



HAL
open science

Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur osseuse du cancer de la prostate.

Mélissa Cuména1

► **To cite this version:**

Mélissa Cuména1. Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur osseuse du cancer de la prostate.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC114 . tel-04224012

HAL Id: tel-04224012

<https://theses.hal.science/tel-04224012>

Submitted on 1 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2021



N° d'ordre

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE
ET ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de docteur

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Neurosciences

Soutenue le 01 mars 2021

Mélissa Cuménal

**Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement
de la douleur osseuse du cancer de la prostate**

Rapporteurs	Dr. Dimitra GKIKA	CANTHER UMR9020 CNRS - UMR-1277 Inserm, Lille
	Dr. Claire MAGNON	LCM - UMR SGCSR, Paris
	Pr. Jacques NOEL	IPMC – UMR 7275 CNRS, Valbonne
Membres	Dr. Lénaïc MONCONDUIT	NeuroDol – UMR 1107 Inserm, Clermont-Ferrand
Directeur	Dr. Jérôme BUSSEROLLES	NeuroDol – UMR 1107 Inserm, Clermont-Ferrand
Président	Pr. Laurent MOREL	GReD – UMR 1103 CNRS/Inserm, Clermont-Ferrand

NeuroDol UMR 1107 INSERM/UCA

Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur
Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-
Ferrand

A mes proches

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, le professeur Denis Ardid de m'avoir accueillie au sein du laboratoire NeuroDol et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie le professeur Jacques Noël, le docteur Claire Magnon et le docteur Dimitra Gkika d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en qualité de rapporteur. Je remercie, bien sûr, le docteur Lénaïc Monconduit et le professeur Laurent Morel d'avoir accepté de participer à ma thèse en tant que membre.

Je remercie le docteur Silvère Baron et le docteur Laurent Guy, pour avoir contribué à la réflexion et l'évolution de ces travaux de thèse, en participant à mes comités de suivi de thèse.

J'adresse d'immenses remerciements à mon directeur de thèse Jérôme Busserolles. Merci d'avoir accepté de m'encadrer durant cette thèse, pour toutes les idées, tes conseils, ta disponibilité et l'aide précieuse que tu m'as apporté notamment durant la rédaction de ce manuscrit. Je te remercie de m'avoir transmis ta rigueur scientifique ainsi qu'une partie de tes compétences. Pour moi, cette thèse s'est révélée être une réelle aventure. Rien ne s'est déroulé comme prévu, et à chaque étape se présentait un nouvel obstacle à surmonter. Si mon proverbe initial était : "qui ne tente rien n'a rien", à l'heure actuelle je dirais plutôt : "qui tente quelque chose avec moi a la poisse". Je pense que tu peux en attester. Je ne peux que te remercier d'avoir toujours pris avec le sourire toutes ces fois où je suis arrivée un peu cabossée au labo. Je suis toujours convaincue qu'on a besoin d'un shaman dans la team Busserolles !

Merci à tous les membres du laboratoire :

Merci à Fabien Marchand pour nos nombreuses discussions et la ferveur qu'il a manifesté à l'égard de mon travail. Après toutes ces bières, je te remercie de m'avoir convaincue qu'une Guinness ne se bois qu'en pinte... Merci à Stéphane Lolignier pour être mon Google trad reconnue officiellement. Merci à Mathieu Meleine pour toute l'aide que tu m'as apporté surtout ces derniers temps, je n'aurai jamais pu envoyer autant de manip sans toi. Merci à Laurence Terrail de m'avoir coaché durant le master et de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire, ce qui me permet de remercier Mélina Bégou, ma première tutrice au sein du laboratoire. Merci pour les apéros bières durant les parties de Molky et notre première partie de luge à Clermont-Ferrand. Frédéric Carvalho pour les différents concours organisés, durant les périodes de fêtes

Remerciements

ou encore pour la coupe du monde de foot. Merci à Florian Jacquot, mon ours en guimauve pour toutes ces discussions et ces moments de complicité lors des soirées et des congrès. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour tes nouvelles aventures avec ta famille, même si je reste persuadée que la recherche perd un grand scientifique. Merci à David Balayssac qui m'a permis de mettre un pied dans l'écriture de revues scientifiques. Merci à Youssef Aissouni alias « Youyou », je ne sais vraiment pas comment je vais faire mes manip sans toi. Ne t'en fais pas je compte bien t'embêter encore de temps en temps car je sais que je vais un peu te manquer quand même.

Je remercie aussi les techniciens qui m'ont toujours apporté l'aide dont j'avais besoin professionnellement et bien plus encore. Julie pour les séances mots fléchés dans la cuisine et pour tes phrases innocentes qui nous ont fait mourir de rire. Sans oublier ta participation à ces apéros Molkky. Un grand merci à notre mimi number 1, Mireille, car même si nous n'avons pas beaucoup manipé ensemble, nos discussions et nos fous-rires ont rendues ma thèse bien plus agréable. Merci pour tes qualités humaines et ton altruisme. Laëtitia pour toutes ces heures passées ensemble en chirurgie, en dissections (même si le grand chef Jérôme râle quand tu te mets à chanter) et en papotage. Merci d'avoir relu et corrigé ce manuscrit. Et bien sûr, je te remercie pour ce que tu m'as apporté amicalement, et te souhaite beaucoup de bonheur avec ta magnifique famille et ton petit dernier Thomas dont j'ai eu la chance de suivre le parcours.

Merci à Christophe Mallet, Aurore Collin, Christine Courteix, Éric Chapuy, Emilie Cléménçon, Frédéric Libert, Benoit Sion, Agathe Gelot, Catherine Coudert, Stéphane Doly, Nicolas Authier vous avez tous apportés une pierre à « l'édifice » et à la personne que je suis aujourd'hui.

Merci également aux membres de la team analgésie, Alain Eschalier, Alice Corteval, Marine Magenties (toutes mes félicitations pour la bonne nouvelle), Nicolas Kerckhove et leur super T-shirt qui m'accompagne dans toute mes courses (clermontoise, canicross...) ainsi que tous mes voyages.

Merci à la team des anciens thésards avec qui j'ai commencé à devenir grande, ou du moins essayé :

Mamanou je ne te remercierai jamais assez pour l'opportunité que tu m'as permis d'obtenir (bon si un peu, vu que tu as le droit à du fromage à vie maintenant), j'ai hâte de retrouver tes défauts de langage (surtout que maintenant avec 3 langues je m'attends au pire pour tes proverbes) !! Tu ne sais vraiment pas ce qu'il t'attend mais je suis sûre que l'on va

Remerciements

encore passer de supers moments ensemble. Je ne pourrais jamais oublier notre voyage au Portugal et ces 19h de route aller parce que Titou est un boulet et qu'il a oublié les papiers de la voiture ...

Laurianne, notre bisounours, avec ton sourire quotidien, même si on n'a jamais compris pourquoi la journée folie c'était le mercredi !

Syssou de m'avoir légué ton bureau et les nombreux mignons. Mais bon surtout d'avoir été mon mentor durant mon master et mon début de thèse. Merci de m'avoir transmis toute ton expérience scientifique et un peu de ta floume aussi j'avoue.

Amélie, pour ta gaité quotidienne ainsi que nos nombreuses soirées mojito et surtout pour la découverte de toutes les variétés de ton île : la vanille, le rhum arrangé et tes boules à thés.

Ludivine, la maman des thésards qui a pris son envol. Merci pour tes conseils scientifiques et ton aide précieuse. Je te souhaite pleins de bonheur dans ton nouveau job et avec ta petite famille que j'ai pu voir s'agrandir.

Amandine, pour cet esprit infatigable surtout pour les conneries de bureau ! Merci pour tous ces bons moments.

Pierre-Yves même si on ne s'est pas beaucoup vu (c'est vrai que je ne dépasse pas de mon écran) j'ai apprécié nos moments ensemble et nos batailles de Nerf.

Geoffroy, le dernier sorti, merci pour ta culture et nos débats scientifiques sur les dinosaures ainsi que pour m'avoir toujours suivi dans les répliques de film.

Merci aux thésards actuels et les non-thésards du bureau :

Merci à Guillaume d'avoir partagé ses années d'études avec moi ainsi que pour tes conseils et les cafés. Je te souhaite bonne chance car maintenant tu es dans la même panade...

Merci également aux nouvelles sardines Margaux et Clémence, fraîchement débarquées, peut-être plus aussi fraîche. Je vous remercie également pour toutes ces idées de cadeaux ainsi que Sandi.

Merci Maëva d'avoir animé mes journées, mais surtout mes soirées au détour d'une danse ou plusieurs sur les battles de just dance, pour tes Gossip mais également pour ton amour de l'uniforme... Enfin merci d'avoir enrichie ma culture musicale (même si Wejdene et Aya

Remerciements

Nakamura ce n'est pas de la musique) mais surtout merci pour tes chansons douteuses, c'est mimi la souris... Sur ce je te laisse en tête à tête avec tes ballonnets.

Merci à l'équipe de choc les rangers du risque « Tic » et « Tac », pour leurs doublures parfaites, leurs motivations sans faille pour les tests à grande échelle ou plutôt à très petite échelle.

Même si tu ne fais pas partie du même bureau, on est dans la même team alors merci à ma partenaire d'eau douce, ma très chère barbie, Ludivine, sans qui je n'aurai jamais pu acquérir Ken. Nos sorties du mercredi me manquent... merci COVID. Merci lulus l'an... pour nos soirées just dance, de m'avoir nourrie durant toutes ces soirées chez toi. Je retiendrai de notre relation tous ces bons moments, je dirai même sans censure notre intimité privilégiée de la machine à laver, au détriment d'Améline. Je ne peux finir sans sourire au souvenir des bières que nous dégustions et de toujours avoir une pensée pour notre très cher ami et ton étoile Jeremy qui nous a appris à snowborder et que je ne pourrai jamais oublier.

Ma reconnaissance va bien entendu à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral :

Je remercie mes amis : tout d'abord mes amis de Master (Jana et Xavier, papy Geo et Philippine, Thibault et Clémence et bien sûr mon petit fruit François) qui ont rendu mes études tellement plus fun (je n'oublierai jamais les révisions crêpes, les soirées poker et les soirées d'anniversaire au casino). Merci au club CaniVulcain et particulièrement à monsieur le président Rémi pour toutes ces sorties qui m'ont permis de découvrir l'Auvergne même si la seule course que j'ai faite m'aura valu quelques côtes... Je remercie mes amis d'enfances Marie et Aurélie pour toutes ces discussions autour des poneys. Et bien sûr je ne remercierai jamais assez ma meilleure amie Marion (et son petit cornichon Carole) !! Ces amies qui vous conseillent, confortent et qui sont toujours là dans tous les moments de votre vie même à plusieurs kilomètres. Vous me manquez tellement, j'espère vite refaire des soirées Disney ! Je vous souhaite pleins de bonheur.

Je remercie ma famille pour tout ce qu'elle m'a apporté durant toutes ces années. Je vous remercie, vous qui avez essayé durant ces 3 années de comprendre mon sujet de thèse, et qui tente encore d'en élucider les termes. Maman, papa merci pour votre soutien, votre patience et vos encouragements. Merci de m'avoir autant ouvert au monde à travers tous ces voyages à vos côtés. Papi, mamie merci d'être toujours là pour moi et de toujours trouver les mots pour me rassurer. Merci à ma sœur Julie qui m'a supporté durant ces premières années de vie

Remerciements

communes (désolée de toujours t'avoir fait accuser à ma place mais c'est ton rôle de grande sœur non ?!) et sans qui je serai passée à côté de beaucoup de découvertes. Je te souhaite pleins de bonheur avec Anthony et tout le reste de la petite famille, mon adorable (mais pas moins terrible) nièce que j'aime ma Lilou et ses deux acolytes Chris et Kylian.

Et bien sûr ma belle-famille, François, Geneviève et sans oublier le "grand" Julian (je ne vais pas développer plus sur toi je pourrai sûrement en écrire une thèse mais bon après ça deviendra chiant). Vous m'avez toujours soutenu bien plus que je ne pouvais l'espérer ! Vous êtes des personnes en or. Je suis sûr qu'on fêtera ça autour d'un apéro dinatoire, comme à notre grande habitude.

Enfin, comment trouver les mots pour remercier la personne la plus importante de ma vie. Celle qui m'a toujours soutenu, encouragé et sans qui, cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci de me pousser à me dépasser chaque jour, m'aiguiller dans tous mes choix, même les plus ridicules (bon faut dire aussi que je t'ai pas mal suivi dans TES idées farfelues). Merci d'être là pour moi, de continuer à me suivre et je suis sûre que tu le feras jusqu'à nos vieux jours. Parce que oui, notre NOUS a toujours été une évidence dès le départ. Aucun doute possible tu es bien mon âme sœur. Ma seconde moitié (c'est vrai qu'à nous deux on ferait presque la taille d'une personne normale...). Tu as été la pierre à cet édifice qui fait de moi aujourd'hui la personne que je suis et sache que j'en suis terriblement fière, fière de toi aussi pour tout ce que tu as accompli durant ces 6 ans de vie commune. Améline mon amour, je ne pourrai jamais te remercier autant que tu me procures de bonheur chaque jour. Parce que vivre avec toi c'est la simplicité à l'état pur et surtout toujours une bonne dose de rigolade. Merci de t'être occupée du "quotidien" et surtout de notre petit Nash (Nashou, Natchos, chouchou, crapaud, papuche), pendant la rédaction de cette thèse. Merci pour ta patience et toute l'attention que tu m'as donnée durant cette période. J'angoisse à l'idée de commencer une nouvelle vie loin de toi, mais je sais que quoi qu'il arrive tu seras toujours là pour moi comme je le serai toujours pour toi. Je me languis de te retrouver dans ce nouveau pays et continuer encore et encore notre histoire et nos projets. Je finis ces remerciements sur ces quelques mots, merci d'être la personne que tu es, merci d'être là et bien plus encore, je t'aime.

Résumé

Les cancers de la prostate (CaP), du sein et des poumons sont souvent de diagnostic difficile notamment en raison de leur caractère initial asymptomatique. Rarement douloureux aux stades primaires, ces cancers ont une forte propension à métastaser vers le microenvironnement osseux. Cliniquement, à ce stade, cela se traduit par des douleurs qui sont à la fois très invalidantes et résistantes aux traitements antalgiques de référence, y compris aux morphiniques. La difficulté provient en partie du caractère multifactoriel de ces douleurs qui associent composantes nociceptive et neuropathique. Parmi les acteurs de cette douleur, un rôle essentiel est attribué au dérèglement du système nerveux (périphérique et central) et à la croissance tumorale qui affecte tous deux le microenvironnement osseux.

Le glutamate, neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux, est récemment apparu comme une cible potentielle dans la prise en charge de certains cancers, dont le CaP. Le riluzole, une molécule anti glutamatergique, possédant déjà une autorisation de mise sur le marché dans le traitement de la SLA, a démontré un effet antalgique dans plusieurs modèles de douleur inflammatoire et neuropathique et un effet antiprolifératif *in vitro*. C'est pourquoi, nous avons recherché si cette molécule pouvait avoir des effets bénéfiques dans le traitement des douleurs osseuses induites par le CaP, et comment il pouvait influencer sur le développement du CaP métastatique osseux. Nous avons utilisé un modèle de douleur osseuse par injection intratibiale de cellules humaines de CaP, les cellules PC3-luc, et administré de riluzole dans l'eau de boisson. Chez ce modèle, le riluzole a démontré un effet antalgique significatif impliquant le canal TREK-1, canal sélectif pour l'ion potassium. De plus, le riluzole diminue significativement la viabilité des cellules *in vitro* et ralentit la croissance tumorale *in vivo* sans affecter le remodelage osseux. L'effet antiprolifératif du riluzole impliquerait une augmentation de l'expression des canaux TREK-1 dans les cellules PC3 participant à leur hyperpolarisation.

En conclusion, ce travail permet de mettre en évidence l'intérêt du riluzole en tant que molécule d'intérêt pour le traitement des douleurs osseuses du CaP dont le mécanisme d'action implique certainement le canal potassique fond TREK-1.

Abstract

Prostate (PCa), breast and lung cancers are often difficult to diagnose, in particular due to their initial asymptomatic nature. Rarely painful in the primary stages, these cancers have a strong propensity to metastasise to the bone microenvironment. Clinically, at this stage, this results in pain that is both very disabling and resistant to standard analgesic treatments, including morphine. The difficulty is in part due to the multifactorial nature of this pain which combines nociceptive and neuropathic components. Among the proposed mechanisms, an essential role is attributed to the disturbance of the peripheral and central nervous system and to tumour growth, both of which affect the bone microenvironment.

Glutamate, a major excitatory neurotransmitter of the nervous system, has recently emerged as a potential target for the treatment of cancers, including CaP. Riluzole, an anti-glutamatergic molecule marketed for the treatment of ALS, has an analgesic effect in several models of inflammatory and neuropathic pain and an anti-proliferative effect *in vitro*. Therefore, we investigated whether this molecule could have beneficial effects for the treatment of CaP-induced bone pain and how it could influence the development of bone metastatic CaP. We used a bone pain model induced by intratibial injection of human CaP cells, PC3-luc cells, and administered riluzole in drinking water. In this model, riluzole demonstrated a significant analgesic effect involving the TREK-1 potassium channel. In addition, riluzole significantly decreased cell viability *in vitro* and slowed tumour growth *in vivo*, without affecting bone remodelling. The antiproliferative effect of riluzole is believed to involve an increase in the expression of TREK-1 channels in PC3 cells, which is involved in their hyperpolarisation.

In conclusion, this work highlights riluzole as a molecule of interest for the treatment of CaP bone pain, a compound whose mechanism of action certainly involves the background potassium channel TREK-1.

Contributions scientifiques et pédagogiques

➤ Enseignement

Module « Informatique » - DUT 1^{ère} année (128h équivalent TD)

➤ Communications affichées

Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement
(mai 2019 – Clermont-ferrand – France)



Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur du cancer de prostate

Cuménal.M, Lamoine.S, Prival.L, Boudieu.L, Aissouni.Y, Busserolles.J.

Association pour la recherche sur les tumeurs de la prostate (ARTP) (Novembre 2018 –
Paris – France) Prix poster



Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur du cancer de prostate

Cuménal.M, Lamoine.S, Prival.L, Boudieu.L, Aissouni.Y, Busserolles.J.

➤ Communications orales :

Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (Novembre 2019 – Strasbourg –
France) Invité



Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur du cancer de prostate

Cuménal.M, Lamoine.S, Prival.L, Boudieu.L, Aissouni.Y, Busserolles.J.

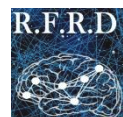
Association pour la recherche sur les tumeurs de la prostate (ARTP) (Novembre 2019 –
Paris – France) Invité



Research for new molecular targets for the treatment of bone pain in prostate cancer

Cuménal.M, Lamoine.S, Prival.L, Boudieu.L, Aissouni.Y, Busserolles.J.

15^{ème} symposium du Réseau Français de recherché contre le Douleur (Mars 2019 – Paris –
France)



Research for new molecular targets for the treatment of bone pain in prostate cancer

Cuménal.M, Lamoine.S, Prival.L, Boudieu.L, Aissouni.Y, Busserolles.J.

➤ Articles

“The potassium channel TREK-1 is involved both in the analgesic and antiproliferative effect of riluzole in bone cancer pain.”

M. Cumenal, S. Lamoine, M. Meleine, Y. Aissouni, L. Prival, M. Fereyrolles, J. Barbier, L. Boudieu, J. Schopp, L. Mazuel, A. Briat, E. Miot-Noirault, A. Eschalier, S. Lolignier, J. Busserolles. – *En préparation*

“The class I HDAC inhibitor, MS-275, prevents oxaliplatin-induced chronic neuropathy and potentiates its antiproliferative activity.”

S. Lamoine*, **M. Cumenal***, D.A. Barriere, Y. Aissouni, L. Prival, M. Fereyrolles, J. Barbier, L. Boudieu, A. Briat, E. Miot-Noirault, A. Eschalier, J. Busserolles – *en préparation, co-first authors*

“Epigenetics involvement in oxaliplatin-induced potassium channel transcriptional downregulation and hypersensitivity.”

V. Pereira ; S. Lamoine ; **M. Cuménal**; S. Lolignier; Y. Aissouni; A. Pizzoccaro; L. Prival; A. Eschalier; E. Bourinet; J. Busserolles. – *Mol Neurobiol 2021, DOI : 10.1007/s12035-021-02361-6.*

“The safety of medications used to treat peripheral neuropathic pain, part 1 (antidepressants and antiepileptics): review of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials.”

M. Selvy, **M. Cuménal**, N. Kerckhove, C. Courteix, J. Busserolles, D. Balayssac. – *Expert Opinion Drug Safety, DOI: 10.1080/14740338.2020.1764934. (2020)*

“The safety of medications used to treat peripheral neuropathic pain, part 2 (opioids, cannabinoids and other drugs): review of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials.”

M. Cuménal, M. Selvy, N. Kerckhove, C. Bertin, M. Morez, C. Courteix, J. Busserolles, D. Balayssac. – *Expert Opinion Drug Safety, DOI: 10.1080/14740338.2021.1842871 (2020)*

SOMMAIRE

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures et tableaux	
PARTIE A : Introduction Bibliographique.....	1
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l’homme	3
I. Généralités sur le cancer de la prostate.....	3
1. Description générale	3
2. Epidémiologie et facteurs de risque.....	3
2.1. L’âge	5
2.2. Les facteurs génétiques	5
2.3. Le mode de vie.....	6
2.4. Les agents environnementaux.....	7
3. Symptôme et diagnostic.....	8
3.1. Le bilan initial	8
3.2. Le bilan d’extension.....	9
II. Physiopathologie du cancer de la prostate.....	9
1. Les classifications.....	9
1.1. La classification TNM	9
1.2. Le score de Gleason	10
1.3. La classification ISUP	11
2. Le micro-environnement tumoral (MET).....	12
2.1. Les cellules vasculaires.....	13
2.2. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs).....	13
2.3. Les cellules immunitaires et inflammatoires	14

Sommaire

2.4. La matrice extracellulaire (MEC)	18
2.5. La neurogenèse	19
3. Mécanismes physiopathologiques : les étapes de la carcinogenèse prostatique	21
3.1. L’atrophie inflammatoire proliférative (PIA)	22
3.2. La néoplasie intra-épithéliale ou PIN	23
3.3. Le carcinome.....	23
3.4. Le cancer métastatique.....	24
3.4.1 La dissémination tumorale	24
3.4.2 Les niches pré-métastatiques.....	26
III. Stratégies thérapeutiques dans le traitement du CaP	28
1. L’abstention thérapeutique et la surveillance active.....	28
2. La prostatectomie totale.....	30
3. La radiothérapie externe	31
4. La curiethérapie	32
5. Les ultrasons focalisés de haute densité (HIFU)	32
6. L’hormonothérapie	32
6.1. La castration chirurgicale ou pulpectomie.....	33
6.2. Les traitements chimiques	34
6.2.1 Les agonistes de la LHRH (luteinizing hormone releasing hormone)	34
6.2.2 Les antagonistes de la LHRH.....	34
6.2.3 Les anti-androgènes.....	34
6.3. Les hormonothérapies de seconde génération	35
7. La chimiothérapie	36
8. Les médicaments ciblant l’os	37
9. Les nouveaux traitements du CaP	38
Chapitre II : La douleur osseuse dans le contexte du cancer de la prostate.....	40

Sommaire

I. Généralités sur l'os	40
1. Anatomie et fonction de l'os	40
1.1. Classification anatomique de l'os :	40
1.2. Constitution des os :	41
1.2.1 Structure anatomique macroscopique des os.....	41
1.2.2 Cellules et matrice extra cellulaire	42
1.3. Le remodelage osseux.....	43
1.3.1 Remodelage osseux en condition physiologique	43
1.3.2 Remodelage osseux dans le cancer de la prostate	44
2. L'innervation osseuse	46
II. Douleur et nociception : généralités	51
1. Définition de la douleur aiguë versus chronique	52
2. Nociception à l'origine de la perception douloureuse.....	52
3. Douleur osseuse par acidose et fracture induites par la tumeur	54
4. Douleur osseuse induite par les cellules tumorales et leurs interactions avec les cellules stromales	54
5. Douleur osseuse induite par germination du système nerveux périphérique	56
6. Sensibilisation centrale : son implication dans la douleur osseuse induite par les métastases osseuses	57
7. Prise en charge thérapeutique de la douleur osseuse du CaP	59
Chapitre III : Le Riluzole : molécule d'intérêt pour le traitement des douleurs osseuses du CaP ?.....	62
I. Le riluzole.....	62
1. Généralités	62
2. Riluzole et douleur.....	63
3. Riluzole et cancer	64

Sommaire

II. TREK-1 : cible moléculaire du Riluzole pour le traitement de la douleur du CaP	65
1. Les canaux ioniques de la famille TREK	66
2. Structure et expression du canal TREK-1	68
3. Mécanismes de régulation	68
3.1. Etirement membranaire	69
3.2. Température	69
3.3. Variation du pH	70
3.4. Phospholipides	71
3.5. Neurotransmetteurs et RCPG	71
3.6. Autres protéines modulatrices	72
4. Rôles physiologiques du canal TREK-1	73
4.1. TREK-1 et anesthésie générale	74
4.2. TREK-1 et neuroprotection	74
4.3. TREK-1 et dépression	75
4.4. TREK-1 et perception douloureuse	76
4.5. TREK-1 et cancer	78
Chapitre IV : Objectifs de la thèse	80
PARTIE B : Résultats	82
I. Effet antalgique du riluzole dans un modèle murin de douleur prostatique	84
1. Caractérisation du modèle de douleur osseuse de CaP	84
1.1. Caractérisation phénotypique et validation pharmacologique	84
1.2. Données immunohistochimiques	90
2. Caractérisation de la progression tumorale et du remodelage osseux	91
3. Effet du riluzole dans la physiopathologie de la douleur du CaP	94
4. Implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole	99
II. Effet du riluzole vis-à-vis des métastases osseuses du CaP ?	105

Sommaire

1. Caractérisation de l'effet anti-cancéreux du riluzole.....	105
1.1. Effet du riluzole sur la viabilité des cellules de CaP	105
1.2. Effet du riluzole sur la croissance tumorale dans le modèle murin de douleur osseuse	107
2. Evaluation de l'effet du riluzole sur le remodelage osseux.....	110
3. Le canal TREK-1 est-il impliqué dans l'effet anti-prolifératif du riluzole ?.	112
PARTIE C : Discussion	122
I. Effet antalgique du riluzole chez un modèle animal de douleur osseuse induite par l'injection intratibiale de cellules PC3	124
1. Choix et caractérisation du modèle	124
2. Effet antalgique du riluzole	128
II. Impact du riluzole sur la progression tumorale et le remodelage osseux	133
Conclusion générale.....	138
PARTIE D : Matériel et Méthodes	140
I. Cultures cellulaires	142
1. Mise en culture et maintien de la culture.....	142
2. Traitements	142
3. Evaluation de la viabilité cellulaire	142
4. Test de la cicatrice	143
II. Tests comportementaux	143
1. Evaluation de la douleur induite par l'injection de cellule de cancer de prostate métastatique	144
1.1. Injection intra-tibiale de cellules PC3 ou PC3-luc.....	144
1.2. Tests de douleur évoquée.....	144
1.2.1 Le test du Von Frey : (Bioseb, France)	144
1.3. Tests de douleur spontanée	145

Sommaire

1.3.1	Le test d'incapacitance ou distribution pondérale statique (static weigh bearing – SWB) : (Bioseb, France)	145
1.3.2	Vidéotracking par phénotyper (Noldus, France) :.....	145
1.4.	Administration des molécules et design des expériences	146
III.	Imagerie	147
1.	Bioluminescente	147
2.	Scintigraphique par ^{99m} Tc-HMDP	147
IV.	Dosage du glutamate	148
1.	<i>In vitro</i>	148
2.	<i>In vivo</i>	148
V.	Marquage de cibles <i>ex vivo</i>	149
1.	Préparation des tissus.....	149
2.	Immunohistochimie	149
3.	RNAscope.....	150
VI.	RT-PCR quantitative	151
1.	Extraction d'ARN et rétrotranscription	151
2.	qPCR.....	152
VII.	Imagerie potassique	154
VIII.	Electrophysiologie	155
IX.	Imagerie calcique.....	156
X.	Analyses statistiques.....	157
	PARTIE E : Références bibliographiques	158

Liste des abréviations

A

5-HT3	Récepteur de la sérotonine de type 3
^{99m} Tc	Technétium-99 métastable
αSMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
ACh	Acétylcholine
ACD	Advanced Cell Diagnostics
ACTH	<i>Adreno CorticoTropic Hormone</i>
AFU	Association Française d'Urologie
AICR	<i>American Institute for Cancer Research</i>
AINS	Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens
AKAP150	<i>A kinase anchor protein</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ASIC	<i>Acid-Sensing Ion Chanel</i>
ATF3	Activating Transcription Factor 3

