n° 2, p. 93-95, juill. 2009.
[50] T. Kawashiri *et al.*, « L type Ca2+ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats », *Mol. Pain*, vol. 8, n° 1, p. 7, janv. 2012.
[51] J.-H. Yeo *et al.*, « Repetitive Acupuncture Point Treatment with Diluted Bee Venom Relieves Mechanical Allodynia and Restores Intraepidermal Nerve Fiber Loss in Oxaliplatin-Induced Neuropathic Mice », *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.*, vol. 17, n° 3, p. 298-309, mars 2016.
[52] J. Boyette-Davis et P. Dougherty, « Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline », *Exp. Neurol.*, vol. 229, n° 2, p. 353-357, juin 2011.
[53] M. Nolano, D. A. Simone, G. Wendelschafer-Crabb, T. Johnson, E. Hazen, et W. R. Kennedy, « Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation », *Pain*, vol. 81, n° 1–2, p. 135-145, mai 1999.
[54] M. J. Koskinen *et al.*, « Intraepidermal nerve fibre density in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy », *Anticancer Res.*, vol. 31, n° 12, p. 4413-4416, déc. 2011.
[55] A. K. Kosturakis *et al.*, « Subclinical peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma before chemotherapy is correlated with decreased fingertip innervation density », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 28, p. 3156-3162, oct. 2014.
[56] F. R. Luo, S. D. Wyrick, et S. G. Chaney, « Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 44, n° 1, p. 29-38, 1999.
[57] M. J. McKeage, T. Hsu, D. Screnci, G. Haddad, et B. C. Baguley, « Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs », *Br. J. Cancer*, vol. 85, n° 8, p. 1219-1225, oct. 2001.
[58] I. P. Chessell *et al.*, « Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain », *Pain*, vol. 114, n° 3, p. 386-396, avr. 2005.
[59] K. Nishida *et al.*, « Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death », *J. Neurochem.*, vol. 122, n° 6, p. 1118-1128, sept. 2012.
[60] S.-Y. Yoon, C. R. Robinson, H. Zhang, et P. M. Dougherty, « Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity », *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.*, vol. 14, n° 2, p. 205-214, févr. 2013.
[61] L. Di Cesare Mannelli, A. Pacini, L. Micheli, A. Tani, M. Zanardelli, et C. Ghelardini, « Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain », *Exp. Neurol.*, vol. 261, p. 22-33, nov. 2014.

[62] M. Sakurai, N. Egashira, T. Kawashiri, T. Yano, H. Ikesue, et R. Oishi, « Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia », *Pain*, vol. 147, n° 1-3, p. 165-174, déc. 2009.

[63] L. Gamelin *et al.*, « Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, n° 12 Pt 1, p. 4055-4061, juin 2004.

[64] M. W. Saif et J. Reardon, « Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy », *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 1, n° 4, p. 249-258, déc. 2005.

[65] K. Bradley, M. Laforest, S. Kish, et C. Guillemette, « Efficacité d'un tableau d'ajustement de l'oxaliplatine selon le grade de neuropathie à l'Hôtel-Dieu de Québec », *Pharmactuel*, vol. 47, n° 2, 2014.

[66] C. Tournigand *et al.*, « 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.*, vol. 24, n° 3, p. 394-400, janv. 2006.

[67] M. W. Saif, « Does OPTIMOX strategy ("stop-and-go" approach) also work in treatment of pancreatic cancer with oxaliplatin-based regimens? », *JOP J. Pancreas*, vol. 9, n° 5, p. 658-663, 2008.

[68] A. De Gramont *et al.*, « OPTIMOX study: FOLFOX 7/LV5FU2 compared to FOLFOX 4 in patients with advanced colorectal cancer », *ASCO Meet. Abstr.*, vol. 22, n° 14_suppl, p. 3525, juill. 2004.

[69] F. Maindrault-Goebel *et al.*, « Evaluation of oxaliplatin dose intensity in bimonthly leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil continuous infusion regimens (FOLFOX) in pretreated metastatic colorectal cancer. Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR) », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 11, n° 11, p. 1477-1483, nov. 2000.

[70] S. Besora, C. Santos, C. Izquierdo, M. M. Martinez-Villacampa, J. Bruna, et R. Velasco, « Rechallenge with oxaliplatin and peripheral neuropathy in colorectal cancer patients », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, juin 2018.

[71] F. Lin, F. Conti, et O. Moran, « Competitive blockage of the sodium channel by intracellular magnesium ions in central mammalian neurones », *Eur. Biophys. J.*, vol. 19, n° 3, p. 109-118.

[72] C. M. Armstrong et G. Cota, « Calcium Ion as a Cofactor in Na Channel Gating », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n° 15, p. 6528-6531, 1991.

[73] L. Stansfield, « Calcium and magnesium for oxaliplatin-induced neuropathy », *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, vol. 71, n° 12, p. 987-988, juin 2014.

[74] A. Avan, A. Avan, E. Giovannetti, et G. J. Peters, « Calcium/Magnesium Infusion for Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Protective or Not? », *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 29, p. 3341-3341, oct. 2014.

[75] B. Jordan, F. Jahn, J. Beckmann, S. Unverzagt, C. Müller-Tidow, et K. Jordan, « Calcium and Magnesium Infusions for the Prevention of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Systematic Review », *Oncology*, vol. 90, n° 6, p. 299-306, 2016.

[76] Y.-H. Yang *et al.*, « Duloxetine improves oxaliplatin-induced neuropathy in patients with colorectal cancer: an open-label pilot study », *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer*, vol. 20, n° 7, p. 1491-1497, juill. 2012.

[77] Y. Hirayama *et al.*, « Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial », *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 5, p. 866-871, oct. 2015.

[78] E. M. L. Smith *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*, vol. 309, n° 13, p. 1359-1367, avr. 2013.

[79] E. M. L. Smith *et al.*, « Predictors of duloxetine response in patients with oxaliplatin-induced painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a secondary analysis of randomised controlled trial - CALGB/alliance 170601 », *Eur. J. Cancer Care (Engl.)*, vol. 26, n° 2, mars 2017.

[80] W. Kim, Y. Chung, S. Choi, B.-I. Min, et S. K. Kim, « Duloxetine Protects against Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain and Spinal Neuron Hyperexcitability in Rodents », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, n° 12, déc. 2017.

[81] J.-P. a Durand, C. a b Brezault, et F. a Goldwasser, « Protection against oxaliplatin acute neurosensory toxicity by venlafaxine », *Anticancer. Drugs*, vol. 14, n° 6, p. 423-425, juill. 2003.

[82] J. P. Durand *et al.*, « Efficacy of venlafaxine for the prevention and relief of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: results of EFFOX, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial », *Ann. Oncol.*, vol. 23, n° 1, p. 200-205, janv. 2012.

[83] T. Kus *et al.*, « Efficacy of venlafaxine for the relief of taxane and oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: a single-center retrospective case-control study », *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer*, vol. 24, n° 5, p. 2085-2091, mai 2016.

[84] C. D. Runowicz *et al.*, « American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline: ACS/ASCO Breast Cancer Survivorship Guideline », *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, n° 1, p. 43-73, janv. 2016.

[85] « Résumé des Caractéristiques du Produit - Duloxetine ». [En ligne]. Disponible sur: http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0269029.htm. [Consulté le: 07-févr-2018].

[86] « Résumé des Caractéristiques du Produit - Effexor ». [En ligne]. Disponible sur: http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0232099.htm. [Consulté le: 07-févr-2018].

[87] H. Adelsberger, S. Quasthoff, J. Grosskreutz, A. Lepier, F. Eckel, et C. Lersch, « The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 406, n° 1, p. 25-32, oct. 2000.

[88] G. Y. Wong *et al.*, « A phase III double blinded, placebo controlled, randomized trial of gabapentin in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A North Central Cancer Treatment Group study », *ASCO Meet. Abstr.*, vol. 23, n° 16_suppl, p. 8001, juin 2005.

[89] M. W. Saif, K. Syrigos, K. Kaley, et I. Isufi, « Role of Pregabalin in Treatment of Oxaliplatin-induced Sensory Neuropathy », *Anticancer Res.*, vol. 30, n° 7, p. 2927-2933, janv. 2010.

[90] S. Yamamoto *et al.*, « Excessive spinal glutamate transmission is involved in oxaliplatin-induced mechanical allodynia: a possibility for riluzole as a prophylactic drug », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 9661, août 2017.

[91] M. Waseem, H. Tabassum, et S. Parvez, « Neuroprotective effects of melatonin as evidenced by abrogation of oxaliplatin induced behavioral alterations, mitochondrial dysfunction and neurotoxicity in rat brain », *Mitochondrion*, vol. 30, p. 168-176, sept. 2016.

[92] Y. Du *et al.*, « Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 25, p. 14669-14674, déc. 2001.

[93] J.-H. Yeo *et al.*, « Clonidine, an alpha-2 adrenoceptor agonist relieves mechanical allodynia in oxaliplatin-induced neuropathic mice; potentiation by spinal p38 MAPK inhibition without motor dysfunction and hypotension », *Int. J. Cancer*, vol. 138, n° 10, p. 2466-2476, mai 2016.

[94] S. Fujita *et al.*, « Exenatide Facilitates Recovery from Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Rats », *PloS One*, vol. 10, n° 11, p. e0141921, 2015.

[95] S. Cascinu *et al.*, « Neuroprotective Effect of Reduced Glutathione on Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial », *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 16, p. 3478-3483, août 2002.

[96] F. Arena *et al.*, « Amifostine pretreatment for patients with advanced colorectal cancer receiving folfox chemotherapy », *ASCO Meet. Abstr.*, vol. 25, n° 18_suppl, p. 19663, juin 2007.

[97] C. Gedlicka, W. Scheithauer, B. Schüll, et G. V. Kornek, « Effective Treatment of Oxaliplatin-Induced Cumulative Polyneuropathy With Alpha-Lipoic Acid », *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 15, p. 3359-3361, janv. 2002.

[98] M. Azevedo *et al.*, « The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy », *Mol. Pain*, vol. 9, n° 1, p. 53, 2013.
[99] Z. Salehi et M. Roayaei, « Effect of Vitamin E on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy prevention: A randomized controlled trial », *Int. J. Prev. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 104, 2015.
[100] F. Maffei *et al.*, « Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk », *Mutat. Res.*, vol. 714, n° 1-2, p. 88-92, sept. 2011.
[101] L. Hagfors, P. Leanderson, L. Sköldstam, J. Andersson, et G. Johansson, « Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis », *Nutr. J.*, vol. 2, p. 5, 2003.
[102] J. Marshall, A. Zakari, J. J. Hwang, V. Papadopoulos, A. Rosenberg, et C. Silver, « Ginkgo Biloba (GB) extract as a neuroprotective agent in oxaliplatin (Ox)-induced neuropathy », *ASCO Meet. Abstr.*, vol. 22, n° 14_suppl, p. 3670, juill. 2004.
[103] A. Esfahani *et al.*, « The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on incidence and severity of oxaliplatin induced peripheral neuropathy: a randomized controlled trial », *Biomark. Res.*, vol. 4, juin 2016.
[104] T. C. Coste, A. Gerbi, P. Vague, G. Pieroni, et D. Raccah, « Neuroprotective Effect of Docosahexaenoic Acid-Enriched Phospholipids in Experimental Diabetic Neuropathy », *Diabetes*, vol. 52, n° 10, p. 2578-2585, oct. 2003.
[105] H. Shapiro, « Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? », *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 68, n° 3, p. 219-224, mars 2003.
[106] Z. Ghoreishi *et al.*, « Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A randomized double-blind placebo controlled trial », *BMC Cancer*, vol. 12, p. 355, 2012.
[107] S. Tokuyama et K. Nakamoto, « Unsaturated Fatty Acids and Pain », *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 34, n° 8, p. 1174-1178, 2011.
[108] M. Terashvili *et al.*, « Antinociception Produced by 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Is Mediated by the Activation of β-Endorphin and Met-Enkephalin in the Rat Ventrolateral Periaqueductal Gray », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 326, n° 2, p. 614-622, janv. 2008.
[109] F. Streckmann *et al.*, « The preventive effect of sensorimotor- and vibration exercises on the onset of Oxaliplatin- or vinca-alkaloid induced peripheral neuropathies - STOP », *BMC Cancer*, vol. 18, n° 1, p. 62, 10 2018.
[110] F. Streckmann *et al.*, « Exercise intervention studies in patients with peripheral neuropathy: a systematic review », *Sports Med. Auckl. NZ*, vol. 44, n° 9, p. 1289-1304, sept. 2014.
[111] S. S. Schönsteiner *et al.*, « A randomized exploratory phase 2 study in patients with chemotherapy-related peripheral neuropathy evaluating whole-body vibration training as adjunct to an integrated program including massage, passive mobilization and physical exercises », *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 6, p. 5, 2017.
[112] U. Granacher, A. Gollhofer, et D. Strass, « Training induced adaptations in characteristics of postural reflexes in elderly men », *Gait Posture*, vol. 24, n° 4, p. 459-466, déc. 2006.
[113] M. A. Freeman, M. R. Dean, et I. W. Hanham, « The etiology and prevention of functional instability of the foot », *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 47, n° 4, p. 678-685, nov. 1965.
[114] W. Taube, M. Gruber, S. Beck, M. Faist, A. Gollhofer, et M. Schubert, « Cortical and spinal adaptations induced by balance training: correlation between stance stability and corticospinal activation », *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, vol. 189, n° 4, p. 347-358, avr. 2007.
[115] A. L. Kierszenbaum, *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur, 2006.
[116] W. Kim, M. J. Kim, D. Go, B.-I. Min, H. S. Na, et S. K. Kim, « Combined Effects of Bee Venom Acupuncture and Morphine on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice », *Toxins*, vol. 8, n° 2, p. 33, févr. 2016.

[117] Y.-L. Hsieh *et al.*, « Laser acupuncture attenuates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in patients with gastrointestinal cancer: a pilot prospective cohort study », *Acupunct. Med. J. Br. Med. Acupunct. Soc.*, sept. 2016.

[118] B. Valentine-Davis et L. H. Altshuler, « Acupuncture for Oxaliplatin Chemotherapy–Induced Peripheral Neuropathy in Colon Cancer: A Retrospective Case Series », *Med. Acupunct.*, vol. 27, n° 3, p. 216-223, juin 2015.

[119] M. Théaudin *et al.*, « Familial amyloid polyneuropathy: elaboration of a therapeutic patient education programme, "EdAmyl" », *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis*, vol. 21, n° 4, p. 225-230, déc. 2014.

[120] E. Hoitsma, J. P. H. Reulen, M. de Baets, M. Drent, F. Spaans, et C. G. Faber, « Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder », *J. Neurol. Sci.*, vol. 227, n° 1, p. 119-130, déc. 2004.

[121] T. Krøigård, P. Karlsson, N. B. Finnerup, S. H. Sindrup, et T. S. Jensen, « [Skin biopsy and quantitative sensory testing can contribute to small fibre neuropathy diagnostics] », *Ugeskr. Laeger*, vol. 178, n° 25, juin 2016.

[122] T. Krøigård *et al.*, « Characterization and diagnostic evaluation of chronic polyneuropathies induced by oxaliplatin and docetaxel comparing skin biopsy to quantitative sensory testing and nerve conduction studies », *Eur. J. Neurol.*, vol. 21, n° 4, p. 623-629, avr. 2014.

[123] J. Kaiser, C. Bledowski, et J. Dietrich, « Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment », *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.*, vol. 54, p. 33-50, mai 2014.

[124] H. Mayaudon, P.-O. Miloche, et B. Bauduceau, « A new simple method for assessing sudomotor function: Relevance in type 2 diabetes », *Diabetes Metab.*, vol. 36, n° 6, Part 1, p. 450-454, déc. 2010.

[125] C. S. Yajnik, V. V. Kantikar, A. J. Pande, et J. P. Deslypere, « Quick and Simple Evaluation of Sudomotor Function for Screening of Diabetic Neuropathy », *Int. Sch. Res. Not.*, vol. 2012, p. e103714, juill. 2012.

[126] M. J. Hilz, B. Stemper, F. B. Axelrod, E. H. Kolodny, et B. Neundörfer, « Quantitative thermal perception testing in adults », *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.*, vol. 16, n° 5, p. 462-471, sept. 1999.

[127] M. E. Shy *et al.*, « Quantitative sensory testing Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology », *Neurology*, vol. 60, n° 6, p. 898-904, mars 2003.

[128] P. Kokotis, M. Schmelz, E. Kostouros, N. Karandreas, et M.-A. Dimopoulos, « Oxaliplatin-Induced Neuropathy: A Long-Term Clinical and Neurophysiologic Follow-Up Study », *Clin. Colorectal Cancer*, févr. 2016.

[129] D. R. Cornblath *et al.*, « Total neuropathy score: validation and reliability study », *Neurology*, vol. 53, n° 8, p. 1660-1664, nov. 1999.

[130] D. Bouhassira *et al.*, « Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory », *Pain*, vol. 108, n° 3, p. 248-257, avr. 2004.

[131] E. M. Lavoie Smith, D. L. Barton, R. Qin, P. D. Steen, N. K. Aaronson, et C. L. Loprinzi, « Assessing patient-reported peripheral neuropathy: the reliability and validity of the European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-CIPN20 Questionnaire », *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.*, vol. 22, n° 10, p. 2787-2799, déc. 2013.

[132] T. J. Postma *et al.*, « The development of an EORTC quality of life questionnaire to assess chemotherapy-induced peripheral neuropathy: the QLQ-CIPN20 », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 41, n° 8, p. 1135-1139, mai 2005.

[133] M. Stefansson et P. Nygren, « Oxaliplatin added to fluoropyrimidine for adjuvant treatment of colorectal cancer is associated with long-term impairment of peripheral nerve sensory function and quality of life », *Acta Oncol.*, vol. 0, n° 0, p. 1-9, août 2016.

[134] C. Zimmerman *et al.*, « MC11C4: a pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study of venlafaxine to prevent oxaliplatin-induced neuropathy », *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer*, vol. 24, n° 3, p. 1071-1078, mars 2016.

[135] Biomarkers Definitions Working Group., « Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 69, n° 3, p. 89-95, mars 2001.
[136] J. Polivka, J. Polivka, K. Krakorova, M. Peterka, et O. Topolcan, « Current status of biomarker research in neurology », *EPMA J.*, vol. 7, n° 1, juill. 2016.
[137] G. C. Jickling et F. R. Sharp, « Biomarker panels in ischemic stroke », *Stroke J. Cereb. Circ.*, vol. 46, n° 3, p. 915-920, mars 2015.
[138] R. Senn, M. S. V. Elkind, J. Montaner, M. Christ-Crain, et M. Katan, « Potential role of blood biomarkers in the management of nontraumatic intracerebral hemorrhage », *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.*, vol. 38, n° 6, p. 395-409, 2014.
[139] D. N. Kernagis et D. T. Laskowitz, « Evolving role of biomarkers in acute cerebrovascular disease », *Ann. Neurol.*, vol. 71, n° 3, p. 289-303, mars 2012.
[140] C. Ren *et al.*, « Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in Acute Stroke Patients », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 24588, avr. 2016.
[141] A. H. V. Schapira, « Recent developments in biomarkers in Parkinson disease », *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 26, n° 4, p. 395-400, août 2013.
[142] O. M. A. El-Agnaf *et al.*, « Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 20, n° 3, p. 419-425, mars 2006.
[143] F. Neff, X. Wei, C. Nölker, M. Bacher, Y. Du, et R. Dodel, « Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders », *Autoimmun. Rev.*, vol. 7, n° 6, p. 501-507, juin 2008.
[144] K. Blennow, H. Zetterberg, et A. M. Fagan, « Fluid biomarkers in Alzheimer disease », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, n° 9, p. a006221, sept. 2012.
[145] B. Borroni *et al.*, « Early stages of probable Alzheimer disease are associated with changes in platelet amyloid precursor protein forms », *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*, vol. 23, n° 5, p. 207-210, déc. 2002.
[146] M.-A. Burlot *et al.*, « Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 24, n° 21, p. 5965-5976, nov. 2015.
[147] Y. Sato, I. Suzuki, T. Nakamura, F. Bernier, K. Aoshima, et Y. Oda, « Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology », *J. Lipid Res.*, vol. 53, n° 3, p. 567-576, mars 2012.
[148] M. R. Wenk, « The emerging field of lipidomics », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, n° 7, p. 594-610, juill. 2005.
[149] P. Del Boccio *et al.*, « Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis », *J. Proteomics*, vol. 74, n° 12, p. 2826-2836, nov. 2011.
[150] P. L. Wood, « Lipidomics of Alzheimer's disease: current status », *Alzheimers Res. Ther.*, vol. 4, n° 1, p. 5, févr. 2012.
[151] R. B. Chan *et al.*, « Elevated GM3 plasma concentration in idiopathic Parkinson's disease: A lipidomic analysis. », *PloS One*, vol. 12, n° 2, p. e0172348-e0172348, 2017.
[152] L. Abdullah *et al.*, « Lipidomic analyses identify injury-specific phospholipid changes 3 mo after traumatic brain injury », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 28, n° 12, p. 5311-5321, déc. 2014.
[153] *Loi n° 88-1138 du 20 décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales*. .
[154] *LOI n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine*. 2012.
[155] D. Deplanque, S. Sénéchal-Cohen, et F. Lemaire, « Loi Jardé et règlement européen sur les essais de médicaments : harmonisation et mise en œuvre des nouvelles réglementations », *Thérapie*, vol. 72, n° 1, p. 63-71, févr. 2017.
[156] « Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 relatif aux recherches impliquant la personne humaine | Legifrance ». [En ligne]. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/11/16/AFSP1621392D/jo/texte. [Consulté le: 01-févr-2018].

[157] « Arrêté du 3 mai 2017 fixant la liste des recherches mentionnées au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique | Legifrance ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2017/5/3/AFSP1713689A/jo/texte/fr. [Consulté le: 01-févr-2018].

[158] R. Rolke *et al.*, « Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values », *Pain*, vol. 123, n° 3, p. 231-243, août 2006.

[159] H. Fruhstorfer, U. Lindblom, et W. C. Schmidt, « Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients », *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 39, n° 11, p. 1071-1075, nov. 1976.

[160] D. Yarnitsky, E. Sprecher, R. Zaslansky, et J. A. Hemli, « Heat pain thresholds: normative data and repeatability », *Pain*, vol. 60, n° 3, p. 329-332, mars 1995.

[161] E. Søfteland *et al.*, « Association between visceral, cardiac and sensorimotor polyneuropathies in diabetes mellitus », *J. Diabetes Complications*, vol. 28, n° 3, p. 370-377, juin 2014.

[162] Y. Feng, F. J. Schlösser, et B. E. Sumpio, « The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy », *J. Vasc. Surg.*, vol. 50, n° 3, p. 675-682.e1, sept. 2009.

[163] B. M. W. Illigens et C. H. Gibbons, « Sweat testing to evaluate autonomic function », *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.*, vol. 19, n° 2, p. 79-87, avr. 2009.

[164] P. A. Low, P. E. Caskey, R. R. Tuck, R. D. Fealey, et P. J. Dyck, « Quantitative sudomotor axon reflex test in normal and neuropathic subjects », *Ann. Neurol.*, vol. 14, n° 5, p. 573-580, nov. 1983.

[165] R. D. Fealey, P. A. Low, et J. E. Thomas, « Thermoregulatory sweating abnormalities in diabetes mellitus », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 64, n° 6, p. 617-628, juin 1989.

[166] S. C. Adams, R. Schondorf, J. Benoit, et R. D. Kilgour, « Impact of cancer and chemotherapy on autonomic nervous system function and cardiovascular reactivity in young adults with cancer: a case-controlled feasibility study », *BMC Cancer*, vol. 15, mai 2015.

[167] C. H. Gibbons, B. M. W. Illigens, J. Centi, et R. Freeman, « QDIRT: quantitative direct and indirect test of sudomotor function », *Neurology*, vol. 70, n° 24, p. 2299-2304, juin 2008.

[168] C. Aubert, J. L. Doeuff, J. Lajou, O. Barthélémy, A. Hartemann, et O. Bourron, « P2137 Le test Neuropad est-il utilisable chez les patients diabétiques avec une artériopathie oblitérante des membres inférieurs ? », */data/revues/12623636/v39sS1/S1262363613720470/*, avr. 2013.

[169] B. Bauduceau et L. Bordier, « SUDOSCAN et EZSCAN : deux applications pour les diabétiques d'une même technique innovante », */data/revues/19572557/v7i6/S1957255713707077/*, mars 2014.

[170] D. Hubert, P. Brunswick, J.-H. Calvet, D. Dusser, et I. Fajac, « Abnormal electrochemical skin conductance in cystic fibrosis », *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*, vol. 10, n° 1, p. 15-20, janv. 2011.

[171] A. G. Smith, M. Lessard, S. Reyna, M. Doudova, et J. R. Singleton, « The Diagnostic Utility of Sudoscan for Distal Symmetric Peripheral Neuropathy », *J. Diabetes Complications*, vol. 28, n° 4, p. 511-516, 2014.

[172] B. I. Freedman, S. C. Smith, B. M. Bagwell, J. Xu, D. W. Bowden, et J. Divers, « Electrochemical Skin Conductance in Diabetic Kidney Disease », *Am. J. Nephrol.*, vol. 41, n° 6, p. 438-447, 2015.

[173] C. H. Gibbons, N. Wang, et R. Freeman, « Capsaicin induces degeneration of cutaneous autonomic nerve fibers », *Ann. Neurol.*, vol. 68, n° 6, p. 888-898, déc. 2010.

[174] P. A. Low, « Evaluation of sudomotor function », *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.*, vol. 115, n° 7, p. 1506-1513, juill. 2004.

[175] C. M. Casellini, H. K. Parson, M. S. Richardson, M. L. Nevoret, et A. I. Vinik, « Sudoscan, a noninvasive tool for detecting diabetic small fiber neuropathy and autonomic dysfunction », *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 15, n° 11, p. 948-953, nov. 2013.
[176] C. Moussard, *Biochimie structurale et métabolique: cours*. Bruxelles, Belgique: De Boeck supérieur, 2006.
[177] M. Kosicek et S. Hecimovic, « Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, n° 1, p. 1310-1322, janv. 2013.
[178] M. Belle, « Rôle des voies Wnt dans la régulation des gènes de la myéline et le cytosquelette des cellules de Schwann », phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2011.
[179] S. Schmitt, L. C. Castelvetri, et M. Simons, « Metabolism and functions of lipids in myelin », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1851, n° 8, p. 999-1005, août 2015.
[180] P. Morell et R. H. Quarles, « Characteristic Composition of Myelin », *Basic Neurochem. Mol. Cell. Med. Asp. 6th Ed.*, 1999.
[181] W. T. Norton et W. Cammer, « Chemical Pathology of Diseases Involving Myelin », in *Myelin*, P. Morell, Éd. Boston, MA: Springer US, 1984, p. 369-403.
[182] J. M. Bourre, O. Daudu, et N. Baumann, « Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and poly-unsaturated) », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 424, n° 1, p. 1-7, janv. 1976.
[183] J. M. Bourre, « Biochimie des lipides cérébraux (plus particulièrement des acides gras). Synthèse in situ et origine exogène au cours du développement. Quelques aspects de l'influence de la nutrition », *Reprod. Nutr. Dév.*, vol. 22, n° 1B, p. 179-191, 1982.
[184] J. M. Bourre, N. Gozlan-Devillierre, O. Morand, et N. Baumann, « Importance of exogenous saturated fatty acids during brain development and myelination in mice », *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, vol. 19, n° 1B, p. 173-180, 1979.
[185] O. Morand, N. Baumann, et J. M. Bourre, « In vivo incorporation of exogenous [1-14C]stearic acid into neurons and astrocytes », *Neurosci. Lett.*, vol. 13, n° 2, p. 177-181, juill. 1979.
[186] M. A. Crawford et A. J. Sinclair, « Nutritional influences in the evolution of mammalian brain. In: lipids, malnutrition & the developing brain », *Ciba Found. Symp.*, p. 267-292, 1971.
[187] R. Paoletti et C. Galli, « Effects of essential fatty acid deficiency on the central nervous system in the growing rat. In: lipids, malnutrition & the developing brain », *Ciba Found. Symp.*, p. 121-140, 1971.
[188] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, et E. Holmes, « "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data », *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, vol. 29, n° 11, p. 1181-1189, nov. 1999.
[189] T. Cajka et O. Fiehn, « Increasing lipidomic coverage by selecting optimal mobile-phase modifiers in LC–MS of blood plasma », *Metabolomics*, vol. 12, n° 2, p. 34, févr. 2016.
[190] L. Yang, M. Li, Y. Shan, S. Shen, Y. Bai, et H. Liu, « Recent advances in lipidomics for disease research », *J. Sep. Sci.*, vol. 39, n° 1, p. 38-50, janv. 2016.
[191] E. Abe, S. G. Delyle, et J. C. Alvarez, « Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 22, n° 2, p. 51-59, 2010.
[192] T. Cajka et O. Fiehn, « Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 61, p. 192-206, oct. 2014.
[193] J. Folch, M. Lees, et G. H. Sloane Stanley, « A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues », *J. Biol. Chem.*, vol. 226, n° 1, p. 497-509, mai 1957.
[194] E. G. Bligh et W. J. Dyer, « A rapid method of total lipid extraction and purification », *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, n° 8, p. 911-917, août 1959.