B

BK	Bradykinine
BL-1249	(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>

BSA Albumine de Sérum Bovin

C

CaCl ₂	Chlorure de calcium
CAFs	Fibroblastes associés au cancer
CAO	<i>Cancer Associated Ostéoblast</i>
CaP	Cancer de la Prostate
Cat K	Cathepsine K
CCAFU	Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie
CD	Cellules dendritiques
CD31	Cluster de Différenciation 31
CDC	Cellules dendritiques conventionnelles
CFA	Adjuvant complet de Freund
CGRP	<i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>
CHRNA3	Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3
CIBP	<i>Cancer Induced Bone Pain</i> (Douleur osseuse induite par le cancer)
CK1δ	<i>Casein kinase 1 delta</i>
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
β-COP	<i>bêta-coatomer protein</i>
CRPC	<i>Castrate-Resistant Prostate Cancer</i> (Cancer de la prostate résistant à la castration)

Liste des abréviations

CRPCm	Metastatic <i>Castrate-Resistant Prostate Cancer</i> (Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration)	EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i>	EGTA	Acide egtazique
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique	EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>	EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
CCL	<i>CC-chemokine ligand</i>	pERK1/2	Phosphorylated extracellular-regulated kinase 1/2
D			
DapB	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase de <i>Bacillus subtilis</i>	ESOU	Association Européenne d'urologie Section d'Urologie Oncologie
DCX	Doublecortine	ET-1	Endothéline-1
DES	Diéthylstilbestrol	F	
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DNase I	Désoxyribonucléase 1	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate	FSP-1	<i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>
DRG	Dorsal Root Ganglia (Ganglions de la racine dorsale)	G	
DTT	Dithiothréitol	GABA	Acide- γ AminoButyrique
E			
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i>	GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i> (L'association européenne d'urologie)	GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
EC ₅₀	Concentration médiane Efficace	H	
		H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
		HAS	Haute Autorité de Santé
		HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
		HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
		HGPIN	High Grade Prostatic Intraépithélial Neoplasia

Liste des abréviations

	(Néoplasie inta-épithéliale de haut grade)
HIFU	<i>High Intensity Focused Ultrasound</i> (Ultrasons focalisés de haute intensité)
HMDP	HydroxyMéthylène DiPhosphonate
HRP	Peroxydase de raifort

I

IASP	International Association for the Study of Pain
IB-4	Isolectine-B4
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IGF1	Insulin-like Growth Factor-1 (facteur de croissance analogue à l'insuline)
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporel
InVS	Institut de Veille Sanitaire
i.p	intrapéritonéal
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

ISUP	International Society of Urological Pathology
IVIS	<i>In Vivo Imaging System</i>

K

K ₂ P	Canal potassique à 2 boucles P
KH ₂ PO ₄	Phosphate de monopotassium
KO	<i>Knock-out</i> (aussi noté -/-)
KOH	Hydroxyde de potassium
KCl	Chlorure de potassium

L

LGPIN	<i>Low Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia</i> (Néoplasie inta-épithéliale de bas grade)
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (hormone lutéinisante)
LHRH	<i>Luteinizing Hormone Releasing Hormone</i> (Hormone de libération de l'hormone lutéinisante)
LTβ	Lymphotoxine bêta

M

M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Facteur de stimulation des colonies de macrophages)
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MET	Micro-environnement tumoral
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MET	Microenvironnement tumoral
MgATP	<i>Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt</i>
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MOR	Récepteur μ
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MT2	Métallothionéine 2
Mtap2	Microtubule Associated Protein 2
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

Liste des abréviations

N

NaCl	Chlorure de sodium
NaGTP	<i>Guanosine 5'-triphosphate sodium salt</i>
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium
NE	<i>Norépinéphrine</i>
NF200	Neurofilament de 200 kDa
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NPY	Neuropeptide Y
NTSR3	Récepteur à la Neurotensine 3

O

OCN	Ostéocalcine
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

P2X	<i>Purinoceptor 3</i>
P75NTR	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
PA	Potentiel d'Action
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC3-luc	Cellules PC3 codant pour le gène de la luciférase
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative

PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PDL	Poly-D-Lysine
PFA	Paraformaldéhyde
PGE ₂	Prostaglandine E2
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PIA	<i>Proliferative Inflammatory Atrophy</i> (Atrophie inflammatoire proliférative)
PIN	<i>Prostatic Intraepithelial Neoplasia</i> (Néoplasie Intra-Epithéliales)
PIEZO2	<i>Piezo type mechanosensitive ion channel component 2</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
Polr2a	Sous unité A de l'ARN polymérase II
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> (Antigène spécifique de la prostate)
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i> (Hormone parathyroïdienne)
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i> (La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne)

R

RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B</i>
------	---

Liste des abréviations

RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand</i>	TASK	<i>TWIK-related acid-sensitive potassium channel</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G	TDM	Tomodensitométrie
RNE28	Acide (2E) -2-cyano-3- (furane-3-yl) prop-2-énoïque	TDSF	<i>Tumor-Derived Secreted Factors</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	TEA	Tétraéthylammonium
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	TEMP	Tomographie d'Emission Mono-Photonique
S		TFH	Cellules T auxiliaires folliculaires
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>	TGFβ	Transforming Growth Factor β (Facteur de croissance transformant bêta)
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>	TH	<i>Tyrosine Hydroxylase</i>
SFETD	Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur	THIK	<i>TWIK-related halothane-inhibited K⁺ channel</i>
sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> (Tyrosine Kinase-1 soluble de type fms)	TLR	<i>Toll like receptor</i>
SK3	<i>Small-conductance calcium-activated K⁺ channel</i>	TLS	Structures lymphoïdes tertiaires
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique	TM	Transmembranaire
shRNA	short hairpin RNA	TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
siRNA	small interference RNA	TRAAK	<i>TWIK-related arachidonic acid activated potassium channel</i>
SNC	Système Nerveux Central	TREK	<i>TWIK-related potassium channel</i>
SNP	Système Nerveux Périphérique	TRESK	<i>TWIK-related spinal cord potassium channel</i>
SP	Substance P	TrkA	Récepteur Tyrosine Kinase A
SVF	Sérum de Veau Fœtal	TRPP2	<i>Transient Receptor Potential Polycystin 2</i>
SWB	<i>Static Weight Bearing</i>	TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloïde 1</i>
T		TWIK	<i>Tandem of P domains in a Weak Inwardly-rectifying potassium channel</i>
TALK	<i>TWIK-related alkaline pH activated potassium channel</i>		
TAM	<i>Tumor associated macrophage</i>		

Liste des abréviations

V

VACht	<i>Vesicular Acetylcholine Transporter</i> (Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VE	Vésicule Extracellulaire
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

VIP	<i>Peptide Intestinal Vasoactif</i>
Vm	Potentiel de la membrane plasmique

W

WCRF	World Cancer Research Fund
WDR	<i>Wide Dynamic Range</i>

Z

ZSV	Zone Sous Ventriculaire
-----	-------------------------

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Première cause de décès par cancer chez les hommes dans le monde, 2020. Source : GLOBOCAN 2021	4
Figure 2: Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer de la prostate en fonction de l'âge et en fonction de l'année en France.....	5
Figure 3: Classification TNM.	10
Figure 4: Diagramme schématique du score de Gleason.	11
Figure 5: Schématisation du microenvironnement tumoral.	12
Figure 6: Balance entre les effets anti et protumoraux des différents effecteurs du système immunitaire	18
Figure 7: Principales interactions entre les cellules du microenvironnement lors de la progression tumorale	21
Figure 8: Description des différentes étapes de progression du cancer de la prostate.	22
Figure 9: Phénotype histologique des différents types de néoplasies intra-épithéliales.	23
Figure 10: Dissémination métastatique des cellules tumorales de CaP	25
Figure 11 : Schématisation de niche métastatique osseuse lors des étapes de la formation de métastases osseuses.....	27
Figure 12: Arbre décisionnel simplifié du traitement du cancer de la prostate. http://palliative-science.com	28
Figure 13: Schéma des démarches à suivre lors d'une surveillance active dans le cancer de la prostate.....	30
Figure 14: Hormonothérapie du cancer de la prostate.	33
Figure 15: Structure de l'os long	42
Figure 16: Cercle vicieux des métastases osseuses dans le CaP.....	46
Figure 17: Schéma simplifié de l'innervation de l'os.....	48
Figure 18: Schématisation de la distribution des nerfs dans les os longs.....	49
Figure 19: Classification des fibres innervant les os.....	50
Figure 20: Innervation différentielle de l'os et de la peau	51
Figure 21: Facteurs influençant l'excitabilité des fibres afférentes primaires qui innervent l'os	55
Figure 22: Interactions entre les cellules tumorales, les cellules osseuses, les cellules stromales et les cellules inflammatoires sur le site des métastases osseuses.....	59
Figure 23: Effet antiprolifératif du riluzole dans le cancer du côlon in vitro et in vivo.....	65
Figure 24: Diversité des sous-unités des canaux potassiques chez les mammifères.....	67
Figure 25: Thermosensibilité du canal TREK-1	70

Liste des figures et tableaux

Figure 26: Régulation du canal TREK-1.....	73
Figure 27 : Evaluation de l'hypersensibilité mécanique induite pas l'injection intra-tibiale de cellules tumorales de CaP (Exp1)	85
Figure 28 : Impact de l'injection de cellules tumorales de CaP sur la distribution pondérale (Exp1)	85
Figure 29: Impact de l'injection intratibiale de CaP sur la distance parcouru par les animaux évaluée par videotracking (Exp1)	87
Figure 30: Impact de l'injection de cellules PC3 sur le comportement spontané des animaux analysé par videotracking (Exp1).....	88
Figure 31: Evaluation de l'effet antalgique de la morphine sur le modèle de douleur osseuse (Exp1)	89
Figure 32 : Expression du récepteur aux opiacés μ dans les DRG de souris porteuses de métastases de CaP (Exp1)	89
Figure 33: Les cellules cancéreuses de la prostate PC3 provoquent la germination des fibres nerveuses sensorielles (Exp1)	91
Figure 34 : Design de l'expérimentation de caractérisation de la croissance tumorale et du remodelage osseux in vivo (Exp2).....	92
Figure 35 : Progression tumorale et remodelage osseux évalués dans le modèle de douleur osseuse après injection de cellules de CaP (Exp2).....	93
Figure 36: Evaluation de l'effet du riluzole sur la douleur osseuse (Exp3).....	95
<i>Figure 37: Effet du riluzole sur la distance parcourue par les animaux porteur de tumeur évalué par videotracking (Exp3)</i>	<i>97</i>
Figure 38 : Effet d'un traitement au riluzole sur le comportement spontané des animaux analysé par videotracking (Exp3).....	98
Figure 39: Implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole (Exp4)	100
Figure 40 : Implication du canal TREK-1 sur la douleur spontanée influençant les déplacements des animaux porteurs de tumeur évalué par videotracking (Exp4).....	101
Figure 41 : Identification des neurones de DRG innervant le tibia de souris après injection intratibiale du traceur rétrograde Fluorogold.....	102
Figure 42: Localisation des neurones innervant spécifiquement le tibia et localisation de TREK-1 par RNAscope chez des animaux sains.....	103
Figure 43: Quantification de l'expression du canal TREK-1 dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris.....	104
Figure 44 : Quantification de l'expression du canal TREK-1 dans les DRG de souris modèle de douleur osseuse de CaP traitées au riluzole et/ou à la spadine (Exp4).....	104
Figure 45: Etude de l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules de CaP PC3-luc	106
Figure 46 : Effet du riluzole sur la migration des cellules de CaP.....	107

Liste des figures et tableaux

Figure 47: Evaluation de l'effet du riluzole sur la croissance tumorale dans le modèle de douleur osseuse (Exp5)	108
Figure 48 : Effet du riluzole sur la libération de glutamate par les cellules PC3 dans leur milieu	109
Figure 49 : Effet du riluzole sur la concentration en glutamate dosé dans le sérum et l'extrudât de tibia d'animaux modèle de douleur osseuse de CaP	110
Figure 50: Evaluation de l'effet du riluzole sur le remodelage osseux dans le modèle de douleur osseuse (Exp5)	112
Figure 51: Etude de l'implication du canal TREK-1 sur l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules PC3-luc.	113
Figure 52 : Effet du riluzole sur l'expression de TREK-1 dans les cellules de CaP (PC3-luc)	114
Figure 53: Effet du riluzole sur les courants potassiques impliqués dans le développement des cellules tumorales de CaP.	115
Figure 54 : Effet d'inhibiteur K ₂ P sur l'activation des courants potassique par le riluzole.....	116
Figure 55 : Effet d'inhibiteur K ₂ P sur l'effet antiprolifératif du riluzole	117
Figure 56: Effet du riluzole sur le potentiel de membrane au repos et la réponse à une stimulation électrique dépolarisante sur des cellules PC3-luc	119
Figure 57 : Effet du riluzole sur le flux calcique des cellules de CaP.....	120
Figure 58 : Tableau résumant les doses efficaces de morphine pour soulager les douleurs osseuses face aux douleurs inflammatoires	128
Figure 59 : Principe du test FluxOR™	155
Tableau 1: Mix réactionnel de la transcription inverse.	152
Tableau 2: Mix réactionnel de la qPCR	153
Tableau 3: Amorces utilisées pour la qPCR.....	154

PARTIE A : Introduction

Bibliographique

Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

I. Généralités sur le cancer de la prostate

1. Description générale

Le cancer (du grec *Karkinos* : « écrevisse », et du latin *cancer* « crabe, chancre, cancer »), selon l'institut national du cancer, est une « maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive. Ces cellules dérégulées finissent par former une masse qu'on appelle tumeur maligne. Les cellules cancéreuses ont tendance à se détacher de la tumeur primitive et à envahir les tissus voisins. Elles migrent alors par les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques pour aller former une autre tumeur (métastase). »

La majorité des cancers de la prostate (CaP) sont des adénocarcinomes (90% des cas). Ils se développent à partir des cellules épithéliales qui constituent le tissu de revêtement de la prostate (Institut National Du Cancer 2020). La physiologie initiale du développement carcinologique est largement admise : les cellules tumorales naissent au niveau de l'épithélium à la suite de la dérégulation de clones cellulaires, dont le type demeure encore inconnu, à la faveur d'altérations génétiques faisant perdre à la cellule son équilibre prolifération/différentiation/apoptose.

2. Epidémiologie et facteurs de risque

Le CaP est le 2^{ème} cancer masculin le plus fréquent et le cinquième plus mortel dans le monde, avec environ 1,4 millions de nouveaux cas et 375 000 morts répertoriés en 2020 (H. Sung et al. 2021). L'incidence varie de 6.3 à 83.4 pour 100 000 hommes en fonction des régions, avec des taux plus élevés retrouvés en Europe du Nord et de l'Ouest, dans les Caraïbes, en Australie/Nouvelle Zélande, en Amérique du Nord et en Afrique du Sud et des taux plus faibles en Asie et en Afrique du Nord. Les taux de mortalité sont par contre plus élevés dans les Caraïbes, en Afrique subsaharienne et en Polynésie (H. Sung et al. 2021). Les différences internationales dans les pratiques de diagnostic du cancer de la prostate sont probablement le principal facteur explicatif de variation des taux d'incidence du cancer de la prostate dans le monde (C. K. Zhou et al. 2016). Les taux de mortalité par cancer de la prostate ont diminué

Introduction bibliographique
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

dans la plupart des pays à revenu élevé depuis le milieu des années 1990, y compris ceux d'Amérique du Nord, d'Océanie et d'Europe du Nord et de l'Ouest, reflétant probablement les progrès du traitement et la détection précoce grâce à un dépistage accru. Au cours de la même période, les taux ont augmenté dans de nombreux pays d'Europe centrale et orientale, d'Asie et d'Afrique. Une tendance plus récente (2009-2013) dans les pays riches indique une stabilisation de la baisse de la mortalité (par exemple, États-Unis, Danemark, Norvège, Suisse, Espagne, Argentine, Nouvelle-Zélande, Israël et Japon), alors que les tendances à la baisse se poursuivent dans certains pays (par exemple, le Royaume-Uni, la Grèce, l'Italie, l'Autriche, la France, l'Allemagne, les Pays-Bas, le Brésil, le Canada et l'Australie) [Figure 1].

Top cancer per country, estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, males, all ages

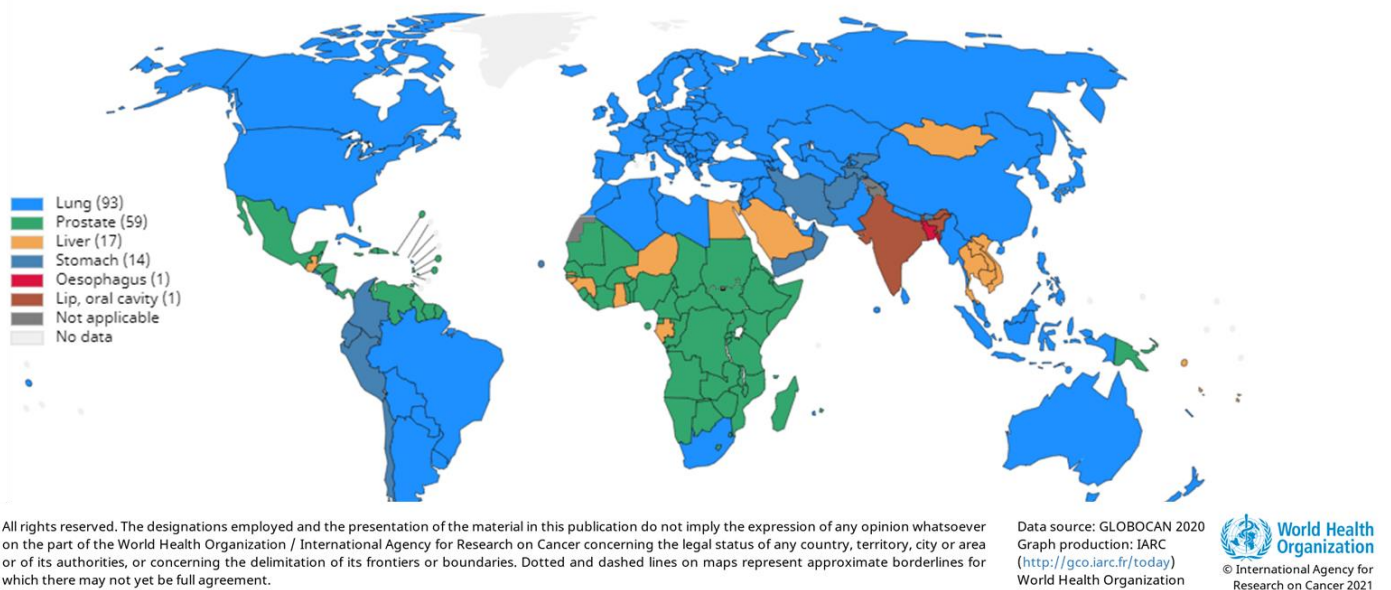


Figure 1: Première cause de décès par cancer chez les hommes dans le monde, 2020. Source : GLOBOCAN 2021 (H. Sung et al. 2021).

En France, d'après la base de données Globocan, le CAP est le 1^{er} cancer masculin et touchait près de 66 000 personnes (en 2020) chaque année, devant les cancers du poumon et du côlon-rectum. Le nombre de nouveaux cas de CaP augmentait en moyenne de 4,8% par an. L'incidence a été multiplié par 4 entre 1980 et 2005. Cette augmentation est en petite partie liée au vieillissement de la population et à l'évolution des méthodes de diagnostic avec la généralisation du dosage de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) survenue à partir des années 1990 comme test de dépistage (Binder-Foucard, Belot, and Delafosse 2013) et l'amélioration des techniques de biopsies. Cette incidence est en baisse sur les dernières périodes évaluées, -3,5% par an en moyenne entre 2010 et 2015, associé à une modification de pratique du dépistage individuel par le dosage du PSA (Tuppin et al. 2016). La diminution de la mortalité en France entre 1990 et 2018 (-2,8% par an en moyenne) est un élément favorable

dans ce contexte, attribuable à l'amélioration des traitements d'une part, mais également au dépistage précoce qui permet de diagnostiquer certains cancers à des stades localement avancés donc curables [Figure 2].

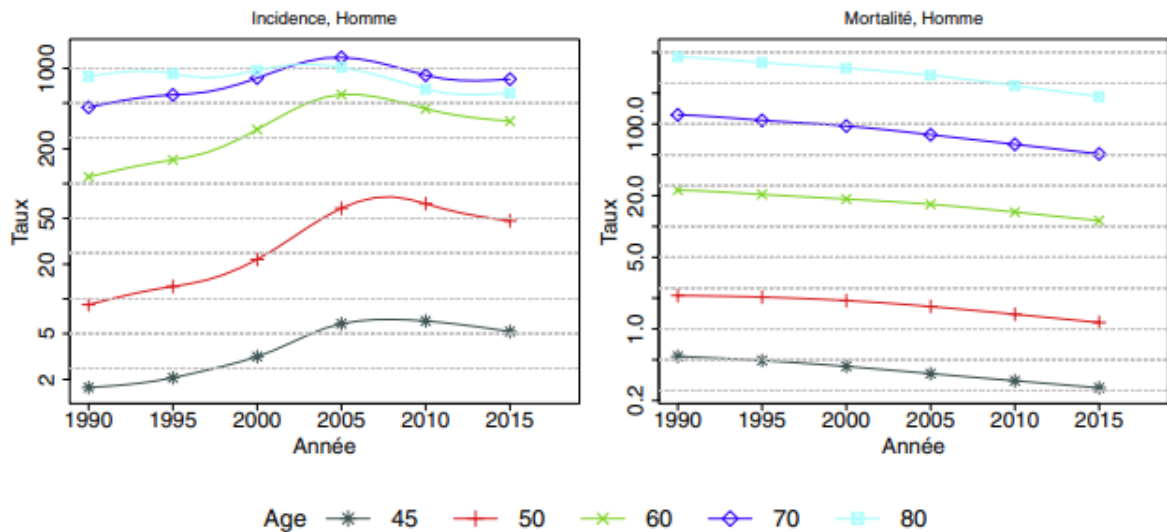


Figure 2: Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer de la prostate en fonction de l'âge et en fonction de l'année en France (Defossez et al. 2019).

De nombreuses études mettent en avant la complexité des mécanismes responsables de l'initiation et la progression du CaP. De plus, un grand nombre de facteurs de risque sont liés à l'âge, à la génétique et à l'environnement dans ce cancer.

2.1. L'âge

Le risque de cancer de la prostate augmente significativement avec l'âge. Ainsi, les hommes de moins de 50 ans ont un faible risque d'être diagnostiqués (- de 0,5% des cas incidents) alors que l'âge moyen de diagnostic est situé entre 75 et 79 ans. Plusieurs hypothèses sont émises quant à l'importance du vieillissement dans la mise en place de cette pathologie. D'une part, une diminution progressive du taux d'androgènes avec l'âge induirait des dérégulations moléculaires au niveau des cellules épithéliales menant au développement de la tumeur (Algarté-Génin, Cussenot, and Costa 2004). D'autre part, l'augmentation du stress oxydant est en partie responsable de cassures de l'ADN provoquant des mutations qui sont favorables au développement tumoral (Bostwick et al. 2004).

2.2. Les facteurs génétiques

Pour les antécédents familiaux, on parle, selon les cas, de forme sporadique (= non héréditaire), qui représente la forme la plus répandue (85% des CaP) et de forme familiale (= hérédité polygénique) quand il existe au moins 2 cas chez des personnes apparentées du premier

ou second degré. Cette forme familiale, représente 20% des CaP et, il est alors recommandé d'adresser le patient en consultation d'oncogénétique pour la recherche de mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Et enfin, la forme héréditaire (=hérédité monogénique) constitue 5% des cas et est évoquée s'il existe au moins 3 cas chez des apparentés du premier ou du second degré ou bien s'il y a au moins 2 cas diagnostiqués avant l'âge de 55 ans dans la famille. Les gènes en cause dans ce cas sont le plus souvent *BRCA2/BRCA1* et *HOXB13*, ces cancers mutés sont aussi marqués par une grande agressivité (Rozet et al. 2016 ; Nombela et al. 2019). Finalement, cette augmentation de risque lié à l'âge par hérédité est évaluée à 2 à 3,5 fois plus important chez les patients ayant un parent du 1^{er} degré atteint (père ou frère) uniquement (Whittemore et al. 1995).

L'appartenance ethnique peut aussi être associée à un risque plus élevé de CaP. Des études épidémiologiques ont démontré l'apparition d'une augmentation de l'incidence de cancer dans les populations noires africaines et caraïbéennes face aux populations caucasiennes (Jack, Davies, and Møller 2007). Une des hypothèses proposées est la présence d'un variant génétique associé avec le cancer, trouvé sur le chromosome 8q24 avec une présence plus élevée dans ces populations afro-américaines (Amundadottir et al. 2006). À l'inverse, les hommes d'origine asiatiques font partie des pays qui présentent l'incidence la plus faible du CaP. De manière générale, ces différences d'incidence liées à l'origine ethnique sont le reflet de plusieurs paramètres, en plus de la génétique que l'on ne peut pas exclure, résultants de différences d'ordre socio-économique qui sont l'environnement et les moyens de diagnostic (Bostwick et al. 2004).

2.3. Le mode de vie

Les précédentes études conduites sur les populations immigrantes suggèrent que des facteurs exogènes peuvent être impliqués dans l'apparition du cancer puisque, comme dit précédemment, le risque dû à l'appartenance ethnique est modulé avec les mouvements géographiques (Winter et al. 1999).

Les facteurs nutritionnels qui protègent ou au contraire qui favorisent le développement de tumeur de CaP sont nombreux. Parmi ceux-ci, l'alimentation riches en lipides, notamment en acides gras polyinsaturés, des pays occidentaux explique en partie que la nutrition est un facteur prépondérant (Watanabe et al. 2000). Les acides gras polyinsaturés sont principalement apportés par l'alimentation. Les cellules humaines ne peuvent pas synthétiser les acides linoléiques (oméga 6) et linoléiques (oméga 3). Or, une étude a montré un lien entre l'acide

linoléique (oméga 6) et le développement de CaP de haut grade (Crowe et al. 2008). Inversement, l'acide linoléique (oméga 3) est associé à une diminution du risque de développement d'un CaP (Chavarro et al. 2008).

De même le cholestérol, retrouvé dans les produits d'origine animale comme les fromages, le jaune d'œuf, les viandes bovines et porcines est un facteur majeur de risque accru de CaP de forme agressive (CaP de stade 3) (Kok et al. 2011). De plus, cette alimentation favorisant le surpoids, l'actualisation en 2018 menée par le World Cancer Research Fund (WCRF) et l'American Institute for Cancer Research (AICR) a conclu à une association entre le statut pondéral (estimé par l'indice de masse corporelle (IMC)) et une augmentation de risque de CaP au stade avancé (WRCF, 2018). Les données montrent par ailleurs que l'adiposité abdominale (mesurée par le tour de taille ou par le rapport tour de taille/tour de hanche) est également prédictive d'une augmentation du risque de CaP.

Concernant l'impact de l'activité sexuelle sur le risque de CaP, la conclusion donnée par l'association européenne d'urologie section d'urologie oncologie (ESOU) montre que les preuves sont encore trop limitées concernant l'impact de l'activité sexuelle sur le risque de CaP (Brookman-May et al. 2019).

2.4. Les agents environnementaux

En ce qui concerne la mise en cause d'agents environnementaux dans l'augmentation du risque de CaP, les études sont souvent controversées et nécessitent de tenir compte du produit, de la dose utilisée et surtout du temps d'expositions. Néanmoins, il semble se dégager quelques agents à risque.

Par exemple, l'exposition à certains pesticides comme le bromure de méthyle (agent alkylant), le DTT (dithiothréitol) ou encore l'héptachlore est associée à une augmentation du risque de CaP (Alavanja et al. 2003). Ce même effet délétère est retrouvé pour les perturbateurs endocriniens ayant des activités oestrogéniques comme le diéthylstilbestrol (DES) et ceux retrouvés dans certains produits agricoles et industriels, plastiques et détergents (Driscoll and Taylor 1980). Des expériences réalisées chez des rongeurs exposés au DES montrent un développement d'hyperplasie, une dysplasie sévère assimilée à de la néoplasie intra-épithéliale signant donc les premières étapes identifiées d'un développement tumoral et permettant aux auteurs de relier ce perturbateur endocrinien à la carcinogénèse prostatique (Prins 2001).