[195] E. Cequier-Sánchez, C. Rodríguez, A. G. Ravelo, et R. Zárate, « Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, n° 12, p. 4297-4303, juin 2008.
[196] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, et D. Schwudke, « Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics », *J. Lipid Res.*, vol. 49, n° 5, p. 1137-1146, mai 2008.
[197] L. Humbert, « Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 22, n° 2, p. 61-68, 2010.
[198] P. Juaneda et G. Rocquelin, « Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges », *Lipids*, vol. 20, n° 1, p. 40-41, janv. 1985.
[199] Y.-Y. Zhao, S.-P. Wu, S. Liu, Y. Zhang, et R.-C. Lin, « Ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 220, p. 181-192, sept. 2014.
[200] L. S. Ettre et K. I. Sakodynskii, « M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903) », *Chromatographia*, vol. 35, n° 3-4, p. 223-231, févr. 1993.
[201] M. E. Swartz, « UPLC™: An Introduction and Review », *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 28, n° 7-8, p. 1253-1263, avr. 2005.
[202] R. Plumb, J. Castro-Perez, J. Granger, I. Beattie, K. Joncour, et A. Wright, « Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, vol. 18, n° 19, p. 2331-2337, 2004.
[203] S. J. J. Thomson, « Rays of positive electricity », *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, avr. 2009.
[204] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, et M. B. Alice, « Molecular Beams of Macroions », *J. Chem. Phys.*, vol. 49, n° 5, p. 2240-2249, sept. 1968.
[205] G. Taylor, « Disintegration of Water Drops in an Electric Field », *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 280, n° 1382, p. 383-397, juill. 1964.
[206] J. V. Iribarne et B. A. Thomson, « On the evaporation of small ions from charged droplets », *J. Chem. Phys.*, vol. 64, n° 6, p. 2287-2294, mars 1976.
[207] F. Xian, C. L. Hendrickson, et A. G. Marshall, « High resolution mass spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 2, p. 708-719, janv. 2012.
[208] A. G. Marshall et C. L. Hendrickson, « High-resolution mass spectrometers », *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif*, vol. 1, p. 579-599, 2008.
[209] W. Paul et H. Steinwedel, « Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld », *Z. Naturforschung Teil A*, vol. 8, p. 448-450, juill. 1953.
[210] P. H. Dawson, J. B. French, J. A. Buckley, D. J. Douglas, et D. Simmons, « The use of triple quadrupoles for sequential mass spectrometry: 1—The instrument parameters », *Org. Mass Spectrom.*, vol. 17, n° 5, p. 205-211, mai 1982.
[211] W. C. Wiley et I. H. McLaren, « Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 26, n° 12, p. 1150-1157, déc. 1955.
[212] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, et V. A. Zagulin, « The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution », *Sov. J. Exp. Theor. Phys.*, vol. 37, p. 45, juill. 1973.
[213] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, et B. A. Thomson, « An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry », *J. Mass Spectrom. JMS*, vol. 36, n° 8, p. 849-865, août 2001.
[214] H. R. Morris *et al.*, « High Sensitivity Collisionally-activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal-acceleration Time-of-flight Mass Spectrometer », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 10, n° 8, p. 889-896, janv. 1996.
[215] N. R. Daly, « Scintillation Type Mass Spectrometer Ion Detector », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 31, n° 3, p. 264-267, mars 1960.
[216] W. C. Wiley et C. F. Hendee, « Electron Multipliers Utilizing Continuous Strip Surfaces », *IRE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 9, n° 3, p. 103-106, juin 1962.
[217] K. Hirano et I. Agilent Technologies, *Electron multiplier for mass spectrometer*. 2014.

[218] Zimmermann, L., « Principe d'un spectromètre de masse ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.crpg.cnrs-nancy.fr/Science/Genesis/PDF/SpectroSchema.pdf. [Consulté le: 12-sept-2016].
[219] M. Li, Z. Zhou, H. Nie, Y. Bai, et H. Liu, « Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, n° 1, p. 243-249, janv. 2011.
[220] N. Navas-Iglesias, A. Carrasco-Pancorbo, et L. Cuadros-Rodríguez, « From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 28, n° 4, p. 393-403, avr. 2009.
[221] H. Luan *et al.*, « Non-targeted metabolomics and lipidomics LC–MS data from maternal plasma of 180 healthy pregnant women », *GigaScience*, vol. 4, avr. 2015.
[222] M. R. Wenk, « The emerging field of lipidomics », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, n° 7, p. 594-610, juill. 2005.
[223] R. Harkewicz et E. A. Dennis, « Applications of mass spectrometry to lipids and membranes », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 80, p. 301-325, 2011.
[224] C. Hu, R. van der Heijden, M. Wang, J. van der Greef, T. Hankemeier, et G. Xu, « Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery », *J. Chromatogr. B*, vol. 877, n° 26, p. 2836-2846, sept. 2009.
[225] V. Croixmarie *et al.*, « Integrated Comparison of Drug-Related and Drug-Induced Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Metabonomic Profiles Using Human Hepatocyte Cultures », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 15, p. 6061-6069, août 2009.
[226] F. M. van der Kloet, I. Bobeldijk, E. R. Verheij, et R. H. Jellema, « Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping », *J. Proteome Res.*, vol. 8, n° 11, p. 5132-5141, nov. 2009.
[227] E. Zelena *et al.*, « Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 4, p. 1357-1364, févr. 2009.
[228] M. Eliasson *et al.*, « Strategy for Optimizing LC-MS Data Processing in Metabolomics: A Design of Experiments Approach », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 15, p. 6869-6876, août 2012.
[229] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, et G. Siuzdak, « XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 3, p. 779-787, févr. 2006.
[230] R. Tautenhahn, C. Böttcher, et S. Neumann, « Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS », *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 504, 2008.
[231] R. Tautenhahn, G. J. Patti, D. Rinehart, et G. Siuzdak, « XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 11, p. 5035-5039, juin 2012.
[232] N. G. Mahieu, J. L. Genenbacher, et G. J. Patti, « A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 30, p. 87-93, févr. 2016.
[233] E. Lange, R. Tautenhahn, S. Neumann, et C. Gröpl, « Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements », *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 375, 2008.
[234] W. B. Dunn *et al.*, « Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry », *Nat. Protoc.*, vol. 6, n° 7, p. 1060-1083, juill. 2011.
[235] X. Shen *et al.*, « Normalization and integration of large-scale metabolomics data using support vector regression », *Metabolomics*, vol. 12, n° 5, p. 89, mars 2016.
[236] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, et M. J. van der Werf, « Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data », *BMC Genomics*, vol. 7, p. 142, 2006.
[237] L. Eriksson, E. Johansson, S. Kettapeh-Wold, et S. Wold, *Introduction to multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS).* Umeå: Umetrics, 1999.
[238] « FDA guidance for industry : bioanalytical method validation ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107. [Consulté le: 29-août-2016].

[239] E. J. Want *et al.*, « Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS », *Nat. Protoc.*, vol. 8, n° 1, p. 17-32, janv. 2013.
[240] M. P. Fay et M. A. Proschan, « Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules », *Stat. Surv.*, vol. 4, p. 1-39, 2010.
[241] Y. Hochberg et Y. Benjamini, « More powerful procedures for multiple significance testing », *Stat. Med.*, vol. 9, n° 7, p. 811-818, juill. 1990.
[242] Å. M. Wheelock et C. E. Wheelock, « Trials and tribulations of 'omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine », *Mol. Biosyst.*, vol. 9, n° 11, p. 2589-2596, oct. 2013.
[243] S. Wold, « Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models », *Technometrics*, vol. 20, n° 4, p. 397–405, 1978.
[244] B. Worley et R. Powers, « Multivariate Analysis in Metabolomics », *Curr. Metabolomics*, vol. 1, n° 1, p. 92-107, 2013.
[245] L. Ståhle et S. Wold, « Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: A Monte Carlo study », *J. Chemom.*, vol. 1, n° 3, p. 185-196, juill. 1987.
[246] M. Barker et W. Rayens, « Partial least squares for discrimination », *J. Chemom.*, vol. 17, n° 3, p. 166-173, mars 2003.
[247] L. Eriksson, J. Trygg, et S. Wold, « CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models », *J. Chemom.*, vol. 22, n° 11-12, p. 594-600, nov. 2008.
[248] S. Mahadevan, S. L. Shah, T. J. Marrie, et C. M. Slupsky, « Analysis of Metabolomic Data Using Support Vector Machines », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 19, p. 7562-7570, oct. 2008.
[249] S. Wiklund *et al.*, « Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 1, p. 115-122, janv. 2008.
[250] D. S. Wishart, « Advances in metabolite identification », *Bioanalysis*, vol. 3, n° 15, p. 1769-1782, août 2011.
[251] C. A. Smith *et al.*, « METLIN: a metabolite mass spectral database », *Ther. Drug Monit.*, vol. 27, n° 6, p. 747-751, déc. 2005.
[252] E. Fahy, M. Sud, D. Cotter, et S. Subramaniam, « LIPID MAPS online tools for lipid research », *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, n° Web Server issue, p. W606-612, juill. 2007.
[253] R. Jensen, T. Hystad, A. Kvale, et A. Baerheim, « Quantitative sensory testing of patients with long lasting Patellofemoral pain syndrome », *Eur. J. Pain Lond. Engl.*, vol. 11, n° 6, p. 665-676, août 2007.
[254] X. Mo, J. Zhang, Y. Fan, P. Svensson, et K. Wang, « Thermal and mechanical quantitative sensory testing in Chinese patients with burning mouth syndrome--a probable neuropathic pain condition? », *J. Headache Pain*, vol. 16, p. 84, 2015.
[255] I. J. Fuss, M. E. Kanof, P. D. Smith, et H. Zola, « Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood », *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Chapter 7, p. Unit7.1, avr. 2009.
[256] T. Idziorek, J. Estaquier, F. De Bels, et J.-C. Ameisen, « YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability », *J. Immunol. Methods*, vol. 185, n° 2, p. 249-258, janv. 1995.
[257] M. Dutot, J.-M. Warnet, C. Baudouin, et P. Rat, « Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: Role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 33, n° 2, p. 138-145, févr. 2008.
[258] A. J. M. Beijers, F. Mols, et G. Vreugdenhil, « A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration », *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer*, vol. 22, n° 7, p. 1999-2007, juill. 2014.
[259] S. Ng Wing Tin, D. Ciampi de Andrade, C. Goujon, V. Planté-Bordeneuve, A. Créange, et J.-P. Lefaucheur, « Sensory correlates of pain in peripheral neuropathies », *Clin. Neurophysiol.*, vol. 125, n° 5, p. 1048-1058, mai 2014.

[260] T. Ide *et al.*, « Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, n° 3, p. 438-442, mars 2002.
[261] E. E. M. Brouwers, A. D. R. Huitema, W. Boogerd, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, « Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin », *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, vol. 48, n° 6, p. 832-841, 2009.
[262] S. B. Park, C. S. Y. Lin, A. V. Krishnan, D. Goldstein, M. L. Friedlander, et M. C. Kiernan, « Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility », *The Oncologist*, vol. 16, n° 5, p. 708-716, 2011.
[263] A. Abad *et al.*, « Genotype-based selection of treatment for patients with advanced colorectal cancer (SETICC): a pharmacogenetic-based randomized phase II trial », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, nov. 2017.
[264] J. A. Boyette-Davis *et al.*, « Subclinical peripheral neuropathy is a common finding in colorectal cancer patients prior to chemotherapy », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, n° 11, p. 3180-3187, juin 2012.
[265] M. Sereno *et al.*, « Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy », *BMC Cancer*, vol. 17, n° 1, p. 63, janv. 2017.
[266] L. Di Cesare Mannelli, M. Zanardelli, P. Failli, et C. Ghelardini, « Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: could it correlate with in vivo neuropathy? », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 61, p. 143-150, août 2013.
[267] L. Di Cesare Mannelli, M. Zanardelli, P. Failli, et C. Ghelardini, « Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin », *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.*, vol. 13, n° 3, p. 276-284, mars 2012.
[268] R. Coriat *et al.*, « Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir », *J. Clin. Invest.*, vol. 124, n° 1, p. 262-272, janv. 2014.
[269] S. Afzal, S. A. Jensen, J. B. Sørensen, T. Henriksen, A. Weimann, et H. E. Poulsen, « Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 69, n° 2, p. 301-307, févr. 2012.
[270] S. M. de F. Ribeiro *et al.*, « Effect of Zinc Supplementation on Antioxidant Defenses and Oxidative Stress Markers in Patients Undergoing Chemotherapy for Colorectal Cancer: a Placebo-Controlled, Prospective Randomized Trial », *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 169, n° 1, p. 8-16, janv. 2016.
[271] B. Glimelius *et al.*, « Persistent prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using calmangafodipir (PledOx®): a placebo-controlled randomised phase II study (PLIANT) », *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, vol. 57, n° 3, p. 393-402, mars 2018.
[272] R. Geng *et al.*, « Oxidative Stress-Related Genetic Polymorphisms Are Associated with the Prognosis of Metastatic Gastric Cancer Patients Treated with Epirubicin, Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 12, déc. 2014.
[273] S. Kiokias, C. Proestos, et V. Oreopoulou, « Effect of Natural Food Antioxidants against LDL and DNA Oxidative Changes », *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 7, n° 10, oct. 2018.
[274] N. S. Dhalla, R. M. Temsah, et T. Netticadan, « Role of oxidative stress in cardiovascular diseases », *J. Hypertens.*, vol. 18, n° 6, p. 655-673, juin 2000.
[275] S. Mena, A. Ortega, et J. M. Estrela, « Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis », *Mutat. Res.*, vol. 674, n° 1-2, p. 36-44, mars 2009.
[276] C. Gorrini, I. S. Harris, et T. W. Mak, « Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, n° 12, p. 931-947, déc. 2013.
[277] A. Kawabata, « Prostaglandin E2 and pain--an update », *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 34, n° 8, p. 1170-1173, 2011.
[278] H. Ulrich-Pur *et al.*, « Oxaliplatin-induced fever and release of IL-6 », *Oncology*, vol. 59, n° 3, p. 187-189, sept. 2000.
[279] G. Tonini *et al.*, « Oxaliplatin may induce cytokine-release syndrome in colorectal cancer patients », *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 16, n° 2, p. 105-109, juin 2002.
[280] A. Marino et N. Giotta, « Cinacalcet, fetuin-A and interleukin-6 », *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 23, n° 4, p. 1460-1461, avr. 2008.

[281] S. Roger, B. Jelassi, I. Couillin, P. Pelegrin, P. Besson, et L.-H. Jiang, « Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1848, n° 10, Part B, p. 2584-2602, oct. 2015.
[282] G. L. Pittenger, M. Ray, N. I. Burcus, P. McNulty, B. Basta, et A. I. Vinik, « Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients », *Diabetes Care*, vol. 27, n° 8, p. 1974-1979, août 2004.
[283] J. N. Mandrekar, « Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 5, n° 9, p. 1315-1316, sept. 2010.
[284] A. I. Vinik *et al.*, « Normative Values for Electrochemical Skin Conductances and Impact of Ethnicity on Quantitative Assessment of Sudomotor Function », *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 18, n° 6, p. 391-398, 2016.
[285] P. Novak, « Electrochemical Skin Conductance Correlates with Skin Nerve Fiber Density », *Front. Aging Neurosci.*, vol. 8, août 2016.
[286] S. Rajan, M. Campagnolo, B. Callaghan, et C. H. Gibbons, « Sudomotor function testing by electrochemical skin conductance: does it really measure sudomotor function? », *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.*, juin 2018.
[287] D. Selvarajah *et al.*, « SUDOSCAN: A Simple, Rapid, and Objective Method with Potential for Screening for Diabetic Peripheral Neuropathy », *PloS One*, vol. 10, n° 10, p. e0138224, 2015.
[288] J. C. S. K. K. CHOO, « Temperature sensitivity of the body surface over the life span », *Somatosens. Mot. Res.*, vol. 15, n° 1, p. 13-28, janv. 1998.
[289] I. Darian-Smith, K. O. Johnson, C. LaMotte, Y. Shigenaga, P. Kenins, et P. Champness, « Warm fibers innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to thermal stimuli », *J. Neurophysiol.*, vol. 42, n° 5, p. 1297-1315, sept. 1979.
[290] J.-P. Lefaucheur *et al.*, « Diagnosis of small fiber neuropathy: A comparative study of five neurophysiological tests », *Neurophysiol. Clin. Clin. Neurophysiol.*, vol. 45, n° 6, p. 445-455, déc. 2015.
[291] K. Tobin, M. J. Giuliani, et D. Lacomis, « Comparison of different modalities for detection of small fiber neuropathy », *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.*, vol. 110, n° 11, p. 1909-1912, nov. 1999.
[292] J. Lanzini, D. Dargère, A. Regazzetti, A. Tebani, O. Laprévote, et N. Auzeil, « Changing in lipid profile induced by the mutation of Foxn1 gene: A lipidomic analysis of Nude mice skin », *Biochimie*, vol. 118, p. 234-243, nov. 2015.
[293] R. K. Yu, Y.-T. Tsai, T. Ariga, et M. Yanagisawa, « Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview », *J. Oleo Sci.*, vol. 60, n° 10, p. 537-544, 2011.
[294] P. O. Behan et B. A. Haniffah, « Gangliosides and neurological diseases. », *BMJ*, vol. 305, n° 6865, p. 1309-1310, nov. 1992.
[295] R. B. Chan *et al.*, « Elevated GM3 plasma concentration in idiopathic Parkinson's disease: A lipidomic analysis », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 2, p. e0172348, févr. 2017.
[296] A. S. Woods *et al.*, « Gangliosides and Ceramides Change in a Mouse Model of Blast Induced Traumatic Brain Injury », *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, n° 4, p. 594-600, janv. 2013.
[297] V. Rubovitch, Y. Zilberstein, J. Chapman, S. Schreiber, et C. G. Pick, « Restoring GM1 ganglioside expression ameliorates axonal outgrowth inhibition and cognitive impairments induced by blast traumatic brain injury », *Sci. Rep.*, vol. 7, janv. 2017.
[298] E. Zaprianova *et al.*, « Serum ganglioside patterns in multiple sclerosis », *Neurochem. Res.*, vol. 26, n° 2, p. 95-100, févr. 2001.
[299] I. I. Doronin *et al.*, « Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells », *BMC Cancer*, vol. 14, p. 295, avr. 2014.
[300] J. Zhang, Y. Ren, B. Huang, B. Tao, M. Ransborg Pedersen, et D. Li, « Determination of disialoganglioside GD3 and monosialoganglioside GM3 in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry », *J. Sep. Sci.*, vol. 35, n° 8, p. 937-946, avr. 2012.

[301] Q. Huang *et al.*, « A new liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantification of gangliosides in human plasma », *Anal. Biochem.*, vol. 455, p. 26-34, juin 2014.
[302] S. W. Choi, C. Lee, J.-M. Lee, J. H. Park, et I.-B. Lee, « Fault detection and identification of nonlinear processes based on kernel PCA », *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 75, n° 1, p. 55-67, janv. 2005.
[303] F. E. Grubbs, « Sample Criteria for Testing Outlying Observations », *Ann. Math. Stat.*, vol. 21, n° 1, p. 27-58, mars 1950.
[304] L. D. M. C.-B. Ferreira, P. U. Huey, B. E. Pulford, D. N. Ishii, et R. H. Eckel, « Sciatic nerve lipoprotein lipase is reduced in streptozotocin-induced diabetes and corrected by insulin », *Endocrinology*, vol. 143, n° 4, p. 1213-1217, avr. 2002.
[305] P. Saravanan, N. C. Davidson, E. B. Schmidt, et P. C. Calder, « Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 376, n° 9740, p. 540-550, août 2010.
[306] A. A. Berbert, C. R. M. Kondo, C. L. Almendra, T. Matsuo, et I. Dichi, « Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis », *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif*, vol. 21, n° 2, p. 131-136, févr. 2005.
[307] Z. Harel, F. M. Biro, R. K. Kottenhahn, et S. L. Rosenthal, « Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of dysmenorrhea in adolescents », *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 174, n° 4, p. 1335-1338, avr. 1996.
[308] A. Belluzzi, S. Boschi, C. Brignola, A. Munarini, G. Cariani, et F. Miglio, « Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 71, n° 1 Suppl, p. 339S-42S, 2000.
[309] D. Bagga, L. Wang, R. Farias-Eisner, J. A. Glaspy, et S. T. Reddy, « Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 4, p. 1751-1756, févr. 2003.
[310] L. G. Cleland, M. J. James, et S. M. Proudman, « The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis », *Drugs*, vol. 63, n° 9, p. 845-853, 2003.
[311] D. Miyazawa, A. Ikemoto, Y. Fujii, et H. Okuyama, « Dietary alpha-linolenic acid suppresses the formation of lysophosphatidic acid, a lipid mediator, in rat platelets compared with linoleic acid », *Life Sci.*, vol. 73, n° 16, p. 2083-2090, sept. 2003.
[312] K. Nakamoto, T. Nishinaka, M. Mankura, W. Fujita-Hamabe, et S. Tokuyama, « Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice », *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 33, n° 6, p. 1070-1072, 2010.
[313] G. P. Zaloga et P. Marik, « Lipid modulation and systemic inflammation », *Crit. Care Clin.*, vol. 17, n° 1, p. 201-217, janv. 2001.
[314] P. C. Calder, « omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity », *World Rev. Nutr. Diet.*, vol. 88, p. 109-116, 2001.
[315] C. N. Serhan, « Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins », *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 8, n° 2, p. 115-121, mars 2005.
[316] C. Morisseau *et al.*, « Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 12, p. 3481-3490, déc. 2010.
[317] J. M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, et C. N. Serhan, « Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes », *Nature*, vol. 447, n° 7146, p. 869-874, juin 2007.
[318] G. A. Jicha et W. R. Markesbery, « Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease », *Clin. Interv. Aging*, vol. 5, p. 45-61, avr. 2010.
[319] A. L. Stoll, C. A. Locke, L. B. Marangell, et W. E. Severus, « Omega-3 fatty acids and bipolar disorder: a review », *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 60, n° 5-6, p. 329-337, juin 1999.
[320] A. C. Logan, « Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression », *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.*, vol. 8, n° 4, p. 410-425, nov. 2003.

[321] A. J. Richardson et B. K. Puri, « A randomized double-blind, placebo-controlled study of the effects of supplementation with highly unsaturated fatty acids on ADHD-related symptoms in children with specific learning difficulties », *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 26, n° 2, p. 233-239, févr. 2002.
[322] A. M. Patwardhan *et al.*, « Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents », *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n° 5, p. 1617-1626, mai 2010.
[323] M. Terashvili *et al.*, « Antinociception Produced by 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Is Mediated by the Activation of β-Endorphin and Met-Enkephalin in the Rat Ventrolateral Periaqueductal Gray », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 326, n° 2, p. 614-622, janv. 2008.
[324] M. Igarashi, L. Chang, K. Ma, et S. I. Rapoport, « Kinetics of eicosapentaenoic acid in brain, heart and liver of conscious rats fed a high n-3 PUFA containing diet », *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 89, n° 6, p. 403-412, déc. 2013.
[325] A. M. Tonin *et al.*, « Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain », *Neurochem. Int.*, vol. 56, n° 8, p. 930-936, juill. 2010.
[326] S. A. Sheth, A. T. Iavarone, D. S. Liebeskind, S. J. Won, et R. A. Swanson, « Targeted Lipid Profiling Discovers Plasma Biomarkers of Acute Brain Injury », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 6, p. e0129735, juin 2015.
[327] F. Klein et P. Mandel, « Distribution des acides gras des lipides du nerf sciatique normal du rat », *Biochimie*, vol. 60, n° 1, p. 81-84, mars 1978.
[328] M. J. Weiser, C. M. Butt, et M. H. Mohajeri, « Docosahexaenoic Acid and Cognition throughout the Lifespan », *Nutrients*, vol. 8, n° 2, p. 99, févr. 2016.
[329] T. Coste *et al.*, « Beneficial effects of gamma linolenic acid supplementation on nerve conduction velocity, Na+, K+ ATPase activity, and membrane fatty acid composition in sciatic nerve of diabetic rats », *J. Nutr. Biochem.*, vol. 10, n° 7, p. 411-420, juill. 1999.
[330] P. O. O. Julu, « Essential fatty acids prevent slowed nerve conduction in streptozotocin diabetic rats », *J. Diabet. Complications*, vol. 2, n° 4, p. 185-188, oct. 1988.
[331] H. Y. Kim, L. Edsall, et Y. C. Ma, « Specificity of polyunsaturated fatty acid release from rat brain synaptosomes », *Lipids*, vol. 31 Suppl, p. S229-233, mars 1996.
[332] L. Baró, J. C. Hermoso, M. C. Núñez, J. A. Jiménez-Rios, et A. Gil, « Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 77, n° 11, p. 1978-1983, juin 1998.
[333] I. I. Doronin *et al.*, « Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells », *BMC Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 295, avr. 2014.
[334] R. G. G. Leenders, J. G. N. de Jong, et R. A. Wevers, « Extraction and Purification of Gangliosides from Plasma and Fibroblasts before Analysis by Thin Layer Chromatography », *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Biochem. Lab. Med.*, vol. 32, n° 1, p. 68-73, janv. 1995.
[335] K. Ghauharali-van der Vlugt *et al.*, « Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease », *Clin. Chim. Acta*, vol. 389, n° 1–2, p. 109-113, mars 2008.
[336] S. Formisano, M. L. Johnson, G. Lee, S. M. Aloj, et H. Edelhoch, « Critical micelle concentrations of gangliosides », *Biochemistry*, vol. 18, n° 6, p. 1119-1124, mars 1979.
[337] L. Cantù, M. Corti, D. Acquotti, et S. Sonnino, « Aggregation properties of gangliosides : influence of the primary and secondary structure of the headgroup », *J. Phys. IV*, vol. 03, n° C1, p. C1-57-C1-64, mai 1993.
[338] M. Schley *et al.*, « Skin innervation at different depths correlates with small fibre function but not with pain in neuropathic pain patients », *Eur. J. Pain Lond. Engl.*, vol. 16, n° 10, p. 1414-1425, nov. 2012.

# ANNEXES

# Annexe 1 : Classification des lipides selon LIPID MAPS®

| **Fatty Acyls [FA] - *Acides gras*** |
|---|
| Fatty Acids and Conjugates [FA01] |
| Octadecanoids [FA02] |
| Eicosanoids [FA03] |
| Docosanoids [FA04] |
| Fatty alcohols [FA05] |
| Fatty aldehydes [FA06] |
| Fatty esters [FA07] |
| Fatty amides [FA08] |
| Fatty nitriles [FA09] |
| Fatty ethers [FA10] |
| Hydrocarbons [FA11] |
| Oxygenated hydrocarbons [FA12] |
| Fatty acyl glycosides [FA13] |
| Other Fatty Acyls [FA00] |
| **Glycerolipids [GL] - *Glycérides*** |
| Monoradylglycerols [GL01] |
| Diradylglycerols [GL02] |
| Triradylglycerols [GL03] |
| Glycosylmonoradylglycerols [GL04] |
| Glycosyldiradylglycerols [GL05] |
| Other Glycerolipids [GL00] |
| **Glycerophospholipids [GP] – *Phosphoacylglycérols ou phosphoglycérides*** |
| Glycerophosphocholines [GP01] |
| Glycerophosphoethanolamines [GP02] |
| Glycerophosphoserines [GP03] |
| Glycerophosphoglycerols [GP04] |
| Glycerophosphoglycerophosphates [GP05] |
| Glycerophosphoinositols [GP06] |
| Glycerophosphoinositol monophosphates [GP07] |
| Glycerophosphoinositol bisphosphates [GP08] |
| Glycerophosphoinositol trisphosphates [GP09] |
| Glycerophosphates [GP10] |
| Glyceropyrophosphates [GP11] |
| Glycerophosphoglycerophosphoglycerols [GP12] |
| CDP-Glycerols [GP13] |
| Glycosylglycerophospholipids [GP14] |
| Glycerophosphoinositolglycans [GP15] |
| Glycerophosphonocholines [GP16] |
| Glycerophosphonoethanolamines [GP17] |

| |
|---|
| Di-glycerol tetraether phospholipids (caldarchaeols) [GP18] |
| Glycerol-nonitol tetraether phospholipids [GP19] |
| Oxidized glycerophospholipids [GP20] |
| Other Glycerophospholipids [GP00] |
| **Sphingolipids [SP] - *Sphingolipides*** |
| Sphingoid bases [SP01] |
| Ceramides [SP02] |
| Phosphosphingolipids [SP03] |
| Phosphonosphingolipids [SP04] |
| Neutral glycosphingolipids [SP05] |
| Acidic glycosphingolipids [SP06] |
| Basic glycosphingolipids [SP07] |
| Amphoteric glycosphingolipids [SP08] |
| Arsenosphingolipids [SP09] |
| Other Sphingolipids [SP00] |
| **Sterol Lipids [ST] - *Stérols*** |
| Sterols [ST01] |
| Steroids [ST02] |
| Secosteroids [ST03] |
| Bile acids and derivatives [ST04] |
| Steroid conjugates [ST05] |
| Other Sterol lipids [ST00] |
| **Prenol Lipids [PR] - *Prénols*** |
| Isoprenoids [PR01] |
| Quinones and hydroquinones [PR02] |
| Polyprenols [PR03] |
| Hopanoids [PR04] |
| Other Prenol lipids [PR00] |
| **Saccharolipids [SL] – *Saccharolipides ou glycolipides*** |
| Acylaminosugars [SL01] |
| Acylaminosugar glycans [SL02] |
| Acyltrehaloses [SL03] |
| Acyltrehalose glycans [SL04] |
| Other acyl sugars [SL05] |
| Other Saccharolipids [SL00] |
| **Polyketides [PK] - *Polycétides*** |
| Linear polyketides [PK01] |
| Halogenated acetogenins [PK02] |
| Annonaceae acetogenins [PK03] |
| Macrolides and lactone polyketides [PK04] |
| Ansamycins and related polyketides [PK05] |
| Polyenes [PK06] |

| |
|---|
| Linear tetracyclines [PK07] |
| Angucyclines [PK08] |
| Polyether antibiotics [PK09] |
| Aflatoxins and related substances [PK10] |
| Cytochalasins [PK11] |
| Flavonoids [PK12] |
| Aromatic polyketides [PK13] |
| Non-ribosomal peptide/polyketide hybrids [PK14] |
| Phenolic lipids [PK15] |
| Other Polyketides [PK00] |

# Annexe 2 : Lettre d'information au patient – Etude LIPIDOXA

ETUDE PILOTE D'ANALYSE DES MARQUEURS DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE CHRONIQUE DES PATIENTS TRAITES PAR CHIMIOTHERAPIE A BASE D'OXALIPLATINE.

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

Le Docteur…… (nom, prénom, téléphone), exerçant dans le service d'oncologie du groupe hospitalier Paris Saint-Joseph vous propose de participer à une recherche concernant votre maladie. Il est important de lire attentivement cette note avant de prendre votre décision ; n'hésitez pas à lui demander des explications.

Vous êtes actuellement hospitalisé(e) dans le service d'oncologie pour la prise en charge d'un cancer de la sphère digestive. Le traitement chimiothérapique que vous recevez est à base d'oxaliplatine, un agent cytotoxique induisant des neuropathies.

**1) En quoi consiste la recherche ?**

Cette recherche porte sur l'exploration des mécanismes (physiopathologiques) responsables de l'apparition et du développement de la douleur neuropathique induite par l'oxaliplatine.