L'arsenic est présent en France dans certains anciens sites miniers fermés, qui contaminent encore l'environnement (sols, rivières, etc) en plus des nombreuses industries qui utilisent encore couramment l'arsenic (alliages de métaux, traitements médicaux, etc). Cette exposition peut être environnementale ou professionnelle, soit par inhalation de poussières, ou par ingestion. L'arsenic est également un composant du tabac et selon l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), l'eau distribuée constituerait la principale source d'exposition (InVS, 2008). Ce risque est toutefois local et en régression (Auvergne et Savoie). Bien que plusieurs études montrent une association positive entre expositions à l'arsenic et CaP, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de cet élément dans la survenue de la maladie (Benbrahim-Tallaa and Waalkes 2008).

Enfin le cadmium, un métal lourd retrouvé dans les colorants et les plastiques industriels, semble s'accumuler de manière notable dans les tumeurs prostatiques par rapport aux tissus sains (Ogunlewe and Osegbe 1989 ; Elghany et al. 1990).

3. Symptôme et diagnostic

Le CaP est asymptomatique jusqu'à des stades relativement avancés. Il peut alors entraîner une rétention d'urine, une hématurie, une impuissance sexuelle ou encore des douleurs et/ou un dysfonctionnement d'autres organes liés à la présence de métastases. Les objectifs du diagnostic sont : de confirmer la présence d'un cancer, d'identifier son type, d'évaluer la taille de la tumeur et sa propagation (son stade) et enfin d'élaborer un plan de traitement en fonction de ces données. Le diagnostic se décline donc en deux phases principales : le bilan initial et le bilan d'extension.

3.1. Le bilan initial

Il a pour objectif de déterminer si, oui ou non, il s'agit d'un CaP. Il peut être diagnostiqué lors d'un toucher rectal anormal (l'examen est prescrit tous les ans dès 50 ans chez les hommes asymptomatique) et un dosage anormalement élevé de PSA. Le taux sérique de PSA normal étant inférieur à 4 ng/ml, un taux de PSA supérieur n'est pas nécessairement spécifique d'un CaP (il dépend de l'âge, la taille de la prostate, une éjaculation récente ou une infection de la prostate) et doit engager une discussion quant à la réalisation de biopsies prostatiques échoguidées (Institut National Du Cancer 2020b). Le diagnostic est ensuite confirmé ou infirmé par analyse microscopique d'échantillons de biopsie (par biopsie transrectale) sur lesquels des

examens histopathologiques et cytologiques des glandes sont réalisés (Litt 2013). La complication la plus sévère après la biopsie est l'infection du tractus urogénital septicémique.

3.2. Le bilan d'extension

Lorsqu'il s'agit d'un cancer, il faut ensuite déterminer l'étendue de l'invasion tumorale, locale, ganglionnaire ou métastatique. Le bilan aidera ainsi à la prise de décision thérapeutique. Au niveau local, ceci est réalisé par une IRM (imagerie par résonance magnétique) abdomino-pelvienne permettant d'obtenir des images très précises du contour de la prostate et donc de déceler si le cancer s'est étendu au-delà en touchant les ganglions lymphatiques. Cet examen est recommandé par l'Association Française d'Urologie (AFU), comme référence dans les CaP localisés de risque intermédiaire et avant une deuxième série de biopsies (Rozet et al. 2016). Par la suite, au niveau périphérique, une scintigraphie osseuse est réalisée afin de déterminer s'il y a présence ou non d'éventuelles métastases, puisque l'os (offrant un microenvironnement favorable qui sera décrit dans la suite de ce manuscrit) est un des tissus de prédilection pour le développement de métastases de CaP.

II. Physiopathologie du cancer de la prostate

1. Les classifications

1.1. La classification TNM

La classification TNM est un système international qui permet de classer tous les cancers selon leur extension anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *node*) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est suivie d'un coefficient (Salomon et al. 2010). La lettre **T** symbolisant la tumeur initiale est cotée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation est dépendante du volume tumoral, elle est représentée par le diamètre maximum de la lésion, et de la fixation aux organes voisins. La lettre **N**, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire touché plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. Enfin, la lettre **M** est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quels que soient leur siège et leur nombre [Figure 3].

Introduction bibliographique
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

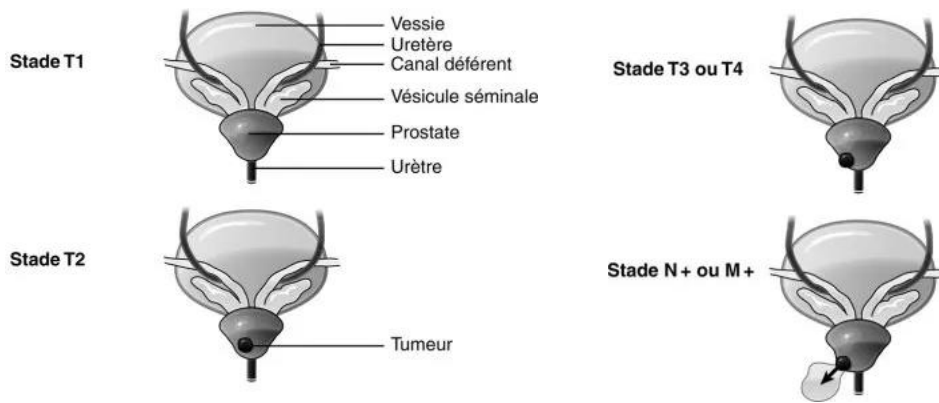


Figure 3: Classification TNM.

La classification TNM est utilisée dans de nombreux cancers et permet d'évaluer l'étendue et la propagation de la tumeur. Elle est basée sur trois stades : l'atteinte locale (tumeur primitive ou T), ganglionnaire (ou N) et métastatique (ou M) (Bosset and De la taille 2020).

1.2. Le score de Gleason

Il s'agit du système le plus couramment utilisé pour grader l'adénocarcinome de la prostate (Gleason, Mellinger, and Arding 1974) malgré son caractère opérateur-dépendent concernant la lecture des lames. Ce système est basé sur l'analyse histologique de tissu prostatique par un pathologiste afin de déterminer le grade de la tumeur. Ce grade indique à quel point le tissu tumoral diffère du tissu prostatique normal. Il permet ainsi de prévoir la vitesse d'évolution/de progression de la tumeur. Le score de Gleason est un système d'attribution de grade entre 2 et 10, avec 2 étant le moins agressif et 10 le plus agressif. Ce grade est la somme des deux profils histologiques les plus fréquents (grades 1-5) de la croissance tumorale. Cette classification permet de séparer les tumeurs en cancers de bas grade de malignité (de 2 à 4), de grade intermédiaire (de 5 à 7) et de haut grade (de 8 à 10) correspondant aux CaP les plus agressifs et évolutifs [Figure 4].

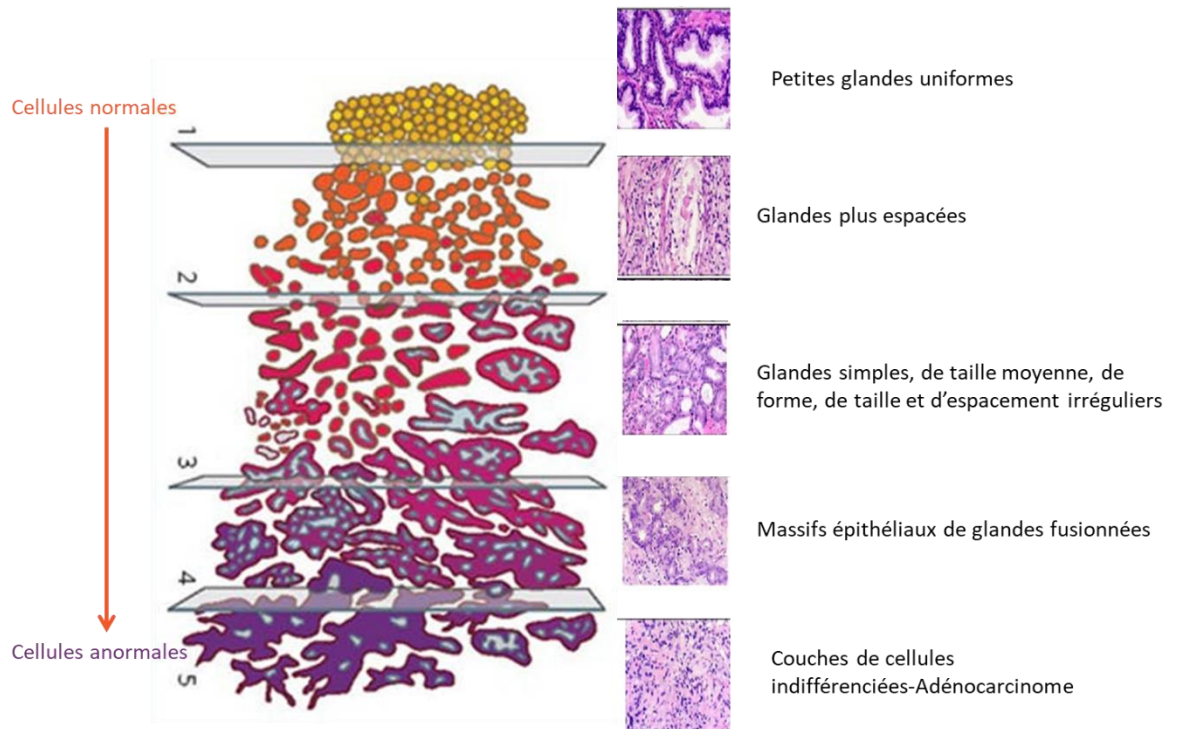


Figure 4: Diagramme schématique du score de Gleason.

Cette échelle histologique permet de noter la tumeur en fonction de sa différenciation. Grade 1, les cellules sont petites et uniformes. Grade 2 les acini sont de taille moyenne et toujours séparés par le stroma. Grade 3, une variation de taille glandulaire apparaît avec la naissance d'infiltration dans le stroma. Grade 4, des cellules atypiques s'infiltrent dans les tissus environnants. Grade 5, les cellules deviennent totalement indifférenciées (Adapté de : (Farooq et al. 2017; Weaver 2018)).

1.3. La classification ISUP

Depuis 2014, une nouvelle classification est utilisée, affinant l'analyse des médecins pathologistes et surtout utilisant un code plus facile à expliquer au patient. Le grade de Gleason est encore utilisé, mais la notation est changée :

- Groupe 1 : ancien Gleason 3+3. Correspond à une tumeur bien différenciée (le plus bénin)
- Groupe 2 : ancien Gleason 3+4 (majorité de grade 3). Tumeur bien à moyennement différenciée
- Groupe 3 : ancien Gleason 4+3 (majorité de grade 4). Tumeur moyennement différenciée
- Groupe 4 : ancien Gleason 4+4. Tumeur peu différenciée

- Groupe 5 : anciens Gleason 9 ou 10, comprenant des cellules de grade 5, dites indifférenciées : les cellules et la glande sont tellement altérées qu'il n'y a plus de ressemblance avec la prostate normale (le plus agressif et évolutif).

2. Le micro-environnement tumoral (MET)

Le micro-environnement tumoral (MET) présente plusieurs particularités qui le différencie du microenvironnement des cellules saines et qui crée les conditions favorables au développement du cancer. Ce MET est un réseau complexe composé de matrice extracellulaire, de cellules stromales et de cellules immunitaires/inflammatoires qui conduisent les cellules cancéreuses de l'invasion à l'intravasation et aux métastases [Figure 5] (Alsibai and Meseure 2018).

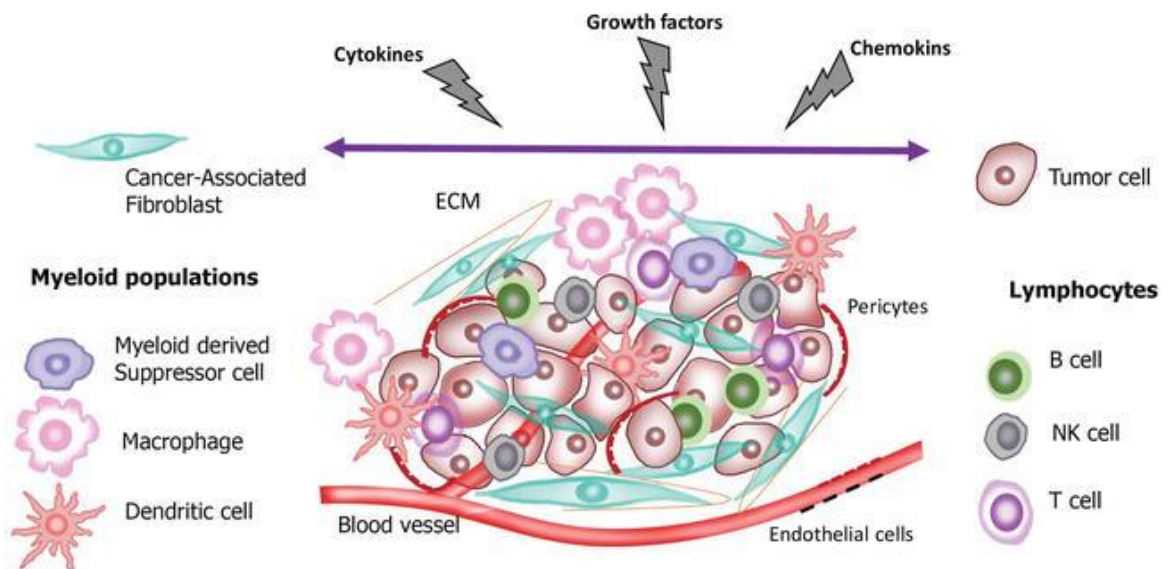


Figure 5: Schématisation du microenvironnement tumoral.

Le microenvironnement tumoral est un réseau complexe constitué de matrice extracellulaire (ECM), de cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales et péricytes) et de nombreuses cellules immunitaires et inflammatoires (cellules T, cellules B, cellules « Natural killer » NK, cellules dendritiques, macrophages et cellules suppressives dérivées des myéloïdes). Cette interface entre cellules tumorales et cellules de soutien représente un espace dynamique contenant des cytokines, des facteurs de croissances et des chimiokines. Le recrutement, l'activation, la reprogrammation et la persistance des cellules stromales et des cellules immunitaires et inflammatoires dans l'espace extracellulaire sont les conséquences d'interactions réciproques entre les composants du microenvironnement tumoral et les cellules tumorales (Alsibai and Meseure 2018).

2.1. Les cellules vasculaires

L'angiogenèse, permettant un apport sanguin suffisant en oxygène et en nutriments essentiels, est un élément clé du développement tumoral. Les nouveaux vaisseaux formés présentent une structure anormale et sont désorganisés. Ils sont dilatés, tortueux, hémorragiques et les connections entre les vaisseaux sont anarchiques (Goel, Wong, and Jain 2012). Les cellules vasculaires sont composées de cellules périvasculaires appelées péricytes, de cellules endothéliales formant la paroi interne des vaisseaux et de cellules musculaires lisses. Les péricytes se différencient des précurseurs mésenchymateux et sont recrutés dans les tumeurs par le PDGF β . Dans le tissu tumoral, les péricytes expriment fortement l' α SMA, qui est souvent absent des péricytes quiescents des tissus non tumoraux. Ces cellules peuvent moduler activement les réponses immunitaires et empêcher l'extravasation et l'activation des lymphocytes dans les tissus tumoraux (Navarro et al. 2016). Les cellules endothéliales fonctionnent comme des régulateurs stromaux actifs impliqués dans la prolifération, l'invasion, la sécrétion de médiateurs inflammatoires et de croissance et la dissémination métastatique. Dans la physiopathologie cancéreuse, ces cellules surexpriment des facteurs de croissance pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le TGF- β 1 ainsi que de nombreux récepteurs membranaires (Ghajar et al. 2013). La membrane basale des vaisseaux est également irrégulière, anormalement épaisse et inversement parfois absente sur certaines portions de vaisseaux. Ces altérations sont entraînées par la présence des facteurs pro-angiogéniques présents en grand nombre et de manière hétérogène dans ce MET (Goel, Wong, and Jain 2012; McDonald and Choyke 2003).

2.2. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Les fibroblastes associés au cancer (CAFs) sont une sous-population de fibroblastes, présentant un phénotype ressemblant à celui des myofibroblastes, retrouvés dans les lésions cancéreuses. Ils représentent la majeure partie des cellules du MET dans de nombreuses tumeurs humaines dont le CaP (Ippolito et al. 2019). Ces CAF sont des cellules hétérogènes qui peuvent être identifiées, selon leur origine, par l'expression de protéines telles que les biomarqueurs mésenchymateux (vimentine et fibronectine), la protéine 1 sécrétée par les fibroblastes (FSP-1), l'actine des muscles lisses α (α SMA), la ténascine-C, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) (Turley, Cremasco, and Astarita 2015; Wang et al. 2017). Ces marqueurs sont exprimés de manière très variable d'une cellule à l'autre, ce qui semble indiquer que les CAFs sont formés

de sous-populations pouvant exercer des effets distincts. Les CAFs sont en majorité composés de fibroblastes activés mais également d'une petite portion de fibroblastes non activés (Hanahan and Coussens 2012; Shimoda, Mellody, and Orimo 2010). Contrairement à l'activation temporaire des fibroblastes pendant le processus de cicatrisation, l'activation des CAFs dans le micro-environnement tumoral est permanente. Cette activation est entretenue par des boucles de rétrocontrôle qui impliquent par exemple la sécrétion de TGF- β par les cellules tumorales activant les fibroblastes, qui à leur tour se mettent à produire du TGF- β et s'activent donc par voie paracrine ou autocrine afin de maintenir une perpétuelle activation. Les CAFs favorisent alors la progression tumorale en libérant de nombreuses interleukines (IL-1, IL-6, IL-8 et IL-22) et des chimiokines (CXC-chimiokine ligand CXCL et CC-chimiokine ligand CCL) (Meseure, Drak Alsibai, and Nicolas 2014). Des observations cliniques ont démontré qu'une expression élevée du TGF- β dérivé du stroma est associée à un mauvais pronostic et à une maladie localement avancée dans le CaP (Costanza et al. 2017). Le même mécanisme a été observé avec le SDF-1 (stromal cell derived factor 1), initié cette fois par les CAFs avec un maintien de l'activation par le biais d'une boucle autocrine (Kojima et al. 2010). Ces CAFs présentent donc un phénotype différent des fibroblastes avec une multiplication plus rapide, une motilité accrue et une surproduction de collagène, de macromolécules, de facteurs de croissances, d'enzymes hydrolytiques, de cytokines et de chimiokines.

Finalement les CAFs sont des acteurs particuliers de la tumorigenèse car ils sont les architectes du MET. En effet bien que les cellules cancéreuses agissent de façon directe sur le MET pour le modifier et le rendre favorable à leur développement, elles utilisent aussi largement les CAFs comme intermédiaires afin de modifier les autres composants essentiels de ce même MET.

2.3. Les cellules immunitaires et inflammatoires

Le MET contient de nombreuses cellules immunitaires et inflammatoires provenant de précurseurs lymphoïdes, parmi lesquelles des cellules T cytotoxiques CD8 + (CTL), des cellules T mémoire, des cellules T auxiliaires CD4 + (Th1, Th2 et Th17), des cellules T régulatrices (Treg), des cellules T auxiliaires folliculaires (TFH), des cellules NKT, des lymphocytes B et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Il contient également des cellules provenant de précurseurs myéloïdes : macrophages associés aux tumeurs (TAM), cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC), CD conventionnelles (CDC), neutrophiles, mastocytes, et plaquettes. Le terme lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL)

désigne un groupe de lymphocytes T (CD3, CD4, CD8 et FoxP3) situés autour des cellules tumorales. De plus, les marges invasives des cancers peuvent comprendre des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) qui présentent de fortes similitudes avec l'organisation des ganglions lymphatiques.

Ces cellules immunitaires et inflammatoires infiltrent le MET en réponse aux cytokines chimiotactiques et aux chimiokines produites par les cellules cancéreuses. Ces cellules contactent directement les cellules cancéreuses et induisent leur élimination. Il en résulte une réduction de la tumeur et un meilleur pronostic. L'efficacité du système immunitaire reste cependant limitée et il est peut être observé un échappement des tumeurs (Gonzalez, Hagerling, and Werb 2018; Ostrand-Rosenberg 2008). Durant cette phase d'échappement, les cellules tumorales perdent l'expression des protéines de surface nécessaires à leur reconnaissance par le système immunitaire ; elles peuvent également diminuer la qualité de la réponse immunitaire par un mécanisme d'immunosuppression active. De manière paradoxale, plusieurs études ont montré que l'augmentation du nombre de cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur est favorable à la progression et l'invasion tumorale. En effet, cette progression semble médiée par l'infiltration de cellules souches mésenchymateuses qui vont stimuler l'angiogenèse, l'invasion, la croissance, la survie et la génération de fibroblastes associés au carcinome (CAF), en plus de la suppression de la réponse immunitaire antitumorale innée et adaptative (Klopp et al. 2011; Y. Shi et al. 2016). Le contact cellule-cellule est également limité dans le CaP lui conférant ses propriétés immunosuppressives, en particulier par l'exclusion des lymphocyte T qui sont alors limités au stroma adjacent et aux zones bénignes (Krueger et al. 2019). Il semble donc que le système immunitaire peut avoir des rôles pro ou antitumoraux selon le contexte (Alsibai and Meseure 2018) :

Les cellules dendritiques (CD) forment une famille de cellules composée de trois sous populations : les cellules dendritiques plasmocytoïdes, les cellules dendritiques conventionnelles, appelées aussi myéloïdes, de type BDCA-1+ et de type BDCA-3+. Toutes dérivent d'un précurseur commun avec la lignée monocytaire. Les cellules dendritiques sont essentielles aux interactions entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Balan, Saxena, and Bhardwaj 2019). Elles font partie des premières cellules à migrer vers le site tumoral en réponse aux facteurs de croissance tels que le VEGF et l'HGF, aux chimiokines (CXCL12 et CXCL8) et au peptide antimicrobien (β -défensine) sécrétés par les cellules cancéreuses et les cellules stromales. Ces cellules peuvent se retrouver sous trois formes : précurseurs de CD, qui sont capables de migrer de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires via la

circulation sanguine, les CD immatures, qui vont fixer l'antigène grâce aux récepteurs TLR (récepteur de l'immunité innée), l'internaliser puis le cliver en petits peptides immunogènes. Ces peptides se fixent en retour sur des molécules de CMH II (Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) et activent les CD immatures en CD matures. Cette étape de maturation, en général, implique une redistribution des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), une augmentation de l'expression de surface des molécules de co-stimulation lymphocytaire qui aboutit à une remarquable augmentation de la capacité des cellules dendritiques à stimuler des lymphocytes T, une régulation négative de l'internalisation de l'antigène, des changements morphologiques (par exemple formation de dendrites), une réorganisation du cytosquelette, une sécrétion de chimiokines, cytokines et protéases, et l'expression de molécules d'adhésion de surface et de récepteurs de chimiokines. Parallèlement, les activités endocytiques et phagocytiques des cellules dendritiques diminuent fortement, pour devenir quasiment indécétables (Dalod et al. 2014). Le MET contient beaucoup moins de CD matures que les tissus sains correspondants et présentent une abondance de CD immatures avec une capacité réduite à stimuler l'immunité antitumorale adaptative. La présence des CD favorise la vascularisation tumorale avec une activité pro angiogénique plus élevée pour les CD immatures (Fainaru et al. 2010) via le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A).

Les macrophages sont des cellules effectrices indispensables dans la cascade immunitaire, cependant dans le micro-environnement tumoral, certaines interleukines ou le facteur de nécrose tumorale (TNF) peuvent induire une altération de leur activité normale et les conduire à exercer un effet pro-tumoral. Ils acquièrent la capacité à synthétiser et sécréter des facteurs chimiotactiques qui stimulent la capacité métastatique des cellules tumorales. En plus des facteurs chimiotactiques, ils peuvent augmenter l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales par le biais d'une production de facteurs de croissance tels que EGF, VEGF ou PDGF. Les monocytes, recrutés au niveau du site tumoral, peuvent se différencier en TAM (*Tumor associated macrophage*) qui, dans la majorité des tumeurs solides comme le CaP, représentent le type de cellules immunitaires le plus abondant dans le MET. Les macrophages possèdent une plasticité et peuvent différer en fonction de leur état de polarisation (Locati, Curtale, and Mantovani 2020). Il en résulte deux phénotypes distincts : les macrophages activés de manière classique (M1) qui sont caractérisés par une grande capacité à présenter des antigènes et sont donc impliqués dans la réponse des cellules Th1 aux pathogènes et au cancer et les macrophages activés de manière alternative (M2) qui possèdent un phénotype

immunosuppresseur qui produisent des facteurs dont la présence est cruciale pour initier une réponse de type Th2. Au sein du MET, les TAM ont généralement un phénotype M2 et vont favoriser l'angiogenèse, le remodelage de la MEC et la réparation (Mantovani et al. 2002; Shiao, Chu, and Chung 2016). Ainsi, un certain nombre d'études ont indiqué qu'une abondance plus élevée de macrophages CD68 + dans les tissus tumoraux reflète un comportement tumoral agressif et des résultats défavorables pour les patients atteints de cancer de la prostate (Larionova et al. 2020).

A l'instar des macrophages, les lymphocytes T (Th1 et Th2), les lymphocytes NKT ont aussi des rôles anti- ou pro-tumoraux selon leurs phénotypes. De la même manière, les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), en plus de supprimer des mécanismes d'immunosurveillance tels que la présentation d'antigène des CD ou l'activation des lymphocytes T, favorisent grandement la vascularisation tumorale (Ostrand-Rosenberg 2008; Shiao, Chu, and Chung 2016).

Finalement, au cours du développement de la tumeur, le MET pré-invasif présente une propriété antitumorale qui comprend principalement des cellules M1 et Th1 produisant de l'IL-12, de l'IFN γ et l'oxyde nitrique synthase (iNOS). La transition vers le MET invasif est marquée par l'acquisition de propriétés pro-tumorales avec un passage de macrophages M1 à M2 et des cellules Th1 à Th2 entraînant une diminution de l'IFN γ et une augmentation de l'IL-1, IL-6, VEGF et indolaminine 2,3-dioxygénase (IDO) (Chimal-Ramírez, Espinoza-Sánchez, and Fuentes-Pananá 2013). Topographiquement, chaque type de cellule immunitaire et inflammatoire a un emplacement préférentiel au sein du MET. Les cellules Th1 sont situées aux marges invasives et/ou dans le noyau de la tumeur. Les CD immatures se trouvent dans le noyau également, tandis que les CD matures sont en contact étroit avec les cellules T CD4+ et CD8+. Les TAM et les TFH sont au contact ou dans les zones des cellules B, tandis que les cellules NK sont dispersées dans le stroma et sur les marges invasives (Goc et al. 2013).

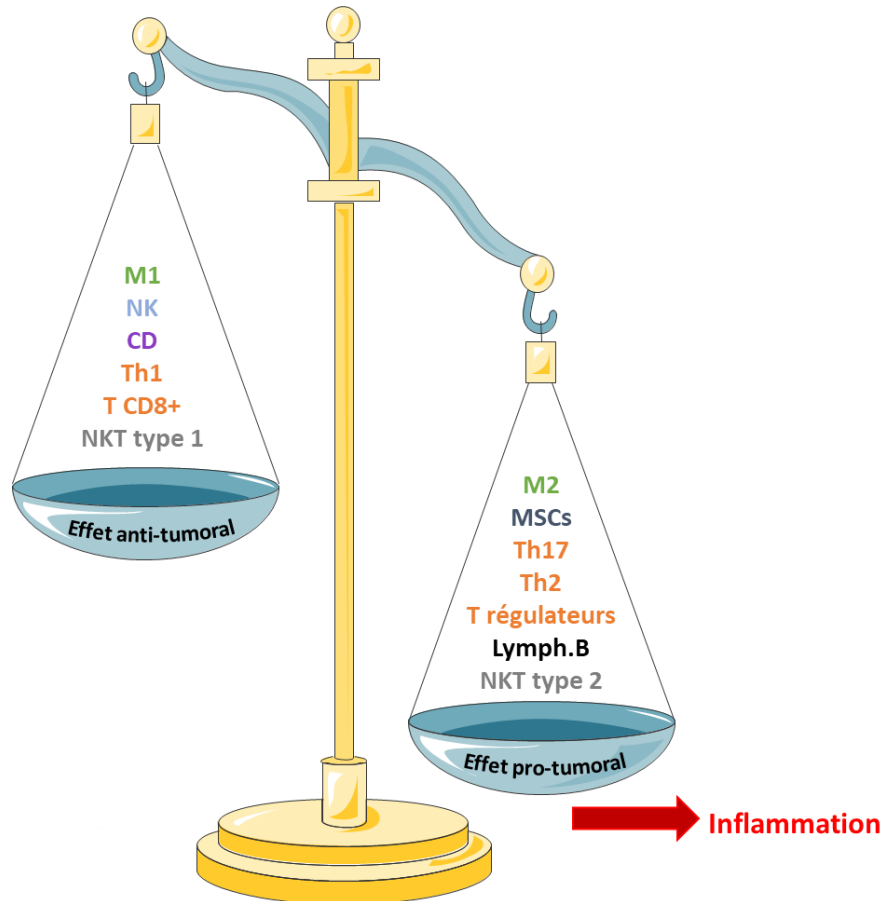


Figure 6: Balance entre les effets anti et protumoraux des différents effecteurs du système immunitaire

Macrophages : M1 et M2 ; Lymphocytes T ; Lymphocytes B ; Cellules myéloïdes Suppressives ; Lymphocytes NK ; Lymphocytes NKT type 1 et type 2 ; Cellules dendritiques.

2.4. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de protéines (collagènes, laminines et fibronectines), protéoglycanes et hyaluronanes dans une organisation spécifique. Cette composition de la MEC se voit totalement dérégulée et désorganisée dans le MET par rapport à un microenvironnement sain. Cela se traduit par une modification de ses propriétés biochimiques et physiques conduisant à son altération, de par la diminution de la quantité de molécules présentes mais aussi de par sa composition et son organisation structurale. Ce remodelage implique de nombreuses enzymes, notamment les héparanases, l'urokinase, les métalloprotéinases matricielles, la lysyl oxydase et des cathepsines (Bissell, Kenny, and Radisky 2005). L'expression de ces enzymes est souvent retrouvée dérégulée dans le cancer, le plus souvent elles sont surexprimées, permettant une modification importante de la MEC (Ilan, Elkin, and Vlodavsky 2006). L'hétérogénéité de la MEC est cruciale dans le contrôle des

comportements invasifs et du pouvoir métastatique des cellules tumorales. La MEC sélectionne ainsi les cellules cancéreuses survivantes afin de favoriser la croissance et l'invasion de la tumeur. De plus, la MEC contient les cytokines, les facteurs de croissances et les hormones sécrétées par les cellules stromales et cancéreuses, qui agissent indirectement sur les capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales (Drak Alsibai and Meseure 2018). Elle fournit également un microenvironnement hypoxique et/ou acide plus favorable à la survie des cellules cancéreuses que des cellules saines. Enfin, la MEC interagit avec les lymphocytes (principalement les lymphocytes T) et influence donc de manière cruciale la motilité et la localisation des cellules immunitaires, ce qui aide les cellules tumorales dans la suppression de la réponse immunitaire (Turley, Cremasco, and Astarita 2015).

2.5. La neurogenèse

Comme le développement de l'embryon nécessite une neurogenèse, une hématopoïèse et une angiogenèse, l'initiation de tumeurs primaires et l'apparition de métastases nécessitent le développement d'un réseau nerveux, immunitaire et vasculaire (Eichmann and Thomas 2013). Les fibres nerveuses nouvellement formées s'infiltrant et se développent dans de nombreux cancers solides, y compris les cancers de la prostate (Magnon et al. 2013). Dans le CaP, le nombre de neurones par ganglion est augmenté, ce qui suggère qu'un processus potentiel de neurogenèse se produit dans les tumeurs et que ce processus participe au développement et à la progression de la tumeur (Ayala et al. 2008). Cette neurogenèse est corrélée aux caractéristiques de cancer agressif et à la récurrence du CaP. La dénervation chirurgicale ou chimique des nerfs adrénergiques sympathiques inhibe l'initiation des tumeurs de la prostate et le blocage de la signalisation cholinergique parasympathique diminue la propagation des cellules cancéreuses de la prostate (Magnon et al. 2013). Une étude clinique rétrospective a même démontré une réduction de la mortalité spécifique au CaP chez que des patients présentant une maladie à haut risque ou métastatique recevant des bêtabloquant (ratio de sous-risque ajusté : 0,79 ; intervalle de confiance à 95% : 0,68-0,91 ; $p=0,001$) (Grytli et al. 2014). Le système nerveux central peut également réguler le développement et la progression du cancer. Dans des conditions de stress, il peut activer le système nerveux autonome ou l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien; il en résulte la sécrétion de divers médiateurs (tels que les glucocorticoïdes et les catécholamines) qui favorisent l'initiation et la progression de la tumeur (Magnon 2015). Par ailleurs, il a été récemment démontré que le réseau neuronal adrénergique intratumoral peut provenir de la différenciation de progéniteurs neuronaux issus du système nerveux central (Mauffrey et al. 2019). L'existence de la neurogenèse adulte chez l'homme, qui a fait débat jusqu'en 2018,

semble être une réalité (Moreno-Jiménez et al. 2019). L'étude de la neurogenèse adulte chez les mammifères passe par la détection de certains marqueurs qui sont maintenant bien décrits et étudiés, notamment chez les rongeurs. On peut par exemple citer la doublecortine (DCX), une protéine dont l'expression est enrichie dans les nouveaux neurones encore immatures, couramment utilisée pour détecter les nouveaux neurones chez les mammifères. L'analyse d'une cohorte de patients atteints d'une hyperplasie bénigne ou d'un cancer (de haut grade ou de bas grade) de la prostate a révélé que les tumeurs cancéreuses primaires de haut grade sont infiltrées par des cellules stromales exprimant des marqueurs de progéniteurs neuronaux du système nerveux central, notamment la DCX, et dont le nombre est associé à l'agressivité et au caractère invasif du cancer. Les résultats de l'équipe du Dr Magnon, obtenus chez un modèle murin transgénique du cancer de la prostate, indiquent qu'une sous-population de progéniteurs neuronaux quitte la zone sous ventriculaire (ZSV) en traversant une barrière hémato-encéphalique localement perméabilisée, pour gagner la circulation sanguine et migrer jusqu'à la tumeur primaire. Dans les tissus tumoraux, ces progéniteurs se différencient en neurones adrénergiques, qui participent aux premières étapes du développement tumoral (Mauffrey et al. 2019). De même, les cellules cancéreuses de la prostate qui atteignent l'os, favorise la germination des neurones sensoriels positifs au CGRP et au NF200 dans la moelle osseuse, participant aux douleurs osseuses induites par le cancer. Ces fibres nerveuses sensorielles coexpriment également TrkA et GAP43 qui est impliqué dans la germination et la régénération nerveuses dans les systèmes nerveux central et périphérique (Juan M. Jimenez-Andrade et al. 2010). Cette germination ectopique se produit dans les fibres nerveuses sensorielles qui sont présentes à proximité de la tumeur, des cellules stromales associées et de l'os nouvellement formé lors du remodelage. Cet ensemble de fibres nouvellement créées forment des lésions sclérotiques et génère des douleurs qui seront décrites dans la suite de ce manuscrit.

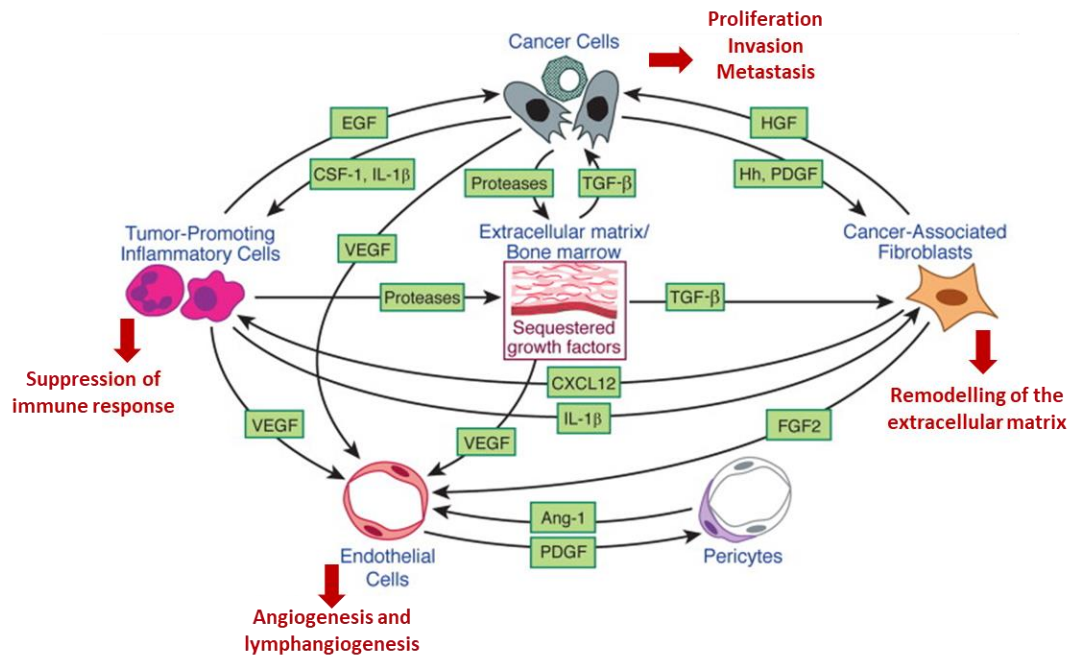


Figure 7: Principales interactions entre les cellules du microenvironnement lors de la progression tumorale (Adapté de Hanahan and Weinberg 2011).

C'est l'ensemble de ces facteurs associant cellules tumorales et microenvironnement qui gouverne toutes les étapes de la carcinogénèse dans le CaP [Figure 7]. Ainsi, prendre en compte la tumeur et son environnement est nécessaire pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

3. Mécanismes physiopathologiques : les étapes de la carcinogénèse prostatique

Le CaP est un adénocarcinome qui se développe majoritairement (85% des cas) au niveau de la zone périphérique de cet organe à partir des cellules épithéliales qui constituent le tissu de revêtement de la prostate (Institut National Du Cancer 2020a). La mise en place et la progression de ce cancer est un processus relativement long au cours duquel il est possible de distinguer différentes étapes : l'atrophie inflammatoire, la néoplasie intra-épithéliale, le carcinome puis l'invasion métastatique [Figure 8].

Introduction bibliographique
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

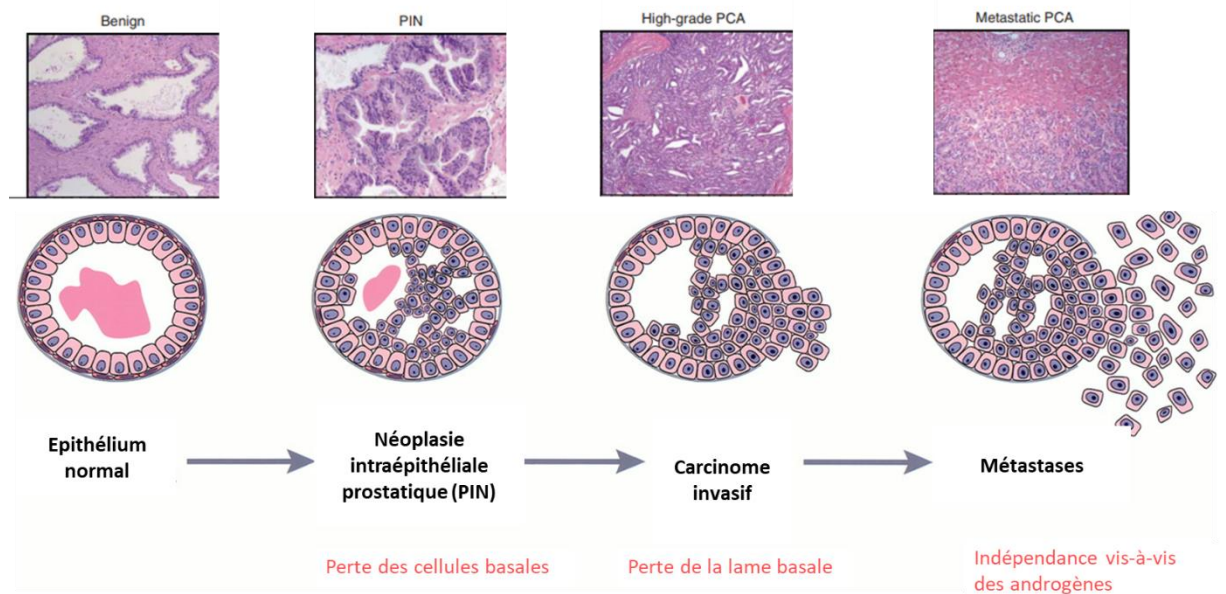


Figure 8: Description des différentes étapes de progression du cancer de la prostate.

Le CaP se développe à partir de l'épithélium. On distingue plusieurs stades d'évolution au cours de son évolution. Les cellules épithéliales prolifèrent de façon incontrôlée à l'intérieur du compartiment luminal entraînant la formation de néoplasies intra-épithéliales (PIN). Après ouverture de la lame basale, les cellules proliférantes envahissent le compartiment stromal ce qui caractérise l'étape du carcinome invasif. Enfin, les cellules tumorales peuvent évoluer vers des stades plus agressifs leur donnant la capacité de coloniser d'autres tissus pour former des tumeurs secondaires ou métastases. Modifié d'après (Abate-Shen and Shen 2000; Tomlins et al. 2007).

3.1. L'atrophie inflammatoire proliférative (PIA)

La PIA est décrite comme une prolifération de l'épithélium glandulaire de la prostate avec l'apparence morphologique d'une atrophie associée à une inflammation (Ruska, Sauvageot, and Epstein 1998). Au sujet des lésions, une prolifération des cellules épithéliales est retrouvée associée à des cellules inflammatoires telles que des mononucléaires et/ou des polynucléaires neutrophiles à la fois dans le compartiment épithélial mais également stromal, avec une atrophie stromale associée à une fibrose plus ou moins importante. Cette étape inflammatoire est donnée comme étant une réponse proliférative aux dommages environnementaux que l'on retrouve chez l'homme âgé. Cependant, son implication dans la cinétique de carcinogenèse est très controversée. Ainsi, d'après Tomlins et al, elle correspondrait à une étape très précoce voire sans rapport avec le cancer (Tomlins et al. 2007). De plus, certaines des signatures moléculaires de la transformation néoplasique sont retrouvées dans cette étape précoce (Joshua et al. 2008).

3.2. La néoplasie intra-épithéliale ou PIN

Il s'agit pour cette étape de l'apparition des lésions présumées initiatrices de la carcinogenèse prostatique. La majorité des altérations rapportées au cours de la progression tumorale se mettrait en place durant la transition entre l'épithélium sain de la glande prostatique et la néoplasie intra-épithéliale (Tomlins et al. 2007). La mise en place des PIN se traduit par une désorganisation des structures d'unités prostatiques. En fonction de leur architecture et de leur cytologie, elles peuvent être classées en PIN de bas grade (LGPIN : *low grade*) ou de haut grade (HGPIN : *high grade*) (Joniau et al. 2005) regroupées autour de 4 formes majeures qui n'influent pas sur le pronostic : en touffe, micropapillaire, cribiforme et plate [Figure 9].

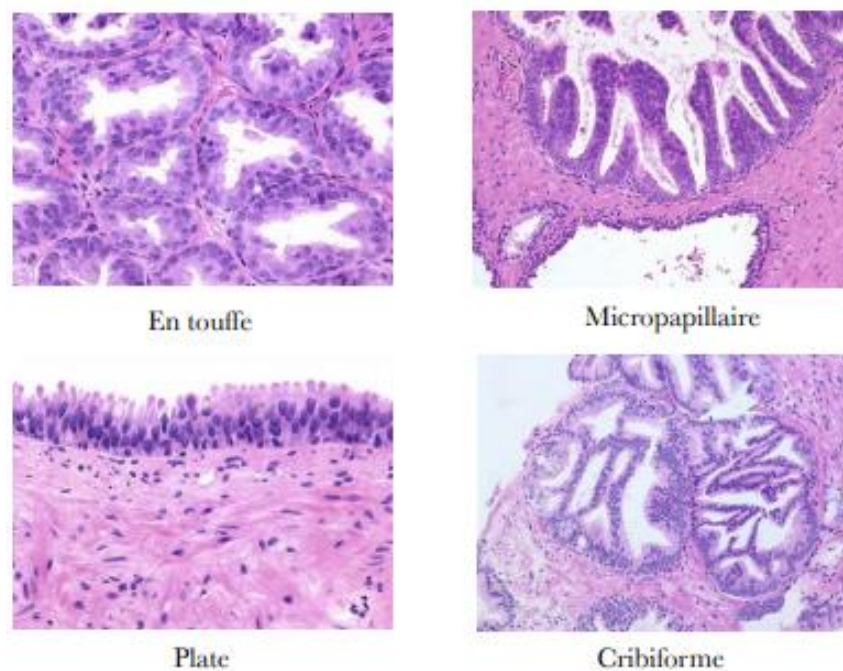


Figure 9: Phénotype histologique des différents types de néoplasies intra-épithéliales.

L'architecture des PIN est regroupée autour de 4 formes majeures : en touffe, microcapillaire, plate et cribiforme. <https://www.webpathology.com>

Les PIN de haut grade seraient une transition entre les PIN de bas grade et les carcinomes invasifs (Abate-Shen and Shen 2000; Bostwick et al. 2004).

3.3. Le carcinome

La perte de la lame basale est la principale caractéristique qui permet de distinguer le carcinome invasif de la PIN de haut grade, les altérations sont semblables entre les deux formes, notamment concernant les marqueurs de différenciation et les anomalies chromosomiques. Au stade de carcinome, les cellules épithéliales basales et lumenales présentent une très forte

activité de prolifération qui se traduit par une augmentation des sécrétions et donc des marqueurs de diagnostic tel que le PSA détectable au niveau plasmatique. Elles deviennent ensuite plus agressives et vont envahir le tissu de soutien de la glande prostatique ainsi que les acini adjacents et enfin les organes voisins (vésicules séminales, vessie et rectum) (Wittekind et al. 2002).

3.4. Le cancer métastatique

3.4.1 La dissémination tumorale

Dans le stade le plus avancé du CaP, la progression tumorale s'oriente vers la formation de métastases qui, outre les ganglions lymphatiques et le cerveau, ont un fort tropisme osseux. L'enchaînement complexe d'événements qui conduit au développement de métastases osseuses implique des étapes communes à tous les mécanismes métastatiques (perte d'adhérence des cellules entre elles et avec la matrice extra-cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse, échappement à l'immuno-surveillance, intravasation dans la circulation sanguine depuis la tumeur primaire, établissement d'une niche pré-métastatique dans le tissu hôte, chimiotactisme, extravasation) mais il existe en plus des processus plus spécifiques au tissu osseux (colonisation de la moelle osseuse, automimétisme, dérégulation de l'activité des ostéoblastes/ostéoclastes) qui permettent de valider la théorie de « semences et sol », proposée par Stephan Paget il y a plus d'un siècle, selon laquelle les cellules tumorales (la semence-*seed*) ont une affinité particulière pour l'environnement de certains organes (le sol-*soil*) (Paget 1889).

Les métastases osseuses surviennent à une fréquence élevée chez les patients présentant un stade avancé de la maladie et entraînent une morbidité et une mortalité importantes. Aujourd'hui, il a été démontré qu'un grand nombre de changements génétiques dans les cellules cancéreuses conduit à la formation d'une interaction préférentielle des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales de la moelle osseuse et entraîne ainsi la libération de chimio-attractants par les cellules cancéreuses à partir d'éléments osseux. Le médiateur clé identifié tout au long de ce processus métastatique est la famille des intégrines. Effectivement, une modification de leur expression et de leur fonction favorise la dissociation des cellules cancéreuses de la masse tumorale primaire et leur migration dans la circulation sanguine. Une fois en circulation, les intégrines facilitent la survie des cellules cancéreuses grâce à des interactions inter-cellulaires : cellules cancéreuses, plaquettes et cellules endothéliales de l'os cible [Figure 10].

Introduction bibliographique
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

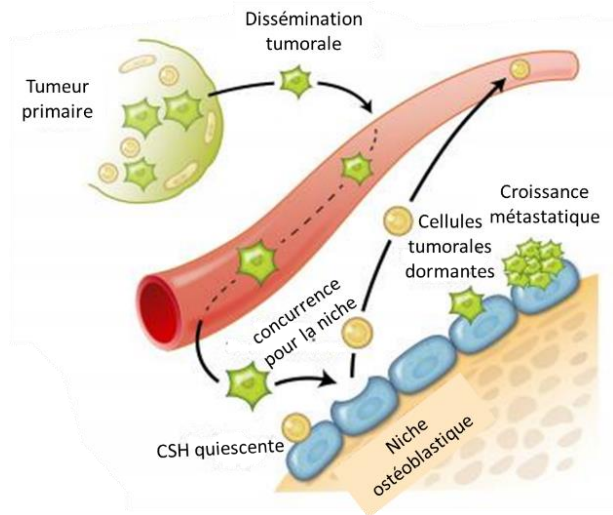


Figure 10: Dissémination métastatique des cellules tumorales de CaP

Les cellules cancéreuses quittent la tumeur primaire après avoir subi des modifications génétiques. Elles migrent alors jusqu'à l'os via la circulation sanguine. Les cellules cancéreuses entrent en compétition avec les cellules souches hématopoïétiques pour s'installer dans les niches ostéoblastiques et restent dormantes parfois plusieurs années avant de redevenir actives et proliférer jusqu'à former une métastase osseuse. CSH : cellules souches hématopoïétiques (University of Michigan 2011).

Différents mécanismes moléculaires ont été décrits dans la formation des métastases ostéoblastiques (formation osseuse) et des métastases ostéolytiques (résorption osseuse) [partie détaillée chapitre II 1.3]. Le CaP génère principalement des lésions ostéoblastiques mais malgré cette distinction, la plupart des métastases osseuses sont un mélange des deux types et présentent des activités simultanées entre ostéoclastes et ostéoblastes probablement en raison de leur rôle complémentaire dans l'homéostasie osseuse. Dans les lésions ostéoblastiques, les cellules tumorales sécrètent des cytokines (IL-1, Tnf- α) afin de favoriser le recrutement et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices, ainsi que la prolifération des ostéoblastes. Lorsque les précurseurs ostéoblastiques sont au contact des précurseurs ostéoclastiques qui possèdent à leur surface la molécule RANK, une liaison se forme avec RANKL des cellules stromales. Cette voie d'activation peut être contrebalancé par la capacité des ostéoblastes et leur précurseur à sécréter l'Optéoprotégérine (OPG). En raison du couplage des activités des ostéoblastes et des ostéoclastes, les ostéoclastes sont également stimulés dans les lésions ostéoblastiques. Cependant, le taux global de résorption osseuse est inférieur à celui de la formation osseuse, peut-être en raison d'un rapport relativement faible de RANKL et d'OPG dans l'environnement. Ainsi, l'effet net sur l'os est une augmentation anormale de la masse osseuse. Les cellules tumorales ostéolytiques peuvent également activer directement les ostéoclastes en exprimant RANKL, Jagged1 et des métalloprotéinases. Une activité ostéoclastique accrue entraîne une destruction osseuse et libère des facteurs de croissance et du calcium de la matrice osseuse, qui à leur tour favorisent l'expansion des cellules tumorales (W. Zhang et al. 2019).

3.4.2 Les niches pré-métastatiques

La moelle osseuse est connue depuis longtemps pour héberger un environnement unique propice à la colonisation par métastase des cellules tumorales. La description récente de la «niche» métastatique osseuse, a permis des avancées dans la compréhension de la contribution du stroma osseux à chaque étape de cette dissémination. Les découvertes dans ce domaine ont démontré que lorsque les cellules cancéreuses colonisent la niche dans laquelle résident normalement les cellules souches / progénitrices hématopoïétiques et mésenchymateuses, une diaphonie bidirectionnelle se met en place entre les cellules tumorales et le stroma métastatique osseux. Cette communication module chaque étape de la formation de métastases osseuses, y compris la colonisation initiale, la formation de micrométastases, la croissance des macrométastases et le maintien de la dormance à long terme des cellules tumorales disséminées dans l'os. Des facteurs sécrétés par la tumeur primaire TDSF (*Tumor-Derived Secreted Factors*) prépareraient à distance les futurs foyers métastatiques dans le tissu cible, favorisant ainsi la mise en place d'un nouveau MET propice à l'accueil des cellules cancéreuses. Il a été démontré que les cellules stromales osseuses, telles que les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules souches/stromales mésenchymateuses, les cellules endothéliales, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et les cellules souches hématopoïétiques, sont capables de moduler la croissance des cellules cancéreuses au sein de l'os. Un grand nombre de médiateurs sécrétés par ces cellules environnantes sont aujourd'hui connu pour impacter cette progression. Ainsi, CX-chimiokine ligand 12 (CXCL 12), des intégrines comme cités précédemment, l'ostéopontine, la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1), le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), Jagged 1 et l'activateur du récepteur du ligand du facteur nucléaire κ -b (RANKL) sont ceux présentant la plus grande influence sur la spécification de la niche métastatique. Le rôle de ces facteurs sécrétés par les tumeurs primaires est double. D'une part, les cellules hématopoïétiques recrutées via leurs récepteurs à la fibronectine vont interagir avec les fibroblastes résidents afin de stimuler la production de fibronectine et ainsi former un site d'ancrage efficace pour les cellules cancéreuses migrantes. D'autre part, les fibroblastes activés vont sécréter à leur tour des facteurs comme le CXCL 12 qui va attirer les cellules tumorales dans cette niche nouvellement formée et permettre leur développement. (Ren, Esposito, and Kang 2015) [Figure 11]. Les mécanismes impliqués dans l'effet des cellules tumorales sur l'os et inversement l'effet des cellules osseuses sur la croissance tumorale seront détaillés dans le chapitre suivant.

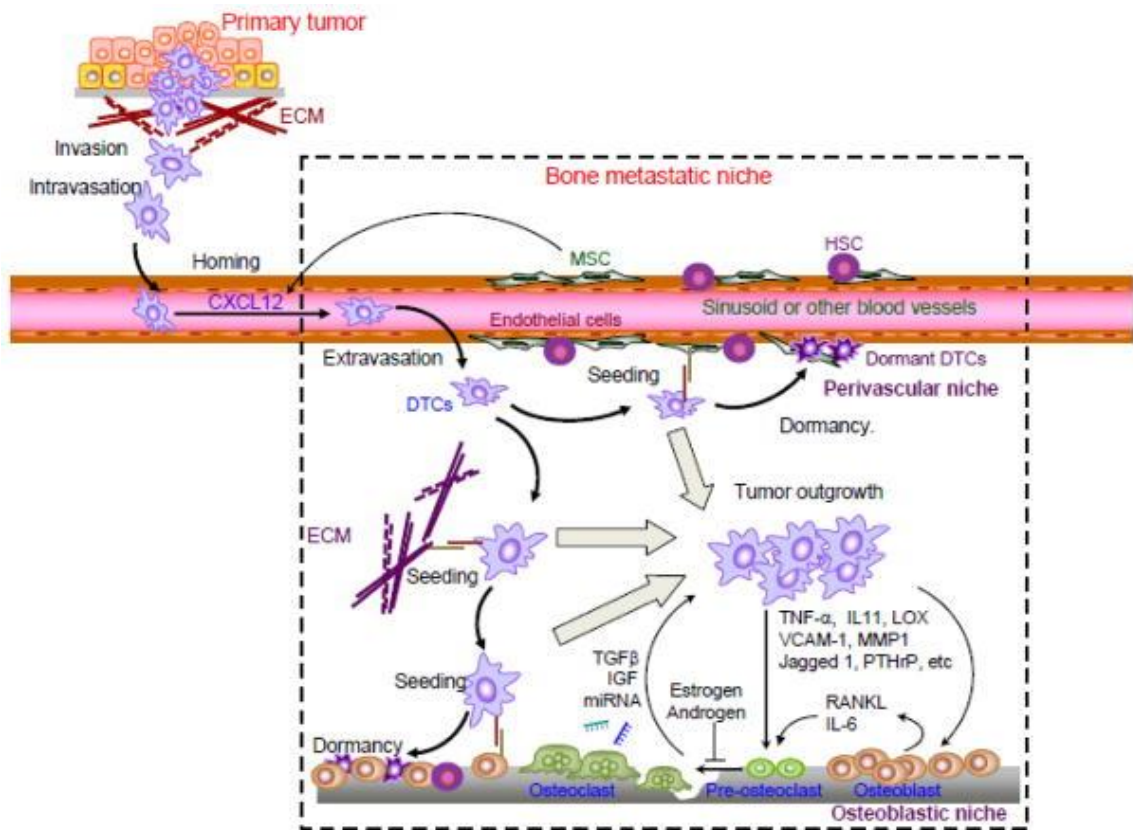


Figure 11 : Schématisation de niche métastatique osseuse lors des étapes de la formation de métastases osseuses

Les cellules de la niche osseuse, notamment les cellules vasculaires, les BM-MSCs et les ostéoblastes, recrutent les DTCs via des facteurs pro-tumorigènes pour qu'ils se logent dans l'os, entraînant la libération de CXCL12. Ces DTCs s'implantent ensuite dans la niche ostéoblastique par adhésion médiée par le stroma menant les cellules dans un état de dormance ou de développement en macrométastases ostéolytiques et/ou ostéoblastiques. Abréviations : EMC matrice extracellulaire, DTC cellules tumorales disséminées, MSC cellules souches mésenchymateuses, HSC cellules souches hématopoïétiques, LOX lysyl oxydase, MMP métalloprotéinases matricielles, PTHrP protéine liée à l'hormone parathyroïdienne, IGF facteur de croissance à l'insuline (Ren, Esposito, and Kang 2015).