**2) Quel est le but de cette recherche?**

Le but de cette étude est de comprendre les mécanismes (physiopathologiques) des neuropathies induites par l'oxaliplatine pour mieux prendre en charge cet effet indésirable et le prévenir. Celle-ci s'inscrit dans une démarche d'optimisation de la qualité et de la sécurité des soins anticancéreux.

**3) Quel est le calendrier de la recherche ?**

Votre participation durera le temps de votre séjour en oncologie. Des données cliniques vous concernant seront recueillies le jour de votre inclusion dans l'étude. Afin de mieux comprendre les mécanismes de cet effet indésirable, nous complèterons vos analyses de sang habituelles par d'autres tests biologiques sans que ceux-ci n'entraînent de prélèvements supplémentaires. Les tubes seront anonymisés et seront traités dans une unité de recherche de l'université Paris Descartes.

**4) Quels sont les bénéfices et les contraintes liés à votre participation ?**

Cette étude repose sur l'évaluation des seuils de douleur par des examens pouvant se révéler douloureux. Il s'agit de provoquer des impressions de froid, de chaud ou encore de piqûres. Ces stimuli sont certes désagréables mais l'opérateur de l'examen entend réduire cette pénibilité en arrêtant le stimulus dès qu'il fait mal. Ces évaluations seront réalisées à chaque cycle et dureront une vingtaine de minutes. Ces appareils de mesures sont utilisés par de nombreuses équipes médicales. Le recul désormais suffisant en assure une bonne maîtrise.

En revanche, cette étude ne modifie pas les modalités de la prise en charge thérapeutique et n'apporte pas en soi de bénéfice individuel pour les personnes qui y participent.

**5) Que vont devenir les prélèvements effectués pour la recherche ?**

Les prélèvements seront traités dans une unité de recherche de l'université Paris Descartes. Aucun échantillon sanguin ne sera conservé après leur analyse, ceux-ci seront détruits en accord avec les pratiques usuelles dans ce type de recherche.

**6) Si vous participez, que vont devenir les données recueillies pour la recherche ?**

Dans le cadre de la recherche clinique à laquelle le groupe hospitalier Saint Joseph vous propose de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche.

A cette fin, les données médicales vous concernant seront conservées par le groupe hospitalier Paris Saint-Joseph, gestionnaire de cette recherche en France. Les données nécessaires à la recherche seront anonymes et identifiées par un numéro de code. Le lien avec vos données nominatives sera établi dans un fichier conservé par le centre de recherche clinique du groupe hospitalier Paris Saint-Joseph. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises. Pour tout arrêt de votre participation, les données recueillies précédemment à cet arrêt seront utilisées sauf si vous ne le souhaitez pas.

**7) Comment cette recherche est-elle encadrée ?**

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile de France, en date du 20/05/2014.

**8) Quels sont vos droits ?**

Votre participation à cette recherche est entièrement libre et volontaire. Votre décision n'entraînera aucun préjudice sur la qualité des soins et des traitements que vous êtes en droit d'attendre.

Vous pourrez tout au long de la recherche demander des explications sur le déroulement de la recherche au médecin qui vous suit.

Vous pouvez vous retirer à tout moment de la recherche sans justification, sans conséquence sur la suite de votre traitement ni la qualité des soins qui vous seront fournis et sans conséquence sur la relation avec votre médecin. A l'issue de ce retrait, vous pourrez être suivi par la même équipe médicale.

Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement ainsi que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par le groupe hospitalier Saint Joseph pour la recherche et soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux par l'intermédiaire du médecin qui vous suit dans le cadre de cette recherche.

**9) Formulaire de consentement :**

Je soussigné(e)Mme, Melle, M. (rayer les mentions inutiles) (nom, prénom)
…….. ……demeurant
…… accepte librement et volontairement de participer à la recherche médicale intitulée

ETUDE PILOTE D'ANALYSE DES MARQUEURS DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE CHRONIQUE DES PATIENTS TRAITES PAR CHIMIOTHERAPIE A BASE D'OXALIPLATINE.

dont le groupe hospitalier Paris Saint-Joseph est le gestionnaire, et qui m'a été proposée par le Docteur (nom, prénom, téléphone)……, médecin investigateur dans cette recherche.

**Etant entendu que :**

- le médecin investigateur, qui m'a informé et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que j'étais libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche,
- avant de participer à cette recherche, j'ai bénéficié d'un examen médical dont les résultats m'ont été communiqués,
- je pourrais avoir communication par le médecin investigateur au cours ou à l'issue de la recherche des informations concernant ma santé, qu'il détient,
- j'ai bien compris dans le formulaire d'information qui m'a été remis que pour pouvoir participer à cette recherche,
- je suis parfaitement conscient(e) que je peux retirer à tout moment mon consentement à ma participation à cette recherche et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité mais je m'engage dans ce cas à en informer le médecin investigateur. Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à mes relations avec ce médecin, qui me proposera, si je le souhaite, et, si besoin, une autre prise en charge.
- si je le souhaite, à son terme, je serai informé(e) par le médecin investigateur des résultats globaux de cette recherche,
- mon consentement ne décharge en rien le médecin investigateur et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités, tous mes droits étant garantis par la loi.

Fait à : ……., le ……

➔ Signature du patient

➔ Signature du médecin investigateur qui atteste avoir pleinement expliqué à la personne signataire le but, les modalités ainsi que les risques potentiels de la recherche :

Fait à : ……., le ……

**Ce document est à réaliser en 2 exemplaires originaux, dont le premier doit être gardé 10 ans par le GHPSJ, l'autre remis à la personne donnant son consentement.**

# Annexe 3 : Discours au patient pour réaliser le Thermotest

| | |
|---|---|
| Présentation du test | - L'oxaliplatine peut modifier votre sensibilité au chaud et au froid<br>- Il s'agit d'évaluer votre sensibilité au chaud et au froid grâce à cette machine<br>- Le dispositif en métal est capable de se réchauffer et de se refroidir<br>- Installez-vous confortablement dans votre fauteuil, soyez détendu(e)<br>*On place la thermode sur une table à hauteur du patient et on l'invite à poser sa main sur la thermode (T=32 °C), puis on lui demande ce qu'il ressent.*<br>- Ce test a pour objectif de déterminer votre seuil de sensibilité et de douleur au froid et au chaud. Nous allons appliquer cette thermode au niveau de votre main et vous nous indiquerez vos différents seuils en appuyant sur ce bouton. Dès que vous aurez appuyé sur ce bouton la température reviendra à sa valeur normale.<br>- Cette machine n'est pas dangereuse, elle a été conçue pour garantir votre sécurité. La modification de la température est toujours progressive. Celle-ci ne dépassera jamais 50 °C (température d'une boisson chaude) et ne descendra jamais en dessous de 5 °C (température d'un réfrigérateur).<br>- Le test ne durera pas plus d'une demi-heure en tout. |
| Seuil de sensibilité au froid | - Dans un premier temps, on va évaluer la sensibilité au froid<br>- La température va baisser progressivement<br>- Dès que vous commencez à ressentir une sensation de froid, vous pressez le bouton et la température reviendra à sa valeur normale que vous ressentez actuellement<br>- Ceci sera répété 5 fois de suite |
| Seuil de sensibilité à la chaleur | - On va réaliser le contraire désormais, il s'agit d'évaluer la sensibilité au chaud<br>- La température va augmenter progressivement<br>- Dès que vous commencez à ressentir une sensation de chaleur, vous pressez le bouton et la température reviendra à sa valeur de base que vous ressentez actuellement<br>- Ceci sera répété 5 fois de suite également |
| Seuil de douleur au froid | - A présent, on va passer à quelque chose d'un peu plus désagréable mais qui ne doit pas vous faire mal, il s'agit d'évaluer votre seuil de douleur au froid.<br>- Le principe est de laisser la température descendre jusqu'à ce que vous commenciez à ressentir un début de douleur. A ce moment, vous pressez le bouton et la température regagne sa valeur normale.<br>- La sensation de début de douleur se caractérise par une sensation différente qui vient se surajouter à la simple sensation de froid. Il peut s'agir par exemple d'une impression de picotement ou de fourmillement désagréable.<br>- On le fera 5 fois également |
| Seuil de douleur à la chaleur | - Pour finir, on va évaluer votre seuil de douleur à la chaleur.<br>- Le principe est de laisser la température s'élever jusqu'à ce que vous commenciez à ressentir un début |

| | |
|---|---|
| | de douleur. A ce moment, vous pressez le bouton et la température regagne sa valeur normale.<br>- La sensation de début de douleur se caractérise par sensation différente qui vient se surajouter à la simple sensation de chaleur. Il peut s'agir par exemple d'une impression de picotement ou de fourmillement désagréable.<br>- On le fera également 5 fois. |

# Annexe 4 : Questionnaire NPSI

*Nous voudrions savoir si vous avez des douleurs spontanées, c'est-à-dire des douleurs en l'absence de toute stimulation. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à* ***l'intensité de vos douleurs spontanées en moyenne au cours des 24 dernières heures.*** *Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur.(Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q1/. Votre douleur est-elle comme une brulûre ?

| Aucune brulûre | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Brulûre maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q2/. Votre douleur est-elle comme un étau ?

| Aucun étau | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Etau maximal imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q3/. Votre douleur est-elle comme une compression ?

| Aucune compression | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Compression maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q4/. **Au cours des dernières 24 heures,** vos douleurs spontanées ont été présentes:

*Veuillez cocher la réponse qui correspond le mieux à votre état*

| | |
|---|---|
| En permanence | /_/ |
| Entre 8 et 12 heures | /_/ |
| Entre 4 et 7 heures | /_/ |
| Entre 1 et 3 heures | /_/ |
| Moins d' 1 heure | /_/ |

*Nous voudrions savoir si vous avez des crises douloureuses brèves. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à* ***l'intensité de vos crises douloureuses en moyenne au cours des 24 dernières heures.*** *Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur.(Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q5/. Avez-vous des crises douloureuses comme des décharges électriques ?

| Aucune décharge électrique | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Décharge électrique maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q6/. Avez-vous des crises douloureuses comme des coups de couteau ?

| Aucun coup de couteau | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Coup de couteau maximal imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q7/. **Au cours des dernières 24 heures,** combien de ces crises douloureuses avez-vous présenté ?

*Veuillez cocher la réponse qui correspond le mieux à votre état*

| | |
|---|---|
| Plus de 20 | /_/ |
| Entre 11 et 20 | /_/ |
| Entre 6 et 10 | /_/ |
| Entre 1 et 5 | /_/ |
| Pas de crise douloureuse | /_/ |

*Nous voudrions savoir si vous avez des douleurs provoquées ou augmentées par le frottement, la pression, le contact d'objets froids sur la zone douloureuse. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à* ***l'intensité de vos douleurs provoquées en moyenne au cours des 24 dernières heures.*** *Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur.(Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q8/. Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par le frottement sur la zone douloureuse ?

| Aucune douleur | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Douleur maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q9/. Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par la pression sur la zone douloureuse ?

| Aucune douleur | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Douleur maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q10/. Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par le **contact** avec un objet froid sur la zone douloureuse ?

| Aucune douleur | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Douleur maximale imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

*Nous voudrions savoir si vous avez des sensations anormales* ***dans la zone doulourouse****. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à l'intensité de* ***vos sensations anormales en moyenne au cours des 24 dernières heures.*** *Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de sensation.(Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q11/. Avez-vous des picotements ?

| Aucun picotement | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Picotement maximal imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Q12/. Avez-vous des fourmillements ?

| Aucun fourmillement | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Fourmillement maximal imaginable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

RESULTATS

| SCORE TOTAL | SOUS-SCORES |
|---|---|
| 1 – Q1 = ..... | BRULURES (Douleurs spontanées superficielles): Q1= ...../10 |
| 2 – (Q2+Q3) = ..... | CONSTRICTION (Douleurs spontanées profondes): (Q2+Q3)/ 2 = ...../10 |
| 3 – (Q5+ Q6) = ..... | DOULEURS PAROXYSTIQUES: (Q5+ Q6)/ 2 = ...../10 |
| 4 – (Q8+Q9+Q10) = ..... | DOULEURS EVOQUEES: (Q8+Q9+Q10) /3= ...../10 |
| 5 – (Q11+Q12) = ..... | PARESTHESIES/DYSESTHESIES: (Q11+Q12)/2 = ...../10 |
| (1+2+3+4+5) = ...../100 | |

# Annexe 5 : Lettre d'information au patient – Etude CANALOXA

**ETUDE CANALOXA : EXPLORATION DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE INDUITE PAR L'OXALIPLATINE PAR UNE APPROCHE ELECTROPHYSIOLOGIQUE : INTERET DE L'UTILISATION DU SUDOSCAN®**

Madame, Monsieur,

Le Docteur……, exerçant au sein du service d'oncologie du Groupe hospitalier Paris Saint-Joseph vous propose de participer à une recherche concernant votre maladie.

Vous êtes actuellement suivi(e) dans le service d'oncologie pour la prise en charge de votre maladie.

**Quel est le but de la recherche ?**

Cette étude est réalisée dans le but de comprendre les effets indésirables de votre traitement anticancéreux pour à terme mieux les contrôler.

**Nombre de patients prévus et durée de la recherche :**

Il est prévu d'inclure 36 patients. La durée totale de la recherche est de un an (Février 2016 – octobre 2016)

**Comment se déroule la recherche ?**

Au cours de votre traitement, il n'y aura pas de prélèvements sanguins autres que ceux qui sont habituellement effectués dans le cadre de la prise en charge de votre pathologie. En revanche, des données cliniques seront recueillies grâce à des examens complémentaires.

Deux examens non invasifs et non douloureux de mesure du fonctionnement des fibres nerveuses seront réalisés au niveau de la paume de la main et de la plante des pieds.

- Le premier examen (Sudoscan®) permet de mesurer en quelques minutes la quantité des ions chlore présents sur la peau. Pour cette mesure, vous posez simplement la paume de la main et la plante des pieds sur une plaque et la machine mesure en quelques minutes ce paramètre, vous ne ressentez rien de particulier.
- Le second examen (Thermotest®) permet d'estimer le seuil à partir duquel vous ressentez une sensation de chaud ou de froid. Pour ceci, une thermode est appliquée sur la peau et la température de cette thermode augmente ou diminue jusqu'à ce que vous ressentiez du chaud ou du froid.
- Toutes les données sont analysées localement, aucun échange de données avec d'autres services ou hôpitaux ne sera effectué, garantissant le caractère anonyme de la recherche.
- Ces mesures ne modifient pas les modalités de votre prise en charge thérapeutique et n'apportent pas de bénéfice individuel.

**Quels sont les conditions pour participer à cette étude** ?

Pour pouvoir participer à cette recherche vous devez être affilié(e) ou bénéficier d'un régime de sécurité sociale. Toutefois, votre participation à cette recherche n'engendrera pour vous aucun frais supplémentaire par rapport à ceux engagés dans la prise en charge habituelle.

**Quels sont les bénéfices attendus de cette recherche ?**

Cette recherche clinique n'interférera pas ni de modifiera votre traitement, aussi, elle ne vous apportera pas de bénéfice individuel ni de préjudice.

En revanche, les résultats de cette étude permettront à l'avenir la mise au point de technique permettant le diagnostic de neuropathie et la meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de neurotoxicité. A terme, l'intérêt final est d'améliorer/soulager la prise en charge des patients traités par oxaliplatine**.**

**Quels sont les risques et les contraintes prévisibles ajoutés par la recherche ?**

La participation à cette recherche pourra éventuellement allonger votre temps de présence à l'hôpital d'une durée de l'ordre de quelques dizaines de minutes au plus.

**Quelles sont les données recueillies pour la recherche ?**

Les données médicales recueillies lors de cette étude feront l'objet d'un traitement informatisé anonymisé et confidentiel. Aucune information portant votre nom ne sera fournie à quiconque, à l'exception du médecin responsable de l'étude et le personnel autorisé. Toutes les données sont analysées localement, aucun échange de données avec d'autres services ou hôpitaux ne sera effectué, garantissant le caractère anonyme de la recherche. La liste d'indentification (correspondance entre votre code pour l'étude et votre identité) sera maintenue strictement confidentielle.

**Quels sont vos droits ?**

Votre participation à cette recherche est **entièrement libre et volontaire**. Vous avez le droit de ne pas participer à cette recherche.

Vous ne pouvez pas être inclus dans un protocole de recherche visant à évaluer les soins courants/une nouvelle technique sans avoir été informé au préalable. Votre médecin doit vous fournir toutes les explications nécessaires concernant cette recherche. Conformément à l'article R. 1121-3 du Code de la santé publique, l'information à la recherche fait l'objet d'un document écrit soumis préalablement au comité de protection des personnes Ile-de-France …… qui a donné un avis favorable le ... …….

Vous pouvez à tout moment arrêter votre participation à la recherche sans justification. Ceci n'aura pas de conséquence ni sur la qualité des soins et des traitements qui vous seront fournis ni sur votre relation avec votre médecin.

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ces droits s'exercent auprès du médecin en charge de la recherche. En application des dispositions de l'article L. 1111-7 du Code de la Santé Publique, vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble des données médicales vous concernant.

Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement ainsi que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par le Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph pour la recherche et soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux de celle-ci.

Si, après avoir lu toutes ces informations et discuté tous les aspects avec le médecin, vous décidez de participer à cette recherche, l'information et l'absence d'opposition de votre part seront notifiées et datées dans votre dossier médical.

Si vous le souhaitez, vous pourrez être tenu informé des résultats globaux de cette recherche une fois celle-ci achevée. Le Docteur François COUDORE investigateur coordonnateur de cette étude, reste à votre disposition pour répondre à vos questions. Vous pourrez la contacter à l'adresse email suivante : crc@hpsj.fr/ fcoudore@hpsj.fr

# Annexe 6 : Figures supplémentaires de l'étude CANALOXA

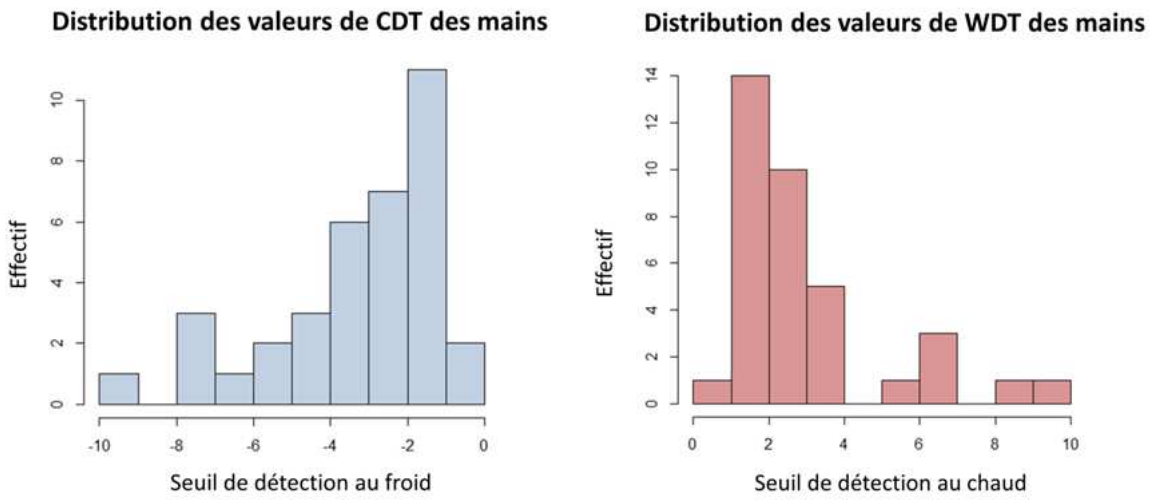



Figure 101| Distribution des seuils de détection du froid (CDT) et au chaud (WDT) des mains.

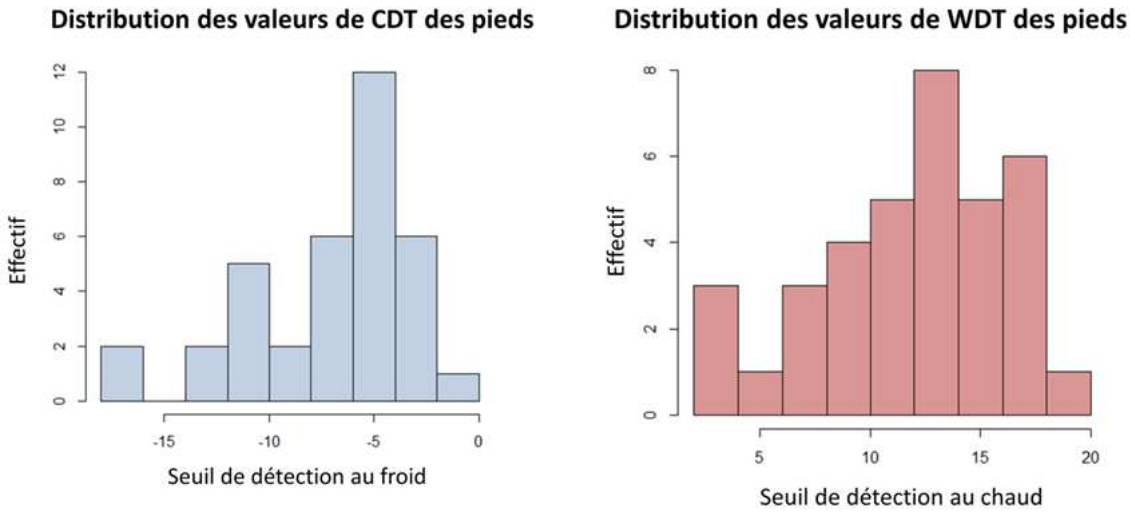



Figure 102| Distribution des seuils de détection du froid (CDT) et au chaud (WDT) des pieds.

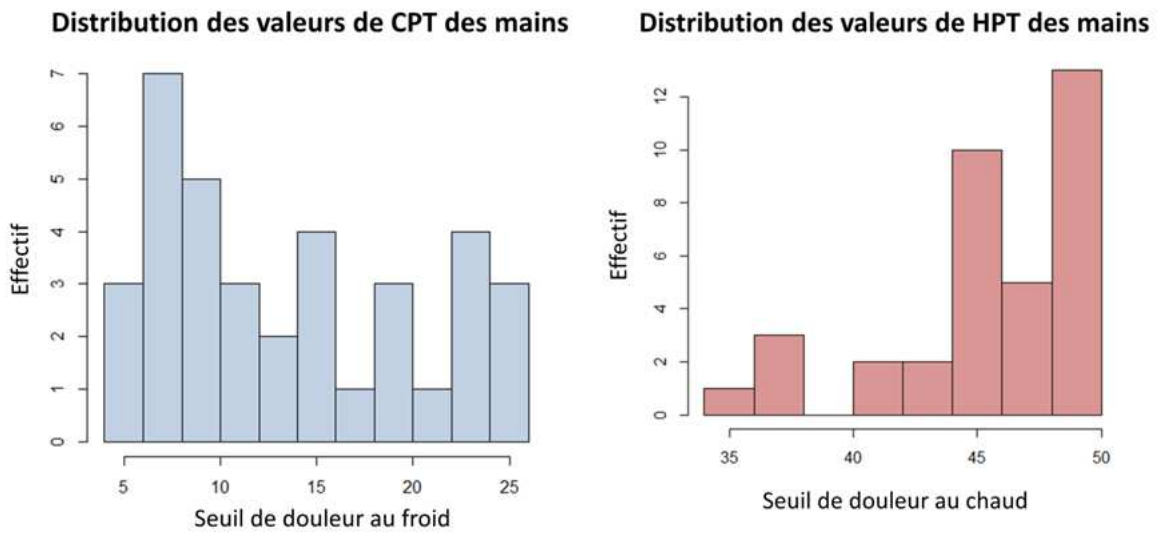



Figure 103| Distribution des seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains.

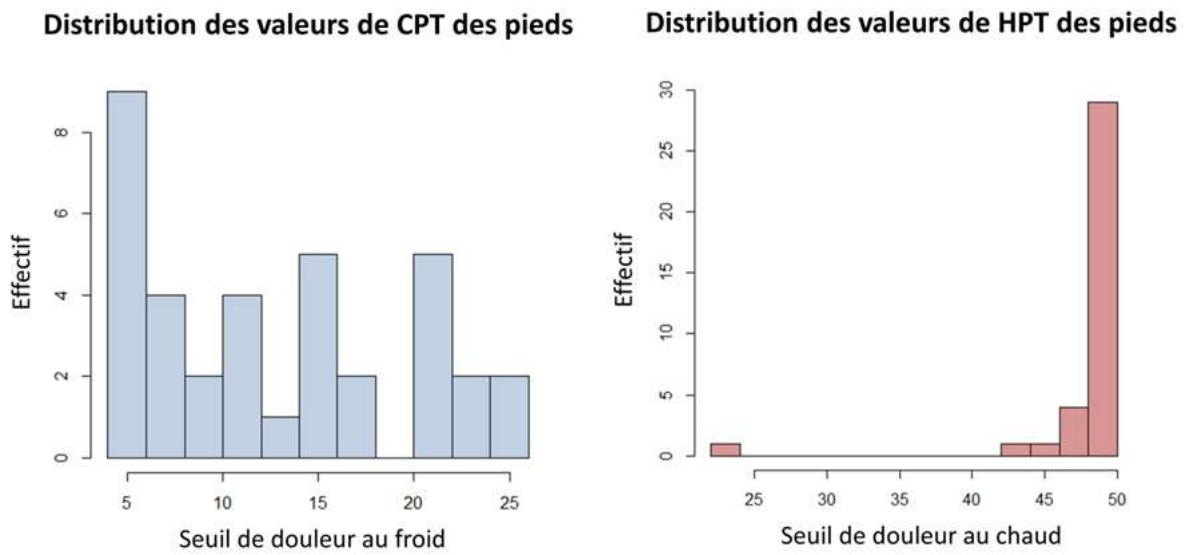



Figure 104| Distribution des seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des pieds.

**Seuils de détection du froid et du chaud selon le grade de neuropathie**

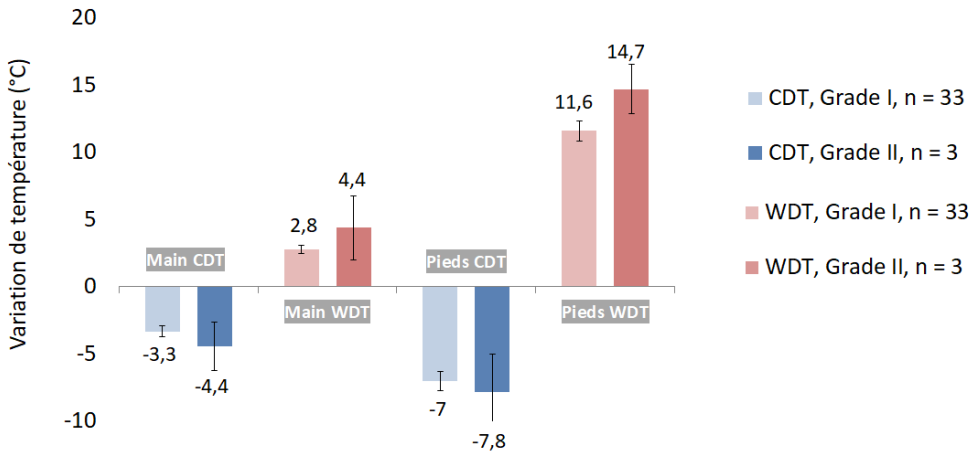



Figure 105| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le grade de neuropathie évalué le jour de la visite.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon le grade de neuropathie p = 0,65 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,63 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,87 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,29 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

**Seuils de détection du froid et du chaud selon le stade de cancer**

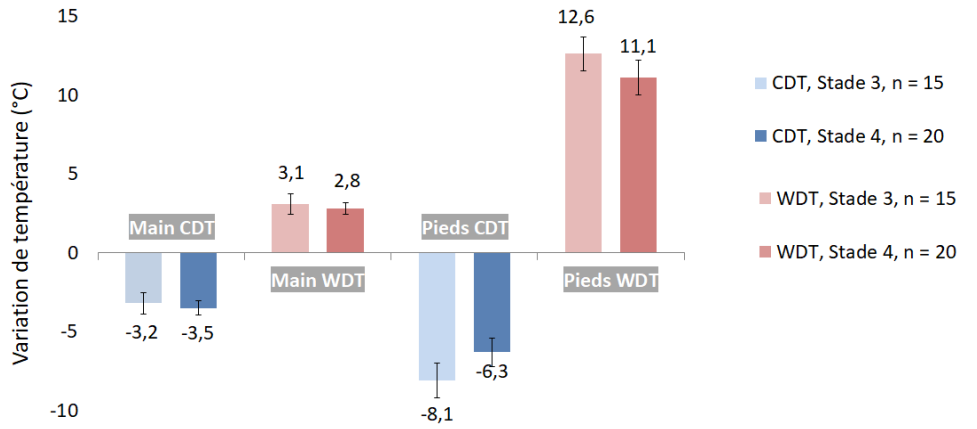



Figure 106| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le stade de cancer.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon le stade du cancer p = 0,30 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,83 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,17 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,25 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

*NB : un seul patient souffrant d'un cancer au stade 2, non pris en compte dans l'analyse.*

**Seuils de détection du froid et du chaud selon la localisation primitive de la tumeur**

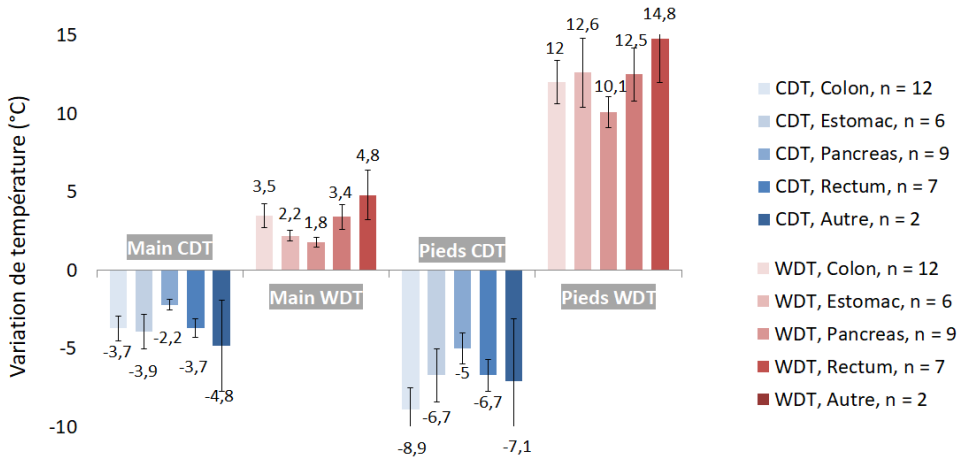



Figure 107| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon la localisation primitive de la tumeur.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon la localisation de la tumeur p = 0,45 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,13 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,31 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,50 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

*NB : les autres localisations correspondent à un cancer du péritoine et à un cancer du foie.*

**Seuils de détection du froid et du chaud selon le caractère douloureux de la neuropathie**

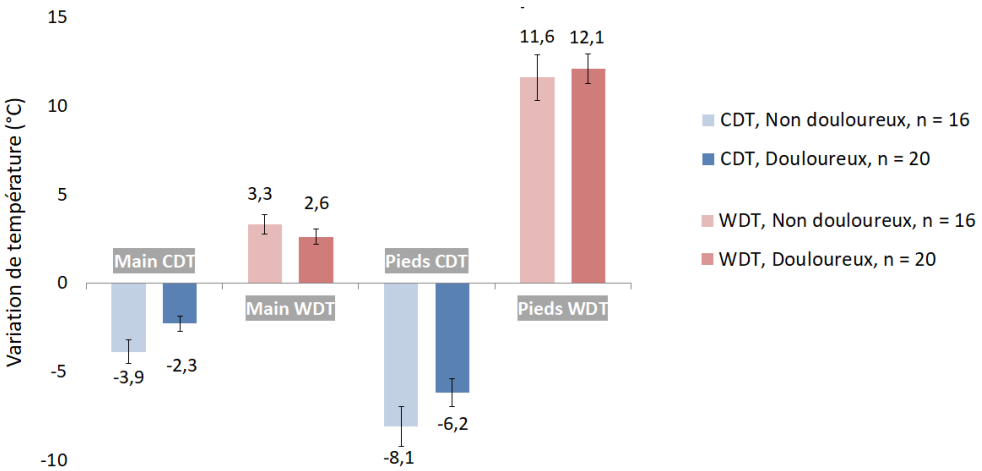



Figure 108| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le caractère douloureux de la neuropathie évalué par le questionnaire NPSI.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon le caractère douloureux de la neuropathie p = 0,45 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,28 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,13 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,99 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

*Patients avec un score nul au questionnaire NPSI : n = 16*

*Patients avec un score strictement positif au NPSI : n = 20*

**Seuils de détection du froid et du chaud selon le protocole de chimiothérapie**

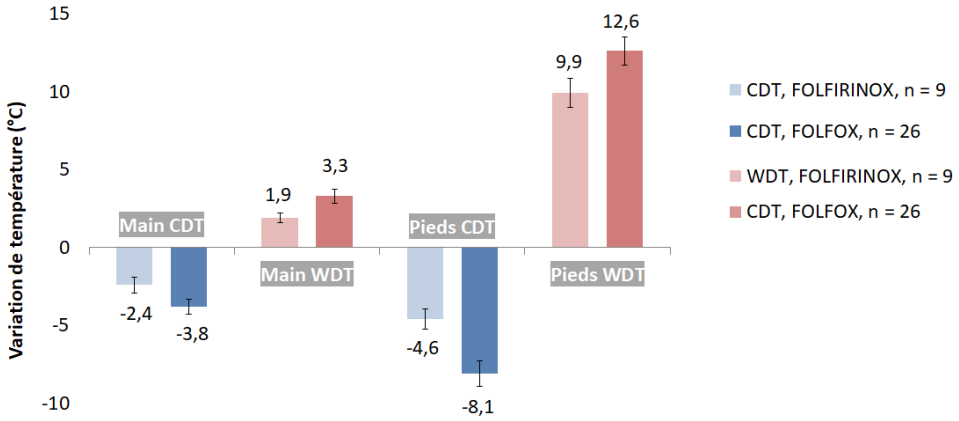



Figure 109| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le protocole de chimiothérapie.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon le protocole de chimiothérapie p = 0,13 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,09 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,03 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,06 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

*NB : un seul patient dans le protocole GEMOX, non pris en compte dans les analyses.*

**Seuils de détection du froid et du chaud selon le délai de modification de traitement**

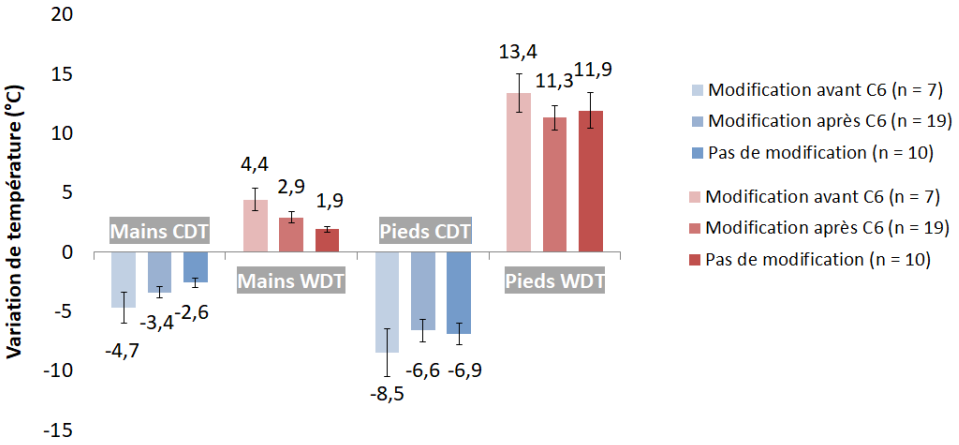



Figure 110| Seuils de détection du froid (CDT) et du chaud (WDT) des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement.

*Les seuils de détection thermique ne diffèrent pas selon le délai de modification du traitement p = 0,55 pour les seuils de détection du froid des mains ; p = 0,07 pour les seuils de détection du chaud des mains ; p = 0,60 pour les seuils de détection du froid des pieds et p = 0,64 pour les seuils de détection du chaud des pieds.*

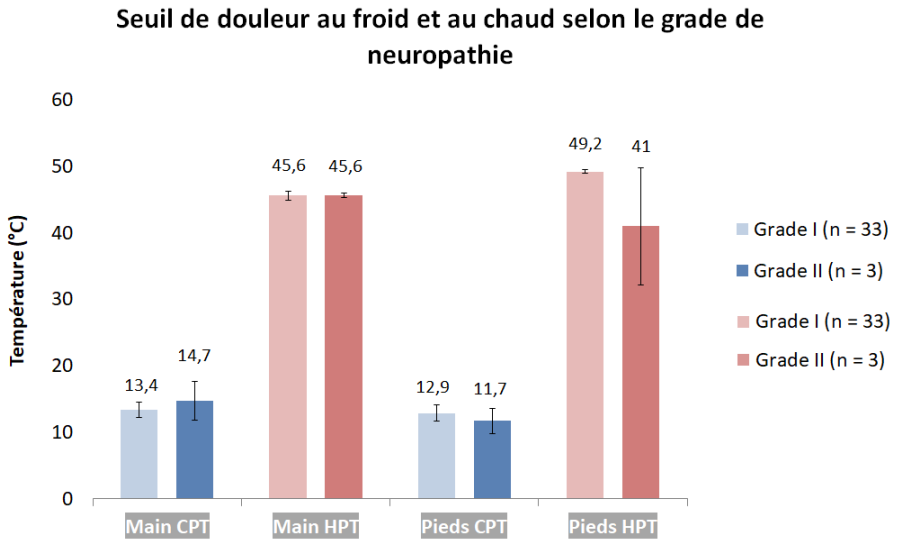



Figure 111| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le grade de la neuropathie évalué le jour de la visite.

*Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon le grade de neuropathie p = 0,60 pour les seuils de douleur au froid des mains ; p = 0,64 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; p = 0,91 pour les seuils de douleur au froid des pieds et p = 0,25 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.*

*Patients avec un score nul au questionnaire NPSI : n = 16*

*Patients avec un score strictement positif au NPSI : n = 20*

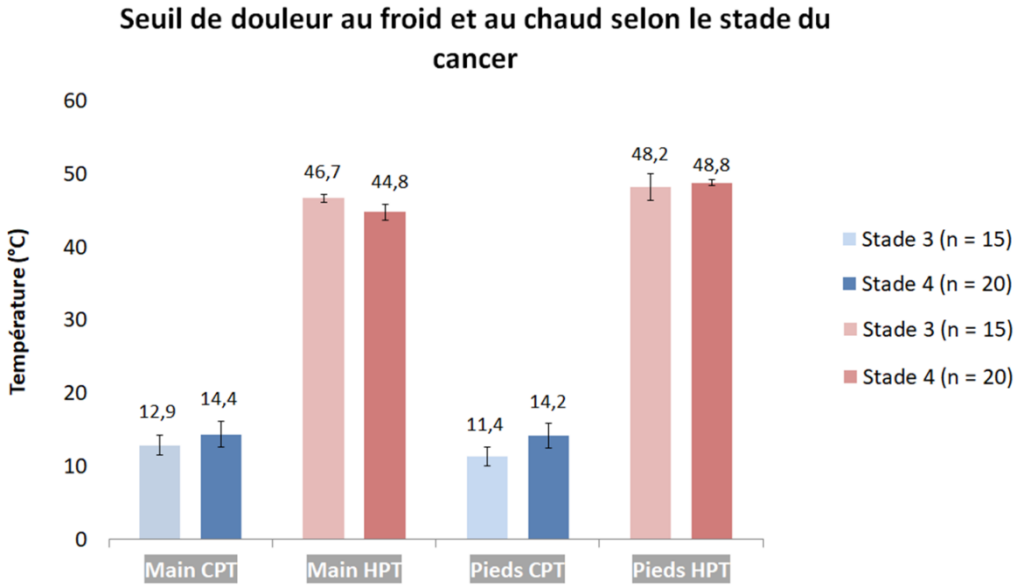



Figure 112| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le stade du cancer.

Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon le stade du cancer *p* = 0,80 pour les seuils de douleur au froid des mains ; *p* = 0,62 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; *p* = 0,37 pour les seuils de douleur au froid des pieds et *p* = 0,40 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.

*NB : un seul patient souffrant d'un cancer au stade 2, non pris en compte dans l'analyse.*

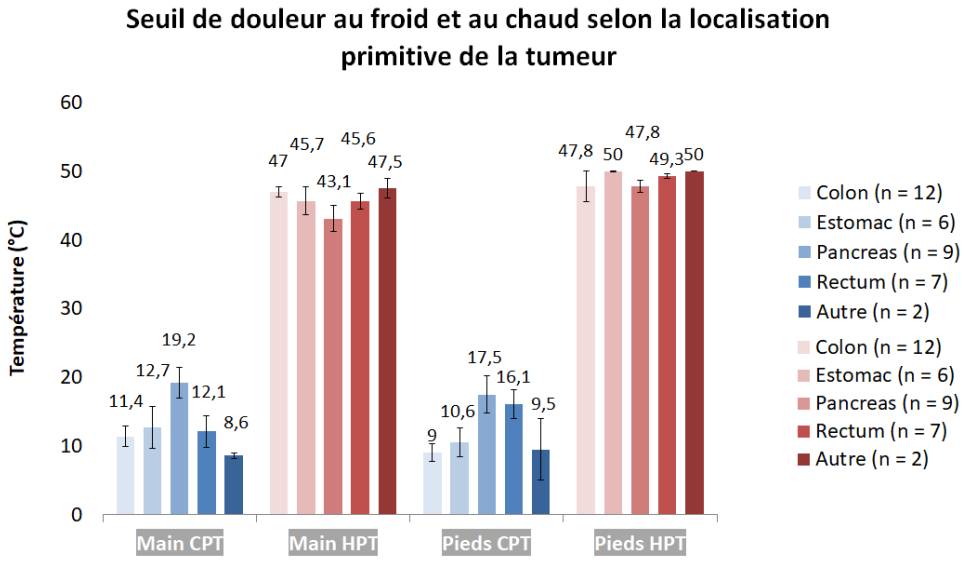



Figure 113| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon la localisation de la tumeur.

*Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon la localisation de la tumeur p = 0,10 pour les seuils de douleur au froid des mains ; p = 0,60 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; p = 0,05 pour les seuils de douleur au froid des pieds et p = 0,05 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.*

*NB : les autres localisations correspondent à un cancer du péritoine et à un cancer du foie.*

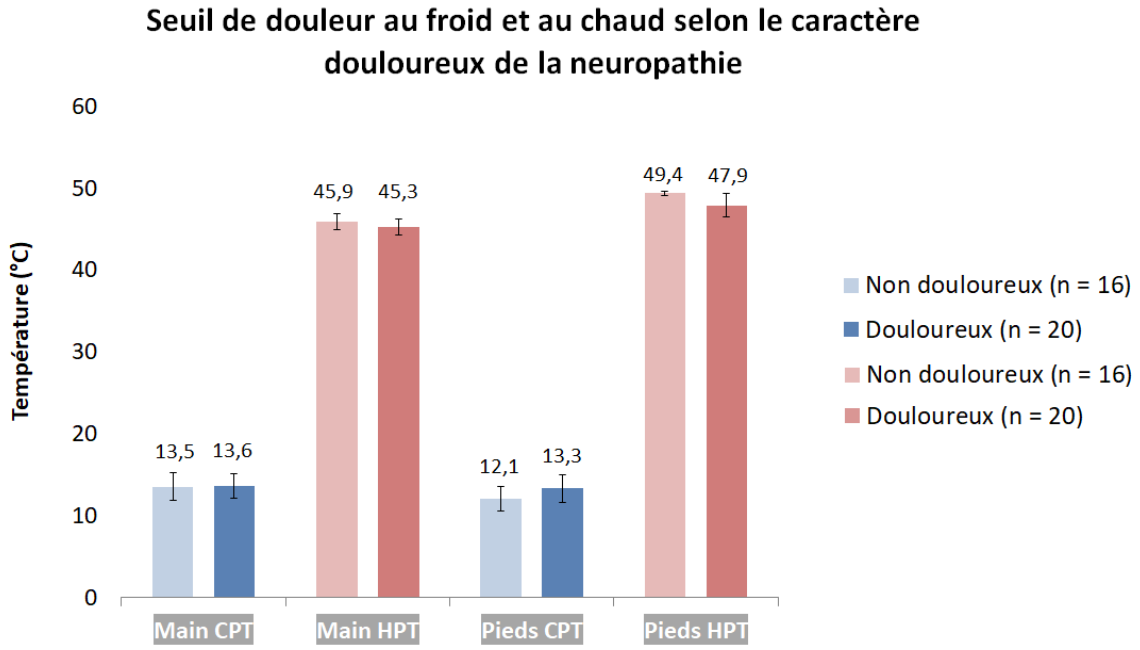



Figure 114| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le caractère douloureux de la neuropathie évalué par le questionnaire NPSI.

*Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon le caractère douloureux de la neuropathie p = 0,94 pour les seuils de douleur au froid des mains ; p = 0,94 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; p = 0,74 pour les seuils de douleur au froid des pieds et p = 0,99 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.*

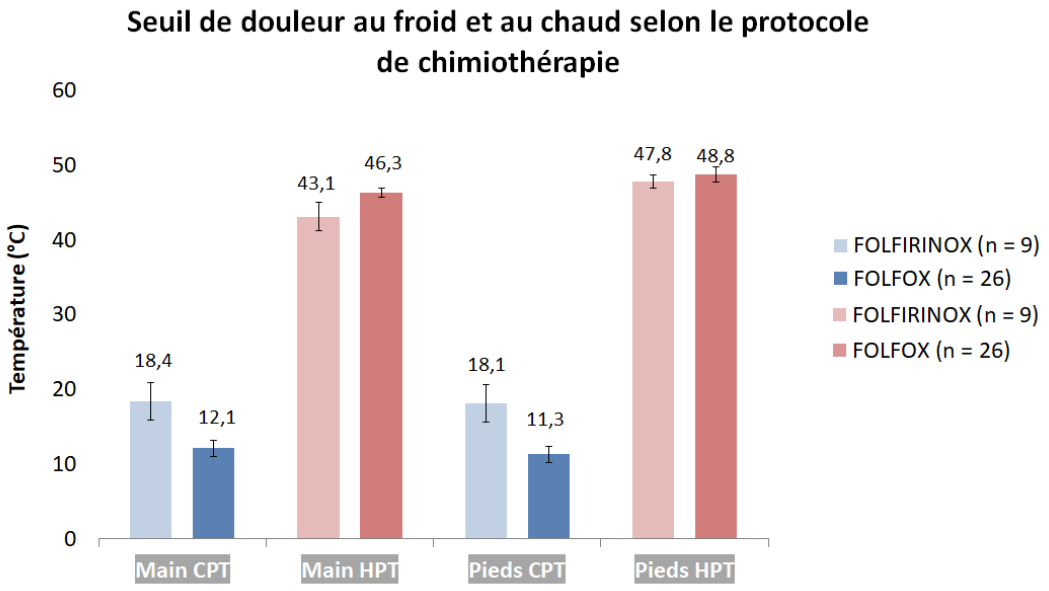



Figure 115| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le protocole de chimiothérapie.

*Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon le protocole de chimiothérapie p = 0,02 pour les seuils de douleur au froid des mains ; p = 0,17 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; p = 0,02 pour les seuils de douleur au froid des pieds et p = 0,10 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.*

*NB : un seul patient dans le protocole GEMOX, non pris en compte dans les analyses.*

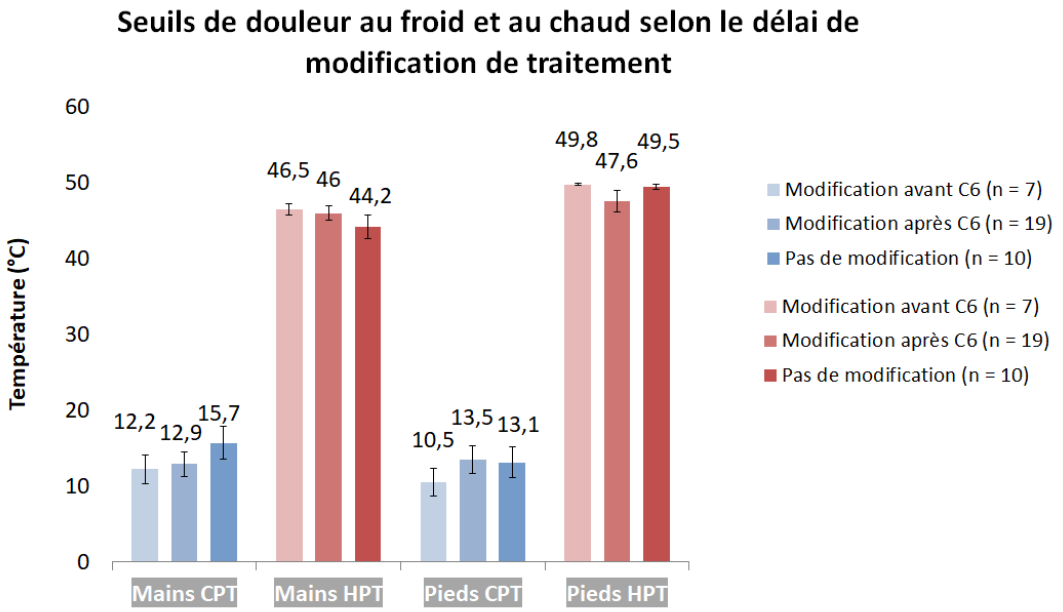



Figure 116| Seuils de douleur au froid (CPT) et au chaud (HPT) des mains et des pieds selon le délai de modification du traitement.

*Les seuils de douleur thermique ne diffèrent pas selon le délai de modification du traitement p = 0,43 pour les seuils de douleur au froid des mains ; p = 0,57 pour les seuils de douleur au chaud des mains ; p = 0,59 pour les seuils de douleur au froid des pieds et p = 0,31 pour les seuils de douleur au chaud des pieds.*

# Annexe 7 : Listes des lipides détectés en mode ESI+ et ESI-

**Diglycérides** :

t0 *vs* t3

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7,83 | 801,6771 | DG(46:1) | 4 | [M+K]+ | 0,0376 | 66 126 ± 24 628 | 49 759 ± 23 892 | -25 % |

t0 *vs* t12

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t12 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5,59 | 675,5356 | DG(42:8) | 0 | [M+H-H2O]+ | 0,0008 | 40 991 ± 16 160 | 50 993 ± 15 636 | +24 % |

**Triglycérides**

t0 *vs* t3

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9,1 | 821,7399 | TG(52:3) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0072 | 22 551 ± 17 077 | 58 866 ± 47 623 | +161 % |
| 8,89 | 823,6746 | TG(48:2) | 4 | [M+Na]+ | 0,0072 | 16 332 ± 9 625 | 37 408 ± 30 799 | +129 % |
| 9,09 | 795,7214 | TG(50:2) | 2 | [M+H-2H2O]+ | 0,0072 | 8 580 ± 10 204 | 27 629 ± 27 582 | +222 % |
| 8,89 | 819,7231 | TG(52:4) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0072 | 5 381 ± 3 711 | 16 479 ± 14 811 | +206 % |
| 8,63 | 769,6306 | TG(46:5) | 4 | [M+H]+ | 0,0072 | 3 901 ± 5 300 | 11 582 ± 10 858 | +197 % |
| 8,87 | 793,7069 | TG(50:3) | 1 | [M+H-2H2O]+ | 0,0072 | 3 424 ± 3 470 | 14 069 ± 15 514 | +311 % |
| 8,65 | 795,6465 | TG(48:6) | 4 | [M+H]+ | 0,0072 | 3 404 ± 3 034 | 8 988 ± 7 234 | +164 % |
| 8,92 | 844,7349 | TG(50:4) | 4 | [M+NH4]+ | 0,0087 | 18 767 ± 9 993 | 34 504 ± 25 409 | +84 % |
| 8,92 | 845,7391 | TG(54:5) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0094 | 8 560 ± 5 181 | 16 241 ± 12 961 | +90 % |
| 9,11 | 846,7525 | TG(50:3) | 2 | [M+NH4]+ | 0,0142 | 113 713 ± 47 445 | 157 886 ± 70 921 | +39 % |
| 6,82 | 757,6144 | TG(48:7) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0215 | 14 555 ± 4 496 | 12 433 ± 4 502 | -15 % |
| 7,64 | 787,659 | TG(50:6) | 2 | [M+H-2H2O]+ | 0,0244 | 16 0642 ± 50 956 | 132 303 ± 52 169 | -18 % |
| 9,4 | 868,7427 | TG(52:6) | 4 | [M+NH4]+ | 0,0244 | 23 626 ± 12 373 | 32 440 ± 15 403 | +37 % |
| 8,86 | 766,6894 | TG(44:1) | 3 | [M+NH4]+ | 0,0244 | 7 446 ± 11 107 | 31 150 ± 42 330 | +318 % |
| 8 | 919,6743 | TG(56:11) | 4 | [M+Na]+ | 0,0244 | 7030 ± 1567 | 5 765 ± 1 852 | -18 % |
| 8,86 | 767,6938 | TG(48:2) | 1 | [M+H-2H2O]+ | 0,0244 | 3 210 ± 4 447 | 13 460 ± 18 469 | +319 % |
| 9,11 | 851,7095 | TG(50:3) | 0 | [M+Na]+ | 0,0304 | 100 106 ± 37 504 | 125 585 ± 48 306 | 25 % |
| 8 | 837,6766 | TG(54:9) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0310 | 72 756 ± 22 152 | 59 402 ± 23 450 | -18 % |
| 9,51 | 851,7854 | TG(54:2) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0323 | 74 143 ± 27 089 | 105 567 ± 57 990 | +42 % |
| 8,97 | 925,7264 | TG(58:11) | 1 | [M+H]+ | 0,0380 | 27 497 ± 20 377 | 18 549 ± 19 057 | -33 % |

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8,86 | 740,6727 | TG(42:0) | 4 | [M+NH4]+ | 0,0380 | 4 126 ± 7 566 | 12 806 ± 17 327 | +210 % |
| 9,09 | 769,705 | TG(48:1) | 3 | [M+H-2H2O]+ | 0,0386 | 2 122 ± 3 325 | 5 638 ± 6 222 | +166 % |
| 7,23 | 781,6145 | TG(50:9) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0396 | 11 769 ± 3 041 | 9 029 ± 3 801 | -23 % |

t0 *vs* t6

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t6 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8,97 | 921,765 | TG(60:9) | 5 | [M+H-2H2O]+ | 0,0285 | 11 373 ± 6848 | 4 822 ± 2 439 | -58 % |
| 9,16 | 922,7795 | TG(56:7) | 6 | [M+NH4]+ | 0,0285 | 46 348 ± 26364 | 19 765 ± 13 063 | -57 % |
| 7,23 | 781,6145 | TG(50:9) | 0 | [M+H-2H2O]+ | 0,0285 | 12 381 ± 2233 | 10 281 ± 2 549 | -17 % |
| 8,97 | 925,7264 | TG(58:11) | 1 | [M+H]+ | 0,0336 | 30 083 ± 18987 | 15 199 ± 7 921 | -49 % |
| 8 | 919,6743 | TG(56:11) | 4 | [M+Na]+ | 0,0336 | 7 174 ± 1719 | 5 304 ± 1 972 | -26 % |
| 8,97 | 920,7703 | TG(56:8) | 0 | [M+NH4]+ | 0,0454 | 14 485 ± 8187 | 7 975 ± 5 490 | -45 % |
| 8,99 | 951,7368 | TG(58:9) | 4 | [M+Na]+ | 0,0454 | 8 930 ± 7347 | 4 115 ± 3 188 | -54 % |
| 8,99 | 952,7418 | TG(59:13) | 3 | [M+NH4]+ | 0,0454 | 5 209 ± 4087 | 2 363 ± 1 688 | -55 % |
| 9,17 | 948,7972 | TG(58:7) | 4 | [M+NH4]+ | 0,0454 | 7 006 ± 5739 | 2 619 ± 2 004 | -63 % |

## Phospholipides

t0 *vs* t3

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7,22 | 789,6095 | PE(38:2) | 2 | [M+NH4]+ | 0,0396 | 120 206 ± 48 493 | 156 047 ± 42 483 | +30 % |
| 5,98 | 783,5654 | PE(38:5) | 0 | [M+NH4]+ | 0,0396 | 51 057 ± 27 317 | 72 294 ± 31 362 | +42 % |
| 7,31 | 746,567 | PE(36:1) | 3 | [M+H]+ | 0,0396 | 1 707 ± 856 | 2 879 ± 1 753 | +69 % |
| 7,23 | 760,636 | PE-Cer(d16:1/24:1) | 4 | [M+NH4]+ | 0,0396 | 25 394 ± 8 321 | 20 505 ± 7 185 | -19 % |
| 8,92 | 849,6926 | PG(O-20:0/22:0) | 1 | [M+H]+ | 0,0396 | 25 055 ± 11 083 | 38 365 ± 20 962 | +53 % |
| 8,92 | 850,6892 | PG(P-20:0/21:0) | 0 | [M+NH4]+ | 0,0396 | 12 580 ± 5 635 | 18 638 ± 10 310 | +48 % |
| 7,23 | 781,6145 | PG(O-20:0/20:2) | 3 | [M+H-2H2O]+ | 0,0396 | 11769 ± 3 041 | 9 029 ± 3 801 | -23 % |
| 6,43 | 727,5675 | PG(O-16:0/20:1) | 3 | [M+H-2H2O]+ | 0,0396 | 2 178 ± 1 089 | 1 529 ± 569 | -30 % |
| 7,27 | 814,6292 | PC(38:2) | 3 | [M+H]+ | 0,0487 | 13 810 ± 5 355 | 17 566 ± 3 888 | +27 % |

**Céramides**

t0 *vs* t3

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6,62 | 816,5801 | LacCer(d18:1/14:0) | 4 | [M+H-H2O]+ | 0,0077 | 9 698 ± 3 174 | 7 789 ± 2 326 | -20 % |
| 6,53 | 788,552 | LacCer(d18:1/12:0) | 0 | [M+H-H2O]+ | 0,0077 | 5 012 ± 2 228 | 3 370 ± 2150 | -33 % |
| 7,08 | 818,5964 | LacCer(d18:0/14:0) | 3 | [M+H-H2O]+ | 0,0163 | 8 651 ± 2 667 | 6 865 ± 3 168 | -21 % |
| 8,6 | 743,6115 | Glc-Cer(d18:1/18:1) | 3 | [M+NH4]+ | 0,0163 | 3 938 ± 5 454 | 13 553 ± 16 156 | +244 % |

**Sphingomyélines**

t0 *vs* t3

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6,76 | 731,6039 | SM(d18:1/18:1) | 3 | [M+H]+ | 0,0086 | 69 971 ± 29 452 | 49 079 ± 22 360 | -30 % |
| 8,92 | 849,6808 | SM(d17:1/26:1) | 1 | [M+Na]+ | 0,0086 | 25 168 ± 10 903 | 38 361 ± 20 835 | +52 % |
| 9,21 | 839,6962 | SM(d18:0/24:0) | 1 | [M+Na]+ | 0,0086 | 9 090 ± 6 368 | 15 714 ± 10 279 | +73 % |
| 7,83 | 802,6818 | SM(d18:1/22:1) | 2 | [M+NH4]+ | 0,0418 | 27 693 ± 9 993 | 21 433 ± 9 967 | -23 % |
| 9,4 | 841,7199 | SM(d18:1/26:1) | 4 | [M+H]+ | 0,0474 | 18 598 ± 14 608 | 31 081 ± 24 149 | +67 % |

**Cholestérol**

t0 *vs* t6

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t6 | variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8,21 | 659,6139 | CE(20:2) | 1 | [M+H-H2O]+ | 0,041 | 2 394 ± 1 285 | 1 552 ± 671 | -35 % |

Tableau 19 | Listes des lipides détectés en mode ESI + présentant une variation statistiquement significative entre t0 et t3, t6 ou t12.