III. Stratégies thérapeutiques dans le traitement du CaP

Lorsque le diagnostic est confirmé, le choix de la stratégie thérapeutique est basé sur l'âge du patient, les caractéristiques de la tumeur et les pathologies associées (Litt 2013) [Figure 12].

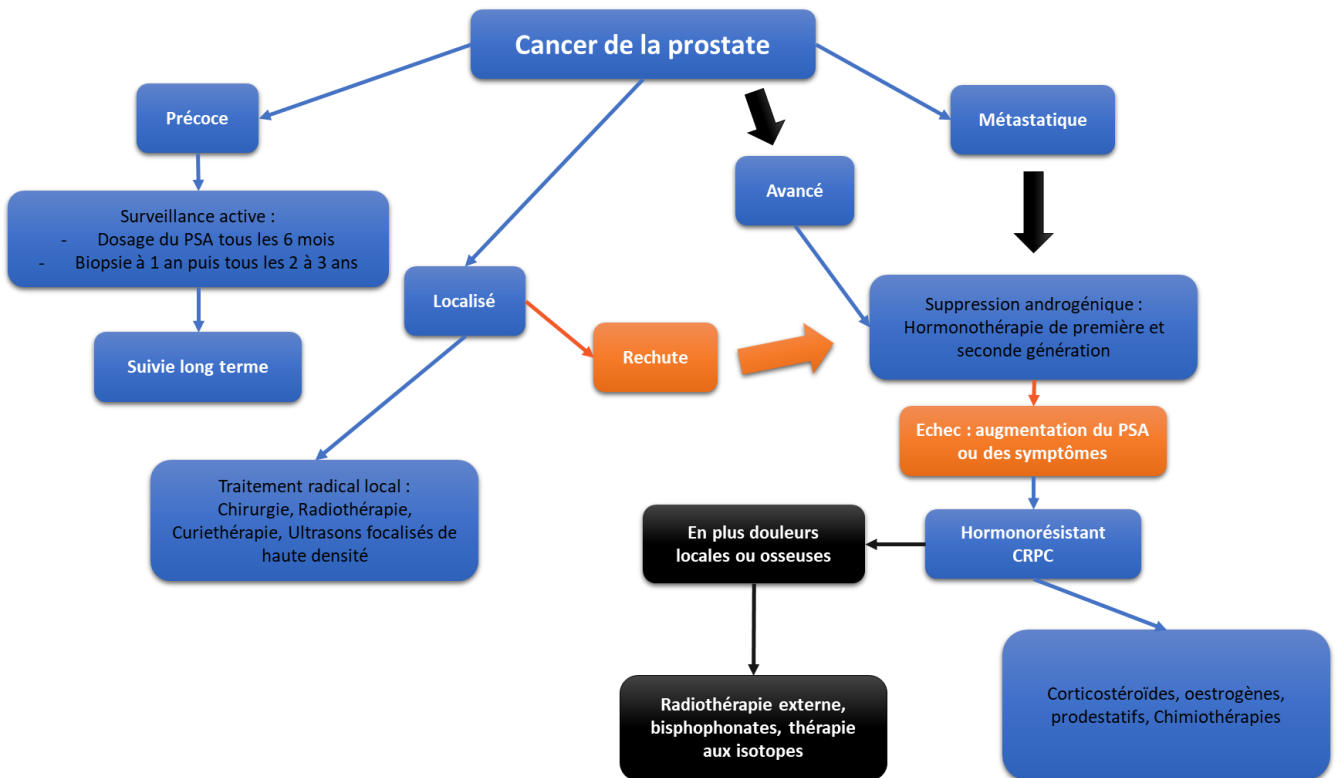


Figure 12: Arbre décisionnel simplifié du traitement du cancer de la prostate. <http://palli-science.com>

1. L'abstention thérapeutique et la surveillance active

L'abstention de surveillance ou *watchful waiting* est une méthode qui consiste à ne proposer aucune thérapie et à repousser tous traitements jusqu'à l'apparition des symptômes du CaP. Elle concerne les hommes ayant un cancer initialement localisé (tumeur localisée et surtout non agressive) et les patients ayant une probabilité de survie limitée (inférieure à 10 ans) en raison des polyopathologies associées. Un traitement palliatif est instauré dès lors que leur cancer devient symptomatique et multi-métastatiques.

Le CaP est un cancer considéré comme latent chez l'homme car il existe une différence importante entre son incidence clinique et autopsique (Mottet and Irani 2008). La survie globale chez des patients dépistés mais non traités (avec un score de Gleason inférieur à 7) est de 70% sur 10 ans (Albertsen, Hanley, and Fine 2005). Contrairement à l'abstention-surveillance, la surveillance active est une option thérapeutique curative qui a pour but de ne pas surtraiter les

CaP à faible risque de progression en l'absence de traitement. Elle consiste à réaliser des dosages de marqueurs de progression (tel que le PSA) tous les 6 mois, des biopsies à 1 an puis tous les 2 à 3 ans et des touchers rectaux de façon rapprochée afin de permettre d'initier un traitement au moment optimal. Dès que l'un des paramètres ne répond plus aux critères fixés lors du premier diagnostic, la tumeur sera considérée comme évolutive et sera traitée. A l'heure actuelle en France, la surveillance active est bien mise en place dans le milieu hospitalier mais elle n'est pas encore standardisée. Un protocole nommé SurACaP (Surveillance active du cancer de la prostate) a été mis en place, il a pour but d'obtenir une survie spécifique à 10 ans pour des patients ne bénéficiant pas d'emblée d'un traitement actif. Cette étude prospective multicentrique nationale a clos ses inclusions en 2011 [**Figure 13**]. Deux ans après la sélection, 55 (34%) des 162 patients initiaux restaient dans le protocole SurACaP. Les sorties de la surveillance active sont survenues majoritairement à la biopsie prostatique de confirmation. Après l'inclusion, 55% des patient restent inclus. Finalement, la cause la plus fréquente de sortie était la présence d'un CaP évolutif. En effet, une étude utilisant les critères d'inclusion SurACaP suggère que ces critères d'inclusion pour ce protocole manquent de fiabilité pour définir les cancers à faible risque. Pour certains auteurs, l'élément qui pourrait être mis en place afin d'améliorer les inclusions dans un protocole de surveillance active est celui de la rebiopsie précoce qui est recommandée par le CCAFU (Comité de cancérologie de l'association française d'urologie). Les critères de sélection SurACaP ne seraient donc pas suffisants selon les premiers résultats obtenus, mais nous aurons les résultats définitifs en termes de survies globales et spécifiques en 2021 (Xylinas et al. 2011).

Introduction bibliographique

Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

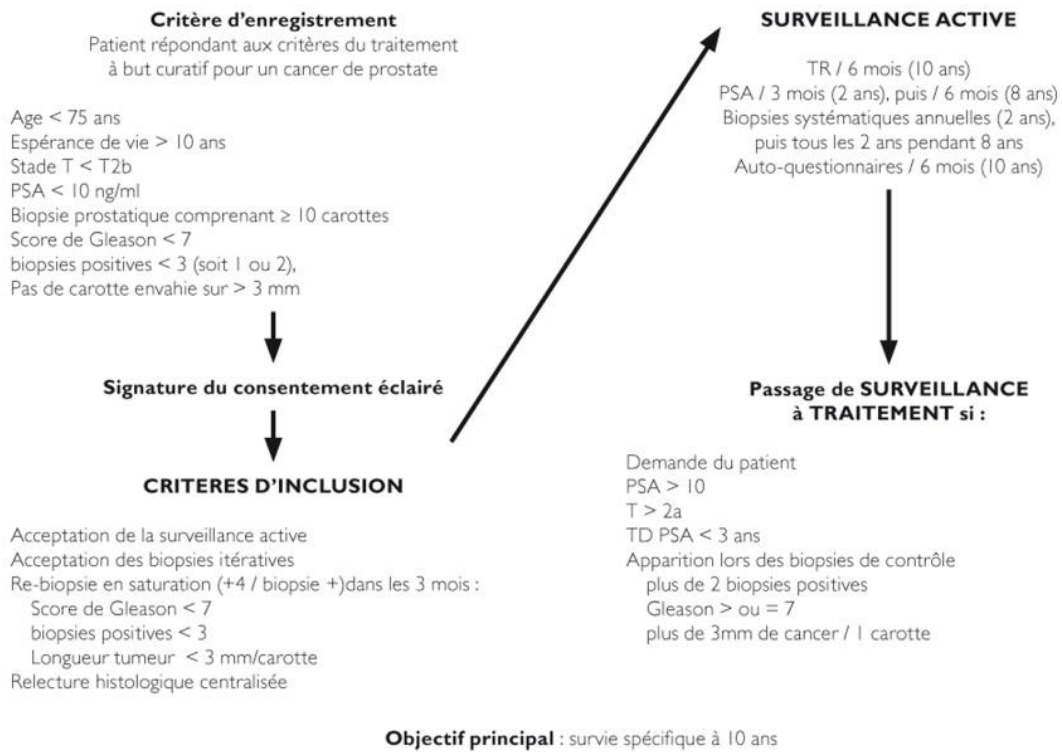


Figure 13: Schéma des démarches à suivre lors d'une surveillance active dans le cancer de la prostate (Mottet and Irani 2008)..

2. La prostatectomie totale

La prostatectomie totale fait partie des traitements de référence du CaP localisé chez des patients dont l'espérance de vie est supérieure ou égale à 10 ans avec un âge limite de 70 ans car la morbidité compétitive augmente et rend le bénéfice de la chirurgie discutable par rapport aux autres alternatives thérapeutiques (Litt 2013). Cette technique s'applique majoritairement aux tumeurs intra-capsulaires, mais elle peut aussi être envisagée pour des tumeurs extra-capsulaires limitées, en particulier chez des patients jeunes, combinée à d'autres modalités thérapeutiques. Elle consiste en l'ablation de la glande et des vésicules séminales soit par voie ouverte rétro-pubienne ou périnéale, par laparoscopie trans-péritonéale ou extra-péritonéale, ou par coelioscopie. Les principales complications sont l'incontinence urinaire (symptôme fréquent durant les premières semaines de cicatrisation, et peut subsister 1 an après dans 5% des cas, nécessitant un sondage urinaire), des dysfonctionnements érectiles, une anéjaculation et une sténose vésico-urétrale. Un suivi par un premier dosage de PSA total est recommandé dans les 3 mois qui suivent la chirurgie et le PSA devient normalement indétectable en 6 semaines. À la suite de cette chirurgie, la survie générale à 5 ans est alors de 95%, le taux de survie sans progression à 5 ans diminue à 22% et le taux de traitement secondaire est de 70% (Rozet et al. 2016).

3. La radiothérapie externe

La radiothérapie consiste à diriger des rayons provenant d'une source externe sur le tissu prostatique afin d'inhiber le développement des cellules cancéreuses (Gross 2011). Cette thérapie demande une approche pluridisciplinaire faisant intervenir oncologue, radiothérapeute, chirurgien et radiologue. Après un repérage radiographique de la prostate, cette technique vise à cibler préférentiellement les cellules tumorales à l'aide de radiations ionisantes dont l'intensité est calculée par rapport au volume prostatique à traiter afin de cibler au mieux les tissus cancéreux tout en épargnant le plus possible les structures anatomiques saines. Ces rayons X, de très haute énergie, agissent en altérant le patrimoine génétique des cellules. La dose optimale est calculée pour provoquer des lésions de l'ADN suffisamment importantes et nombreuses pour que ces cellules se trouvent dans l'incapacité de les réparer entraînant leur mort cellulaire dès lors que les cellules tentent de se multiplier. C'est le traitement de référence des cancers localisés de bas grade ou de grade intermédiaire. Il est souvent associé à l'hormonothérapie pour les cancers localisés de haut grade ou localement avancés. En effet, l'hormono-radiothérapie a démontré un effet supérieur à la radiothérapie seule sur le contrôle local, le contrôle biochimique, l'apparition de métastases et sur la survie globale à 10 ans (Etude EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), niveau de preuve 1) et l'association radiothérapie à l'hormonothérapie de longue durée (>3 ans) sont les standards thérapeutiques du traitement de cancers localement avancés (Heidenreich et al. 2008). Enfin, la radiothérapie externe est également utilisée dans le traitement des douleurs des métastases osseuses (Institut National Du Cancer 2020b). Les principaux effets secondaires de cette thérapie sont des rougeurs de la peau (dû à l'intensité des rayons) et une inflammation de la vessie et de l'urètre.

Il est important de noter que les patients présentant une récurrence de l'augmentation de PSA après une prostatectomie totale ou une radiothérapie primaire présentent des risques différents de mortalité ultérieure spécifique au CaP. Une étude clinique a montré que les hommes avec un temps de doublement du PSA < 3mois et un score de Gleason de 8-10 avec un temps de récurrence biochimique <3 ans représentent un sous-groupe avec un risque élevé de développer des métastases agressives entraînant une dégradation rapide du CaP et la mort des patients (Cornford et al. 2017).

4. La curiethérapie

La curiethérapie est une intervention qui est réalisée sous anesthésie par un urologue accompagné d'un oncologue radiothérapeute. Il s'agit d'implanter de façon permanente des grains d'iode 125 ou de façon temporaire de l'iridium 192 dans la masse tumorale et de laisser la radioactivité détruire la tumeur au cours du temps (Pommier et al. 2016). Les grains radioactifs émettent sur une distance faible permettant ainsi de mieux cibler les tissus cancéreux en évitant la destruction des tissus sains. Cette thérapie est majoritairement indiquée en cas de cancer localisé de bas grade (score de Gleason < 6). Les effets secondaires associés sont l'apparition d'ecchymoses et de saignements au niveau du lieu d'insertion des implants, réalisée par échoguidage, mais également de troubles urinaires (inflammation, hématurie, rétention d'urine) et plus tardivement des troubles de l'érection dans 30% des cas (Institut National Du Cancer 2020b).

5. Les ultrasons focalisés de haute densité (HIFU)

Cette technique non invasive est basée sur l'utilisation d'ultrasons focalisés de haute intensité sur une zone définie à l'intérieur de la prostate *via* une sonde endorectale afin d'obtenir un effet d'ablation thermique. Les ultrasons sont émis sous forme d'impulsion détruisant de petites zones ciblées (22mm de long et 2mm de diamètre). Selon le volume de la prostate 400 à 600 tirs sont nécessaires pour traiter toute la zone (1 à 3h d'intervention). Le patient est ensuite sondé afin d'éliminer les urines résiduelles jusqu'à diminution de l'œdème. Ce traitement peut être proposé dans des cas de cancer localisé de bas grade et lorsque la radiothérapie n'a pas eu d'effet (Rebillard, Davin, and Soulie 2003; Rozet et al. 2016). Les principaux effets secondaires sont liés à des troubles mictionnels et comme pour les autres traitements curatifs des cancers localisés, à long terme cet examen peut entraîner une incontinence urinaire et une sténose de l'urètre prostatique.

6. L'hormonothérapie

Tout comme le développement et le maintien de l'homéostasie de la prostate, la progression du CaP est fortement dépendante des hormones masculines : les androgènes, qui proviennent des glandes surrénales, et plus particulièrement la testostérone qui elle est produite par les testicules. Le principal objectif des anti-androgènes est donc de bloquer la production de ces hormones afin d'éviter toute stimulation sur les cellules cancéreuses et ainsi stopper le développement du cancer. Associée à la radiothérapie, il s'agit du traitement de référence des

cancers de la prostate localisés de haut grade ou localement avancés (Spina 2018). Lorsque les ganglions sont atteints et que des métastases ont été détectées, l'hormonothérapie est utilisée pour une longue durée (Heidenreich et al. 2008). Plusieurs stratégies dont l'efficacité est variable existent [Figure 14].

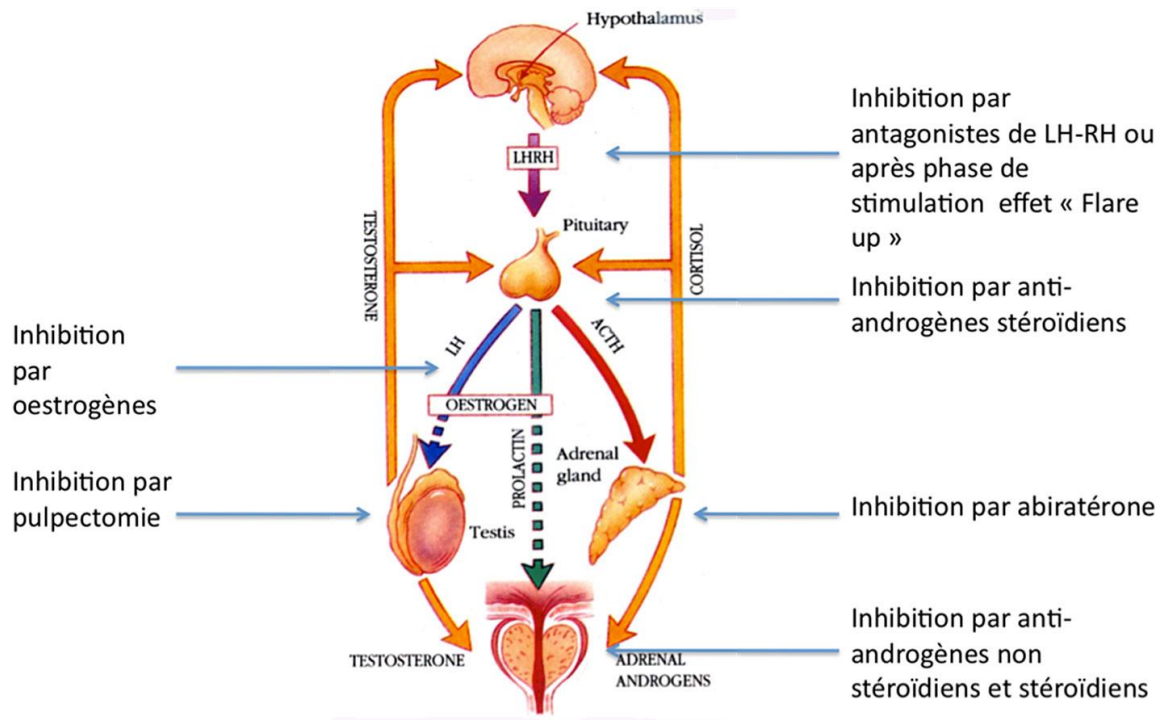


Figure 14: Hormonothérapie du cancer de la prostate.

LHRH (luteinizing hormone releasing hormone), *LH* (luteinizing hormone), *ACTH* (hormone adrénocorticotrope) (Collège Français Des Urologues).

6.1. La castration chirurgicale ou pulpectomie

La castration physique, utilisée au départ dans le cadre d'hypertrophie de la prostate, était initialement la seule solution. Cette intervention chirurgicale vise à supprimer la source de testostérone produite par les testicules. Même si son efficacité est incontestable, elle permet une diminution de 90 à 95% de testostérone et entraîne une régression rapide de la tumeur prostatique, elle est très peu utilisée de nos jours laissant place à la pulpectomie et la castration chimique. La pulpectomie consiste à retirer la pulpe du testicule en laissant en place l'albuginée (enveloppe du testicule) qui est refermée.

6.2. Les traitements chimiques

6.2.1 Les agonistes de la LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*)

La LHRH est une hormone sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus en direction de l'hypophyse antérieure libérant ensuite la LH (*Luteinizing Hormone*). C'est elle qui est responsable de la production de la testostérone au niveau testiculaire. Ces traitements ont pour but de saturer la voie de la LHRH aboutissant progressivement à l'arrêt de production de la testostérone. Il existe un effet rebond à l'induction du traitement entraînant une élévation brutale de la testostéronémie avant son effondrement : cet effet est dit « flare up » nécessitant une co-prescription d'un anti-androgène pendant au moins 1 mois. Des analogues de la LHRH tels que le leuproreléline (Enantone®), Goserelin® ou la triptoreline (Décapeptyl®) stimulent constamment l'hypophyse ce qui engendre une diminution du nombre de récepteurs de LHRH et donc de la production de LH. Ces analogues montrent une efficacité comparable à la castration chimique (Denis 1998) et à l'œstrogène de synthèse, le diéthylstilbestrol (Leuprolide versus Diethylstilbestrol for Metastatic Prostate Cancer 1984).

6.2.2 Les antagonistes de la LHRH

Le seul antagoniste de la LHRH commercialisé en France est le degarelix (Firmagon®). Cette molécule agit en se fixant de façon réversible et compétitive aux récepteurs de la GnRH hypophysaire et engendre une réduction immédiate de LH et donc de la synthèse de testostérone et du PSA circulant (Boccon-Gibod, Iversen, and Persson 2009). Contrairement aux agonistes de la LHRH, les antagonistes n'engendrent pas d'effet « flare up » en début de traitement.

6.2.3 Les anti-androgènes

Il existe deux types d'anti-androgènes : les anti-androgènes non stéroïdiens et les anti-androgènes stéroïdiens. Les anti-androgènes non stéroïdiens ont un mode d'action périphérique : ils agissent au niveau des récepteurs aux androgènes (AR) intra-cytoplasmiques ils entrent en compétition avec la testostérone ou la dihydrotestostérone pour la fixation sur le récepteur androgénique (AR) et inhibent sa translocation vers le noyau et donc son activité biologique (Klotz 2006). Les plus utilisés sont la flutamide (Eulexin®), bicalutamide (Casodex®), nilutamide (Nilandron®). L'acétate de cyprotérone (Androcur®), analogue de l'hydroxyprogestérone, est la seule molécule anti-androgénique stéroïdienne commercialisée en France. Son mécanisme d'action diffère de celui des anti-androgènes non stéroïdiens, il bloque

l'interaction des androgènes avec le AR et provoque une inhibition centrale (Torri and Floriani 2005). Ces anti-androgènes sont le plus souvent administrés en complément des analogues de LHRH.

Les effets secondaires de l'hormonothérapie sont nombreux, majoritairement liés à la baisse de la testostérone : les bouffées de chaleur, des troubles de l'érection, la baisse de la libido et l'irritabilité. Une étude récente a même démontré que la thérapie de privation androgénique pouvait favoriser la prolifération aberrante des cellules épithéliales de la prostate et le développement d'une néoplasie (Bousset et al. 2020). De plus, l'utilisation de médicaments inhibant la synthèse des androgènes accélère la perte osseuse en diminuant la densité osseuse. En effet, le rôle des stéroïdes sexuels sur l'homéostasie osseuse a largement été étudié. La signalisation des AR dans les ostéoblastes est responsable des effets protecteurs des androgènes sur la masse osseuse, conduisant à une diminution de la résorption osseuse. Après l'initiation d'un traitement hormonal, les taux de testostérone chutent drastiquement ce qui entraîne une forte perturbation de l'intégrité osseuse. Une étude a montré que le taux de perte osseuse chez les patients atteints d'un CaP sous une thérapie de privation androgénique était 5 à 10 fois plus élevé que chez les patients témoins sains ou même chez les patients atteints de CaP non hormono-déprimés (Amel Badri, Salawu, and Brown 2019). L'augmentation du risque de fracture doit donc être prise en considération. Classiquement, une monothérapie par agoniste ou antagoniste est prescrite en première ligne. Malheureusement, cette hormonosensibilité n'est que transitoire, en générale pas plus de 30 mois de traitement (Russell et Khatri, 2006). Les cellules deviennent alors pharmaco-résistantes et on parle de CaP résistant à la castration (CRPC).

6.3. Les hormonothérapies de seconde génération

Elles sont indiquées dans les CaP résistant à la castration et métastatiques (CRPCm) et permettent de mieux contrôler la progression tumorale et ainsi d'améliorer la survie globale. Ces nouvelles thérapies sont :

- L'acétate d'abiratérone (ZytigaTM) est un inhibiteur spécifique et irréversible de la synthèse des androgènes. Plus spécifiquement, l'abiratérone inhibe de manière sélective l'enzyme 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17). Cette enzyme est exprimée et nécessaire lors de la biosynthèse des androgènes au niveau des testicules, des glandes surrénales et des tissus tumoraux prostatiques et cellule tumorale prostatique :

- L'enzalutamide (Xtandi™) est un inhibiteur puissant de la voie de signalisation des AR, par inhibition compétitive de la liaison androgène-récepteurs, inhibition de la translocation nucléaire des récepteurs activés et inhibition de la liaison à l'ADN.
- L'aplatumide (Erleada™) est un inhibiteur sélectif de récepteur aux androgènes par liaison directe au domaine de liaison du récepteur. Il empêche ainsi la translocation du récepteur aux androgènes, inhibe la liaison à l'ADN, ralentit la transcription médiée par AR sans activité agoniste sur le récepteur.

Ces hormonothérapies de seconde génération ont démontré une amélioration des symptômes et de la qualité de vie, avec habituellement une bonne tolérance clinique et biologique. Leur utilisation doit se faire avec un maintien de la suppression androgénique.

7. La chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement de référence utilisé lorsque le CaP atteint le stade de cancer métastatique hormono-résistant ou CRPC. Elle est rarement utilisée pour traiter les CaP métastatiques avant hormonothérapie. La chimiothérapie permet de cibler les cellules tumorales quelle que soit leur localisation et d'agir sur les mécanismes de proliférations des cellules à forte vitesse de prolifération (principalement les cellules cancéreuses mais touche également les cellules folliculaires tel que les cheveux, les ongles, etc...). Pour limiter leurs nombreux effets indésirables, ces molécules sont souvent associées à un anti-inflammatoire glucocorticoïde, la prednisone (Pred Forte®) qui a la capacité d'inhiber la production de précurseurs androgéniques surrénaliens et présente en plus des propriétés anti-inflammatoires améliorant l'état général des patients et diminuant les douleurs ressenties. Les médicaments utilisés et la fréquence des chimiothérapies sont adaptés en fonction des individus selon leur cancer mais également leur tolérance au traitement. Le docétaxel (Taxotère®) est le médicament de référence pour le traitement des CRPC, il effectue un blocage de la mitose cellulaire en inhibant la dépolymérisation des microtubules. Au vu de sa toxicité, plusieurs combinaisons (principalement avec des glucocorticoïdes) ont été testées afin de limiter les doses à administrer tout en préservant son efficacité permettant une amélioration de la survie globale des patients de 18,9 mois avec une dose de 75 mg/m² tous les 21 jours pour 6 à 10 cycles (Berthold et al. 2008). Le Cabazitaxel (Jevtana®) est lui le traitement standard de chimiothérapie de deuxième ligne (Rozet et al. 2016) utilisé en cas d'échappement thérapeutique avec un allongement de la survie globale de 2,4 mois avec une dose de 25 mg/m² (De Bono et al. 2010). Il est principalement utilisé chez les patients risquant un cumul de toxicité des taxanes et chez des

patients dont la maladie a progressé rapidement sous hormonothérapie, à condition que le traitement précédent par le docétaxel, ait été bien toléré (Haute Autorité de Santé 2014). Une autre molécule, intercalant de l'ADN, utilisée est le mitoxantrone (Novantrone®). Comme pour les hormonothérapies, la perte osseuse induite par les glucocorticoïdes utilisés en association avec la chimiothérapie est bien connue, ce qui limite leur utilisation.

8. Les médicaments ciblant l'os

Les localisations secondaires du CaP étant essentiellement ganglionnaires et osseuses, la prise en charge des métastases osseuses repose sur des traitements visant principalement à soulager les symptômes en améliorant la qualité de vie des patients et réduisant les douleurs, d'après les directives de l'EAU. Il s'agit donc principalement de soins de supports. Le traitement standard aussi bien dans la prévention que dans le traitement des complications osseuses est l'acide zolédronique qui est un bisphosphonate. Il inhibe la résorption osseuse liée à l'activité ostéoclastique. Le desonumab est un anticorps anti-Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand (RANKL) qui a montré une efficacité supérieure au zolédronate en termes de prévention des dégradation osseuses du CRPCm (Fizazi et al. 2011; Rozet et al. 2016). L'efficacité de ces molécules a été démontrée dans les CRPCm mais leur utilisation nécessite un bilan dentaire initial, dû aux effets secondaires importants d'ostéonécrose de la mandibule. Une supplémentation en calcium et vitamine D est nécessaire afin de minimiser l'impact de ces molécules sur la résorption osseuse (Gartrell et al. 2014). Les radio-isotopes tels que le Strontium⁸⁹ ou le Samarium¹⁵³ ont également un intérêt dans la prise en charge des douleurs associées aux métastases osseuses. Ces molécules agissent en émettant des radiations ionisantes au niveau des cristaux d'hydroxyapatite de calcium qui sont présents en grande quantité au niveau des métastases osseuses. De même le dichlorure de Radium²²³ est indiqué pour le traitement des CRPCm. C'est un émetteur alpha mimétique du calcium qui se fixe sur les zones de fort renouvellement osseux qui, en plus d'améliorer la qualité de vie et de soulager la douleur, a démontré une efficacité en termes de survie globale (survie moyenne de 14,9 mois vs 11,3 mois placebo) (Rozet et al. 2016; Sartor et al. 2014). Cependant, un traitement par cette thérapie est un coût important (environ 5 000 euros/injections non remboursé (Hamdi 2018)) limitant sa prescription par les médecins. De plus, le radium²²³ présente des effets indésirables qui sont : une détérioration de la santé, des douleurs osseuses et des effets indésirables hématologiques (Huynh-Le et al. 2020).

9. Les nouveaux traitements du CaP

La recherche sur le CaP ne cesse de s'améliorer, l'émergence des nouveaux concepts décrit précédemment ont permis l'arrivée de nouveaux traitements pour le CaP localisé et le CaP avancé sur le marché :

L'immunothérapie : Ces thérapies visent à stimuler le système immunitaire du patient afin de détruire plus efficacement les cellules cancéreuses. Le premier vaccin contre le CaP approuvé par la FDA en 2010, Sipuleucel-T (Provenge), est utilisé dans le traitement du CaP avancé qui ne répond plus au traitement hormonal, mais est à l'origine de peu ou pas de symptômes. Ce vaccin est fabriqué spécifiquement pour chaque patient. Il consiste à réaliser trois prélèvements de cellules sanguines circulantes et en extraire les cellules immunitaires, en particulier les cellules présentatrices de l'antigène. Elles sont alors mises en culture *in vitro* et activées par la protéine PA2024 puis réinjectées trois jours après le dernier prélèvement. Une étude a démontré son effet bénéfique objectivé par une augmentation significative de la durée de survie de 4,1 mois (Rozet et al. 2016). Cette avancé a permis d'ouvrir les portes du développement de vaccins thérapeutiques dans le cancer. D'autres médicaments que sont les d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (check-point inhibitors) sont également développés afin de déclencher la réponse immunitaire. Le pembrolizumab (Keytruda) est un inhibiteur qui cible la voie PD-1 une protéine de contrôle sur les lymphocytes T. En effet, certaines cellules cancéreuses contiennent de grandes quantités de PD-L1, ligand de PD1, leurs permettant d'échapper au système immunitaire. Les anticorps monoclonaux tels que le pembrolizumab peuvent bloquer la liaison PD-1/PD-L1 et ainsi stimuler la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses (Isaacsson Velho and Antonarakis 2018).

Thérapies ciblées : Ces thérapies en cours de développement ciblent des parties spécifiques des cellules cancéreuses ou le MET. Chaque type de thérapie ciblée fonctionne différemment, mais toutes modifient la façon dont une cellule cancéreuse se divise, se répare ou interagit avec le MET. Les inhibiteurs de la poly-adénosine diphosphate ribose polymérase (PARP) sont utilisées chez les patients présentent la mutation dans les gènes de réparation de l'ADN (comme BRCA2). Les inhibiteurs tels que l'olaparib, le rucaparib et le niraparib ont montré des résultats prometteurs mais ils nécessitent encore de passer des études cliniques de plus grande envergure. Les anticorps monoclonaux peuvent être liés à des médicaments chimiothérapeutiques ou à des petites molécules radioactives permettant de mieux cibler les cellules cancéreuses face aux cellules saines.

Introduction bibliographique
Chapitre I : Le cancer de la prostate chez l'homme

L'amélioration de la qualité de vie des patients atteints d'un CaP, notamment lorsqu'ils ont des métastases osseuses, nécessite la gestion de la douleur osseuse, et plus globalement la prise en charge de la santé des os chez ces patients comme élément clé (Amel Badri, Salawu, and Brown 2019). Aujourd'hui encore, les traitements utilisés dans la prise en charge des douleurs osseuses du CaP présentent un faible ratio bénéfice/risque essentiellement dû à une très faible efficacité. Une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques impliqués dans la mise en place et l'entretien de cette douleur est nécessaire.

Chapitre II : La douleur osseuse dans le contexte du cancer de la prostate

I. Généralités sur l'os

1. Anatomie et fonction de l'os

Le squelette est la charpente humaine qui soutient le corps et protège les organes internes. La plupart des os sont liés les uns aux autres par des articulations flexibles donnant à cette charpente un grand degré de flexibilité. Chaque os a une forme et une taille propre, selon le travail qu'il fournit et son emplacement dans le corps. Le tissu osseux est l'un des tissus les plus résistants de l'organisme. C'est également un tissu dit dynamique car il est constamment remodelé, capable d'adapter sa densité au taux de sollicitation et ainsi minimiser les contraintes des zones les plus sollicitées. Le squelette a aussi deux autres fonctions principales. La première est une fonction de contrôle du métabolisme phosphocalcique. Le calcium et le phosphore sont en effet présents dans le tissu osseux sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, et interviennent dans la résistance mécanique de l'os. En effet, du fait des pressions mécaniques subies, le remodelage constant du tissu osseux entraîne la libération ou le stockage de ces sels minéraux. La deuxième est une fonction hématopoïétique, la moelle hématopoïétique renfermée dans l'espace médullaire produisant les cellules sanguines qui, lorsqu'elles sont matures, migrent vers la circulation sanguine.

1.1. Classification anatomique de l'os :

On peut classer les os en fonction de leurs caractéristiques anatomiques :

- Les os longs : sont des os dont la morphologie et non leur taille est identique, comprenant un corps central ou diaphyse et deux extrémités ou épiphyses. La clavicule qui n'a qu'une épiphyse, fait exception. Ex : le tibia, le fémur ou encore l'humérus et le radius.
- Les os courts : sont ceux dont les trois dimensions sont à peu près égales, de forme cubique. Ex : les carpiens du poignet et les tarsiens de la cheville.
- Les os plats : sont caractérisés par la prédominance de la longueur et de la largeur sur l'épaisseur. Ex : le sternum, les côtes ou la scapula.

- Les os sésamoïdes : sont un type particulier d'os courts enchâssés dans un tendon. Ex : la rotule.
- Les os irréguliers : n'appartenant à aucune des catégories précédentes. Ils ont une forme complexe. Ex : certains os du crâne, les vertèbres et les os iliaques.

1.2. Constitution des os :

1.2.1 Structure anatomique macroscopique des os

Les os longs sont formés de différentes structures [Erreur ! Source du renvoi introuvable.] :

- Le tissu spongieux, situé au niveau des épiphyses dans les os longs, est imprégné de moelle rouge produisant les cellules sanguines. Elle contient deux types de cellules spécifiques, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) capables de se différencier dans un des trois types de cellules sanguines (leucocytes, érythrocytes ou plaquettes) et les cellules du stroma médullaire qui constitue le tissu de soutien qui permet la multiplication des CSH et leur différenciation.
- La cavité médullaire qui est la partie centrale de l'os contenant la moelle jaune.
- La moelle jaune qui est un tissu adipeux servant de réserve de graisses.
- L'os compact est un cylindre de matière osseuse dont les fibres sont disposées parallèlement à l'axe de l'os. Il forme une protection pour la partie interne.
- Le périoste est un tissu conjonctif composé d'une couche externe fibreuse, d'une couche intermédiaire fibroélastique et d'une couche interne ostéoblastique qui adhère à l'os compact et qui assurent la croissance en épaisseur de l'os. Il permet d'assurer l'insertion des tendons et ligaments sur l'os.
- Les vaisseaux sanguins et les nerfs pénètrent à l'intérieur de l'os par des trous ou foramen nourriciers.
- Les surfaces articulaires qui sont lisses et recouvertes de cartilage.

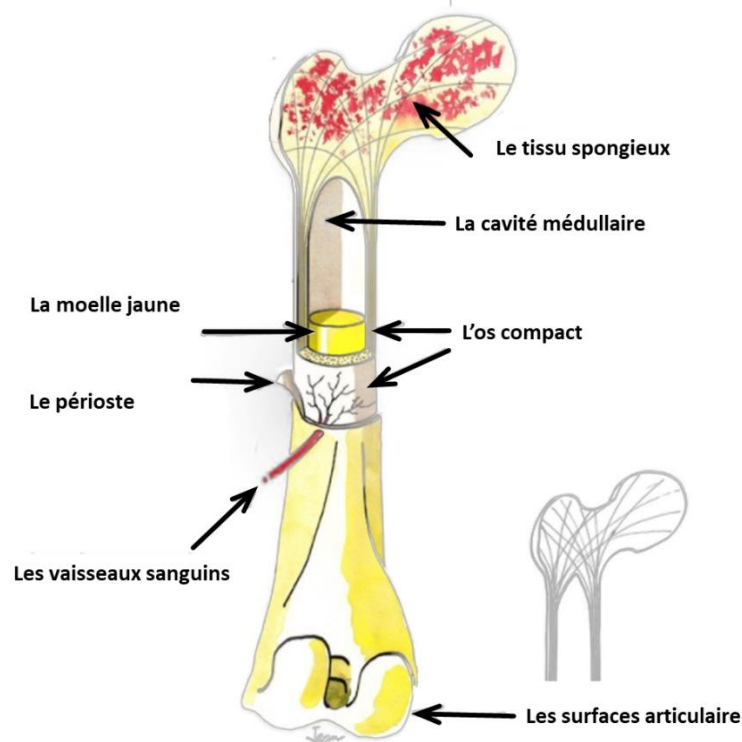


Figure 15: Structure de l'os long (Adapté de : <http://www.jeanduperrex.ch>).

1.2.2 Cellules et matrice extra cellulaire

Les os, innervés et vascularisés, sont constitués d'un tissu conjonctif spécialisé caractérisé par la nature de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) qui a la propriété de se calcifier et de se solidifier. Ce tissu osseux contient 4 types de cellules : d'une part les cellules ostéoformatrices qui comprennent les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes et d'autre part les cellules ostéorésorbantes qui sont les ostéoclastes.

- Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance. Ils élaborent les constituants organiques de la MEC. Ils peuvent être transformés en ostéocytes ou mis au repos sous la forme de cellules bordantes.
- Les ostéocytes eux sont donc des ostéoblastes différenciés incapables de se diviser et sont entièrement entourés par la MEC minéralisée. Ils siègent dans des logettes, et participent au maintien de la matrice osseuse.
- Les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos qui revêtent les surfaces osseuses et sont susceptibles, s'ils sont sollicités par divers médiateurs, de redevenir des ostéoblastes actifs.

- Les ostéoclastes, sont des cellules très volumineuses et sont le siège du processus de résorption osseuse. Ce sont des cellules très mobiles et capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre.

Les ostéoclastes, ostéoblastes et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface du tissu osseux, alors que les ostéocytes sont eux situés à l'intérieur de la matrice extracellulaire du tissu osseux (Chapitre I Les Os 1. FONCTIONS ET ANATOMIE DES OS).

La MEC de l'os est calcifiée et comporte une partie organique et une partie minérale :

- La matrice organique est principalement composée de microfibrilles de collagène, et de différents éléments intervenant dans la minéralisation de la MEC osseuse.
- La partie minérale est constituée de cristaux de phosphate de calcium localisés entre les fibres de collagène et/ou à l'intérieur de celles-ci.

1.3. Le remodelage osseux

1.3.1 Remodelage osseux en condition physiologique

Le squelette adulte est en renouvellement permanent grâce à un mécanisme que l'on appelle le remodelage osseux. Il est défini depuis les années 1970 comme « l'ensemble des processus continus de croissance, de renforcement et de résorption osseuse qui interviennent dans la vie de l'os » (Cowin and Hegedus 1976). Chez l'adulte, le tissu osseux est renouvelé environ tous les quatre mois. Ce mécanisme permet le maintien de l'homéostasie osseuse et il est dépendant des différents types cellulaires cités précédemment. Ce remodelage est un mécanisme cyclique entre résorption et formation successives du tissu osseux grâce à l'association ostéoclastes et ostéoblastes. On peut discerner plusieurs phases :

- Une phase d'activation : La surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la MEC. Sous l'effet de facteurs ostéorésorbants, tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH) ou la prostaglandine E2 (PGE₂) par exemple, les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes (cellules de la résorption osseuse) qui vont alors adhérer à la matrice osseuse. Cet afflux d'ostéoclastes entraîne la synthèse de plusieurs molécules qui vont en même temps entraîner la différenciation des ostéoblastes en nouveaux ostéoclastes.
- Une phase de résorption du tissu osseux : les ostéoclastes devenus actifs vont venir se fixer à la MEC. Cette phase de résorption débute par la dissolution de la phase minérale,

par acidification, et se poursuit par la dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes.

- La phase d'inversion : lorsque les ostéoclastes ont creusé un « trou » appelé lacune de Howship dans le tissu osseux, ils meurent. Des macrophages, cellule du système immunitaire, viennent alors les remplacer afin de lisser le fond de la lacune.
- La phase de formation de tissu osseux : enfin cette phase composée de deux étapes est la plus longue du processus. Les cellules du fond de la lacune se différencient alors en ostéoblastes qui vont synthétiser une nouvelle MEC progressivement minéralisée par la suite.

Il faut savoir que chez l'Homme adulte, la masse osseuse totale demeure constante, car ce processus de résorption/dépôt est égal. Cependant, la formation de tissu osseux est moins rapide que la résorption chez les individus âgés.

1.3.2 Remodelage osseux dans le cancer de la prostate

Alors que les métastases issues de cancers du sein et du poumon ont la propension à induire des lésions osseuses ostéolytiques, les cellules cancéreuses du CaP produisent des lésions à prédominance ostéoblastique avec une composante ostéolytique : elles sont dites mixtes (Chappard et al. 2003; Msaouel et al. 2008). Ces processus entraînant une hypercalcémie, des fractures spontanées et des douleurs débilantes pour les patients. Les différents réseaux de cytokines mis en jeu et l'environnement tumoral entraînent un « cercle vicieux » entre le métabolisme des cellules tumorales et celui des cellules osseuses participant au remodelage physiologique de l'os. Grâce à cette diapasonie initiale, les cellules du CaP métastatiques favorisent le remodelage osseux lors de la formation de tumeurs métastatiques dans l'os. Cette théorie, appelée ostéomimétisme, a été proposée par Knerr et al, elle repose sur l'hypothèse que les cellules du CaP doivent acquérir des propriétés « osseuse » pour s'adapter et se développer dans cet environnement osseux (Knerr et al. 2004; Scimeca et al. 2018). Les cellules de CaP expriment des protéines associées à la maturation et à la différenciation des ostéoblastes : les BMP (Bone morphogenetic protein), les protéines apparentées aux hormones parathyroïdiennes (PTHrP) et l'endothéline-1 (ET-1). Ces facteurs déclenchent l'activation de la voie du ligand RANK/RANKL, facilitant ainsi l'activité des ostéoclastes. L'ostéolyse alors activée est associée à une forte libération de facteurs de croissance et de cytokines de la matrice osseuse qui vont, à leur tour, permettre la progression des cellules tumorales du CaP.

Des études récentes ont démontré que les interactions entre les cellules néoplasiques et les cellules osseuses sont bien plus complexes que ce que nous pensions initialement. Les progrès de ces recherches ont révélé que les tumeurs primaires peuvent « préparer » le site de futures métastases en éduquant les cellules de la moelle osseuse avant même que la propagation métastatique ne se produise. Ces données sont en accord avec l'hypothèse « sol/semence » émise en 1889 par Stephan Paget qui proposait que l'os serait un milieu propice favorisant l'invasion, la fuite immunitaire et la formation des métastases (Paget 1889). De même, la majorité des études se sont concentrées sur la fonction des facteurs solubles tel que le VEGF, la thrombospondine-1, la cytokine pléiotrope IL-6, la lymphotoxine bêta (LT β), la tyrosine kinase-1 de type fms soluble (sFlt-1) dans la progression du CaP (Friedl and Wolf 2003; J. M. Kim et al. 2018; Merz et al. 2016; Ridge et al. 2018). De nouvelles études ont mis en évidence le rôle critique des vésicules extracellulaires (VE) comme messagers des interactions entre cellules de CaP et ostéoblastes (Saber et al. 2020; Willms et al. 2018). Ces VE représentent une population hétérogène de vésicules d'origine membranaire libérées par la majorité des types cellulaires. Leur principale caractéristique est le transfert de molécules actives (acides nucléiques, protéines, lipides) vers les cellules receveuses, influençant leurs propriétés physiologiques (Yáñez-Mó et al. 2015). Ainsi, les VE dérivés du CaP sont capables de faciliter la progression tumorale en orientant les ostéoblastes vers un phénotype pro-tumorigène (Furesi, Rauner, and Hofbauer 2020) [Erreur ! Source du renvoi introuvable.].

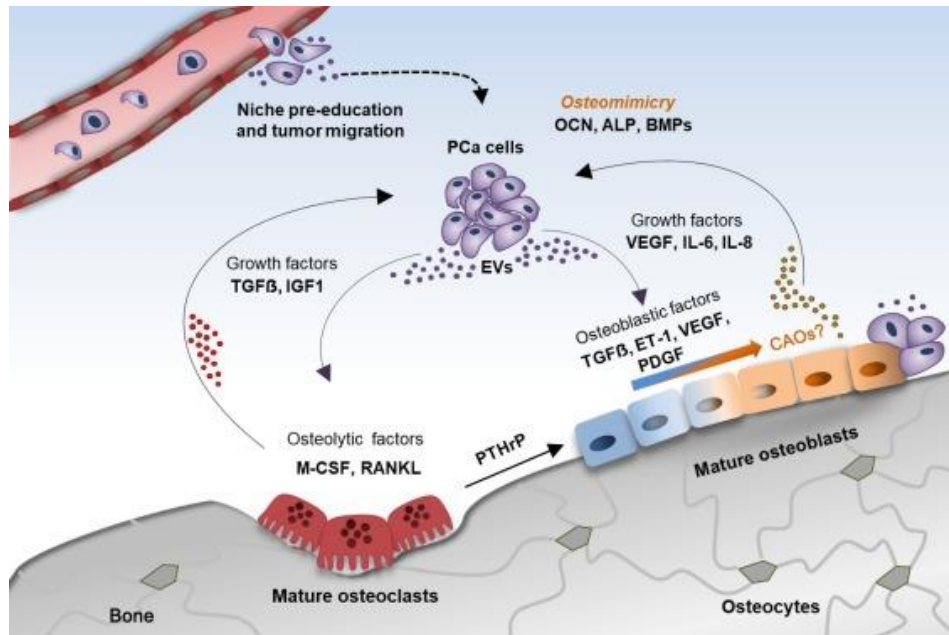


Figure 16: Cercle vicieux des métastases osseuses dans le CaP

Représentation schématique du cercle vicieux des métastases osseuses du CaP. Avant leur arrivée dans l'os, les cellules tumorales du CaP sécrètent des vésicules extracellulaires (EV) qui reprogramment les ostéoblastes et favorisent la formation d'un environnement ou niche pré métastatique. Une fois dans cette niche, les cellules de CaP acquièrent un phénotype ostéoblastique et sécrètent des molécules impliquées dans la différenciation et le maintien des cellules osseuses. Cela permet la mise en place d'un cercle vicieux impliquant croissance tumorale, fragilité osseuse et altération du remodelage osseux. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs solubles (TGF- β , ET-1, PDGF, M-CSF, RANKL) qui activent les ostéoclastes et favorise la transformation des ostéoblastes en un phénotype cancéreux (cancer associated osteoblast : CAO). Les cellules osseuses sécrètent des molécules (TGF- β , IGF-1, VEGF, IL-6, IL-8) qui favorisent la survie des cellules de CaP dans un microenvironnement étranger et hostile. Abréviations : TGF β , facteur de croissance transformant bêta ; IGF1, facteur de croissance analogue à l'insuline ; M-CSF, facteur de stimulation des colonies de macrophages ; PTHrP, protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne, ET-1 endothéline-1, VEGF facteur de croissance vasculaire endothélial, PDGF facteur de croissance dérivé des plaquettes ; IL-6/8, interleukine 6/8 ; OCN, ostéocalcine ; ALP, phosphatase alcaline ; BMPs, protéines morphogénétiques osseuses ; EVs, vésicules extracellulaires ; RANKL, activateur du récepteur du ligand du facteur nucléaire kappa-B (Furesi, Rauner, and Hofbauer 2020).

2. L'innervation osseuse

L'hypothèse selon laquelle le métabolisme osseux est contrôlé localement par le système nerveux a été proposée depuis de nombreuses années. L'os est en effet richement innervé et de nombreuses données expérimentales et observations cliniques indiquent que la modulation nerveuse est impliquée dans le remodelage osseux.

Les premiers marquages histologiques à l'argent ont permis de démontrer la présence dans l'os et dans le périoste de fibres nerveuses, myélinisées ou non, et leur relation avec les vaisseaux sanguins (Calvo and Forteza-Vila 1969). La présence des fibres nerveuses fonctionnelles a été mise en évidence plus tardivement grâce à l'histochimie par fluorescence et l'immunodétection des neuropeptides ou des marqueurs de terminaisons nerveuses. Il est maintenant clairement établi que les fibres nerveuses présentes dans le périoste et dans l'os, sont d'origine sensitive et autonome. L'entrée sympathique dans les organes, y compris la moelle osseuse, implique toujours une voie de sortie à deux neurones ; le neurone pré-ganglionnaire de premier ordre réside dans la corne latérale de la moelle épinière thoracique tandis que le neurone de second ordre est situé dans les ganglions sympathiques para ou pré-vertébraux. L'innervation parasympathique implique également une voie de sortie à deux neurones, le neurone de premier ordre étant situé soit dans le noyau moteur dorsal du nerf vague au niveau du tronc cérébral, soit dans la corne latérale de la moelle épinière sacrée ; les neurones du second ordre sont eux situés dans les ganglions parasympathiques à proximité de l'os. Ces branches du système nerveux autonome diffèrent par les neurotransmetteurs utilisés au niveau des organes effecteurs, la noradrénaline pour le système nerveux sympathique et l'acétylcholine (ACh) pour le système nerveux parasympathique. Les fibres afférentes sensibles ont leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux et trigéminaux [Figure 17].

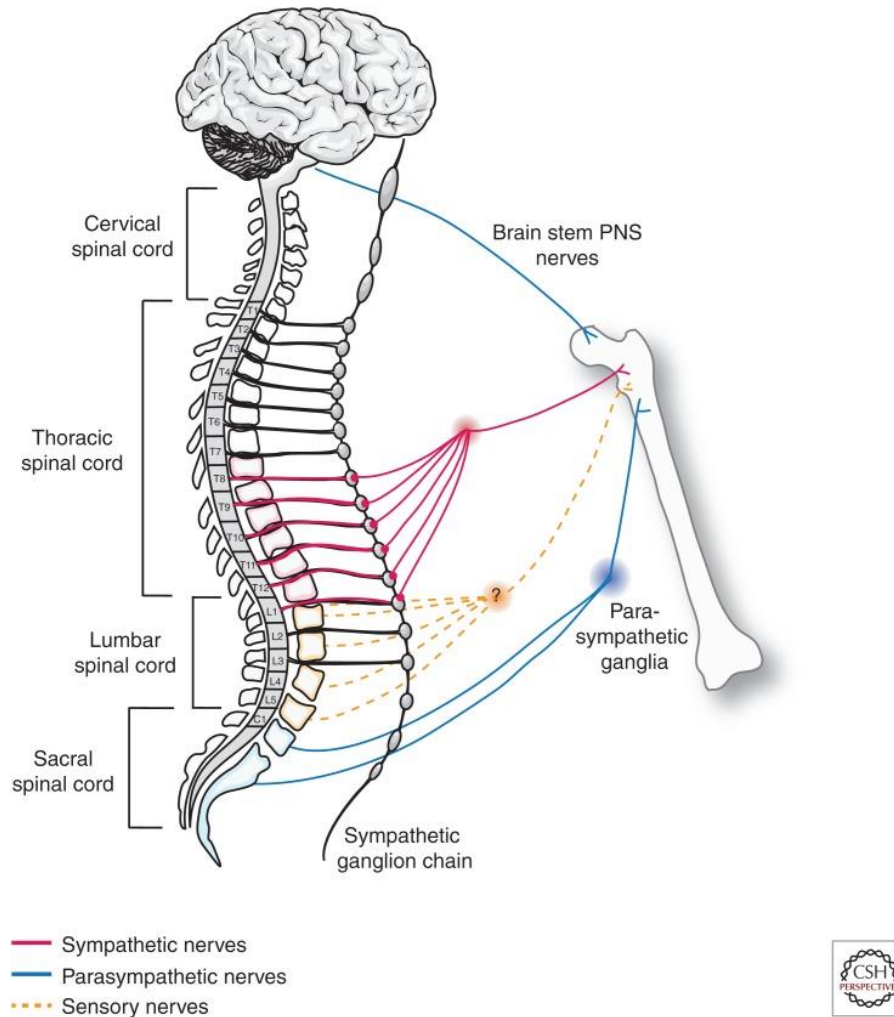


Figure 17: Schéma simplifié de l'innervation de l'os.

Illustration schématique décrivant l'origine anatomique de l'innervation sympathique, parasympathique et sensorielle de l'os. Le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) utilise deux neurones entre le système nerveux central (SNC) et l'os. Le corps cellulaire du neurone préganglionnaire est localisé au niveau de la corne intermedio-latérale de la moelle épinière et son axone se projette vers les ganglions sympathiques. Le neurone postganglionnaire innerve, lui, les cellules osseuses. Les fibres afférentes sensorielles ont, elles, leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux (DRG) (Maryanovich, Takeishi, and Frenette 2018).

Les différents compartiment de l'os, à savoir, la moelle osseuse, l'os minéralisé et le périoste, sont densément innervés par les fibres nerveuses sensorielles et/ou autonome (Juan Miguel Jimenez-Andrade et al. 2010). Certaines fibres s'arrêtent à l'interface os-périoste, mais de petites branches de nerfs ou des fibres dites isolées peuvent pénétrer dans l'os cortical via les canaux de Havers ou les canaux de Volkmann. Finalement, les fibres nerveuses sensorielles et sympathiques sont surtout abondantes près de la plaque de croissance épiphysaire et dans la métaphyse des os long, formant des réseaux très denses parallèlement aux vaisseaux sanguins [Figure 18]. Le périoste est le tissu le plus densément innervé mais en considèrent le volume

total de chaque tissu, la moelle osseuse reçoit le plus grand nombre de fibres sensorielles et sympathiques suivis de l'os minéralisé puis du périoste. L'innervation autonome se met en place après l'innervation sensitive, ces changements de distribution au cours de la croissance de l'os et de son ossification sont en accord avec un rôle prépondérant de l'innervation dans ces processus, les fibres sensibles étant d'avantage impliquées.

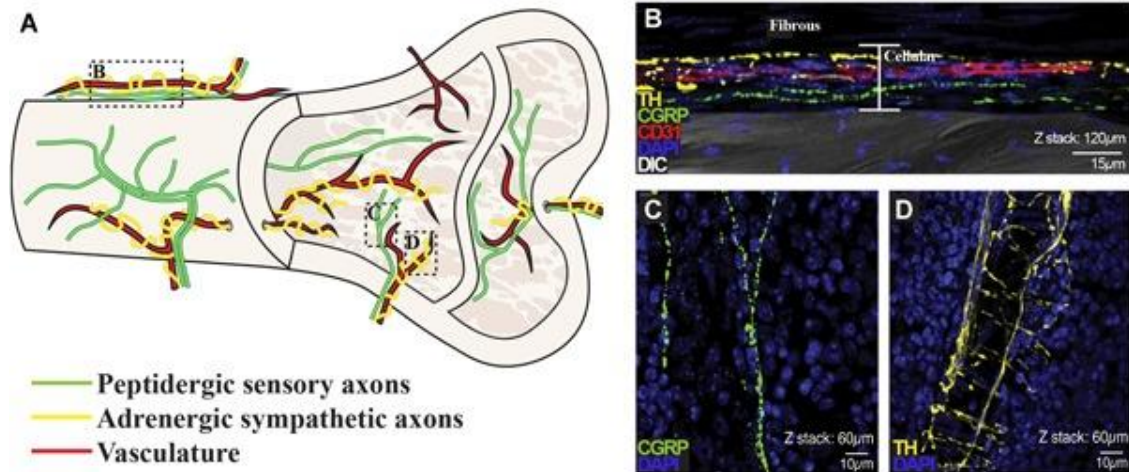


Figure 18: Schématisation de la distribution des nerfs dans les os longs.