*Le test utilisé est un test de Student apparié avec correction FDR.*

*En bleu : les variables présentant une baisse significative*
*En rouge : les variables présentant une hausse significative*

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t3 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3,65 | 365.2661 | Acide dihydroxy arachidique | 3 | [M-H]- | 0,0152 | 69 923 ± 15 560 | 61 121 ± 10 540 | -12 % |
| 3,65 | 283.2634 | Acide stéarique | 3 | [M-H]- | 0,0058 | 1 322 650 ± 358 489 | 1 096 010 ± 206 188 | -17 % |
| 4,49 | 311.295 | Acide éicosanoïque (C20:0) | 1 | [M-H]- | 0,0249 | 13 437 ± 6 307 | 10 106 ± 4 013 | -24 % |

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t6 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,73 | 301,2164 | hydroxyéicosatétraénoïque | 1 | $[M-H2O-H]^-$ | 0,0116 | 2 337 ± 2 343 | 4 407 ± 3 163 | +89 % |
| 2,52 | 306,2508 | Acide Eicosapentaénoïque (20:5) | 6 | $[M-H]^-$ | 0,0129 | 1 735 ± 1 188 | 2 980 ± 1 590 | +72 % |
| 2,52 | 305,2479 | hydroxyeicosadiénoïque | 0 | $[M-H2O-H]^-$ | 0,0144 | 9 385 ± 4 787 | 15 007 ± 7 874 | +60 % |
| 2,13 | 303,2321 | Acide arachidonique (20:4) | 0 | $[M-H2O-H]^-$ | 0,0423 | 31 458 ± 10 926 | 46 656 ± 23 724 | +48 % |
| 1,43 | 225,1852 | Acide hydroxytetradécanoïque (14:0) | 1 | [M-H2O-H]- | 0,0462 | 4 320 ± 3 195 | 10 497 ± 10 912 | +143 % |

| $t_R$ | m/z | Identification | dppm | Adduit | *p* | Intensité t0 | Intensité t12 | Variation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,52 | 306,2508 | Acide Eicosapentaénoïque (20:5) | 6 | $[M-H]^-$ | 0,0372 | 1 735 ± 1 188 | 2 980 ± 1 590 | +38 % |
| 1,43 | 225,1852 | Acide hydroxytetradécanoïque (14:0) | 1 | [M-H2O-H]- | 0,0462 | 3 784 ± 3 049 | 8 844 ± 9 863 | +134 % |

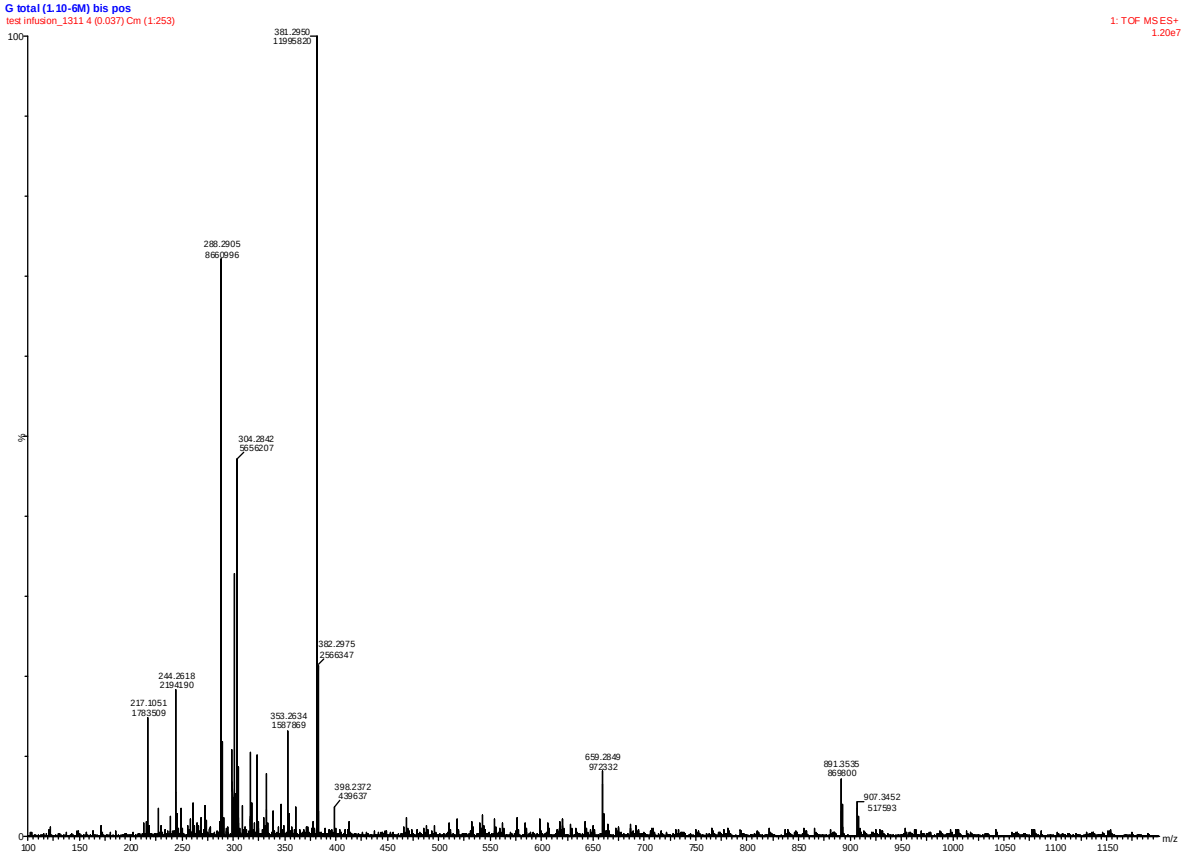
Tableau 20 | listes des variables lipidiques détectées en mode ESI - présentant une variation statistiquement significative entre t0 et t3, ou t6 ou t12.

*Le test utilisé est un test de Student apparié sans correction FDR.*

# Annexe 8 : liste des gangliosides identifiés lors de l'infusion de l'échantillon de gangliosides totaux en mode ESI –

| Masse acquise | adduit | Masse réelle | dppm | Identification |
|---|---|---|---|---|
| 917,9928 | [M-2H]2- | 1837,99247 | 4 | Ganglioside GD1a (d18:0/18:0) |
| 930,9937 | [M-2H]2- | 1864,00812 | 3 | Ganglioside GD1a (d18:1/20:0) |
| 917,9928 | [M-2H]2- | 1837,99247 | 4 | Ganglioside GD1b (d18:0/18:0) |
| 930,9937 | [M-2H]2- | 1864,00812 | 3 | Ganglioside GD1b (d18:1/20:0) |
| 834,9482 | [M-2H]2- | 1671,90835 | 1 | Ganglioside GD2 (d18:1/18:1) |
| 734,9116 | [M-2H]2- | 1471,83988 | 1 | Ganglioside GD3 (d18:1/18:0) |
| 785,9509 | [M-2H]2- | 1573,90795 | 5 | Ganglioside GM1 (18:1/20:0) |
| 798,4547 | [M-2H]2- | 1598,92836 | 2 | Ganglioside GM1 (d18:1/22:1) |
| 441,2494 | [M-3H]3- | 1326,76598 | 3 | Ganglioside GM2 (d18:1/14:0) |
| 459,2644 | [M-3H]3- | 1380,81293 | 1 | Ganglioside GM2 (d18:1/18:1) |
| 1079,6481 | [M-H2O-H]- | 1098,66621 | 0 | Ganglioside GM3 (d18:0/12:0) |
| 805,7206 | [M-3H]3- | 2420,18331 | 0 | Ganglioside GQ1c (d18:0/18:0) |
| 708,6854 | [M-3H]3- | 2129,08789 | 4 | Ganglioside GT1b (d18:0/18:0) |
| 1063,5408 | [M-2H]2- | 2129,08789 | 3 | Ganglioside GT1b (d18:0/18:0) |
| 708,0201 | [M-3H]3- | 2127,07224 | 4 | Ganglioside GT1b (d18:0/18:1) |
| 718,0325 | [M-3H]3- | 2157,11919 | 0 | Ganglioside GT1b (d18:0/20:0) |
| 1090,5551 | [M-2H]2- | 2183,13484 | 4 | Ganglioside GT1b (d18:0/22:1) |
| 732,0492 | [M-3H]3- | 2199,16614 | 1 | Ganglioside GT1b (d18:0/23:0) |
| 736,7198 | [M-3H]3- | 2213,18179 | 0 | Ganglioside GT1b (d18:0/24:0) |
| 741,3933 | [M-3H]3- | 2227,19744 | 1 | Ganglioside GT1b (d18:0/25:0) |
| 708,0201 | [M-3H]3- | 2127,07224 | 4 | Ganglioside GT1b (d18:1/18:0) |
| 1090,5551 | [M-2H]2- | 2183,13484 | 4 | Ganglioside GT1b (d18:1/22:0) |
| 1089,5559 | [M-2H]2- | 2181,11919 | 3 | Ganglioside GT1b (d18:1/22:1) |
| 708,6854 | [M-3H]3- | 2129,08789 | 4 | Ganglioside GT1c (d18:0/18:0) |
| 1063,5408 | [M-2H]2- | 2129,08789 | 3 | Ganglioside GT1c (d18:0/18:0) |
| 708,0201 | [M-3H]3- | 2127,07224 | 4 | Ganglioside GT1c (d18:0/18:1) |
| 718,0325 | [M-3H]3- | 2157,11919 | 0 | Ganglioside GT1c (d18:0/20:0) |
| 1090,5551 | [M-2H]2- | 2183,13484 | 4 | Ganglioside GT1c (d18:0/22:1) |
| 732,0492 | [M-3H]3- | 2199,16614 | 1 | Ganglioside GT1c (d18:0/23:0) |
| 736,7198 | [M-3H]3- | 2213,18179 | 0 | Ganglioside GT1c (d18:0/24:0) |
| 741,3933 | [M-3H]3- | 2227,19744 | 1 | Ganglioside GT1c (d18:0/25:0) |
| 708,0201 | [M-3H]3- | 2127,07224 | 4 | Ganglioside GT1c (d18:1/18:0) |
| 1090,5551 | [M-2H]2- | 2183,13484 | 4 | Ganglioside GT1c (d18:1/22:0) |
| 1089,5559 | [M-2H]2- | 2181,11919 | 3 | Ganglioside GT1c (d18:1/22:1) |
| 940,4648 | [M-2H]2- | 1882,94116 | 1 | Ganglioside GT2 (d18:0/12:0) |
| 954,4767 | [M-2H]2- | 1910,97246 | 2 | Ganglioside GT2 (d18:0/14:0) |
| 939,4564 | [M-2H]2- | 1880,92551 | 0 | Ganglioside GT2 (d18:1/12:0) |
| 653,3284 | [M-3H]3- | 1963,00377 | 1 | Ganglioside GT2 (d18:1/18:1) |
| 1016,5461 | [M-2H]2- | 2035,09767 | 4 | Ganglioside GT2 (d18:1/23:0) |

# Annexe 9 : Spectre de masse de l'échantillon de gangliosides totaux acquis en mode ESI+



# Annexe 10 : Article n°1 : Is quantitative sensory testing helpful in the management of oxaliplatin neuropathy? A two-year clinical study.

Cancer Treatment and Research Communications 17 (2018) 31–36

Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Treatment and Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ctarc

## Is quantitative sensory testing helpful in the management of oxaliplatin neuropathy? a two-year clinical study

JB Delmotte[a,*], H Beaussier[a], N Auzeil[b], F Massicot[b], O Laprévote[b], E Raymond[c], F Coudoré[d,e]

[a] Clinical Research Center, Paris Saint Joseph Hospital, 185 rue Raymond Losserand, Paris, France
[b] UMR8638, Sorbonne Paris Cité University, Faculty of Pharmacy, Paris, France
[c] Oncology Department, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France
[d] CESP/INSERM UMR-S 1178, Paris-Sud Saclay University, Faculty of Pharmacy, Châtenay-Malabry, France
[e] Biology Unit, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

*Keywords:*
Peripheral neuropathy
Oxaliplatin
Hypoesthesia
Thermal detection threshold
Quantitative sensory testing

*Abbreviations:*
ADL
Activity of daily living
CDT
Cold Detection Threshold
NCI-CTCAE
Common Terminology Criteria For Adverse Events From The National Cancer Institute
NPSI
Neuropathic Pain Symptoms Inventory
QST
Quantitative sensory testing
OIPN
Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy
WDT
Warm Detection Threshold
MDT
Mechanical Detection Threshold

ABSTRACT

*Purpose:* To better understand how quantitative sensory testing could help the clinician in the management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in terms of earlier and more reliable detection, we conducted a two-year prospective study.
*Methods:* Thermal sensory assessment, tactile sensory assessment, neuropathic pain assessment and adverse events gradation (NCI-CTC) were performed during treatment and 6 months after treatment completion.
*Results:* 35 patients were enrolled and followed-up during one year. Cold and Warm Detection Thresholds were higher 6 months after treatment completion than at enrollment. Mechanical detection thresholds didn't change significantly. Neurotoxicity was mostly grade-1, only 18% grade-2 and no grade-3. Grade-2 patients received lower oxaliplatin cumulative dose than grade-1, which reveals effective dose adaptation and grade-2 patients were more likely to develop painful neuropathy.
*Conclusion:* Thermal thresholds impairment emerges too late to help the clinician in the prophylaxis of neuropathy. Management of OXA-treatment based on NCI-CTC, as currently recommended, remains the best way to detect neuropathy and ensure treatment adaptation.

### Introduction

Oxaliplatin is an effective platinum-based cytotoxic drug widely used in oncology since the early 2000s [1,2]. Its effectiveness is recognized in first-line chemotherapy regimen in metastatic colorectal cancer and in adjuvant therapy of several gastrointestinal cancers [3–6]. However, its use is limited by a development of a disabling sensitive neuropathy [7]. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) has a negative association with quality of life and this consideration is a major issue in the case of palliative care cancer [8,9]. It constitutes the second most common cause of dose limitation after hematological adverse effects [7,10]. Detection and characterization of OIPN during treatment remains a critical concern for the oncologist who has to continually evaluate the risk benefit ratio of the treatment. Recommendations for the management of this neuropathy include dose adaptation, use of neuromodulatory agents like duloxetin and patient education [7,11,12]. Evaluation of OIPN is based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events from the National Cancer Institute (NCI-CTAE) which is a five-grade severity scale for adverse event grading [12,13].

* Corresponding author. Personal address: 20 rue des tertres, 92220 France.
*E-mail address:* jeanbaptiste.delmotte@aphp.fr (J. Delmotte).

https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2018.10.002
Received 5 July 2018; Received in revised form 18 September 2018; Accepted 8 October 2018
2468-2942/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**
Eligibility criteria of LIPIDOXA study.

| Inclusion criteria |
|---|
| Patient from the Department of Oncology at Paris Saint Joseph Hospital, male or female, aged over 18. |
| Patient suffering from any type of cancer, at any stages (estimated according to the TNM classification) |
| Patients treated with oxaliplatin based regimen: FOLFOX, FOLFIRINOX, GEMOX, XELOX, EOX. |
| **Non inclusion criteria** |
| Patient with brain or leptomeningeal metastasis |
| Patient previously treated with cisplatin |
| Patient addicted to alcohol |
| Diabetic patient with peripheral neurological disorders clinically objectified |
| Patient receiving calcium or magnesium salts intravenously |
| Patient suffering from peripheral neuropathy clinically objectified |
| Patient suffering from psychiatric disorders |
| Patient treated with at least one of the following drug (active in neuropathic pain relieve): venlafaxin, carbamazepin, gabapentin, pregabalin, clomipramin, amitriptylin, imipramin, duloxetin. |

Neurological assessment can also include other tests like quantitative sensory testing (QST) such as thermal thresholds assessment, mechanical thresholds assessment or neuropathic pain assessment [14,15]. To better understand how QST could help the clinician in the management of OIPN in terms of earlier and more reliable detection, we conducted LIPIDOXA, a small prospective and monocentric clinical trial.

## Methods

### *Study design: patients, chemotherapy regimen, study time course*

LIPIDOXA study, is a prospective, open-label, single group assignment and monocentric clinical trial which was standing at the Department of Oncology at Paris Saint Joseph Hospital (F-75014). This study was prospectively registered at clinicaltrials.gov (NCT02169908) and all data regarding study design are available online. Patients included suffered from cancer at any stages and were treated with oxaliplatin-based regimen. All inclusion *criteria* are listed in Table 1 and all oxaliplatin-based regimen characteristics are available in supplementary material. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki II and obtained approval from the ethics committee of Île-de-France II (CPP Île-de-France II) in May 2014. Written informed consent was provided to the patients before enrollment. Patients were recruited between May 2014 and June 2015 and were assessed before the beginning of the treatment, once a month in the course of oxaliplatin cure which lasted 3 or 6 months and finally 6 months after completion of the treatment; *i.e.* at 9th or 12th months follow-up.

### *Clinical assessment of neuropathy*

Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy was assessed using three complementary tests. These tests were (1) thermal sensory assessment using the MSA Thermal Stimulator (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden) [16] (2) tactile sensory assessment using von Frey hairs aesthesiometer [17] (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden) and (3) global neuropathic pain assessment using the Neuropathic Pain Symptom Inventory scale (NPSI) [15].

#### *Thermal sensory assessment*

Thermal sensory assessment consisted in measuring two parameters using the MSA Thermal Stimulator: Cold Detection Threshold (CDT) and Warm Detection Threshold (WDT) in the thenar. Thermal stimuli were applied using a Peltier probe applied to the skin (25 mm wide and 50 mm high). The probe was set at a baseline temperature of 32 °C and stimulus was delivered at 1 °C/s in both directions to a defined and stable value. Thresholds measurement was based on the method of limits [16]. For Warm and Cold Detection Thresholds, patients were instructed to indicate by clicking on a mouse as soon as they felt a change in temperature. Mean thresholds were calculated using three consecutive measurements, spaced by a random period of 4–10 s.

#### *Mechanical sensory assessment*

Mechanical Detection Threshold (MDT) was measured with a standardized set of seven von Frey hairs that exert forces between 0.63 and 235.4 mN. The contact area of the von Frey hairs with the skin was of uniform shape and size. The calibrated rounded tip avoids sharp edges that would facilitate nociceptor activation (rounded tip, 0.5 mm in diameter) [18,19]. The hairs were repetitively applied perpendicularly to the skin surface on the dorsum of the hand. The threshold value was calculated using the geometric mean of five series of *stimuli* [20].

#### *Neuropathic pain assessment*

Neuropathic pain symptoms were recorded, and their severity was scored using the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI scale), a 11-point (0–10) numerical scale of ten neuropathic symptoms (burning, squeezing, pressure, electric shocks, stabbing, pain evoked by a brush, by pressure or by cold, tingling, pins and needles). The total NPSI score *i.e.* the sum of individual sub-scores out of 100 was calculated [15].

The severity of neurotoxicity was graded with the National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 (NCI-CTCAE) scale. Grade-1 corresponds to paresthesia or loss of deep tendon reflexes; grade-2 corresponds to moderate symptoms, limiting activity of daily living (ADL); grade-3 corresponds to severe symptoms, limiting self-care of ADL [13].

### *Statistical analysis*

Results were presented as mean ± standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Mechanical Detection threshold was transformed logarithmically before analysis. Comparisons were made using Kruskall-Wallis and Wilcoxon test on R software, v.64 bits 3.4.1. $p < .05$ was considered to be significant.

### *Outcomes*

The outcomes were the thermal thresholds (CDT, WDT), the mechanical threshold (MDT), the NPSI score and the grade of neurotoxicity (according to the NCI-CTCAE v4.0).

## Results

### *Patients*

Between May 2014 and June 2015, 35 patients, 16 women and 19 men, were enrolled in LIPIDOXA study. Patient characteristics are presented in Table 2. The average age was 66.3 ± 10.7 years; ranging from 46 to 89 years. Most patients suffered from colorectal cancer ($n$ = 19; *54%*) and were at a metastatic stage (stage IV) ($n$ = 20; *57%*). At 6-month follow-up, three patients had been lost, one deceased and two left the clinical trial. The follow-up visits, *i.e.* 6 months following treatment completion, were performed only in 19 patients. This corresponds to the patients who consulted their practitioner six months after treatment completion as part of their personal medical care.

Thermal detection thresholds and clinical scales were reported for three visits. The *baseline visit* was stated as a reference since patients were naïve from oxaliplatin based treatment. The *end of treatment visit* corresponded to the last infusion of oxaliplatin and coincided with the onset of the highest acute neuropathy crisis. Finally, the *follow-up visit* took place approximately six months after treatment completion

**Table 2**
Patient demographics (n = 35).

| | *n* | *(%)* |
|---|---|---|
| Gender | | |
| Female | 16 | *(46)* |
| Male | 19 | *(54)* |
| Age (years) | | |
| <60 | 8 | *(23)* |
| [60–66[ | 8 | *(23)* |
| [67–73[ | 10 | *(28)* |
| ≥73 | 9 | *(26)* |
| Primary site of cancer | | |
| Colon | 14 | *(40)* |
| Duodenum | 1 | *(3)* |
| Stomach | 7 | *(20)* |
| Liver | 1 | *(3)* |
| Ovary | 1 | *(3)* |
| Pancreas | 6 | *(17)* |
| Rectum | 5 | *(14)* |
| Tumor Node Metastasis (TNM) stage | | |
| I | 3 | *(9)* |
| II | 5 | *(14)* |
| III | 7 | *(20)* |
| IV | 20 | *(57)* |
| Oxaliplatin based regimen | | |
| FOLFOX | 29 | *(82)* |
| FOLFIRINOX | 3 | *(9)* |
| EOX | 1 | *(3)* |
| XELOX | 1 | *(3)* |
| GEMOX | 1 | *(3)* |

*Thermal sensory assessment*

Detection thresholds corresponded to a temperature deviation from 32 °C (Fig. 1, Table 3). When baseline visit was compared to follow-up visit, the thermal detection thresholds increased over time ($p = .04$ for cold and $p = .02$ for warm). Indeed, CDT measured at the follow-up visit were higher than the ones measured at baseline visit, -3.7 °C *vs* -2.1 °C ($p = .01$). Similarly, WDT measured at the follow-up visit were higher than WDT measured at baseline visit; 3.6 °C *vs* 2.0 °C ($p = .003$). In contrast, the values for CDT and WDT exhibited no significant difference neither between baseline visit and end of treatment visit nor between end of treatment visit and follow-up visit.

*Mechanical sensory assessment*

No change in MDT was observed regardless visit: 2.32 ± 0.62; 2.22 ± 0.48; 2.05 ± 0.21; $p > .05$ at baseline, end of the treatment and follow-up, respectively (Table 3 and supplementary material).

*Evaluation of pain with the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) scale*

At baseline, no patient presented neuropathic pain. At the end of the treatment, 44% (12/27) of patients had painful neuropathy (positive NPSI score) while at follow-up, they were only 26% (5/19) (Table 3). Among the patients with painful neuropathy, 39% reported pain triggered by contact with a cold object (question 10, mean = 4.3/10), and 44% reported tingling and prickling pain (questions 11 and 12, Mean = 4.4/10).

*Evaluation of neurotoxicity with the National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) scale*

The grade of neurotoxicity (NCI-CTCAE scale) was assessed six months after the beginning of the treatment, which corresponds to the longer follow-up with minimum patient's loss. At this point, 32 patient's data were analyzable. Most patients had grade-1 neurotoxicity ($n = 23$), while 6 patients experienced a grade-2 neurotoxicity and 3 patients exhibited no neurotoxicity (Grade 0). Patients with grade-2 neurotoxicity received a mean cumulative oxaliplatin dose of 950 mg, patients with grade-1 neurotoxicity received a mean cumulative oxaliplatin dose of 1350 mg and patient with no sign of neurotoxicity received a mean cumulative oxaliplatin dose of 485 mg. Patients with grade-2 neurotoxicity received a dose of oxaliplatin lower than those with grade-1 neurotoxicity ($p = .03$) and similarly, all three patients

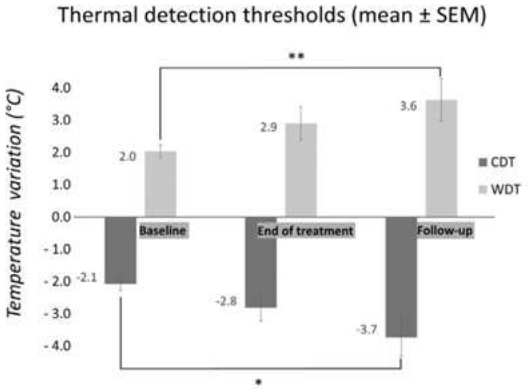



**Fig. 1.** Cold and Warm Detection Thresholds measured at baseline, at the end of treatment and at 6-month follow-up.
Values represent mean ± SEM of temperature differences between detection and basal temperatures after a cold (Cold Detection Threshold, CDT) or a warm stimulation (Warm Detection Threshold, WDT) using the MSA Thermal Stimulator device (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden) in oxaliplatin-treated patients at baseline (*i.e.* before treatment) ($n = 32$), at the end of treatment ($n = 24$) and at follow-up (*i.e.* six months after treatment completion) ($n = 14$). The dark gray bar histogram represents the CDT measured on the thenar. The light gray slanting hatched bar histogram represents the WDT measured on the thenar. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (*i.e.* 32 °C).
Cold Detection Thresholds measured at the follow-up visit were higher than CDT measured at the first visit (−3.7 °C *vs* −2.1 °C; $p = .022$). Similarly, WDT measured at the follow-up visit were higher than WDT measured at the first visit (3.6 °C *vs* 2.0 °C, $p = .005$).
Statistical analysis use Wilcoxon test. * $p < .05$; ** $p < .01$.

**Table 3**
Thermal Detection Thresholds, Mechanical Detection Thresholds and Neuropathic Pain Symptoms Inventory score at baseline, end of treatment and 6 months after treatment completion.

| | Baseline | End | Follow-up |
|---|---|---|---|
| CDT (Δ. °C, mean ± SD) | −2.1 ± 1.2 | −2.8 ± 2.0 | −3.7 ± 2.2 |
| WDT (Δ. °C, mean ± SD) | 2.0 ± 1.1 | 2.9 ± 2.6 | 3.6 ± 2.5 |
| | Baseline | End | Follow-up |
| MDT (log mg, mean ± SD) | 2.32 ± 0.62 | 2.22 ± 0.48 | 2.05 ± 0.21 |
| | Baseline | End | Follow-up |
| % painful neuropathy (NPSI scale) | 0 | 44 ± 19 | 26 ± 20 |
| NPSI scale (mean ± SD) | 0 | 3.9 ± 5.3 | 3.4 ± 8.5 |

Values represent mean ± SEM of Cold Detection Threshold (CDT), Warm Detection Threshold (WDT) and Mechanical Detection Threshold (MDT) using the Thermotest device and Von Frey Hairs (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden). Proportions of neuropathic patients are presented as percentage ± 95%IC and score of the Neuropathic Pain Symptoms Inventory scale (NPSI) is presented as mean ± SD. The effectives of the studied population are $n = 32$ oxaliplatin-treated patients at baseline (*i.e.* before treatment), $n = 24$ at the end of treatment and $n = 14$ at follow-up (*i.e.* six months after treatment completion).

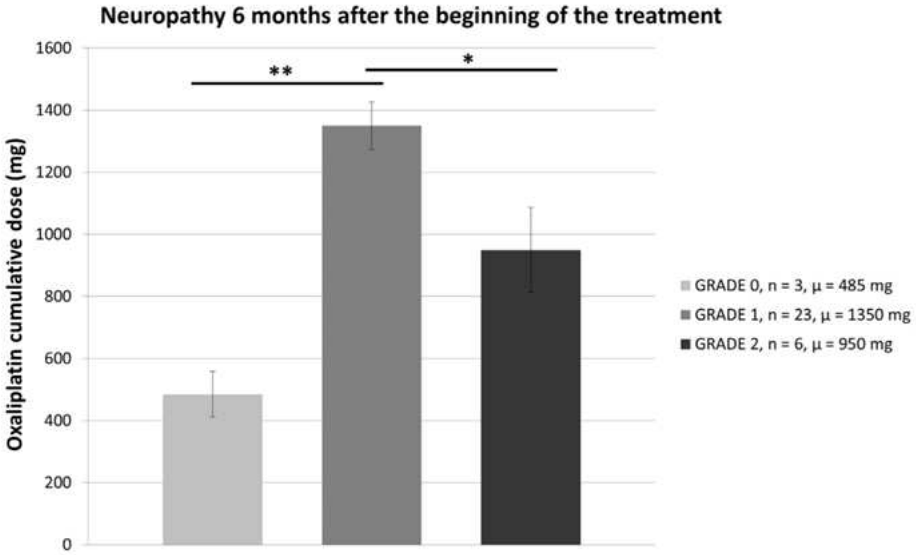



**Fig. 4.** Mean cumulative dosages of oxaliplatin presented by grade of neuropathy at 6 months.
Six months after the beginning of the treatment, three patients had no clinically neuropathy (grade-0); 23 patients had a grade-1 neurotoxicity and 6 had a grade-2 disabling neuropathy. Patients with grade-2 neuropathy received less oxaliplatin dosage than those with grade-1 neuropathy (950 ± 333 mg *vs.* 1350 ± 368 mg, $p = 0.03$). Similarly, all three patients with grade-0 neuropathy received less oxaliplatin dosage than those with grade-1 neuropathy (485 ± 126 mg *vs* 950 ± 333 mg, $p = .001$).
Statistical analysis use Wilcoxon test. * $p < .05$; ** $p < .01$.

with grade-0 neurotoxicity received a lower dose of oxaliplatin than those with grade-1 neurotoxicity ($p = .001$). Results are presented in Fig. 4.

*Subset analyzes*

In subset analyzes, the patients were retrospectively divided into three subgroups:

(1) According to the grade of neurotoxicity (NCI-CTCAE): grade-0, $n = 3$; grade-1, $n = 23$; grade-2, $n = 6$.
(2) According to the dose adjustment time: modification of the dose within the three first months ($n = 9$); modification within the three last months, $n = 9$; no modification of the dose ($n = 14$) (Figs. 2 and 3).

(1) Thermal and Mechanical Detection Thresholds didn't show any difference according to the grade of neurotoxicity ($p > .05$). Regarding NPSI scale results, among patients who developed grade-1 neurotoxicity, 47% (9/19) were painful at the end of the treatment, whereas only 8% (1/12) were painful at follow-up. For grade-2, 60% (3/5) of patients were painful both at the end of treatment and at follow-up. Grade 2 neuropathic patients were more likely to develop painful neuropathy ($p = .05$).

(2) Thermal and Mechanical Detection Thresholds as far as neuropathic pain occurrence didn't show any relationship with the dose adjustment time ($p > .05$).

## Discussion

The present study attempts to assess whether quantitative sensory testing can help the clinician in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy management. In this field, thermal sensory assessment, tactile sensory assessment, neuropathic pain assessment and adverse events gradation (NCI-CTC), were performed during treatment and 6 months after treatment completion.

Regarding thermal sensory assessment, Cold and Warm Detection Thresholds were higher six months after completion of the treatment, revealing an hypoesthesia to thermal stimuli [21]. At this visit, chronic neuropathy was clinically present while acute neuropathy was very unlikely to be observed [14]. The few studies dealing with long term follow-up of oxaliplatin treated patients report a delayed onset of chronic OIPN, confirming our results [22]. Brouwers et al. estimated a long half-life recovery of neuropathy in the hands to 6.8 ( ± 3.1) years [21]. Park et al. highlighted persistence of hypoesthesia two years after the end of the treatment [23]. In the subset analyses, evolution of cold and warm detection thresholds didn't differ according to the dose adjustment time. But, interestingly, the CDT measured at baseline appeared to be lower in the patients whose treatment was modified earlier than the patients who didn't experiment change in treatment. This could suggest a greater thermal sensitivity of patients whose treatment was modified earlier because of early neurotoxicity. However, these differences were not significant and there was no relationship between the Cold Detection Threshold measured at the start of treatment and the dose adjustment time (logistic regression performed).

Regarding mechanical sensory assessment, no difference was found between the different visits. The mean MDT values measured during treatment were consistent with those published in previous studies [14]. Interestingly and in the same way as previously, the MDT measured at baseline appeared to be lower in the patients whose treatment was modified earlier than the patients who didn't experiment change in treatment. Of the same, this could also suggest a greater mechanical sensitivity of patients whose treatment was modified earlier because of early neurotoxicity. But, these differences were not significant and there was no relationship with the dose adjustment time.

For both Cold and Mechanical Detection Threshold, we cannot

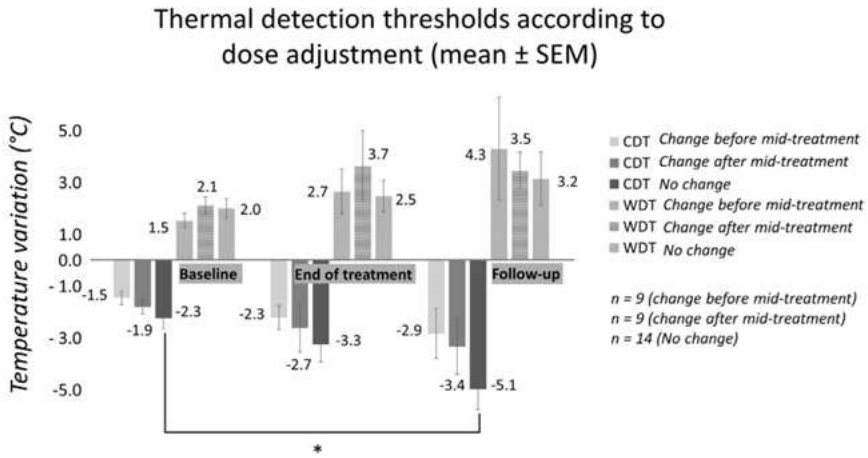



**Fig. 2.** Cold and Warm Detection Thresholds measured at baseline, at the end of treatment and at 6-month follow-up according to dose adjustment time.
Values represent mean ± SEM of temperature differences between detection and basal temperatures after a cold (Cold Detection Threshold, CDT) or a warm stimulation (Warm Detection Threshold, WDT) using the MSA Thermal Stimulator device (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden). At the end of the study, three groups of patients were established according to the eventual change of dosage at mid-treatment (Change before mid-treatment, Change after mid-treatment and No change). Of the 32 analyzable patients, 9 patients experimented change in treatment before mid-treatment ($n = 7$ at the end of treatment and $n = 4$ at follow-up); 9 patients experimented change in treatment after mid-treatment ($n = 7$ at the end of treatment and $n = 6$ at follow-up); 14 patients experimented no change in treatment ($n = 10$ at the end of treatment and $n = 4$ at follow-up).
The light gray bar histogram represents the CDT measured in the group *Change before* mid-treatment. The medium gray bar histogram represents the CDT measured in the group *Change after* mid-treatment. The dark gray bar histogram represents the CDT measured in the group *No change*. The left slanting hatched bar histogram represents the WDT measured in the group *Change before* mid-treatment. The horizontal hatched bar histogram represents the WDT measured in the group *Change after* mid-treatment. The right slanting hatched bar histogram represents the WDT measured in the group *No change*. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (*i.e.* 32 °C).
No differences were found for CDT and WDT between the visits except for CDT measured at the follow-up visit which was greater than CDT measured at baseline (-5.1 °C *vs* −2.3 °C, $p = .02$).
Statistical analysis use Wilcoxon test. * $p < .05$.

conclude if patients with higher sensitivity at the start of treatment were more likely to develop severe OIPN. A literature review did not find any elements dealing with this subject. A larger number of patients and a better selection of patients are needed to study this possible relationship. For instance, it would be wise to restrict the study population to that treated with FOLFOX regimen in a future study. Indeed, this would reduce the variability caused by the toxicity of the anticancer drugs of the other regimens and thus increase the power of statistical tests. In addition, the high recruitment potential of FOLFOX patients would not compromise future patient recruitment.

Regarding the neuropathic pain assessment with NPSI scale, 44% of patients experimented neuropathic pain at the end of the treatment and among them, 39% reported pain from a cold object and 44% reported pain as tingling and prickling. This is consistent with Attal *et al* data [14].

Regarding the neurotoxicity assessed with the NCI-CTCAE scale, neurological side effect management seems to be well controlled in LIPIDOXA study with the current care management. For instance, in André et al. study, 31.6% and 12.4% of patients exhibited grade-2 and grade-3 neurotoxicity respectively, whereas, in LIPIDOXA study, 19% and 0% of patients exhibited grade-2 and grade-3 neurotoxicity respectively [24]. In LIPIDOXA study, patients with grade-2 neurotoxicity received an average dose of oxaliplatin lower than those with grade-1 neurotoxicity. Similarly, all three patients with no neuropathy received less oxaliplatin than those with grade-1 neuropathy. LIPIDOXA is a study in current care practice and we can assume that these results are due to an early decrease in dosage by the practitioner when NPIO occurs rapidly and intensely. This reveals an attempt of oxaliplatin dose adaptation by the oncologist to reduce the severity of OIPN with NCI-CTCAE [7]. Thus, a promising area to develop could be patient education to enhance the relevance of NCI-CTC outcome. Besides, these results are consistent with those presented in a review which examined the relationship between oxaliplatin cumulative dose and the OIPN grade [25]. This meta-analysis was based on fourteen studies corresponding to a total of 3869 patients treated with oxaliplatin for colorectal cancer. The clinical endpoint was the NCI-CTCAE score and the degree of neuropathy ranged from 0 to 3. Among the 14 studies, only six assessed the relationship between neuropathy grade and cumulative dose and only one did not demonstrate a relationship. This study included 45 patients treated with oxaliplatin (20) or cisplatin (25) [21]. As in LIPIDOXA study, oxaliplatin-induced neuropathy did not appear to be related to the dose. Even though statistical methods were different between the two studies, conclusions are consistent. This suggests that other factors such as genetic polymorphism, comorbidity or cancer can explain this variability [26–28].

## Conclusion

Hypoesthesia to thermal stimuli forms a marker of chronic oxaliplatin-induced neuropathy of late onset. This sensory loss worsens even after treatment completion and QST seems to remain useless for the management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. Management of OIPN based on NCI-CTCAE remains the best way to detect neuropathy and ensure treatment adaptation.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest. The Clinical Research Center has received grants from APICIL foundation (Lyon, France) to support some studies promoted by Paris Saint Joseph Hospital among

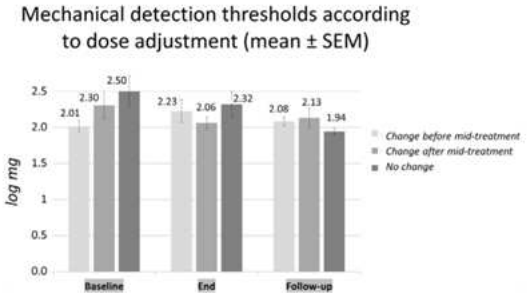



**Fig. 3.** Mechanical Detection Thresholds measured at baseline, at the end of treatment and at 6-month follow-up according to kinetics of dose adjustment. Values represent mean ± SEM of Mechanical Detection Thresholds (MDT) expressed in log(threshold in milligram). A standardized set of seven von Frey hairs (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden) was used. At the end of the study, three groups of patients were established according to the eventual change of dosage at mid-treatment (Change before mid-treatment, Change after mid-treatment and No change). Of the 32 analyzable patients, 9 patients experimented change in treatment before mid-treatment ($n = 8$ at the end of treatment and $n = 5$ at follow-up); 9 patients experimented change in treatment after mid-treatment ($n = 7$ at the end of treatment and $n = 6$ at follow-up); 14 patients experimented no change in treatment ($n = 12$ at the end of treatment and $n = 6$ at follow-up).
Retrospective analysis
The light gray bar histogram represents the MDT measured in the group *Change before* mid-treatment. The medium gray bar histogram represents the MDT measured in the group *Change after* mid-treatment. The dark gray bar histogram represents the MDT measured in the group *No change*.
No differences were found for MDT (Statistical analysis use Wilcoxon test).

which the study LIPIDOXA.


## Acknowledgments

The authors thank Pr C. Dubray from CIC-501 Clermont-Ferrand (France) for his expertise, Dr G. Deplanque and all the staff of the Oncology Department of Paris Saint Joseph Hospital, all members of the local clinical research center, Dr M. Jardin-Sucks from the Pharmacy Department of Paris Saint Joseph Hospital, and B. Johansson from SOMEDIC (Hörby, Sweden) for his technical assistance.


## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ctarc.2018.10.002.

## References


[1] J. Graham, M. Muhsin, P. Kirkpatrick, Oxaliplatin, Nat. Rev. Drug Discov. 3 (2004) 11–12, https://doi.org/10.1038/nrd1287.
[2] G. Folprecht, C.H. Köhne, M.P. Lutz, Systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer, Cancer Treat. Res. 134 (2007) 425–440.
[3] T. André, C. Boni, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, A. Bonetti, P. Clingan, J. Bridgewater, F. Rivera, A. de Gramont, Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial, J. Clin. Oncol. 27 (2009) 3109–3116, https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771.
[4] D.G. Haller, J. Tabernero, J. Maroun, F. de Braud, T. Price, E.V. Cutsem, M. Hill, F. Gilberg, K. Rittweger, H.-J. Schmoll, Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer, J. Clin. Oncol. 29 (2011) 1465–1471, https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.6297.
[5] W. Xu, M. Kuang, Y. Gong, C. Cao, J. Chen, C. Tang, Survival benefit and safety of the combinations of FOLFOXIRI ± bevacizumab *versus* the combinations of FOLFIRI ± bevacizumab as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a meta-analysis, OncoTargets Ther. 9 (2016) 4833–4842, https://doi.org/10.2147/OTT.S104981.
[6] E. Raymond, S. Faivre, J.M. Woynarowski, S.G. Chaney, Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity, Semin. Oncol. 25 (1998) 4–12.
[7] M.W. Saif, J. Reardon, Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, Ther. Clin. Risk Manag. 1 (2005) 249–258.
[8] F. Mols, T. Beijers, G. Vreugdenhil, L. van de Poll-Franse, Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review, Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer. 22 (2014) 2261–2269, https://doi.org/10.1007/s00520-014-2255-7.
[9] M. Stefansson, P. Nygren, Oxaliplatin added to fluoropyrimidine for adjuvant treatment of colorectal cancer is associated with long-term impairment of peripheral nerve sensory function and quality of life, Acta Oncol 0 (2016) 1–9, https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1197420.
[10] M. Saad, D. Psimaras, C. Tafani, M. Sallansonnet-Froment, J.-H. Calvet, A. Vilier, J.-M. Tigaud, F. Bompaire, M. Lebouteux, T. de Greslan, B. Ceccaldi, J.-M. Poirier, F.-R. Ferrand, S.L. Moulec, O. Huillard, F. Goldwasser, H. Taillia, T. Maisonobe, D. Ricard, Quick, non-invasive and quantitative assessment of small fiber neuropathy in patients receiving chemotherapy, J. Neurooncol. 127 (2016) 373–380, https://doi.org/10.1007/s11060-015-2049-x.
[11] W. Kim, Y. Chung, S. Choi, B.-I. Min, S.K. Kim, Duloxetine protects against oxaliplatin-induced neuropathic pain and spinal neuron hyperexcitability in rodents, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017), https://doi.org/10.3390/ijms18122626.
[12] K. Bradley, M. Laforest, S. Kish, C. Guillemette, Efficacité d'un tableau d'ajustement de l'oxaliplatine selon le grade de neuropathie à l'Hôtel-Dieu de Québec, Pharmactuel. 47 (2014), http://www.pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/951 , Accessed date: 21 June 2018.
[13] Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) version 4.0, Natl. Cancer Inst. (n.d.). http://www.cancer.gov/ (Accessed 29 August 2016).
[14] N. Attal, D. Bouhassira, M. Gautron, J.N. Vaillant, E. Mitry, C. Lepère, P. Rougier, F. Guirimand, Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study, Pain 144 (2009) 245–252, https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.024.
[15] D. Bouhassira, N. Attal, J. Fermanian, H. Alchaar, M. Gautron, E. Masquelier, S. Rostaing, M. Lanteri-Minet, E. Collin, J. Grisart, F. Boureau, Development and validation of the neuropathic pain symptom inventory, Pain 108 (2004) 248–257, https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.024.
[16] M.E. Shy, E.M. Frohman, Y.T. So, J.C. Arezzo, D.R. Cornblath, M.J. Giuliani, J.C. Kincaid, J.L. Ochoa, G.J. Parry, L.H. Weimer, Quantitative sensory testing report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American academy of neurology, Neurology 60 (2003) 898–904, https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000058546.16985.11.
[17] R.S. Johansson, Å.B. Vallbo, G. Westling, Thresholds of mechanosensitive afferents in the human hand as measured with von Frey hairs, Brain Res. 184 (1980) 343–351, https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90803-3.
[18] S. Lu, L. Baad-Hansen, T. List, Z. Zhang, P. Svensson, Somatosensory profiling of intra-oral capsaicin and menthol in healthy subjects, Eur. J. Oral Sci. 121 (2013) 29–35, https://doi.org/10.1111/eos.12014.
[19] R. Rolke, W. Magerl, K.A. Campbell, C. Schalber, S. Caspari, F. Birklein, R.-D. Treede, Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials, Eur. J. Pain Lond. Engl. 10 (2006) 77–88, https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.02.003.
[20] U. Baumgärtner, W. Magerl, T. Klein, H.C. Hopf, R.D. Treede, Neurogenic hyperalgesia *versus* painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain, Pain 96 (2002) 141–151.
[21] E.E.M. Brouwers, A.D.R. Huitema, W. Boogerd, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin, Acta Oncol. Stockh. Swed. 48 (2009) 832–841, https://doi.org/10.1080/02841860902806609.
[22] P. Kokotis, M. Schmelz, E. Kostouros, N. Karandreas, M.-A. Dimopoulos, Oxaliplatin-induced neuropathy: a long-term clinical and neurophysiologic follow-up study, Clin. Colorectal Cancer. (2016), https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.009.
[23] S.B. Park, C.S.Y. Lin, A.V. Krishnan, D. Goldstein, M.L. Friedlander, M.C. Kiernan, Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility, Oncol. 16 (2011) 708–716, https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0248.
[24] T. André, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont, Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer, N. Engl. J. Med. 350 (2004) 2343–2351, https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709.
[25] A.J.M. Beijers, F. Mols, G. Vreugdenhil, A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration, Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer. 22 (2014) 1999–2007, https://doi.org/10.1007/s00520-014-2242-z.
[26] A. Abad, E. Martínez-Balibrea, J.M. Viéitez, V.A. Orduña, P. García Alfonso, J.L. Manzano, B. Massutí, M. Benavides, A. Carrato, M. Zanui, J. Gallego, C. Grávalos, V. Conde, M. Provencio, M. Valladares, R. Salazar, J. Sastre, C. Montagut, F. Rivera, E. Aranda, Genotype-based selection of treatment for patients with advanced colorectal cancer (SETICC): a pharmacogenetic-based randomized phase II trial, Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. (2017), https://doi.org/10.1093/annonc/mdx737.
[27] J.A. Boyette-Davis, C. Eng, X.S. Wang, C.S. Cleeland, G. Wendelschafer-Crabb, W.R. Kennedy, D.A. Simone, H. Zhang, P.M. Dougherty, Subclinical peripheral neuropathy is a common finding in colorectal cancer patients prior to chemotherapy, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 18 (2012) 3180–3187, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0205.
[28] M. Sereno, G. Gutiérrez-Gutiérrez, J.M. Rubio, M. Apellániz-Ruiz, L. Sánchez-Barroso, E. Casado, S. Falagan, M. López-Gómez, M. Merino, C. Gómez-Raposo, N. Rodriguez-Salas, F.Z. Tébar, C. Rodríguez-Antona, Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy, BMC Cancer. 17 (2017) 63, https://doi.org/10.1186/s12885-016-3031-5.

# Annexe 11 : Article n°2 : Quantification of Chronic Oxaliplatin-Induced Hypesthesia in Two Areas of the Hand

ORIGINAL RESEARCH

## Quantification of Chronic Oxaliplatin-Induced Hypesthesia in Two Areas of the Hand

Mihary Andriamamonjy,* Jean-Baptiste Delmotte,* Francesco Savinelli,† Helene Beaussier,* and Francois Coudore‡§

*Clinical Research Center, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France; †Oncology Department, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France; ‡Microbiology Unit, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France; and §CESP, INSERM UMRS 1178, Fac Pharmacie, Univ Paris-Saclay, Univ Paris Sud, Ch tenay-Malabry, France.

**Introduction:** Oxaliplatin is a platinum derivate widely used in cancer treatment but producing dose-limiting peripheral neurotoxicity. Acute neuropathy is characterized by a transient cold-induced distal allodynia, whereas chronic neuropathy leads to sensory loss. To design a method for quantitative assessment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, we developed a study that aims to characterize the most appropriate skin area of the hand to perform sensory tests.

**Methods:** We included patients treated for at least 6 months with oxaliplatin. Thermal sensory tests are assessed using the Thermotest (Somedic) and consist in measuring thermal thresholds in the thenar and in the fingertips of the opposite hand. Results are analyzed using T-Tests comparing thermal sensory thresholds between the two areas of the hand, globally and then individually.

**Results:** In 7 weeks, 12 patients (7 men and 5 women; mean age: 64.5 years) were included, all treated with FOLFOX protocol. Thermal detection thresholds measured on the fingertips are 146% and 108% greater than the ones measured on the palm for cold and warm, respectively ($P < 0.0001$). Thermal pain thresholds are difficult to interpret. Regarding individual tests, 9/12 patients and 8/12 patients experienced hypesthesia to cold and warm, respectively.

**Conclusions:** These results reveal that distal hypesthesia occurring under treatment with oxaliplatin is markedly pronounced in the fingertips; however, as thermal threshold is unknown before treatment, it is difficult to assert that fingertip thermal hypesthesia has developed under treatment. Finally, this short study may be useful to design a method for quantifying oxaliplatin-induced neuropathy.

**Key Words:** Peripheral neuropathy, Oxaliplatin, Hypesthesia, Quantitative sensory testing.

(J Clin Neurophysiol 2016;00: 1–6)

Oxaliplatin is a platinum-based cytotoxic drug widely used in oncology. Its effectiveness is recognized as first-line treatment of gastrointestinal cancers. However, its use is limited by the development of a disabling peripheral neuropathy. Although this side effect occurs very frequently, the pathophysiology of the development of oxaliplatin-induced neuropathy (OIN) is not well understood. Oxaliplatin-induced neuropathy occurs preferentially in the distal part of the members and is characterized by a transient cold-induced distal allodynia and dysesthesia, whereas chronic neuropathy leads to permanent sensory loss, dysesthesia, and functional impairment.[1–3] Oxaliplatin-induced neuropathy has a negative association with quality of life, and these considerations are major issues for palliative care cancer.[4] Performing a clinical trial dealing with oxaliplatin side effects, we noticed that patients experienced greater trouble in the fingertip than in the thenar hand area used in the clinical trial to quantify OIN. Indeed, painful complaints reported by patients concerned abnormal pricking and tingling at the upper extremities. To precisely characterize thermal sensory impairment after chronic exposure to oxaliplatin, we designed a short study that aims to characterize the most affected hand area by OIN. In other words, the objective is to identify the most appropriate hand area to highlight this hypesthesia and finally optimize methodology of clinical or biological study dealing with OIN.

The authors have no conflicts of interest to disclose.
The Clinical Research Center has received grants from Roche laboratory (Paris, France) and APICIL foundation (Lyon, France) to support the studies promoted by Paris Saint Joseph Hospital.
Address correspondence and reprint requests to Jean-Baptiste Delmotte, PharmD, PhD student, Clinical Research Center, Hôpital Paris Saint Joseph, 185 rue Raymond Losserand, 75014 Paris, France; e-mail: jbdelmotte@gmail.com.
Copyright © 2016 by the American Clinical Neurophysiology Society
ISSN: 0736-0258/16/0000-0001
DOI 10.1097/WNP.0000000000000347

## MATERIALS AND METHODS

### Patients' Study

Patients included were above 18 years and had gastrointestinal cancer at any stages. They were recruited in the oncology department of Paris Saint Joseph Hospital. They were treated with oxaliplatin (FOLFOX protocol) for at least 3 months (six cycles). Other inclusion criteria were treatment-naive oxaliplatin and free from preexisting neuropathy. Every 14 days, oxaliplatin is infused in 2 hours at the dose of 85 mg/m$^2$ and associated with 5-fluorouracile and calcium folinate. The study obtained approval from the ethics committee of Ile de France II (CPP Ile de France II). Patients provided written informed consent before study participation. This study was prospectively registered at clinicaltrials.gov (NCT02169908) and is conducted according to the Declaration of Helsinki II.

### Quantitative Sensory Testing

From July to September 2015, patients underwent a bilateral evaluation of thermal sensitivity thresholds at two separate areas of the hand: the thenar and the fingertips. Thermal sensory tests were assessed using the computer-controlled Thermotest device (Somedic AB, Sweden) and consisted in measuring four



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

**TABLE 1.** Patients Characteristics

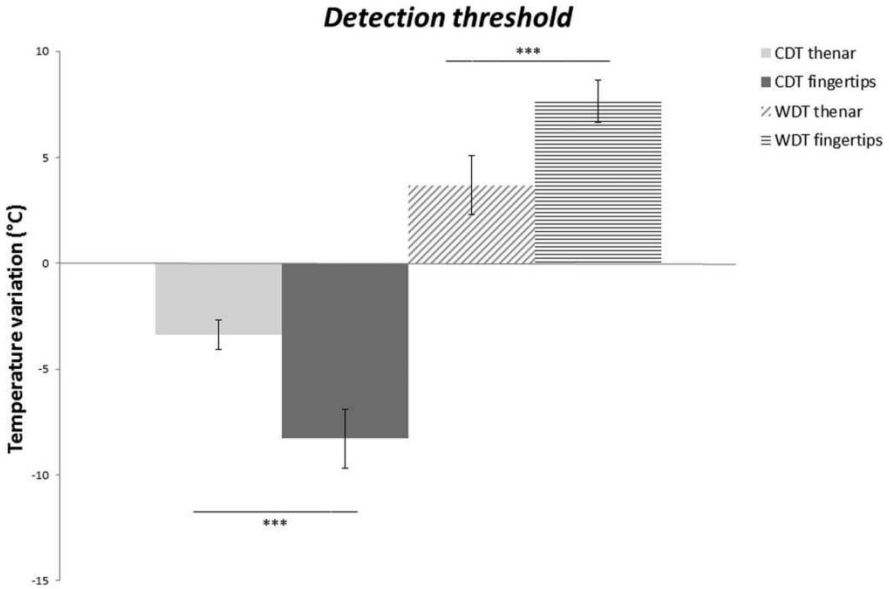
| | |
|---|---|
| Age (mean ± SD) | 64.5 ± 11.7 |
| Sex | |
| Male | 7 (58%) |
| Female | 5 (42%) |
| Primary disease | |
| Colon | 7 |
| Rectum | 2 |
| Colon and rectum | 1 |
| Stomach | 2 |
| Tumor node metastasis (TNM) stage | |
| I | 0 |
| II | 1 |
| III | 5 |
| IV | 6 |
| Cycles (C) | |
| C6–C12 | 8 |
| Follow-up (C12 + 3 months) | 4 |
| Neuropathy grade (according to CTCAE v4.0) | |
| I | 6 |
| II | 5 |
| III | 1 |

CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events.

parameters: cold detection threshold (CDT); warm detection threshold (WDT); cold pain threshold (CPT); and heat pain threshold (HPT) in the thenar of one hand and then in the fingertips (forefinger, middle finger, and ring finger) of the opposite hand, as recommended in scientific literature.[5] Thermal stimuli were applied using a 25-mm wide and 50-mm high Peltier probe applied to the skin. The Thermotest device was set at a baseline temperature of 32°C and stimulus was delivered at 1°C/second in both directions to a defined and stable value (5°C or 50°C). Thresholds measurement was based on the method of limits.[6] For heat and cold detection or pain thresholds, patients were instructed to indicate by clicking on a mouse when they felt a change in temperature or when they could no longer tolerate the temperature, respectively. Mean thresholds of three consecutive measurements, spaced by a random period of 4 to 10 seconds, were calculated.

## Data Analysis

Data were analyzed using Wilcoxon signed rank test comparing thermal sensory thresholds between the two areas of the hand: thenar eminence and fingertips. In the first step, analyses were performed globally on all patients combined and in the second step individually for each patient. We considered




AQ : 11 **FIG. 1.** Cold and warm detection threshold values on thenar or fingertips. Values represent mean ± standard error of mean of temperature differences between detection and basal temperatures on thenar or fingertips after a cold (cold detection threshold, CDT) or a warm stimulation (warm detection threshold, WDT) using the Thermotest device (Somedic) in 12 oxaliplatin-treated patients (64.5 ± 11.7 years) (85 mg/m$^2$, more than 6 cycles of treatment). The light gray bar histogram represents the cold detection threshold measured on the thenar. The dark gray bar histogram represents the cold detection threshold measured on the fingertips. The slanting hatched bar histogram represents the warm detection threshold measured on the thenar and the horizontal hatched bar histogram represents the warm detection threshold measured on the fingertips. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (i.e., 32°C). Statistical analysis use Student *t*-test. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

significant differences between the thermal sensory thresholds for $P$ values lower than 0.05. Both analyses were performed with the statistical software R (version 3.2.2).

## RESULTS

From the 13th of July to the 4th of September 2015, 12 patients were included. Demographic and clinical characteristics are described in Table 1. The neuropathy grade was based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events, an assessment of chemotherapy-induced side effects based only on symptoms. Results showed significant differences in thermal detection thresholds between the values measured at the two areas.

Globally, the mean of CDT measured on the fingertips was significantly higher than the mean of CDT measured on the thenar eminence (8.28 ± 5.07°C; 3.37 ± 2.45°C respectively, $P = 2.77 \times 10^{-5}$). (Fig. 1). Individually, the variation of detection thresholds between thenar and fingertips exceeded 200% for 5 patients of 12 (n°2, 3, 5, 8, and 11). Increases of CDT were in the range of (3.2°C [patient 9] − 14.4°C [patient 8]) and (0.5°C [patient 5] − 7.7°C [patient 10]), respectively, for fingertips and thenar (Fig. 2). In summary, 9 patients of 12 had less sensitivity to cold detection in the fingertips than in the thenar.

In terms of warm detection, mean of WDT measured on the fingertips was also statistically higher than that measured on the thenar (7.65 ± 3.69°C; 3.68 ± 3.06°C, respectively, $P = 10^{-5}$) (Fig. 1). Individually, variation of detection thresholds between thenar and fingertips exceeded 200% for 4 patients of 12 (n°2, 3, 5, 7). Increases of WDT were in the range of (2.4°C [patient n°12] − 15.6°C [patient n°11]) and (0.8°C [patient n°5] − 11°C [patient n°11]), respectively, for fingertips and thenar (Fig. 2). In summary, 8 patients of 12 had less sensitivity to warm detection in the fingertips than in the thenar.

In terms of pain, the values of CPT and HPT were similar in the thenar and the fingertips (Figs. 3 and 4). The CPT measured on the fingertip was 12% higher than the one measured on the thenar (21.78°C vs. 19.52°C; $P = 0.039$); the HPT measured on the fingertips was not statistically different than the one measured

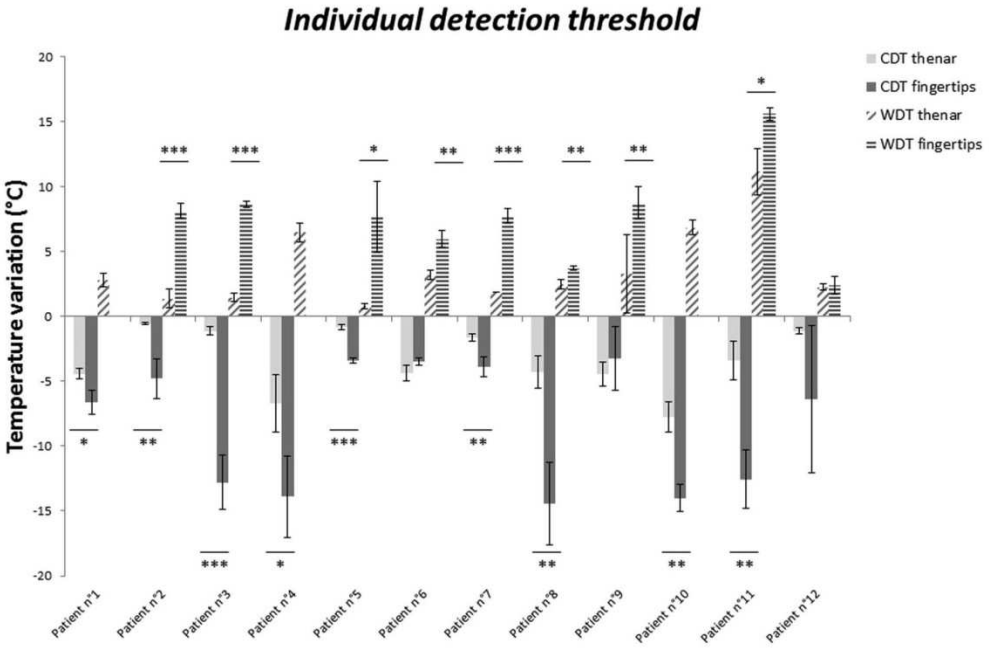



**FIG. 2.** Individual values of cold and warm detection threshold values on thenar or fingertips. Values represent mean ± standard error of mean of three measures of temperature differences between detection and basal temperatures on thenar or fingertips after a cold (cold detection threshold, CDT) or a warm stimulation (warm detection threshold, WDT) using the Thermotest device (Somedic) in each oxaliplatin-treated patient (85 mg/m$^2$, more than 6 cycles of treatment). The light gray bar histogram represents the cold detection threshold measured on the thenar. The dark gray bar histogram represents the cold detection threshold measured on the fingertips. The slanting hatched bar histogram represents the warm detection threshold measured on the thenar and the horizontal hatched bar histogram represents the warm detection threshold measured on the fingertips. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (i.e., 32°C). Statistical analysis use Student $t$-test. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

on the palm (15.8°C vs. 15°C; $P = 0.322$). Regarding individual tests, only 4/12 patients and 2/12 patients experienced a modification in their CPT and HPT, respectively.