(A) Schéma des fibres sensorielles peptidergiques et des fibres sympathiques adrénérgiques entourant le réseau vasculaire et mise en évidence des fibres pénétrant l'os cortical et l'espace médullaire. (B-D) Micrographies confocales d'un fémur distal de souris avec immunocoloration des fibres sympathiques TH+ (jaune), fibres sensorielles peptidergiques CGRP+ (vert), cellules endothéliales des vaisseaux sanguins CD31+ (rouge) et des noyaux cellulaires par DAPI (bleu) (Brazill et al. 2019).

Les fibres riches en peptides exprimant le CGRP et la SP sont répandues dans les os des espèces de vertébrés (Bjurholm et al. 1988; Mach et al. 2002). Elles peuvent être identifiées par immunohistochimie avec le marqueur pour la protéine de neurofilament NF200. Les fibres C pauvres en peptides peuvent être détectées grâce à l'islectine-B4 (IB4) représentent de 11% à 34% des corps des cellules neuronales (DRG) innervant le tibia de rat. Les neurones autonomes postganglionnaires sont identifiés par la présence de neurotransmetteurs ou d'enzymes. On distingue les neurones adrénérgiques sympathiques exprimant la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitant la vitesse de synthèse de la norépinéphrine (NE), qui sont abondants dans les os, des neurones cholinergiques, identifiables par le marquage du transporteur vésiculaire l'acétylcholine (VACht), qui innervent également l'os (Brazill et al. 2019). D'autres biomarqueurs sont souvent utilisés dans la littérature tel que le récepteur neurotrophique de la tyrosine kinase de type 1 (TrkA) qui est exprimé dans de nombreux nerfs sensoriels peptidergiques et la majorité des neurones autonomes TH⁺ de l'os [Figure 19].

Introduction bibliographique
Chapitre II : La douleur osseuse dans le contexte du cancer de la prostate

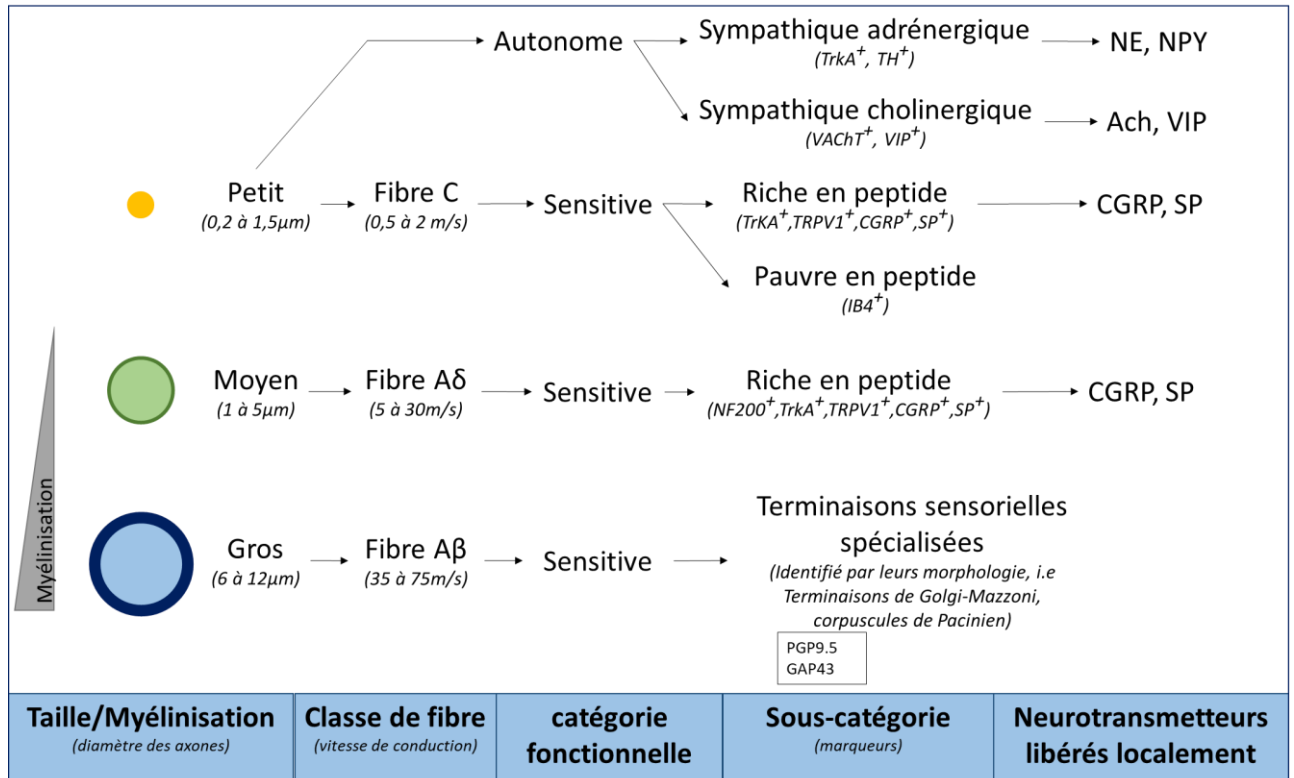


Figure 19: Classification des fibres innervant les os.

TrkA = récepteur neurotrophique de la tyrosine kinase de type 1; TH = tyrosine hydroxylase; VAcHT = transporteur vésiculaire d'acétylcholine; VIP = peptide intestinal vasoactif; TRPV1 = sigle anglais pour transient receptor potential vanilloïde 1; CGRP = peptide lié au gène de la calcitonine; SP = substance P; IB4 = isolectine-B4; NF200 = neurofilament 200; PGP9.5 = produit du gène protéique 9,5; GAP43 = protéine 43 associée à la croissance; NE = norépinéphrine; NPY = neuropeptide Y; Ach = acétylcholine (Adapté de : Brazill et al. 2019).

De plus, on sait que l'innervation du squelette adulte est très différente de celle de la peau [Figure 20]. Cette différence dans la population de fibres nerveuses sensorielles commence au cours du développement périnatal et postnatal. Les os sont généralement des structures plus profondes situées sous la surface de la peau et manquent probablement d'innervation par les fibres nerveuses sensorielles Aβ parce que la détection d'un toucher fin n'est pas nécessaire pour leur fonction. Par conséquent, la plupart des nerfs sensoriels qui innervent l'os ne semblent être activés que par des blessures ou des lésions osseuses (on parle alors de nocicepteurs silencieux) (P. W. Mantyh 2014a).

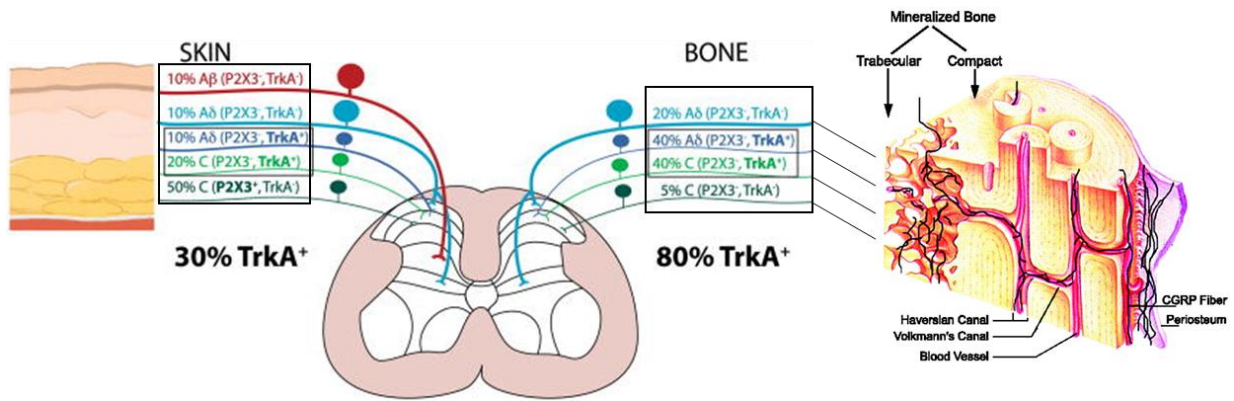


Figure 20: Innervation différentielle de l'os et de la peau

La majorité des fibres afférentes primaires innervant l'os sont des fibres Aδ à 75% alors que les fibres C ne représentant que 25% de l'innervation osseuse. Ces fibres expriment dans 80% des cas TrkA et sont donc sensibles au ligand de TrkA : le facteur de croissance des nerfs ou NGF. Avec un profil différent, l'innervation de la peau comprend majoritairement des fibres C à 70%, des fibres Aδ à hauteur d'environ 20% et des fibres Aβ à 10%. Seuls 30% de ces fibres sont TrkA⁺. TrkA : récepteur tyrosine kinase A (d'après Guedon et al. 2016; Goblirsch et al. 2006).

Outre les fibres nerveuses afférentes primaires nociceptives, l'os est donc également innervé par des fibres nerveuses sympathiques (adrénergiques) et parasympathiques (cholinergiques). Des études ont montré un rôle important de ces fibres dans la régulation du métabolisme osseux, dans la vasodilatation/vasoconstriction des vaisseaux sanguin, dans l'infiltration des macrophages ou encore dans le fonctionnement des cellules progénitrices osseuses (P. W. Mantyh 2014b). Une dérégulation de ces fibres par une pathologie telle qu'une croissance tumorale peut alors fortement impacter ces mécanismes de régulation de la physiologie osseuse.

II. Douleur et nociception : généralités

La définition de la douleur a été récemment mis à jour par le IASP (*International Association for the Study of Pain*) afin de prendre en compte les individus non communiquant ou en situation ne permettant pas de la décrire comme étant : « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à, une lésion tissulaire réelle ou potentielle » (Raja et al. 2020). Cette expérience subjective pour chaque individu est ainsi modulée par ses expériences passées, l'affect, ses capacités cognitives, le genre, l'environnement, et même, pour certaines personnes, influencée par la culture.

1. Définition de la douleur aiguë versus chronique

La douleur aiguë, de courte durée et plus ou moins intense, est un signal d'alarme important du corps humain, décrite par la société française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD) comme « un signal d'alarme lié à une atteinte tissulaire brutale (*e.g.* traumatisme, lésion inflammatoire, distension d'un viscère...), souvent associée à des manifestations neurovégétatives (*e.g.* tachycardie, sueurs...) et de l'anxiété ». Alors que la douleur chronique est définie par la HAS comme une « persistance ou une récurrence de la douleur au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale présumée, notamment si la douleur évolue depuis plus de trois mois », et comme une « réponse insuffisante au traitement » en plus d'une « détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière ».

2. Nociception à l'origine de la perception douloureuse

La nociception implique la détection de stimuli potentiellement dommageables par des terminaisons nerveuses libres appelées nocicepteurs. Les potentiels d'action générés sont transmis ensuite par les fibres afférentes primaires au niveau de la lames I et II de la corne dorsale de la moelle épinière. La transmission de ces signaux nociceptifs par les neurones du second ordre via les tractus spinothalamiques se font vers les centres supérieurs du cerveau. Le cerveau peut alors à son tour activer les voies de signalisation endogènes descendantes opioïdiques et noradrénergiques qui vont réduire la douleur ressentie (Basbaum et al. 2009). La nociception est une modalité somatosensorielle qui se réfère au transfert d'un signal nerveux généré par l'activation de récepteurs spécifiques entraînés par l'exposition à des stimuli potentiellement dangereux, nocifs tels qu'une brûlure ou un pincement. Ce n'est qu'après traitement de cette information par les systèmes nerveux périphérique (SNP) et central (SNC) que l'information devient alors une perception douloureuse. La douleur en tant que telle doit être intégrée par les centres cérébraux supérieurs, ainsi, paradoxalement la nociception peut être présente en absence de douleur et une douleur peut être présente en l'absence de signal nociceptif (Tracey 2017).

La nociception comprend cinq composantes (Risch, Pointeau, and Poquet 2017) :

- La **transduction** : transformation du stimulus (mécanique, thermique ou chimique) en message nerveux (électrique).

- La **conduction** : acheminement du message nerveux des fibres périphériques vers les voies centrales (grâce à la génération de potentiel d'action (PA)).
- La **transmission** : passage du message nerveux d'une synapse à une autre (grâce aux neurotransmetteurs).
- La **perception** : phénomène cérébral à l'origine de la perception douloureuse.
- La **modulation** : mécanisme de régulation des messages nociceptifs et de leur perception (réduisant la douleur ressentie).

Les nocicepteurs sont donc définis comme les terminaisons libres de certains types de fibres nerveuses, dites fibres afférentes primaires, dont le seuil d'activation est élevé et qui sont capables de détecter des stimuli potentiellement nocifs pour l'organisme. Ces nocicepteurs possèdent une morphologie dite pseudo-unipolaire, c'est-à-dire qu'ils ont un prolongement unique à partir du corps cellulaire qui se sépare en deux branches axonales : l'une va innervier les organes situés en périphérie et l'autre est centrale innervant la moelle épinière. Ces branches axonales, au niveau périphérique, vont former une arborisation présente au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires, osseux et dans les parois des viscères. Leurs corps cellulaires sont localisés au niveau des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRGs) faisant d'eux le premier relais du message douloureux, et pour ceux innervant la face, ils sont situés au niveau du ganglion trigéminal (Basbaum et al. 2009). Nous avons vu dans le chapitre précédent les spécificités de l'innervation osseuse par rapport à l'innervation cutanée.

La douleur osseuse du CaP : une douleur à double composante ?

La douleur osseuse est décrite comme localisée et irradiante lorsqu'elle est associée à une fracture, qui implique principalement le périoste. En revanche, pour les pathologies confinées dans la moelle osseuse, telles que les métastases du cancer du CaP, la douleur est dite paroxystique. Elle est diffuse, intermittente, difficile à localiser et intense. Cette douleur osseuse persistante induite par les métastases est l'un des symptômes les plus pénibles pour les patients. Le mécanisme de la douleur ressentie par les patients à la suite de métastases osseuses reste complexe, car il implique diverses interactions entre les cellules tumorales, les cellules osseuses, les cellules inflammatoires activées et les neurones innervant les os. Il comprend deux processus principaux : inflammatoire et neuropathique. Les modifications au niveau des tissus et des nerfs périphériques vont jusqu'à impacter le bon fonctionnement des niveaux supérieurs du système nerveux (moelle épinière et cerveau).

3. Douleur osseuse par acidose et fracture induites par la tumeur

Une fois que les cellules tumorales du CaP commencent à se développer dans l'os, un cycle de croissance tumorale, de destruction osseuse et de formation d'os tissé commence, ce qui peut entraîner une douleur considérable, des fractures du squelette et une hypercalcémie. Les cellules cancéreuses ne détruisent pas directement l'os, mais elles et/ou les cellules stromales environnantes expriment l'activateur du récepteur du ligand du facteur nucléaire κ -B (RANKL), qui se lie à son récepteurs, RANK, exprimé par les ostéoclastes. L'activation de cette voie RANKL/RANK, favorise la prolifération et l'hypertrophie des ostéoclastes destructeurs d'os. Cette activation des ostéoclastes entraîne la formation des « fosse » de résorption qui sont des environnements très acides. Cet environnement acide va stimuler à son tour les canaux sensibles aux protons tels que les TRPV1 (Transient receptor potential vanilloïde 1) ou ASIC (Acid-sensing ion channel) exprimés par une population importante de fibres nerveuses et vont ainsi engendrer des douleurs spécifiques de la douleur osseuse induite par le cancer (CIBP).

De plus, les tumeurs à composante mixte, ostéolytiques et ostéoblastiques, comme les cellules de CaP, induisent une perte de résistance mécanique et de stabilité de l'os minéralisé, de sorte qu'avec un remodelage osseux important, un stress mécanique peut entraîner la distorsion et l'activation des fibres nerveuses mécano-sensibles qui innervent l'os. L'expansion tumorale dans le canal médullaire comprime également les nocicepteurs osseux et induit un étirement du périoste densément innervé. Ces forces biomécaniques appliquées à l'os cancéreux affaibli conduisent donc à des épisodes douloureux spontanés (P. Mantyh 2013).

4. Douleur osseuse induite par les cellules tumorales et leurs interactions avec les cellules stromales

Les cellules stromales sont plus nombreuses que les cellules tumorales et comprennent les cellules endothéliales, les fibroblastes, ainsi qu'une foule de cellules inflammatoires et immunitaires comprenant des macrophages, des mastocytes, des neutrophiles et des lymphocytes T. Cet ensemble de cellules sécrètent une grande variété de facteurs, dont le pouvoir de sensibilisation et d'activation neuronale a été démontré. Les propriétés physiques de la matrice osseuse, y compris un faible taux d'oxygène, un pH acide, une concentration extracellulaire élevée de Ca^{2+} (Morrissey and Vessella 2007) et des facteurs de croissance tels que le TGF- β , les facteurs de croissance de type insuline (IGF) I et II, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), les protéines

morphogénétiques osseuses (BMP) (Bussard, Gay, and Mastro 2008), fournissent un terrain fertile pour la croissance de la cellule tumorale. Le large éventail de médiateurs pro-hyperalgésiques libérés par les ostéoclastes, les ostéoblastes, les cellules tumorales et les cellules immunitaires associées aux tumeurs sensibilise collectivement les nocicepteurs périphériques dans le milieu osseux. Les stimuli générés activent directement les récepteurs spécifiques situés sur les fibres afférentes primaires. Ainsi, les prostaglandines, les endothélines, la bradykinine, les facteurs de stimulation tel que le TNF- α , le TGF- β , le PDGF, l'interleukine 1, le facteur de croissance nerveuse (NGF) et l'interleukine 6 sont des composants d'une « soupe pro-inflammatoire » qui sensibilise activement les nocicepteurs dans les CIBP (Schmidt et al. 2010) [Figure 21].

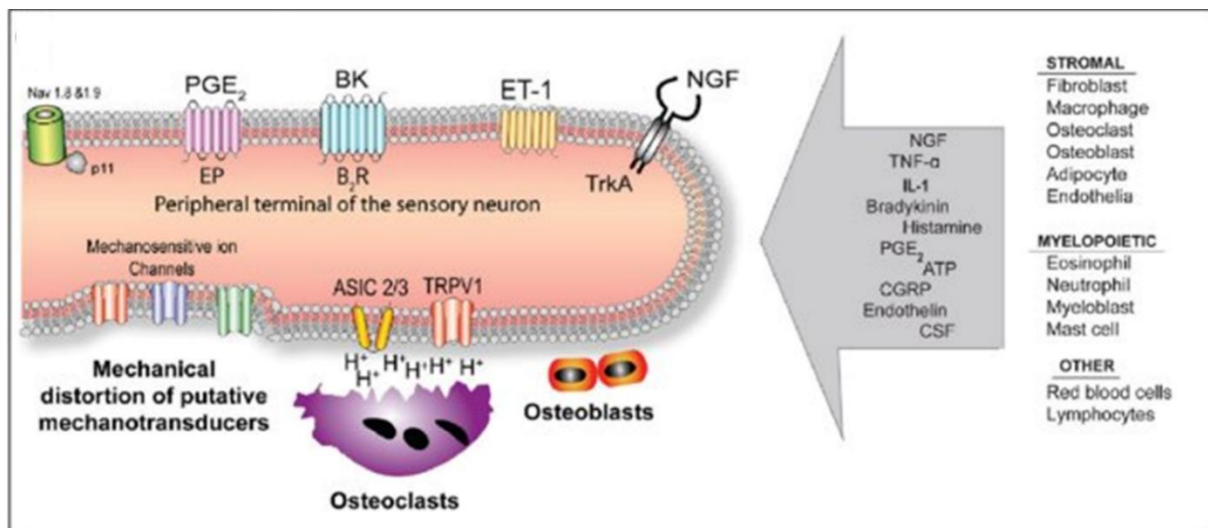


Figure 21: Facteurs influençant l'excitabilité des fibres afférentes primaires qui innervent l'os

Les nocicepteurs possèdent un grand nombre de récepteurs, de canaux ioniques permettant de détecter les stimuli nocifs produits par les cellules tumorales et les cellules immunitaires associées aux tumeurs. Récepteur vanilloïde potentiel de récepteur transitoire 1 (TRPV1), canaux ioniques sensibles à l'acide (ASIC), canaux mécano-sensibles comme TREK-1, prostaglandine (PGE₂), facteur de croissance nerveuse (NGF), l'endothéline (ET), bradykinine (BK) adénosine triphosphate (ATP) Colony-stimulating factor (CSF) (P. W. Mantyh 2014a)

C'est cette composante dite inflammatoire de la douleur osseuse induite par la tumeur et les cellules stromales associées, l'acidose induite par des ostéoclastes destructeurs de l'os, et la déstabilisation mécanique due à la fracture de l'os qui handicape grandement les patients souffrant de CIBP. Cette douleur d'origine inflammatoire peut également s'installer dans la chronicité, selon un mécanisme de stimulation perpétuelle des fibres par cet environnement inflammatoire auto-entretenu dans le cadre des douleurs osseuses dû aux métastases de CaP. On parle alors de douleur par excès de nociception. Lorsque la tumeur envahit un tissu, comme

un os, le corps peut la détecter et il la considère comme un corps étranger. Il déclenche alors une réaction d'inflammation, proche des nerfs innervant l'os et la tumeur, induisant une sensibilisation des fibres afférentes primaires. Ces douleurs inflammatoires issues des réactions environnantes ont la particularité d'augmenter la nuit, lorsque le corps est au repos ou lors des mouvements (Juan M. Jimenez-Andrade et al. 2007).

5. Douleur osseuse induite par germination du système nerveux périphérique

La tumeur en contact avec le tissu osseux, détruit l'os minéralisé et expose ainsi les terminaisons nerveuses libres, favorisant les micro-fractures. Cette lésion induite par les cellules tumorales et la destruction des extrémités distales des fibres nerveuses sensorielles qui innervent l'os s'accompagnent d'une augmentation des comportements douloureux chez les patients. Cette douleur caractéristique des CIBP est souvent associée à une douleur dite neuropathique. Ces douleurs sont caractérisées par des sensations de fourmillements, de perte ou d'augmentation de la sensibilité et/ou des crises soudaines décrites comme des chocs électriques. L'invasion de l'os par les cellules tumorales initie la croissance pathologique et la formation d'un réseau de fibres nouvellement synthétisées avec une morphologie, une organisation et une densité uniques, qui dépasse de 10 à 70 fois la densité physiologique de l'os (Kumar and Mahal 2012). Ces nouvelles fibres nerveuses pathologiques se forment principalement dans le périoste, le tissu osseux minéralisé et la moelle osseuse en raison de l'activité de médiateurs produits et libérés par les cellules tumorales. Il a même été démontré que le NGF joue un rôle crucial dans la création de tels réseaux pathologiques. Dans des conditions pathologiques, le NGF est produit par les cellules tumorales et stromales associées, les cellules inflammatoires et les cellules du système immunitaire. Le NGF affecte ses cellules cibles en se liant à deux types de récepteurs membranaires : TrkA (exclusivement spécifique du NGF) et p75NTR (un récepteur commun à toutes les neurotrophines). Lorsqu'il est lié au récepteur TrkA, le NGF module la libération de neurotransmetteurs (Substance P, peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP)), active les canaux ioniques (TRPV1, ASIC3, P2X3 (*purinoceptor 3*), canaux sodium) et les récepteurs (ex : bradykinine) et régule la synthèse des particules structurelles comme les neurofilaments (Zajączkowska et al. 2019). Des études récentes ont mené à la démonstration de l'efficacité antalgique de plusieurs stratégies ciblant ce facteur ou son récepteur (trkA) dans les douleurs osseuses et articulaires. La différence d'innervation entre l'os et le tissu cutané, précédemment décrite, est un élément explicatif de la meilleure efficacité des thérapie ciblant le NGF dans les douleurs osseuses et articulaires par

rapport aux douleurs cutanées (P. Mantyh 2013). Des effets indésirables importants ont cependant ralenti le développement clinique de ces molécules. De même, il a été observé une augmentation du nombre et de la densité de fibres nerveuses sensitives contenant du CGRP, du neurofilament 200 kDa (NF200) et de la substance P ainsi que du nombre de fibres nerveuses sympathiques post-ganglionnaires TH⁺ aux sites d'ostéogenèse en proximité étroite des métastases de CaP. Effectivement, dans un os normal, les fibres nerveuses sensorielles et sympathiques sont séparées les unes des autres. La croissance pathologique induite par les cellules tumorales de fibres nerveuses sensorielles et sympathiques conduit à leur réorganisation et à la formation de connexions entre ces différents types de fibres. Par conséquent, la douleur peut également être provoquée par l'activation des fibres sympathiques (Juan M. Jimenez-Andrade et al. 2010). De plus, l'expression par les ostéoblastes et par les ostéoclastes de molécules de guidage des axones, qui jouent un rôle important dans le développement du système nerveux, suggère que les cellules osseuses pourraient gouverner leur propre innervation en maintenant de façon dynamique les neurones sympathiques et sensoriels aux endroits où une modulation locale du métabolisme osseux doit survenir.

De la même manière, une sous-population de fibre C qui sont insensibles aux stimuli mécaniques nociceptifs en condition physiologique mais devenant sensibilisés en contexte inflammatoire (par exposition au NGF) a été décrite pour la première fois en 1996 (Michaelis 1996). Un grand nombre de ces nocicepteurs ont été retrouvés dans la vessie, le côlon distal et l'articulation du genou, mais ils sont rares chez les rongeurs ce qui limite leur étude. Néanmoins, ces afférences silencieuses représentent près d'un quart de l'ensemble des fibres C innervant la peau chez l'homme et 50% des fibres afférentes nociceptive peptidergiques innervant les organes viscéraux et les tissus somatiques profonds tels que les os. Ces nocicepteurs silencieux pourraient contribuer de manière significative au développement de l'hyperalgésie mécanique induite par une inflammation. Ils expriment une sous-unité alpha 3 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (CHRNA3) ainsi que le canal ionique mécano-sensible PIEZO2 (Prato et al. 2017).

6. Sensibilisation centrale : son implication dans la douleur osseuse induite par les métastases osseuses

Plusieurs études suggèrent également le rôle d'une plasticité centrale (spinale voire supraspinale) dans le développement et la chronicisation de la douleur osseuse. Des changements des facteurs locaux, y compris des dommages directs des fibres nerveuses

sensorielles, l'infiltration des racines nerveuses par les cellules cancéreuses et des agents algogènes sécrétés dans le microenvironnement tumoral provoquent une sensibilisation centrale des neurones de la corne dorsale. Cette sensibilisation centrale est caractérisée par une réorganisation neurochimique provoquant une douleur osseuse persistante. En effet, trois changements significatifs au niveau de la moelle épinière ont été mis en évidence chez des animaux ayant reçu une injection de cellules de sarcome dans le fémur. Une astrogliose massive, une augmentation de l'expression de la dynorphine et de la protéine c-Fos dans les neurones des lamelles profondes de la moelle épinière (Schwei et al. 1999). De même, une injection intratibiale unilatérale de cellules de CaP chez des rats a entraîné une augmentation significative de l'expression de marqueurs de la microglie et astrocytaire au niveau ipsilatérale de la moelle épinière. Cette étude a également mis en évidence une augmentation de l'expression d'IL-1 β dans ces astrocytes (R. X. Zhang et al. 2005). D'autres travaux réalisés par cette même équipe ont montrés que l'IL-1 β facilitait la douleur osseuse induite par le cancer en augmentant la phosphorylation d'une sous-unité du récepteur NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) au niveau de la moelle épinière (R.-X. Zhang et al. 2008).

L'ensemble de ces éléments créer un environnement complexe impliquant cellules tumorales, cellules osseuses et cellules immunitaire [**Figure 22**].