## DISCUSSION

Our present results show pronounced local differences between two different contact areas of the hand of oxaliplatin-treated patients: the fingertips and the thenar. We observe that hypesthesia is markedly pronounced in the fingertips. However, the lack of information regarding fingertip thermal sensitivity at the beginning of our study may disturb the interpretation of our results because we did not quantify the difference before treatment. Such a difference was previously observed for cold and warm sensitivity in healthy adults,[7] but temperature differences between fingertips and thenar were higher in our oxaliplatin-treated cohort. Indeed, the gap between fingertips and thenar is 4.91°C in our study versus 0.40°C in Stevens' "study for cold detection threshold" and 3.96 in our study versus 0.55°C in Stevens' "study for warm detection threshold." Because of their important number of healthy patients, we can assume that that the Stevens' "study values represent references ones and correspond to values at the start of our study."

Temperature sensitivity is mediated by thinly myelinated A-delta (cold) and unmyelinated C (warm) nerve fibers. The highest observed OXA-induced hypesthesia in fingertips may be discussed in terms of nerve fibers and receptors. The A-delta fibers transmit perception to cold and pain, whereas the C fibers transmit perception to warm and pain. Thermoreceptors are located on free nerve endings of A-delta and C fibers. The distribution of these sensory innervations could differ markedly between the different areas of the hand in a same individual. These asymmetries also concern the dorsum of the fingers, particularly, for the dorsal branch of the ulnar nerve but also for the superficial branch of the radial nerve.[8] Moreover, the density of skin thermoreceptors is very variable, but it is less important than density of mechanoreceptors. Cold-sensitive items (1–5 cold points per square centimeter in the hand) are more abundant than the warm-sensitive items (0.4 warm points per square centimeter

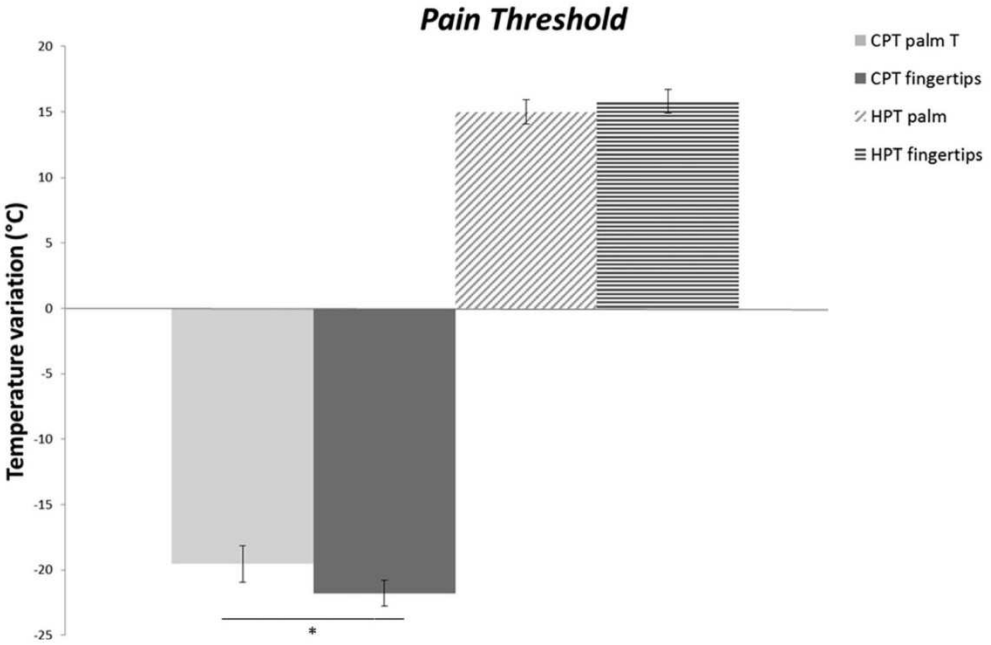



**FIG. 3.** Cold and heat pain threshold values on thenar or fingertips. Values represent mean ± standard error of mean of temperature differences between detection and basal temperatures on thenar or fingertips after a cold (cold pain threshold, CPT) or a heat stimulation (heat pain threshold, HPT) using the Thermotest device (Somedic) in 12 oxaliplatin-treated patients (64.5 ± 11.7 years) (85 mg/m$^2$, more than 6 cycles of treatment). The light gray bar histogram represents the cold pain threshold measured on the thenar. The dark gray bar histogram represents the cold pain threshold measured on the fingertips. The slanting hatched bar histogram represents the heat pain threshold measured on the thenar and the horizontal hatched bar histogram represents the heat pain threshold measured on the fingertips. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (i.e., 32°C). Statistical analysis use Student *t*-test. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

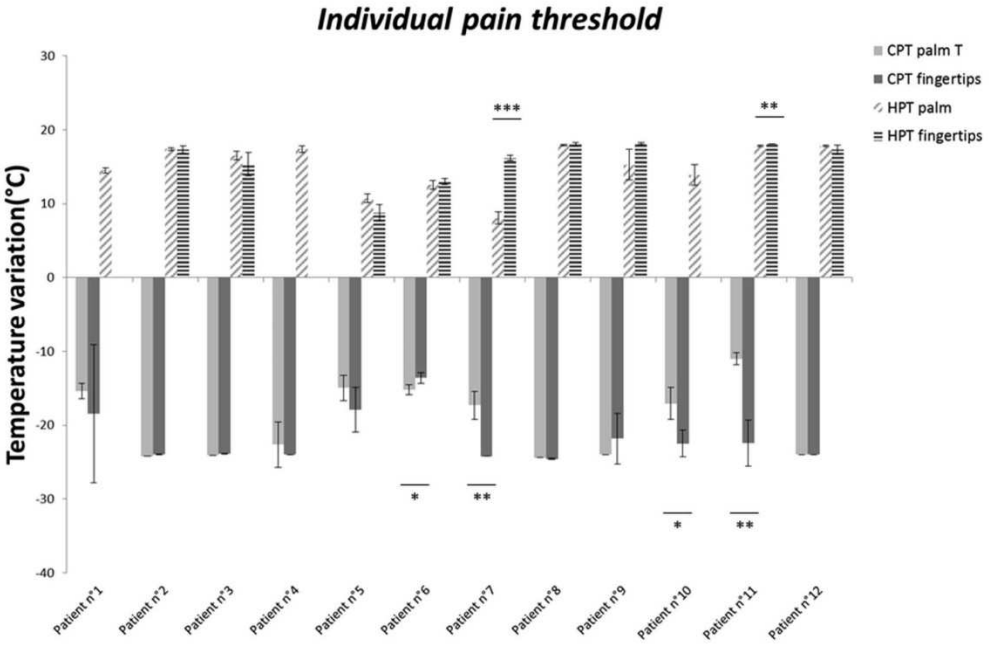



**FIG. 4.** Individual values of cold pain threshold (CPT) and heat pain threshold (HPT) values. Values represent mean ± standard error of mean of three measures of temperature differences between painful and basal temperatures on thenar or fingertips after a cold (cold pain threshold) or a heat stimulation (heat pain threshold) using the Thermotest device (Somedic) in each oxaliplatin-treated patient (85 mg/m$^2$, more than 6 cycles of treatment). The light gray bar histogram represents the cold pain threshold measured on the thenar. The dark gray bar histogram represents the CPDT measured on the fingertips. The slanting hatched bar histogram represents the heat pain threshold measured on the thenar and the horizontal hatched bar histogram represents the heat pain threshold measured on the fingertips. The 0-degree line corresponds to the basal temperature of the thermode (i.e., 32°C). Statistical analysis using Student *t* test. Statistical analysis use Student *t*-test. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

in the hand).[9] Because of the proximo-distal gradient in mechanosensory receptors density in the hand, the concentration of the mechanosensory receptors is higher in the distal parts of the hand than in the thenar.[10] As a consequence, there seems to be a lower innervation density of fibers transmitting thermal sensation in fingertips, possibly due to higher mechanoreceptor density.[11] Oxaliplatin have been involved in a process of nerve fibers loss that innervate the epidermis.[12–14] These intraepidermal nerve fibers (IENFs) are free nerve endings of A-delta and C fibers that enter the epidermis. Other studies have found that IENF loss is most pronounced in areas specific to pain and that loss of IENF is observed in a host of chronic painful neuropathic conditions. As a consequence, we can suppose that oxaliplatin produces a robust painful neuropathy resulting in the loss of IENFs inducing a chronic hypesthesia to cold and warm.[15] However, patients with cancer commonly present a sensorimotor deficit before treatment and these deficits seem to result from disease-related decrease in IENF densities, even before starting chemotherapy.[13,16] Preexisting subclinical neuropathy is likely to progress to grade 2 and 3 chronic neuropathy.[17] This suggests that neurotoxic chemotherapeutic agents cannot be solely blamed for the neuropathic pain but may reveal and intensify a subclinical condition.

Concerning the patients enrolled in the study, we can assert they are free from clinically objectified neuropathy at the beginning of the treatment: all patients included were grade 0 according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events and were rated 0 on the Neuropathic Pain Symptoms Inventory scale. This subclinical neuropathy can be detected thanks to QST assessment.[16] In the framework of the parent study, we did measure palm-CDT and -WDT in the 12 patients at the beginning of the treatment. According to our normal values of palm-CDT and -WDT, we have obtained in 20 healthy volunteers (normal values of CDT: <3.5°C and WDT: <2.8°C), 3 OXA-treated patients had pathologic values for CDT and WDT (patients 1; 4; and 7); one OXA-treated patient had pathologic values for CDT only (patient 12) and one for WDT only (patient 11). Among these 5 patients, only one experienced an increase of CDT by more than 200% (patient 7).

In terms of receptor channels, cold sensations are detected by transient receptor potential melastin 8 (TRPM8) and TRPA1



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

receptor. Kawashiri demonstrated that oxaliplatin and oxalate ions increased membrane expression of TRPM8 in neuronal cultures of murine dorsal root ganglia.[18,19] TRPM8 antagonists as capsazepine, inhibits acute cold allodynia induced by oxaliplatin.[20] These observations suggest that oxaliplatin sensitizes the body to cold by potentiating expression of TRPM8 receptors in acute neuropathy. Because of the deleterious characteristics of OXA on TRPM8, it would be appropriate to study the role of this receptor in the development of OIN.

The results of this study reveal that distal hypesthesia occurring under treatment with oxaliplatin is markedly pronounced in the fingertip. The lack of information regarding fingertip thermal sensitivity at the beginning of the study can disturb the interpretation. According to scientific literature, thermal thresholds are usually higher in the fingertips than in the eminence thenar but these differences are not as important as the ones presented in our study. The results of this ancillary study may be useful to optimize the methodology for quantifying OIN. We could improve this study by performing thermal sensory measures on the fingertips before treatment to allow comparisons of thermal sensitivity before and after exposure to oxaliplatin and performing tactile sensory measures on the fingertips because this area is more sensitive to tactile stimuli. Moreover, the study could be improved by electrophysiological studies such as nerve conduction studies in parallel to the QST to better diagnose chronic polyneuropathies induced by oxaliplatin.[21]

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr C. Dubray from CIC-501 Clermont-Ferrand (France) for his expertise, M. Benkacimi, L. Bendjemar, O. Maiga, and A. Le Neindre from local clinical research center and B. Johansson from SOMEDIC (Sweden) for his technical assistance.

## REFERENCES

1. Attal N, Bouhassira D, Gautron M, et al. Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. Pain 2009;144:245–252.
2. Binder A, Stengel M, Maag R, et al. Pain in oxaliplatin-induced neuropathy—sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. Eur J Cancer Oxf Engl 2007;43:2658–2663.
3. Kokotis P, Schmelz M, Kostouros E, et al. Oxaliplatin-induced neuropathy: a long-term clinical and neurophysiologic follow-up study. Clin Colorectal Cancer Epub February 27, 2016.
4. Mols F, Beijers T, Vreugdenhil G, van de Poll-Franse L. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review. Support Care Cancer 2014;22:2261–2269.
5. Ng Wing Tin S, Ciampi de Andrade D, Goujon C, Planté-Bordeneuve V, Créange A, Lefaucheur JP. Sensory correlates of pain in peripheral neuropathies. Clin Neurophysiol 2014;125:1048–1058.
6. Shy ME, Frohman EM, So YT, et al. Quantitative sensory testing report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 2003;60:898–904.
7. Stevens JC, Choo KK. Temperature sensitivity of the body surface over the life span. Somatosens Mot Res 1998;15:13–28.
8. Stappaerts KH, Van Hees J, Van Den Broeck EA. Peripheral cutaneous nerve distribution to the fingers. Physiother Res Int 1996;1:41–49.
9. Schmidt RF, Thews G. Human physiology. Springer Science & Business Media, 2013.
10. Johansson RS. Tactile sensibility in the human hand: receptive field characteristics of mechanoreceptive units in the glabrous skin area. J Physiol 1978;281:101–125.
11. Wakolbinger R, Roche AD, Stockinger T, Gustorff B, Aszmann OC. Multiregion thermal sensitivity mapping of the hand. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2014;67:1541–1547.
12. Boyette-Davis J, Dougherty P. Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. Exp Neurol 2011;229:353–357.
13. Koskinen MJ, Kautio AL, Haanpää ML, et al. Intraepidermal nerve fibre density in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. Anticancer Res 2011;31:4413–4416.
14. Yeo JH, Yoon SY, Kwon SK, et al. Repetitive acupuncture point treatment with diluted bee venom relieves mechanical allodynia and restores intraepidermal nerve fiber loss in oxaliplatin-induced neuropathic mice. J Pain 2016;17:298–309.
15. Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. Pain 1999;81:135–145.
16. Kosturakis A, He Z, Li Y, et al. Subclinical peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma before chemotherapy is correlated with decreased fingertip innervation density. J Clin Oncol 2014;32:3156–3162.
17. Reddy SM, Vergo MT, Paice JA, et al. Quantitative sensory testing at baseline and during cycle 1 oxaliplatin infusion detects subclinical peripheral neuropathy and predicts clinically overt chronic neuropathy in gastrointestinal malignancies. Clin Colorectal Cancer 2016;15:37–46.
18. Boyette-Davis J, Walters E, Dougherty PM. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. Pain Manag 2015;5:285–296.
19. Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, et al. L type Ca2+ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. Mol Pain 2012;8:7–17.
20. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. Neurosci Lett 2009;458:93–95.
21. Krøigård T, Schrøder H, Qvortrup C, et al. Characterization and diagnostic evaluation of chronic polyneuropathies induced by oxaliplatin and docetaxel comparing skin biopsy to quantitative sensory testing and nerve conduction studies. Eur J Neurol 2014;21:623–629.



Copyright © by the American Clinical Neurophysiology Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

# Annexe 12 : Article n°3 : Electrochemical Skin Conductance as a Marker of Painful Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy

Hindawi
Neurology Research International
Volume 2018, Article ID 1254602, 9 pages
https://doi.org/10.1155/2018/1254602

*Clinical Study*

## Electrochemical Skin Conductance as a Marker of Painful Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy

**Jean-Baptiste Delmotte,[1] Abdulkarim Tutakhail,[2] Kahina Abdallah,[1] Pauline Reach,[3] Marguerite D'Ussel,[4] Gael Deplanque,[5] Hélène Beaussier,[1] and François Coudoré[2,6]**

[1]*Clinical Research Center, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, F-75014, France*
[2]*CESP/UMR-S 1178, Univ. Paris-Sud, Fac. Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, F-92290, France*
[3]*Neurology Department, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, F-75014, France*
[4]*Pain Committee, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, France, F-75014, France*
[5]*Oncology Department, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, F-75014, France*
[6]*Biology Unit, Paris Saint Joseph Hospital, Paris, F-75014, France*

Correspondence should be addressed to Jean-Baptiste Delmotte; jbdelmotte@gmail.com

Received 3 May 2018; Revised 30 July 2018; Accepted 29 August 2018; Published 27 September 2018

Academic Editor: Vincenzo Di Lazzaro

Copyright © 2018 Jean-Baptiste Delmotte et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Purpose.* Oxaliplatin is a platinum compound widely used in gastrointestinal cancer treatment but produces dose-limiting peripheral neuropathy. New insights into oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) assessment are needed to detect more effectively this condition. In this context, we conducted Canaloxa study, a prospective preliminary clinical trial that aimed to investigate how Electrochemical Skin Conductance (ESC), a parameter used in small fiber neuropathy assessment, could be helpful in OIPN diagnosis. *Methods.* Cancer patients treated for at least three months with oxaliplatin and suffering from clinically OIPN were included. Electrochemical Skin Conductance, thermal thresholds, and neuropathic pain were assessed in all included patients. *Results.* During one year, 36 patients were included. The main result was the correlation between ESC and Neuropathic Pain Symptom Inventory score for hands (rho value = -0.69, $p < 0.0001$) and feet (rho value = -0.79, $p < 0.0001$). ESC values were lower in neuropathic patients with painful symptoms than in ones without painful symptoms ($p = 0.0003$ and $p < 0.0001$ for hands and feet, respectively). No correlation was observed between ESC and thermal thresholds. *Conclusion.* These preliminary data suggest that ESC could be a useful objective marker of painful oxaliplatin-induced neuropathy and could complement the use of subjective clinical scales. *This study was prospectively registered on clinicaltrials.gov (*NCT02827916*) before patient recruitment has begun.*

### 1. Introduction

Oxaliplatin is a platinum-based cytotoxic drug widely used in oncology since the early 2000s [1]. Its effectiveness is recognized in first-line chemotherapy regimen in metastatic colorectal cancer and in adjuvant therapy of several gastrointestinal cancers [2–5]. However, its use is limited by a development of a disabling sensitive peripheral neuropathy. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) is characterized by a transient cold-induced distal paresthesia and allodynia, sometimes leading to long-term sensory loss and functional impairment [6–8]. OIPN has a negative association with quality of life and this consideration is a major issue in the case of palliative care cancer [9–11]. Correct assessment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (OIPN) is essential to manage oxaliplatin treatment and therefore limit neuropathy worsening [12].

In clinical practice, OIPN assessment is routinely based on patient-reported outcome and on the National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) grading scale [13]. Whereas these tests are prevailing for OIPN management, the course of this neuropathy remains unpredictable. While symptoms may resolve after chemotherapy is reduced or discontinued, they can also worsen after discontinuation of the treatment [14]. Therefore, new insights into assessment of OIPN are

Table 1: Eligibility criteria of Canaloxa study.

| **Inclusion criteria** |
|---|
| Patient from the Department of Oncology at Paris Saint Joseph Hospital, male or female, aged over 18. |
| Patient suffering from any type of cancer, at any stages (estimated according to the TNM classification) |
| Patients treated with oxaliplatin based regimen for at least 5 cycles (*i.e.,* 10 weeks) |
| Patients with clinical neuropathy objectified according to the NCI-CTCAE v4.0 |
| **Non-inclusion criteria** |
| Patient with brain or leptomeningeal metastasis |
| Patient previously treated with cisplatin |
| Patient addicted to alcohol |
| Diabetic patient (based on fasting glucose) |
| Patient receiving calcium or magnesium salts intravenously |
| Patients with implantable medical devices (pacemakers, implantable defibrillators) |
| Patient suffering from psychiatric disorders |
| Patient treated with at least one of the following drug (active in neuropathic pain relieve): venlafaxin, carbamazepin, gabapentin, pregabalin, clomipramin, amitriptylin, imipramin, and duloxetin. |

needed to detect earlier and more effectively this side effect [15, 16].

In clinical research, OIPN assessment is based on small fiber neuropathy (SFN) assessment which requires at least two of the following three examinations: (1) clinical signs of SFN (pinprick and thermal sensory loss and/or allodynia and/or hyperalgesia), (2) abnormal Quantitative Sensory Testing (QST) such as abnormal warm and/or cold thresholds, and (3) reduced epithelial nerve fiber density (ENFD) assessed by skin biopsy [17].

Recently, Saad et al. report potential interest of Sudoscan® technology (Impeto Medical, Paris, France) in OIPN assessment [18]. The Sudoscan device is a quantitative assessment of small fiber neuropathy and the technology is based on Electrochemical Skin Conductance (ESC) measurement in palm and sole [16, 18, 19]. In small fiber neuropathy, sweat glands are underinnervated and sweat function is altered. As a consequence, ESC reflects the density of intraepidermal nerve fibers (IENF): low ESC is related to reduction in IENF density [20].

To further explore the potential interest of using Sudoscan technology in OIPN assessment, we designed a pilot study, Canaloxa, a prospective and monocentric clinical trial. The objective was to study how ESC values were related to other parameters usually employed in OIPN assessment among which thermal thresholds and neuropathic pain scores.

## 2. Materials and Methods

*2.1. Design of the Study and Regulatory Aspects.* Canaloxa study is a prospective, open-label, single group assignment and monocentric clinical trial which was standing at the Department of Oncology at Paris Saint Joseph Hospital (F-75014). This study was prospectively registered at clinicaltrials.gov (NCT02827916) before patient recruitment has begun and all data concerning study design are available online. Canaloxa study was designed as a current care study. Patients included suffered from gastrointestinal cancer at any stages, were treated with oxaliplatin-based regimen for at least 5 cycles (i.e., 10 weeks), and had a clinical neuropathy according to the NCI-CTCAE v4.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events). This standardized scale was used to grade the severity of neurotoxic adverse events with a score from 0 to 5 (e.g., grade-1: paresthesia or loss of deep tendon reflexes; grade-2: moderate symptoms, limiting activity of daily living (ADL); grade-3: severe symptoms, limiting self-care of ADL) [13]. All inclusion criteria are listed in Table 1. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki (2013 revision) and obtained approval from the ethics committee of Ile de France II (CPP Ile de France II) on April 2016. This study complied with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. Written informed consent was provided to the patients before enrollment. Patients were recruited from April 2016 to March 2017.

*2.2. Clinical Assessment of Neuropathy.* Patients included were assessed for OIPN for only one visit. In addition to the neurological examination based on NCI-CTAE as realized in current practice, OIPN assessment consisted in (1) Electrochemical Skin Conductance assessment using the Sudoscan device (IMPETO Medical, Paris, France) (2) neuropathic pain assessment using the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) scale and (3) thermal sensory assessment using the MSA thermal stimulator (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden).

Before assessment, patients remained in an air-conditioned room (temperature controlled: 22°C ± 2°C) for at least 15 minutes in order to be in stable conditions of blood flow and skin temperature. All the tests were performed by a single trained technician.

*2.2.1. Electrochemical Skin Conductance Assessment.* Electrochemical Skin Conductances were measured with the Sudoscan device (IMPETO Medical, Paris, France). Sudoscan

technology results in a quantitative assessment of small fiber neuropathy. On the technical side, an electrochemical reaction between chloride ions of the sweat and the electrodes produces a current related to the sweat glands innervated by small fibers [19, 21].

Patients were asked to firmly apply bare hands without jewelry and bare feet to the electrodes during the measurement period. The data were displayed on a monitor in the form of a diagram and four ESC values (right and left hands; right and left feet). High conductance (ESC > 60 $\mu$Siemens) is related to a normal sweat function (i.e., no neuropathy) whereas low conductance (ESC < 40 $\mu$Siemens) reveals a dysfunction of the sweat function (advanced peripheral neuropathy). ESC between 40 and 60 $\mu$Siemens represent first signs of peripheral neuropathy. Mean ESC between left and right was calculated to produce a single ESC value for the two hands and a single ESC value for the two feet for each patient. The operator was previously trained with a series of 20 healthy volunteers.

*2.2.2. Neuropathic Pain Assessment.* Neuropathic pain symptoms were recorded, and their severity were scored using the NPSI, a 11-point (0-10) numerical scale of ten neuropathic symptoms (burning, squeezing, pressure, electric shocks, stabbing, pain evoked by a brush, by pressure or by cold, tingling, and pins and needles). The total NPSI score, i.e., the sum of individual subscores out of 100, was calculated [22]. This questionnaire has already been used in previous studies dealing with OIPN [6].

*2.2.3. Thermal Sensory Assessment.* Thermal sensory assessment consisted of measuring four parameters using the MSA thermal stimulator (SOMEDIC AB, Hörby, Sweden): cold detection threshold (CDT), warm detection threshold (WDT), cold pain threshold (CPT), and heat pain threshold (HPT). Thermal stimuli were applied using a Peltier probe (25 mm wide and 50 mm high) applied to the skin of the thenar eminence and to the skin of the sole. The probe was set at a baseline temperature of 32°C and stimulus was delivered at 1°C/s in both directions to a defined and stable value. Thresholds measurement was based on the method of limits [23]. For warm and cold detection thresholds, patients were instructed to indicate by clicking on a mouse as soon as they felt a change in temperature. Mean thresholds were calculated using three consecutive measurements, spaced by a random period of 4-10 seconds. Detection thresholds (CDT, WDT) were presented as a temperature variation, relatively to 32°C (basal temperature) whereas pain thresholds (CPT, HPT) were presented in absolute values. To obtain reproducible and comparable results, instructions given to the patients were standardized and the operator was previously trained with a series of 20 healthy volunteers. In contrast to ESC, normal values of thermal sensitivity thresholds do not reach consensus [24]. Reference thresholds may vary according to the device settings, patient characteristics and environment [23, 25].

*2.3. Statistical Analysis.* Results were presented as mean ± standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM).

Table 2: Characteristics of patients included in Canaloxa study between April 2016 and March 2017 in the Oncology department of Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph (GHPSJ).

| | Patients | |
|---|---|---|
| | n | (%) |
| **Gender** | | |
| **Woman** | 18 | 50 |
| **Man** | 18 | 50 |
| **Age (years)** | | |
| **< 50** | 4 | 11 .11 |
| **[50-60[** | 6 | 16.66 |
| **[60-70[** | 14 | 38.88 |
| **> 70** | 12 | 33.33 |
| **Location of the tumor** | | |
| **Colon** | 12 | 33.33 |
| **Stomach** | 6 | 16.66 |
| **Liver** | 1 | 2.77 |
| **Pancreas** | 9 | 25 |
| **Rectum** | 7 | 19.44 |
| **Peritoneum** | 1 | 2.77 |
| **Cancer Stage** | | |
| **I** | 0 | 0 |
| **II** | 1 | 2.77 |
| **III** | 15 | 41.66 |
| **IV** | 20 | 55.55 |
| **Chemotherapy protocol** | | |
| **FOLFOX** | 26 | 72.22 |
| **FOLFIRINOX** | 9 | 25 |
| **GEMOX** | 1 | 2.77 |
| **Grade of neuropathy according to NCI-CTCAE v4.0** | | |
| **I** | 33 | 91.66 |
| **II** | 3 | 8.33 |

As these data are known to have nonnormal distribution, comparisons tests were based on Wilcoxon tests and correlation tests were based on Spearman test [20]. Receiver operating characteristics (ROC) curves were calculated to compare the utility of ESC in painful OIPN diagnosis. Area under the curve higher than 0.7 was considered to have a good sensitivity and specificity [26].

Statistical analyses were performed with R software, v.64 bits 3.4.1, and $p < 0.05$ was considered to be significant.

## 3. Results

From April 2016 to March 2017, 36 patients were included (18 women and 18 men). The mean age of patients was 64 ± 11 years (range: 26-84). Patient's cancer was predominantly colorectal (n = 19, 52.8%) and at metastatic stage (stage IV) (n = 20, 55.5%). Neuropathy was predominantly at grade I (n = 33, 91.6%) according NCI-CTCAE v4 scale (Table 2).

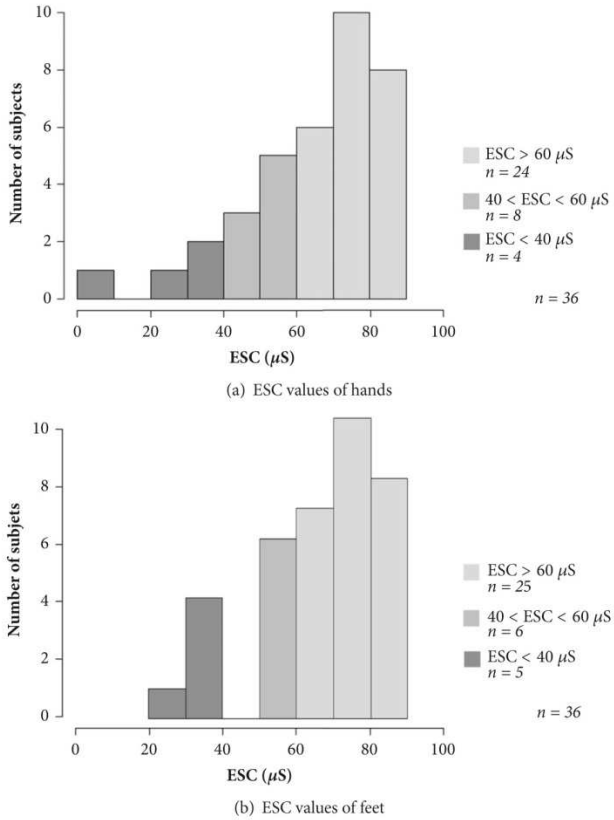



Figure 1: Distribution of the ESC values measured on hands (a) and feet (b) of oxaliplatin-treated patients (n = 36). High conductance values (ESC > 60 $\mu$S): no dysfunction of the sweat function. Intermediate conductance values (40-60 $\mu$S): first signs of a possible peripheral autonomic neuropathy. Low conductance values (ESC < 40 $\mu$S): dysfunction of the sweat function and advanced peripheral neuropathy. ESC: Electrochemical Skin Conductance. $\mu$s: microSiemens.

*3.1. Electrochemical Conductivity of the Skin (ESC).* Mean ESC values were similar between hands and feet: 65.3 ± 19.0 $\mu$S and 65.3 ± 16.6 $\mu$S, respectively. No relationships between ESC and sex, age, or body mass index were highlighted for hands ($p = 0.51$, $p = 0.32$, $p = 0.50$, respectively) and feet ($p = 0.25$, $p = 0.75$, and $p = 0.53$, respectively). Low conductances (ESC < 40 $\mu$S) were detected for 4 patients on hands and 5 patients on feet, whereas intermediate values (40 $\mu$S < ESC < 60 $\mu$S) were detected for 8 patients (hands) and 6 patients (feet) (Figures 1(a) and 1(b)). Normal conductances (ESC > 60 $\mu$S) were detected for 24 patients (hands) and 25 patients (feet). ESC values did not have a normal distribution ($p = 0.01$ and $p = 0.008$ for hands and feet, respectively, Shapiro-Wilk test).

*3.2. Neuropathic Pain.* Regarding neuropathic pain assessed with NPSI questionnaire, pain was declared by 55.5% (20/36) of oxaliplatin-treated patients (Table 3(a)). According to NCI-CTCAE, 51.5% (17/33) of patients with a grade 1 neuropathy and 100% (3/3) with a grade 2 had pain ($p = 0.23$, Fisher exact test). Among them, 90% (18/20) of patients said they felt pain caused by a cold object; 70% and 45% reported pain as prickling and tingling, respectively. One patient declared a pain symptom as electric discharges.

Regarding the relationship between ESC and the presence of a painful neuropathy, ESC values were lower in neuropathic patients with painful symptoms than in patients without painful symptoms: 55.4 ± 19.7 $\mu$S *vs* 77.6 ± 7.9 $\mu$S ($p = 0.0003$) and 55.0 ± 15.0 $\mu$S *vs* 78.1 ± 6.6 $\mu$S ($p < 0.0001$) for hands and feet, respectively, (Figure 2). Furthermore, ESC were correlated with NPSI score for hands (rho = -0.69, $p < 0.0001$) and feet (rho = -0.79, $p < 0.0001$) (Figures 3(a) and 3(b)).

Performance of the Sudoscan device to detect a painful OIPN was estimated with receiver operating characteristics (ROC) curves. Positive NPSI score was used as a reference for the ROC curves of hands and feet ESC (Figure 4). Areas under the ROC curve were employed to assess the performance of the device in term of sensibility and specificity. Areas under the curve were 0.86 and 0.95, for hands and feet,

Table 3

(a) *Neuropathic Pain Assessment.* (1) Number of patients without neuropathic pain (null NPSI score). (2) Number of patients with neuropathic pain (positive NPSI score). (3-5) Number of patients with positive response at questions 10, 11 and 12. NPSI: Neuropathic Pain Symptoms Inventory.

| Neuropathic Pain Assessment | *n* | % |
|---|---|---|
| **(1) NPSI score = 0** | 16 | 44.4 |
| **(2) NPSI score > 0** | 20 | 55.5 |
| **(3) Pain caused by the contact with a cold object (Q10)** | 18 | 90 |
| **(4) Tingling (Q11)** | 9 | 45 |
| **(5) Swarming (Q12)** | 14 | 70 |

(b) *Thermal Sensory Assessment.* Thermal thresholds were measured with the MSA thermal stimulator on hands and feet (n = 36 patients): (i) Cold and Warm Detection Thresholds (CDT, WDT) are presented as relative values (expressed as variations of temperature from the basal temperature of 32°C). (ii) Cold and Heat Pain Thresholds (CPT, HPT) are presented as absolute temperature values.

| Thermal Sensory Assessment | Hands (M ±ET) | Feet (M ±ET) |
|---|---|---|
| **CDT (Δ°C)** | - 3.4 ± 2.2 | - 7.0 ± 4.0 |
| **WDT (Δ°C)** | 2.9 ± 2.0 | 11.6 ± 4.4 |
| **CPT (°C)** | 13.6 ± 6.7 | 12.8 ± 6.8 |
| **HPT (°C)** | 45.6 ± 4.1 | 48.6 ± 4.6 |

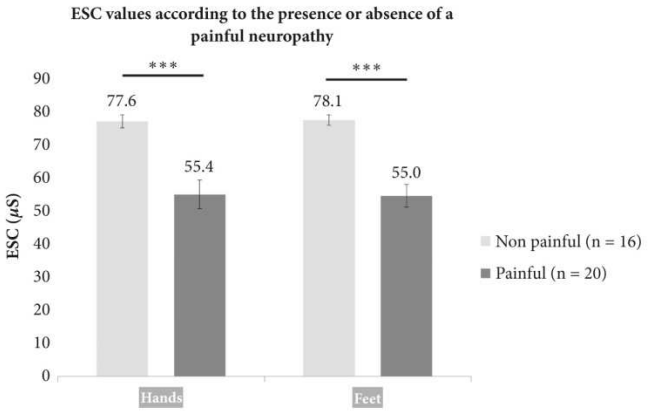



Figure 2: **ESC values measured on hands and feet according to the presence or absence of a painful neuropathy.** ESC values were lower in neuropathic patients with painful symptoms than in patients without painful symptoms: 55.4 ± 19.7 *vs* 77.6 ± 7.9 $\mu$S ($p = 0.0003$) and 55.0 ± 15.0 *vs* 78.1 ± 6.6 $\mu$S ($p < 0.0001$) for hands and feet, respectively.

respectively, higher than 0.7, thus showing a good sensitivity and specificity [26].

*3.3. Thermal Thresholds.* Results are presented in Tables 3(b) and 4. No correlation was found between both detection and pain thresholds (CDT, WDT, CPT, and HPT) and ESC for hands and feet.

## 4. Discussion

The aim of this work was to explore oxaliplatin-induced peripheral neuropathy with the Sudoscan device, a recent technology based on Electrochemical Skin Conductance measurement and already used in diabetic-induced peripheral neuropathy diagnosis. The onset of OIPN remaining unpredictable, new insights into OIPN assessment are needed to detect and prevent more effectively this side effect. In this context, Sudoscan is being assessed to test its opportunity in OIPN diagnosis [18].

In Canaloxa study, pathological Electrochemical Skin Conductance (ESC) was detected for approximately one-third of neuropathic patients with a mean ESC value of 65.3 ± 19.0 $\mu$S for hands and 65.3 ± 16.6 $\mu$S for feet. These figures are consistent with the few first ones published for oxaliplatin-treated patients. In Saad et al. study, ESC measured in oxaliplatin-treated patients were 63 ± 2 $\mu$S in hands and 66 ± 3 $\mu$S in feet. ESC values are known to have a nonnormal distribution, as confirmed by a Shapiro-Wilk test, which made us choose nonparametric tests such as Spearman correlation test and Wilcoxon test. Novak asserts that ESC values can be normalized with weight [20]. The main result of this study is the correlation between

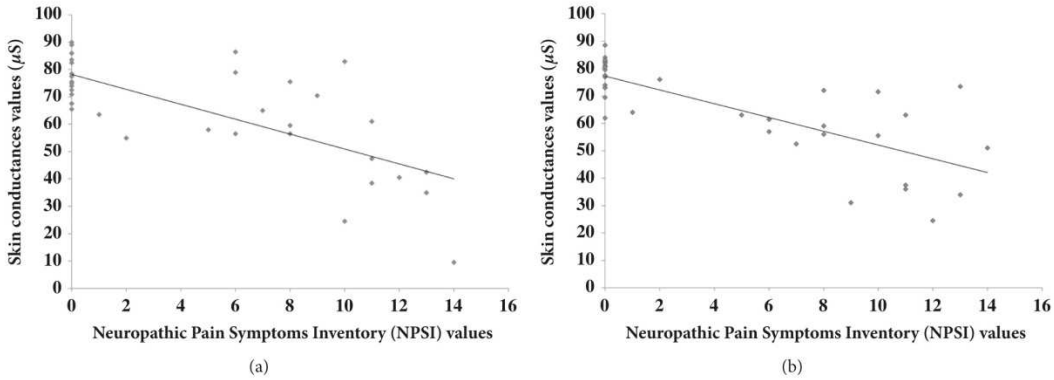



FIGURE 3: Correlation graphs between Electrochemical Conductance (ESC) in $\mu$Siemens ($\mu$S) of hands (a) and feet (b) of treated patients and Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) scores (n = 36). ESC are correlated with NPSI score for hands (rho = -0.69, $p < 0.0001$) and feet (rho value = -0.79, $p < 0.0001$).

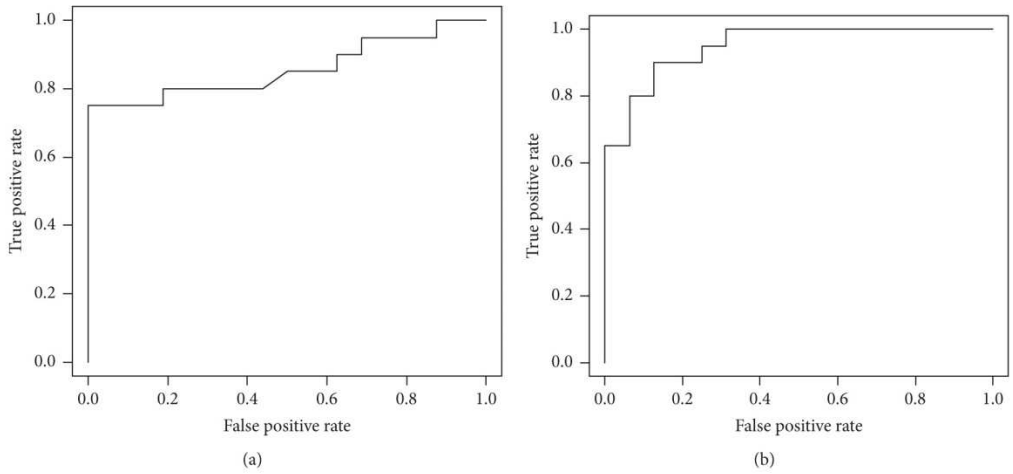



FIGURE 4: **Receiver operating characteristics (ROC) curves for ESC of hands (a) and feet (b) using a positive NPSI score as reference.** AUC = 0,86 for (a) and AUC = 0,95 for (b). (20 patients with painful symptoms and 16 patients without painful symptoms).

TABLE 4: Matrices of correlation crossing ESC values and thermal thresholds. Spearman tests were performed. CDT, WDT: Cold and Warm Detection Thresholds. CPT, HPT: Cold and Heat Pain Thresholds. ESC: Electrochemical Skin Conductance.

| | ESC of hands | | ESC of feet | |
|---|---|---|---|---|
| | rho | $p$ | rho | $p$ |
| CDT (hands, feet) | -0.007 | 0.97 | 0.18 | 0.28 |
| WDT (hands, feet) | 0.20 | 0.25 | -0.14 | 0.40 |
| CPT (hands, feet) | 0.00 | 0.99 | -0.07 | 0.69 |
| HPT (hands, feet) | 0.14 | 0.42 | -0.13 | 0.47 |

the ESC values (hands and feet) and the NPSI score. The ESC was diminished in neuropathic patients with painful symptoms compared to ones without painful symptoms. This relationship was associated with a high performance of the Sudoscan device to diagnose painful OIPN. ROC curve analysis showed significant results for both hands and feet ESC. It is interesting to notice that ESC is fully objective whereas NPSI score is fully subjective. In the same way, there was a relationship between ESC and another subjective score, the Total Neuropathy Score (TNSc), in oxaliplatin-treated patients [18]. In Novak et al. study, ESC failed to correlate with NPSI score [20]. However, in this study, ESC was adjusted for weight and the population was different, with no chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Interestingly, when adjusted for weight, our normalized ESC values have a normal distribution ($p = 0.942$ for hands and $p = 0.14$ for feet, Shapiro-Wilk test). However, these normalized ESC no longer correlate with NPSI score (rho values = -0.36 and -0.42 for hands and feet, respectively). According to Novak, ESC could be affected by subjects' weight because of the variation of pressure on the stainless steel electrodes, but concomitant studies showed no obvious correlation between ESC and weight [20, 27]. Facing this inconsistency, it cannot be excluded that there is a little influence of weight on ESC. Such a minimal influence may perhaps reduce an existing difference between patients with low ESC/high NPSI and patients with high ESC/low NPSI resulting in a reduction of the statistical tests' power after normalization. A study with more patients could bring a response to that question. According to the manufacturer, interpretation of ESC values is based on raw values, what has been respected here.

Platinum derivatives are already known to impair neurite outgrowth [28]. Nerve damage was thereafter confirmed by clinical studies using human skin biopsies [29] and *in vitro* studies [30]. ESC is diminished in patients who have a reduced number of IENF and this reduction is proportional to the density of fibers [20]. Compared to skin biopsies, the interest of Sudoscan device is its noninvasive nature. As ESC was diminished in our OIPN patients with painful symptoms, this study suggests that oxaliplatin could impair small nerve fibers. Nerve cells damage caused by oxaliplatin would be responsible for the pain of OIPN. However, cancer or vitamins deficiency can cause subclinical neuropathy, so we cannot assert that oxaliplatin is exclusively responsible for the nerve impairment [29, 31].

It should be noticed that two-thirds of the neuropathic patients had normal ESC. We can wonder whether (1) ESC was not sensitive enough for OIPN diagnosis or whether (2) ESC can only diagnose painful OIPN. Regarding sensitivity of Sudoscan device to detect OIPN, it should be noticed that, in many neurotoxic processes such as diabetic neuropathy, vegetative disorders are of late onset. By analogy, normal ESC in neuropathic patients could be explained by the delayed onset of vegetative oxaliplatin-neuropathy [32]. This may indicate that oxaliplatin toxic process during the first three months of treatment would not be sufficient to induce impairment of sweat gland function although all patients experiment clinical neuropathy, according to the NCI-CTCAE. There is potentially a poor sensitivity of this method in OIPN detection. A recent meta-analysis dealing with the reliability of the ESC to measure sudomotor or sensory nerve fiber function has questioned this test. According to Rajan et al., large combined data sets of the studies included in the meta-analysis do not support a high sensitivity and specificity. Besides, the pathological thresholds of ESC could depend on pathophysiological parameters and ethnicity [33]. It is obvious that further studies taking into account these concerns could clarify the question. Regarding painful neuropathy detection, low ESC were measured in patients in pain essentially, but, in Saad et al. study, low ESC were measured in neuropathic patients more generally [18]. We can also wonder whether the suitable neurological fibers were explored. Indeed, the Sudoscan device does not explore larger sizes fibers (*e.g.* A-delta). It might be relevant to perform in a future work a nerve conduction study (NCS) to assess large fibers conduction and to better understand whether ESC may be influenced in part by dysfunction of these large fibers in oxaliplatin-treated patients. Indeed, in diabetic subjects, ESC correlates with NCS [34].

Thermal thresholds measured were consistent with those published in previous studies dealing with OIPN [7]. Thermal thresholds in oxaliplatin-treated patients seemed to be greater than in nontreated patients that suggest the onset of a small fiber pathology in these patients [25, 32]. This consideration could reveal a hypoesthesia to thermal stimuli that impair with treatment. No correlation was observed between ESC values and thermal detection or pain thresholds. This suggests that the Sudoscan device and the MSA thermal stimulator assess different nerve fibers function. The Sudoscan device assesses amyelinic sympathetic C-fibers which innervate the sweat glands while the MSA thermal stimulator assess myelinated A-delta fibers and unmyelinated C-fibers. More precisely, warmth receptors are thought to be unmyelinated C-fibers, while those responding to cold have both C-fibers and thinly myelinated A-delta fibers [35]. A painful thermal stimulus is mediated by C-fibers. The poor sensitivity of thermal thresholds to diagnose small fiber neuropathy was already reported [36, 37]. Reproducibility is low and pain thresholds are even more dispersed than detection thresholds [38]. As a matter of fact, interpretation of thermal thresholds is a little bit tender. Thermal thresholds depend on many psychological and physiological, innate and acquired factors. Environmental conditions, instructions given by the manipulator, patient motivation, and ethnic origin may also contribute to the variability of the results [23]. So, some physiological elements, like the variation of the thickness of the *stratum corneum*, may have introduced measurement biases in the thermal thresholds measurement, which could explain the absence of correlation between the different tests.

Canaloxa study was a preliminary study with a limited number of patients and with one-day assessment. This pilot study was conducted to investigate the feasibility of the Sudoscan device to detect OIPN before performing a longitudinal and controlled study with a larger number of patients. ESC values collected in this study provided information about ESC distribution and standard deviation, essential information for the design of the future study.

A control group of cancer-matched patients, not treated with oxaliplatin, and a longitudinal study with ESC values measured before treatment are necessary to attribute the neurological impairment to oxaliplatin. Moreover, regarding non-inclusion criteria, it could be relevant to perform a screening for autonomic symptoms and to dose folates and B12 vitamins at inclusion.

## 5. Conclusion

In conclusion, this study suggests that painful OIPN could be detected using the Sudoscan device. Electrochemical Skin Conductance measurement is a promising, easy-to-perform, and noninvasive test that could be done in current care practice to help the clinician in OIPN management. Otherwise, this study toughens the comprehension of the pathophysiology of OIPN in the field of small fiber neuropathy. However, Canaloxa was a feasibility study and these results have to be confirmed by a longitudinal and controlled study with in a greater number of patients.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Additional Points

Electrochemical Skin Conductance correlates with neuropathic pain symptoms inventory score in a 3-months oxaliplatin-treated patients (n = 36) but does not correlate with thermal sensitivity tests.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors thank all members of local clinical research center for their useful help, Michel Petitjean (Paris Diderot University) and Mathieu Lazerges (Paris Descartes University) for their assistance in data analysis, and Bo Johansson from SOMEDIC (Sweden) for his technical assistance. The Clinical Research Center has received grants from APICIL foundation (Lyon, France) to support the studies promoted by Paris Saint Joseph Hospital.

## References

[1] J. Graham, M. Muhsin, and P. Kirkpatrick, "Oxaliplatin," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 1, pp. 11-12, 2004.

[2] T. André, C. Boni, M. Navarro et al., "Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 19, pp. 3109–3116, 2009.

[3] D. G. Haller, J. Tabernero, J. Maroun et al., "Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 11, pp. 1465–1471, 2011.

[4] W. Xu, M. Kuang, Y. Gong, C. Cao, J. Chen, and C. Tang, "Survival benefit and safety of the combinations of FOLFOXIRI ± bevacizumab versus the combinations of FOLFIRI ± bevacizumab as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: A meta-analysis," *OncoTargets and Therapy*, vol. 9, pp. 4833–4842, 2016.

[5] E. Raymond, S. Faivre, J. M. Woynarowski, and S. G. Chaney, "Oxaliplatin: Mechanism of action and antineoplastic activity," *Seminars in Oncology*, vol. 25, no. 2, pp. 4–12, 1998.

[6] N. Attal, D. Bouhassira, M. Gautron et al., "Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: A prospective quantified sensory assessment study," *PAIN*, vol. 144, no. 3, pp. 245–252, 2009.

[7] A. Binder, M. Stengel, R. Maag et al., "Pain in oxaliplatin-induced neuropathy - Sensitisation in the peripheral and central nociceptive system," *European Journal of Cancer*, vol. 43, no. 18, pp. 2658–2663, 2007.

[8] P. Kokotis, M. Schmelz, E. Kostouros, N. Karandreas, and M.-A. Dimopoulos, "Oxaliplatin-Induced neuropathy: a long-term clinical and neurophysiologic follow-up study," *Clinical Colorectal Cancer*, vol. 15, no. 3, pp. e133–e140, 2016.

[9] F. Mols, T. Beijers, G. Vreugdenhil, and L. Van De Poll-Franse, "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: A systematic review," *Supportive Care in Cancer*, vol. 22, no. 8, pp. 2261–2269, 2014.

[10] M. Stefansson and P. Nygren, "Oxaliplatin added to fluoropyrimidine for adjuvant treatment of colorectal cancer is associated with long-term impairment of peripheral nerve sensory function and quality of life," *Acta Oncologica*, vol. 55, no. 9-10, pp. 1227–1235, 2016.

[11] C. Tofthagen, K. A. Donovan, M. A. Morgan, D. Shibata, and Y. Yeh, "Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy's effects on health-related quality of life of colorectal cancer survivors," *Supportive Care in Cancer*, vol. 21, no. 12, pp. 3307–3313, 2013.

[12] M. W. Saif and J. Reardon, "Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy," *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 1, pp. 249–258, 2005.

[13] National Cancer Institute, "Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0," http://www.cancer.gov/, 29 Aug 2016.

[14] M. S. Trivedi, D. L. Hershman, and K. D. Crew, "Management of Chemotherapy-induced peripheral neuropathy," *American Journal of Hematology / Oncology®*, vol. 11, 2015.

[15] J. Calvet, J. Dupin, H. Winiecki, and P. Schwarz, "Assessment of small fiber neuropathy through a quick, simple and non invasive method in a german diabetes outpatient clinic," *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, vol. 121, no. 02, pp. 80–83, 2013.

[16] A. G. Smith, M. Lessard, S. Reyna, M. Doudova, and J. R. Singleton, "The diagnostic utility of Sudoscan for distal symmetric peripheral neuropathy," *Journal of Diabetes and its Complications*, vol. 28, pp. 511–516, 2014.

[17] G. Devigili, V. Tugnoli, P. Penza et al., "The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology," *Brain*, vol. 131, part 7, pp. 1912–1925, 2008.

[18] M. Saad, D. Psimaras, C. Tafani et al., "Quick, non-invasive and quantitative assessment of small fiber neuropathy in patients receiving chemotherapy," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 127, no. 2, pp. 373–380, 2016.

[19] C. M. Casellini, H. K. Parson, M. S. Richardson, M. L. Nevoret, and A. I. Vinik, "Sudoscan, a noninvasive tool for detecting diabetic small fiber neuropathy and autonomic dysfunction," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 15, no. 11, pp. 948–953, 2013.

[20] P. Novak, "Electrochemical skin conductance correlates with skin nerve fiber density," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 8, 2016.

[21] B. I. Freedman, S. C. Smith, B. M. Bagwell, J. Xu, D. W. Bowden, and J. Divers, "Electrochemical skin conductance in diabetic kidney disease," *American Journal of Nephrology*, vol. 41, pp. 438–447, 2015.

[22] D. Bouhassira, N. Attal, J. Fermanian et al., "Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory," *PAIN*, vol. 108, no. 3, pp. 248–257, 2004.

[23] M. E. Shy, E. M. Frohman, Y. T. So et al., "Quantitative sensory testing: report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American academy of neurology," *Neurology*, vol. 60, no. 6, pp. 898–904, 2003.

[24] R. Rolke, R. Baron, C. Maier et al., "Quantitative sensory testing in the German research network on neuropathic pain (DFNS): standardized protocol and reference values," *PAIN*, vol. 123, pp. 231–243, 2006.

[25] CHOO JCSKK, "Temperature sensitivity of the body surface over the life span," *Somatosensory & Motor Research*, vol. 15, pp. 13–28, 1998.

[26] J. N. Mandrekar, "Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 5, no. 9, pp. 1315-1316, 2010.

[27] A. I. Vinik, A. G. Smith, J. R. Singleton et al., "Normative values for electrochemical skin conductances and impact of ethnicity on quantitative assessment of sudomotor function," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 18, no. 6, pp. 391–398, 2016.

[28] F. R. Luo, S. D. Wyrick, and S. G. Chaney, "Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 44, no. 1, pp. 29–38, 1999.

[29] M. J. Koskinen, A.-L. Kautio, M. L. Haanpää et al., "Intraepidermal nerve fibre density in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy," *Anticancer Reseach*, vol. 31, no. 12, pp. 4413–4416, 2011.

[30] F. Massicot, G. Hache, L. David et al., "P2X7 cell death receptor activation and mitochondrial impairment in oxaliplatin-induced apoptosis and neuronal injury: cellular mechanisms and in vivo approach," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, p. e66830, 2013.

[31] A. K. Kosturakis, Z. He, Y. Li et al., "Subclinical peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma before chemotherapy is correlated with decreased fingertip innervation density," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, no. 28, pp. 3156–3162, 2014.

[32] S. B. Park, C. S. Y. Lin, A. V. Krishnan, D. Goldstein, M. L. Friedlander, and M. C. Kiernan, "Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility," *The Oncologist*, vol. 16, no. 5, pp. 708–716, 2011.

[33] S. Rajan, M. Campagnolo, B. Callaghan, and C. H. Gibbons, "Sudomotor function testing by electrochemical skin conductance: does it really measure sudomotor function?" *Clinical Autonomic Research*, 2018.

[34] D. Selvarajah, T. Cash, and J. Davies, "SUDOSCAN: a simple, rapid, and objective method with potential for screening for diabetic peripheral neuropathy," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 10, Article ID e0138224, 2015.

[35] I. Darian-Smith, K. O. Johnson, C. LaMotte, Y. Shigenaga, P. Kenins, and P. Champness, "Warm fibers innervating palmar and digital skin of the monkey: Responses to thermal stimuli," *Journal of Neurophysiology*, vol. 42, no. 5, pp. 1297–1315, 1979.

[36] J.-P. Lefaucheur, A. Wahab, V. Planté-Bordeneuve et al., "Diagnosis of small fiber neuropathy: A comparative study of five neurophysiological tests," *Neurophysiologie Clinique / Clinical Neurophysiology*, vol. 45, no. 6, pp. 445–455, 2015.

[37] K. Tobin, M. J. Giuliani, and D. Lacomis, "Comparison of different modalities for detection of small fiber neuropathy," *Clinical Neurophysiology*, vol. 110, no. 11, pp. 1909–1912, 1999.

[38] S. N. W. Tin, D. C. d. Andrade, C. Goujon, V. Planté-Bordeneuve, A. Créange, and J.-P. Lefaucheur, "Sensory correlates of pain in peripheral neuropathies," *Clinical Neurophysiology*, vol. 125, no. 5, pp. 1048–1058, 2014.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

**Titre :** Etude des marqueurs de la neuropathie à l'oxaliplatine

**Mots clés :** Oxaliplatine, Neuropathie, Douleur, Conductances Electrochimique de la Peau, Lipidomique, Recherche Clinique

**Résumé :**

L'oxaliplatine (OXA) est un anticancéreux couramment employé en oncologie, son efficacité étant reconnue en première ligne dans le traitement de nombreux cancers. Cependant, son utilisation est limitée par l'apparition de neuropathies impactant la qualité de vie du patient. Pour identifier et étudier des marqueurs cliniques, plasmatiques et électrochimiques de neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine (NPIO), deux études pilotes (LIPIDOXA et CANALOXA) ont été réalisées.
Les patients de l'étude LIPIDOXA ont été inclus avant traitement par OXA et ont été évalués avant traitement, tout au long du traitement et six mois après l'arrêt. Entre mai 2014 et juin 2016, 35 patients ont été inclus. L'apparition d'une hypoesthésie thermique distale a été mise en évidence six mois après arrêt de l'OXA, révélateur d'un processus neurotoxique qui se poursuit même après l'arrêt du traitement. L'étude des marqueurs plasmatiques a révélé, en fin de traitement, une augmentation de la production de prostaglandines E2, un niveau moins élevé de stress oxydant chez les patients souffrant d'une neuropathie de grade 2 ainsi qu'une diminution de la concentration des triglycérides polyinsaturés associée à une tendance à l'augmentation des acides gras libres polyinsaturés.
Les patients de l'étude CANALOXA, tous neuropathiques, ont été inclus en cours de traitement par OXA et évalués une seule fois. Entre avril 2016 et mars 2017, 36 patients ont été inclus. Les valeurs des conductances électrochimiques de la peau (ESC) étaient pathologiques pour un tiers des patients. Les valeurs d'ESC étaient bien corrélées avec le score de douleur neuropathique. Ces marqueurs sont cependant peu spécifiques et semblent d'apparition tardive. Aussi, ils sont difficilement utilisables en pratique clinique pour un éventuel suivi de la tolérance neurologique au traitement. Au-delà de l'apport clinique et thérapeutique modéré, ce travail renforce la compréhension de la physiopathologie de la NPIO dans le domaine de la neuropathie à petites fibres, les processus inflammatoires associés et la perturbation du métabolisme lipidique chez le patient traité par oxaliplatine.
La complémentarité et les similarités de ces travaux rappellent que la prise en charge du patient doit être globale et conjuguer des éléments variés au sein desquels le patient doit rester au cœur de la gestion de la NPIO. Ce projet de recherche s'inscrit dans projet plus général et les résultats des études pilotes constituent une base pour approfondir les travaux.

**Title :** Study of markers of oxaliplatin-induced neuropathy

**Keywords :** Oxaliplatin, Neuropathy, Pain, Electrochemical Skin Conductance, Lipidomic, Clinical Research

**Abstract :** Oxaliplatin (OXA) is an anti-cancer drug widely used in oncology, its effectiveness is recognized in first-line chemotherapy regimen in many cancers. However, its use is limited by an onset of a disabling peripheral neuropathy with a negative association with quality of life. To identify and study clinical, plasma and electrochemical markers of oxaliplatin-induced chronic neuropathy (OIPN), two pilot studies (LIPIDOXA and CANALOXA) were conducted.
Patients in the LIPIDOXA study were included prior to OXA treatment and were evaluated before treatment, during treatment, and six months after discontinuation. Between May 2014 and June 2016, 35 patients were included. The onset of a distal thermal hypoaesthesia was highlighted six months after OXA completion, revealing a neurotoxic process that extends beyond treatment. The study of plasma markers revealed, at the end of treatment, an increase of prostaglandins E2 release, a lower level of oxidative stress in patients suffering from grade-2 neuropathy as well as a decrease in the concentration of polyunsaturated triglycerides associated with a tendency in polyunsaturated free fatty acids increase. The patients in the CANALOXA study, all neuropathic, were included during treatment with OXA and evaluated once. Between April 2016 and March 2017, 36 patients were included. The values of the electrochemical conductances of the skin (ESC) were pathological for one third of patients. ESC values were well correlated with the neuropathic pain score.
However, these markers are sparsely specific and seem to be of late onset. Thus, they are not suitable for a possible monitoring of the neurological tolerance of the treatment in the current care practice. Beyond the moderate clinical and therapeutic contribution, this work strengthens the understanding of the pathophysiology of OIPN in the field of small-fiber neuropathy, the associated inflammatory processes and the disruption of lipid metabolism in the patient treated with oxaliplatin.
The complementarity and similarity of this work remind us that the patient care must be global and combine various elements in which the patient must remain at the heart of the management of the OIPN. This research project is part of a larger project and the results of these pilot studies constitute the basis for further research in this field.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France