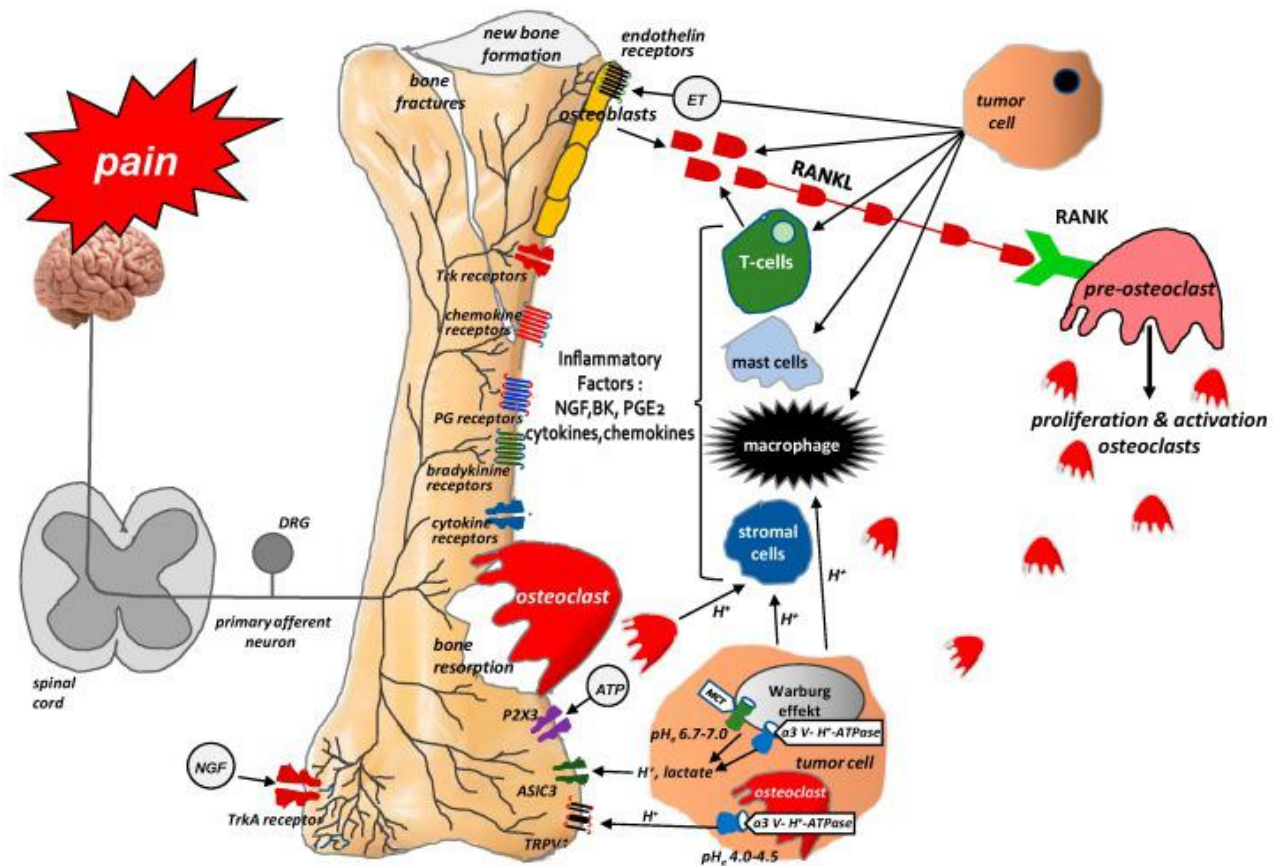


Figure 22: Interactions entre les cellules tumorales, les cellules osseuses, les cellules stromales et les cellules inflammatoires sur le site des métastases osseuses

Pour résumer, les cellules tumorales libèrent de l'endothéline (ET) qui, via ses récepteurs, agit sur les ostéoblastes pour stimuler leur prolifération. Les ostéoblastes activés à leur tour libèrent du RANKL, qui, à son tour, fournit un signal pour la prolifération et la maturation des ostéoclastes. Ces ostéoclastes produisent de l'ATP et une acidose, qui activent des récepteurs sensibles au pH (P2X, TRPV1, ASIC3) situés sur les nocicepteurs. De plus, les cellules tumorales, les cellules stromales et les cellules immunitaires activées sécrètent aussi plusieurs médiateurs (endothélines, prostaglandines, NGF, bradykinine, cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, H⁺, et ATP), qui activent leurs récepteurs situés sur les terminaisons des nocicepteurs innervant les os. Cet ensemble crée les douleurs si particulières associées aux métastases osseuses (Zajęzowska et al. 2019).

7. Prise en charge thérapeutique de la douleur osseuse du CaP

La prise en charge pharmacologique de la douleur osseuse implique l'utilisation des agents analgésiques en suivant l'« échelle analgésique » en trois paliers publiée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en fonction de l'intensité de la douleur. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont généralement prescrits sauf en cas de contre-indications. Le traitement de la douleur spontanée reste un défi. Ces épisodes douloureux peuvent survenir entre deux à huit fois par jour. Dans ce cas-là, l'utilisation d'opioïdes tels que la morphine ou la codéine sont prescrits. Cependant, l'augmentation des doses nécessaire pour

soulager la douleur osseuse s'accompagne d'effets indésirables qui peuvent être gravissimes. Une étude récente a même démontré qu'un besoin accru d'opioïdes pouvait être associé à un résultat clinique (survie sans progression et survie globale) inférieur chez les patients atteints d'un CaP avancé (Zylla et al. 2013). La composante neuropathique développée lors de cette pathologie a suggéré un intérêt potentiel pour l'utilisation de médicaments contre la douleur neuropathique tels que la gabapentine (Neurontin[®]) et la prégabaline (Lyrica[®]) (Coleman et al. 2020). L'ensemble de ces antalgiques sont utilisés en association avec des traitements adjuvants précédemment cité dans le premier chapitre comprenant les bisphosphonates, la thérapie ciblée, la radiothérapie, les radionucléotides. La radiothérapie offre une option de contrôle palliatif de la douleur, il a été démontré qu'elle procure un soulagement global de la douleur à 50 à 80% des patients souffrant de CIBP (Lutz et al. 2011). Le radium²²³ semble être aujourd'hui le traitement le plus prometteur face à ces douleurs osseuses cependant il reste encore des obstacles financiers à surmonter car comme décrit dans le premier chapitre ce traitement très onéreux n'est pour l'heure pas remboursé, ce qui limite grandement sa prescription par les médecins. Il existe donc un besoin médical important non satisfait pour une nouvelle génération d'analgésiques hautement efficaces et bien tolérés afin de soulager les patients souffrant de douleurs osseuses induite par le CaP.

Comme nous venons de le voir, les cellules tumorales libèrent un ensemble de cytokines, qui favorise les processus inflammatoires, contribuent à l'acidification du micro-environnement, et à la sensibilisation des nocicepteurs participant au développement de la douleur (P. Mantyh 2013). Par conséquent, la combinaison des processus neuropathiques et inflammatoires combinés à des événements squelettiques est responsable du profil unique de la douleur du cancer des os, dont la prise en charge reste très limitée (P. Honore et al. 2000; Prisca Honore and Mantyh 2000). Les stratégies thérapeutiques actuelles visant principalement à diminuer la progression de la tumeur et son activité n'ont finalement que peu d'effet sur la diminution de la douleur osseuse ressentie et les antalgiques de référence sont peu efficaces chez ces patients. L'arsenal thérapeutique dont dispose les praticiens aujourd'hui afin de répondre aux souffrances des patients présentant des douleurs osseuses est encore très insuffisant.

Chapitre III : Le Riluzole : molécule d'intérêt pour le traitement des douleurs osseuses du CaP ?

Comme décrit précédemment, les mécanismes moléculaires impliqués dans la douleur osseuse sont, en partie, dû à une surexcitabilité neuronale favorisée par la présence d'un grand nombre de facteurs agissant ensemble dans un microenvironnement acide. Ces mécanismes font intervenir une double composante à la fois inflammatoire et neuropathique. Il nous semble judicieux que la recherche d'une molécule efficace pour le traitement et/ou la prévention de la douleur osseuse induite par des métastases de CaP soit orientée vers une molécule ayant les caractéristiques suivantes : antalgique dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques, sans effet pro-prolifératif et/ou n'altérant pas l'effet antinéoplasique des traitements du CaP, n'accentuant pas le remodelage osseux, bien tolérée et disponible pour le plus grand nombre (donc peu coûteuse). Comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, les données de la bibliographie et les travaux récents du laboratoire ont montré que le riluzole, une molécule antiglutamatergique dont le mécanisme d'action reste incertain, est antalgique chez des modèles animaux de douleur inflammatoire ou neuropathique. Le riluzole semble aussi avoir un effet antiprolifératif *in vitro* sur plusieurs lignées humaines de cancer. Cette molécule a une AMM pour la sclérose latérale amyotrophique et est bien tolérée chez ces patients. On peut donc se poser la question de son action vis-à-vis de la douleur osseuse du CaP.

I. Le riluzole

1. Généralités

Le riluzole (Rilutek®) est un dérivé du benzothiazole. Cet agent neuroprotecteur, approuvé par la FDA, est utilisé en clinique pour protéger les motoneurons dans le cadre du traitement de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot) (Bensimon, Lacomblez, and Meininger 1994). Bien que son mécanisme d'action soit encore inconnu, ses activités pharmacologiques dans les neurones moteurs peuvent être liées à : son effet inhibiteur sur la libération de glutamate, l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants et sa potentielle interférence contre la liaison émetteur/récepteur des acides aminés excitateurs tel que le glutamate et inhibiteur de recaptage de GABA (Acide- γ AminoButyrique).

2. Riluzole et douleur

Le riluzole semble agir à travers la modulation de multiples voies de signalisation intracellulaires impliquant de manière directe ou indirecte son activité anti-glutamatergique, faisant de lui une molécule de choix pour la modulation de la nociception. En effet, la plupart des fibres nociceptives périphériques ont le glutamate comme principal neurotransmetteur excitateur afin de véhiculer le signal nociceptif jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. Le riluzole atténue ou empêche l'apparition de symptômes douloureux dans des modèles de douleurs inflammatoires tels que le test au formol (Blackburn-Munro, Ibsen, and Erichsen 2002; Coderre et al. 2007) ou le modèle d'inflammation induite par injection sous-plantaire de carragénine (Abarca et al. 2000). Il a également montré des effets antalgiques dans des modèles de douleur neuropathique d'origine traumatique tels que les lésions de constriction chronique (B. Sung, Lim, and Mao 2003), les lésions par avulsion des racines vertébrales (Chew, Carlstedt, and Shortland 2014) et des lésions par compression de la moelle épinière (Hama and Sagen 2011). Dans un modèle de neuropathie traumatique chez le rat, la constriction chronique du nerf sciatique induit une diminution de l'expression de transporteurs au glutamate au niveau spinal. Des injections intrathécales préventives de riluzole (deux fois par jour pendant 4 jours) ont montré qu'un jour après la chirurgie, le riluzole prévient la sous-expression des transporteurs au glutamate et l'apparition des symptômes douloureux chez ces animaux (B. Sung, Lim, and Mao 2003). Au laboratoire, une étude sur un modèle murin de neuropathie chronique chimio-induite par l'oxaliplatine, un anticancéreux de 1^{ère} ligne dans le cancer colorectal, a démontré un effet antalgique significatif du riluzole sur ce type de douleur. En plus de son effet antalgique le riluzole a montré des effets préventifs sur les déficits proprioceptifs induits par l'oxaliplatine ainsi que sur le phénotype dépressif-observé chez les animaux traités par l'oxaliplatine (Poupon et al. 2018).

De plus, des études *in vitro* ont montré que le riluzole améliore considérablement la conduction axonale, prévient la nécrose, l'apoptose cellulaire et améliore la régénération des fibres nerveuses dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat (Y. Wu et al. 2013). La vitesse de conduction nerveuse est également significativement altérée dans le modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine et le riluzole a montré un effet préventif significatif sur l'altération de cette vitesse de conduction nerveuse à la fois 7 jours et 28 jours après l'induction du modèle. Le riluzole prévient les anomalies morphologiques observées dans les DRG des animaux traités par oxaliplatine (Poupon et al. 2018), confirmant l'effet neuroprotecteur connu

de la molécule. Cet effet neuroprotecteur du riluzole est connu pour assurer une préservation des structures neuronales et cet effet du riluzole semble être dû à sa capacité à activer les canaux TREK-1 (C. Heurteaux et al. 2004; Y. Wu et al. 2013). *In vitro*, l'application du riluzole sur des cellules HEK transfectées avec le gène codant TREK-1 engendre une augmentation du courant produit par le canal. Le riluzole est également capable d'activer les canaux TREK-2 et TRAAK *in vitro*. De plus, la cinétique d'activation de ces canaux par le riluzole diffère. En effet, le riluzole semble avoir une activation transitoire sur les canaux TREK-1 et TREK-2 alors que son application sur le canal TRAAK entraîne une activation permanente de ce dernier (Duprat et al. 2000; Lesage and Lazdunski 2000). Toutefois, les données obtenues par Poupon et al., démontrent que les effets antalgiques et neuroprotecteurs du riluzole observés chez un modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine sont TREK-1 dépendants et n'impliquent pas les deux canaux parents TREK-2 et TRAAK (Poupon et al. 2018). Ces canaux seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

3. Riluzole et cancer

De nombreuses études ont également démontré un effet antiprolifératif du riluzole. Initialement cet effet a été découvert sur des cellules de mélanomes (Le et al. 2010). Depuis, le riluzole a également démontré un effet significatif inhibiteur de la prolifération de cellules de glioblastome (Sperling et al. 2017), de cancer du sein (Dolfi et al. 2017), d'ostéosarcome (Liao et al. 2017; Raghubir et al. 2020), de carcinome hépatique (Seol et al. 2016), de leucémie (Kamal et al. 2015). Les mécanismes impliqués dans l'activité antiproliférative du riluzole ne sont pas clairement établis. Plusieurs auteurs mettent en avant l'implication potentielle de récepteurs au glutamate, notamment à travers l'inhibition des récepteurs métabotropiques au glutamate 1 et 5, ou du récepteur NMDA (entraînant une diminution de la signalisation calcique nécessaire à l'homéostasie et la prolifération des cellules cancéreuses) (Kamal et al. 2015; Liao et al. 2017). Mais, l'efficacité du riluzole semble également impliquer des voies indépendantes du glutamate, il contribue à l'augmentation de la production de ROS intracellulaire, qui induit l'apoptose (Seol et al. 2016). Des données obtenues au laboratoire ont démontré un effet antiprolifératif du riluzole sur des cellules de cancer colorectal *in vitro* et *in vivo*. En effet, le riluzole a montré, seul, un effet antiprolifératif significatif sur deux lignées cellulaires de cancer du côlon humain : les cellules T84 et HT29 et un effet synergique lorsqu'il est co-administré à l'oxaliplatine, médicament de 1^{ère} ligne dans le traitement du cancer colorectal. Cet effet a également été confirmé *in vivo* sur un modèle de souris APC^{min/+} de néoplasie intestinale,

l'association du riluzole et de l'oxaliplatine a entraîné une diminution significative du nombre de tumeurs dans tout le tractus intestinal (Poupon et al. 2018) [Figure 23].

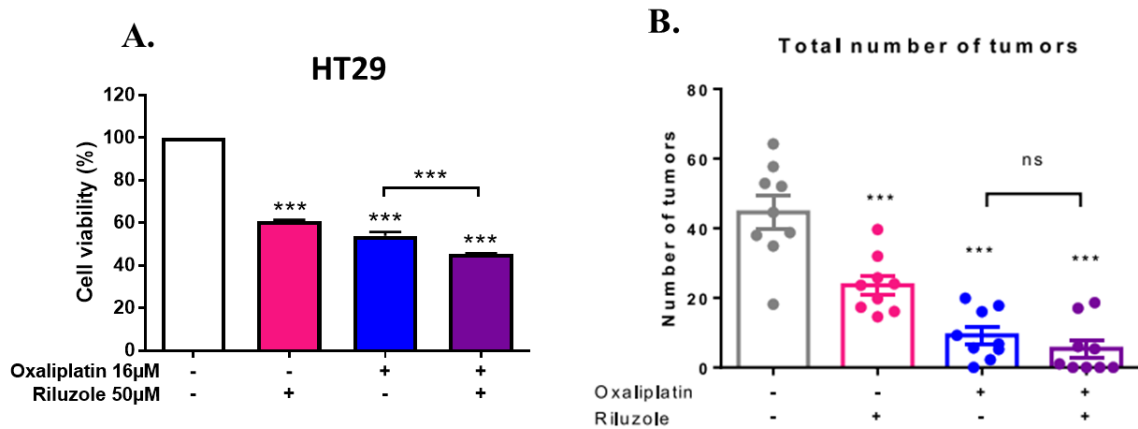


Figure 23: Effet antiprolifératif du riluzole dans le cancer du côlon in vitro et in vivo

A. Le riluzole n'affecte pas négativement l'effet cytotoxique induit par l'oxaliplatine dans les lignées cellulaires de cancer du côlon humain comme les cellules HT29. L'association de l'oxaliplatine et du riluzole diminue de manière significative la prolifération cellulaire dans le cancer colorectal. B. De même, l'effet antitumoral induit par l'oxaliplatine chez les souris $APC^{min/+}$ n'est pas altéré par le riluzole. *** $p < 0.001$ vs véhicule (=oxa/Riluzole) Anova une voie test post-hoc de Bonferonni (Poupon et al. 2018).

Plus récemment, des données sur l'effet antiprolifératif du riluzole ont été obtenues sur des cellules de CaP (Wadosky et al. 2019). Son action sur des cellules de CaP hormono-dépendantes impliquerait une dégradation protéique des AR via les voies de stress du réticulum endoplasmique (Wadosky et al. 2019).

II. TREK-1 : cible moléculaire du Riluzole pour le traitement de la douleur du CaP

En 2000, Duprat et al., découvrent le potentiel activateur du riluzole vis-à-vis du canal TREK-1, un canal potassique de la famille des canaux potassiques à deux boucles P (K_2P) (Duprat et al. 2000). Comme énoncé plus haut, au sein du laboratoire, les effets antalgique et neuroprotecteur du riluzole observés chez un modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine implique ce canal puisque ces effets sont perdus chez des animaux délétés génétiquement pour ce canal. En revanche aucunes données concernant son implication potentielle dans l'effet antiprolifératif du riluzole n'ont été décrites à notre connaissance. Dans cette partie nous donnerons des éléments relatifs aux caractéristiques fonctionnelles de ce canal, ainsi que les

connaissances actuelles sur son rôle dans la physiopathologie, la pharmacologie de la douleur ainsi que dans la tumorigenèse.

1. Les canaux ioniques de la famille TREK

Le canal TREK-1 fait partie des canaux à deux domaine P (K₂P), des canaux à 4 domaines transmembranaires (TM1 à TM4) et 2 boucles P formant le pore du canal (P1 et P2), d'une région extracellulaire reliant les domaines M1 et P1 (TMD1P1) et enfin des domaines N- et C- terminaux intracellulaires. Afin d'être fonctionnels, ces canaux doivent être sous forme dimérisée (homodimères ou hétérodimères) (Renigunta, Schlichthörl, and Daut 2015).

Les canaux K₂P sont responsables de courants de fond, ou courants de « fuite », intervenant dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos et l'excitabilité cellulaire dans les cellules excitables (neurones) et non excitables (cellules musculaires ou cancéreuses) (Bayliss and Barrett 2008; Sauter et al. 2016). Ils sont modulés par de nombreux facteurs physiques et chimiques. Ces canaux sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la sécrétion d'hormones, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les canaux K₂P sont présents dans tous les tissus de l'organisme, néanmoins, chaque canal a un profil d'expression unique (Lesage and Lazdunski 2000; Patel and Honoré 2001). L'extrémité C-ter constitue la séquence la moins conservée entre les différents membres de la famille des K₂P, comportant une centaine d'acides aminés et une boucle extracellulaire de 60 à 70 résidus, localisée entre le premier segment transmembranaire et le premier domaine formant le pore, qui portent de nombreux domaines et sites de régulation. La modulation et l'activation de ces canaux est donc finement contrôlée par de nombreux facteurs intra et extracellulaires. Depuis le clonage du premier membre de cette famille, TWIK1 (tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying K⁺ channel) en 1996 (Lesage et al. 1996), 15 sous-unités K₂P ont été identifiées chez les mammifères et classées en 6 classes fonctionnelles et structurelles [Figure 24].

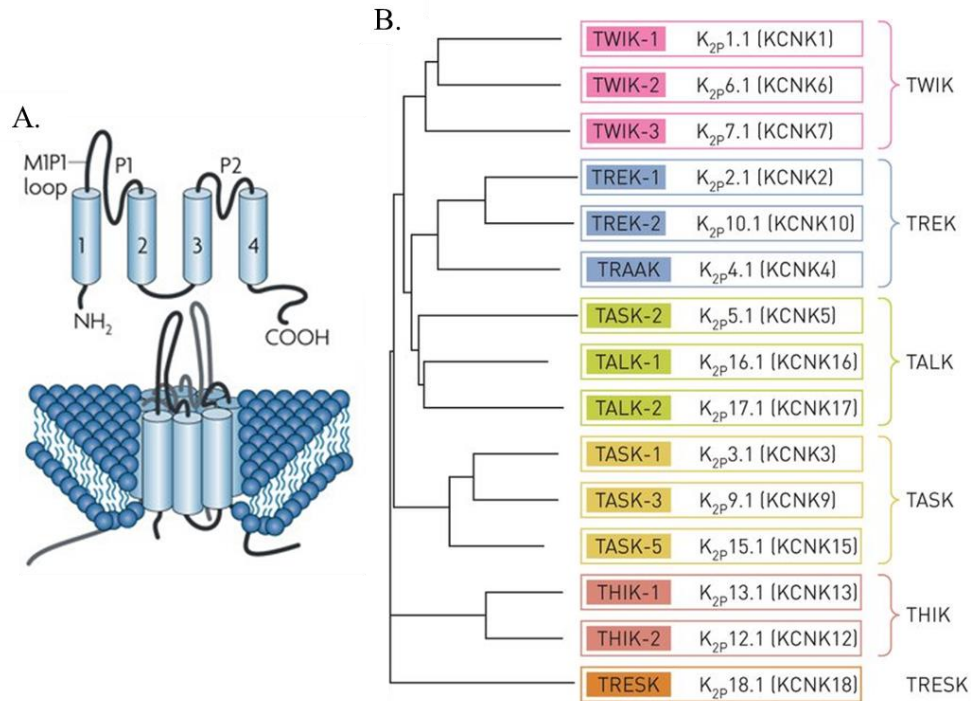


Figure 24: Diversité des sous-unités des canaux potassiques chez les mammifères

A. Structure des canaux K_{2P}. Le canal est composé de 4 domaines transmembranaires, de deux boucles P et d'une région extracellulaire (MIP1) reliant le domaine membranaire 1 (M1) et la boucle P1. B. Arbre phylogénétique de la famille des K_{2P}. (Adapté de Honoré 2007; Olschewski et al. 2017).

- La sous famille des TWIK : canaux K_{2P} à faible rectification entrante regroupe les canaux TWIK-1 (K_{2P} 1.1 ; KCNK1), TWIK-2 (K_{2P} 6.1 ; KCNK6) et KCNK7 (K_{2P} 7.1 ; KCNK7).
- La sous-famille des TASK : canaux K_{2P} sensibles au pH acide regroupe les canaux TASK-1 (K_{2P} 3.1 ; KCNK3), TASK-3 (K_{2P} 9.1 ; KCNK9) et TASK-5 (K_{2P} 15.1 ; KCNK15).
- La sous-famille des TALK : canaux K_{2P} sensibles au pH basique regroupe les canaux TASK-2 (K_{2P} 5.1 ; KCNK5), TALK-1 (K_{2P} 16.1 ; KCNK16) et TALK-2 (K_{2P} 17.1 ; KCNK17).
- La sous-famille des THIK : canaux K_{2P} inhibés par l'halotane regroupe les canaux THIK-1 (K_{2P} 13.1 ; KCNK13) et THIK-2 (K_{2P} 12.1 ; KCNK12).
- La sous-famille des TRESK : canaux K_{2P} présents au niveau de la moelle épinière représenté par un seul membre, le canal TRESK (K_{2P} 18.1 ; KCNK18).
- La sous-famille des TREK : canaux K_{2P} sensibles aux lipides et à un stimulus mécanique regroupe les canaux TREK-1 (K_{2P} 2.1 ; KCNK2), TREK-2 (K_{2P} 10.1 ; KCNK10) et TRAAK (K_{2P} 4.1 ; KCNK4).

2. Structure et expression du canal TREK-1

Le canal TREK-1 codé par le gène KCNK2 est localisé sur le bras long du chromosome 1 (1q41) chez l'homme, et est composé de 7 exons. Il est composé de deux-sous unités de 426 acides aminés pour l'homme et 411 pour la souris, s'associant en dimère pour former le canal.

Dans le système nerveux central, ce canal est particulièrement exprimé par les interneurons GABAergiques du noyau caudé et du putamen, les neurones sérotoninergiques du raphé, le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'hypothalamus (Honoré 2007). L'expression de TREK-1 dans le SNC n'est pas restreintes aux neurones car le canal est également retrouvé dans les astrocytes corticaux où il contribue à leur courant de fuite (Mi Hwang et al. 2014; M. Zhou et al. 2009). TREK-1 est également présent dans le système nerveux périphérique dans les neurones somatosensoriels, en particulier dans les neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG) de grand et petit diamètre, associé à la perception de stimuli thermique, mécanique et chimique, et dans les neurones des ganglions trijumeaux (Kang and Kim 2006; Medhurst et al. 2001). L'expression de TREK-1 a aussi pu être détectée dans le système nerveux autonome, dans les afférences vagues (H. Zhao, Sprunger, and Simasko 2010) et dans les ganglions sympathiques cervicaux (Cadaveira-Mosquera et al. 2011). En dehors du système nerveux, ce canal est également retrouvé dans divers tissus tel que les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires, ainsi que différents vaisseaux sanguins. Il est aussi exprimé dans les muscles lisses de l'intestin, de la vessie et le myomètre, en plus du poumon, du rein et de la prostate (Enyeart et al. 2002; Terrenoire et al. 2001; Voloshyna et al. 2008).

3. Mécanismes de régulation

Le canal TREK-1 génère un courant à rectification sortante qui ne disparaît pas lorsque la cellule est à l'équilibre homéostatique (concentration équimolaire entre la cellule et son milieu). Cette propriété est due au blocage du pore par l'ion Mg^{2+} qui est levé seulement après dépolarisation de la cellule (Maingret et al. 2002). Le courant TREK-1 est caractérisé par cette oscillation très rapide entre les états ouverts et fermés. Son activité peut être modulée par divers stimuli physico-chimiques tels que l'étirement de la membrane plasmique, des variations de température ou pH, des lipides ou encore des neurotransmetteurs dont les récepteurs sont couplés aux protéines G, mais également par différentes protéines du cytosquelette. Les mécanismes de régulation du canal TREK-1 se font principalement sur sa partie C-terminale mais ils peuvent aussi intervenir au niveau de la partie N-terminale et la boucle M1P1.

3.1. Étirement membranaire

Le canal TREK-1 est mécano-sensible. Il est directement activé par des étirements de la membrane (Patel et al. 1998). En effet, l'incorporation d'acides gras à longues chaînes, tels que l'acide arachidonique ou les lysophospholipides dans la couche de phospholipides externe engendre une courbure de cette dernière, mimant un étirement, activant directement le canal. De plus, cette activation mécanique semble être dépendante de l'axe du stimulus. En effet, il a été montré que dans un système reconstitué du canal TREK-1 murin, son activation est due à une pression dans une direction donnée mais inversement il est inhibé si le stress mécanique est exercé dans la direction opposée (Berrier et al. 2013). De même, le cytosquelette peut moduler l'activité des canaux mécano-sensibles soit en interagissant directement avec les sous-unités du canal ou indirectement en régulant la tension appliquée à la membrane plasmique (Ingber 2003; Prager-Khoutorsky, Khoutorsky, and Bourque 2014). Le canal TREK-1 est également directement inhibé par l'actine via une interaction dynamique entre les deux protéines (Lauritzen et al. 2005). Un autre mécanisme de régulation a été démontré impliquant la polycystine 2 (TRPP2). Ainsi une co-expression de ces deux protéines engendre une diminution de l'activité de TREK-1 en réponse à une stimulation mécanique (Peyronnet et al. 2012).

3.2. Température

Le canal TREK-1 est également thermosensible. La probabilité d'ouverture du canal augmente progressivement pour des températures comprises entre 22 et 42°C et l'hyperpolarisation qu'il engendre au niveau des fibres thermosensibles diminuerait leur activité dans cet intervalle de température. En retour, des températures supérieures à 42°C engendre une diminution de l'activité du canal et des températures inférieures à 22°C l'inhibe complètement. Pour des températures non nociceptives (22°C-42°C), l'activation du canal permet une hyperpolarisation des fibres thermosensibles et ainsi limite leur activité (Noël et al. 2009) [Figure 25].

Tempered skin temperature

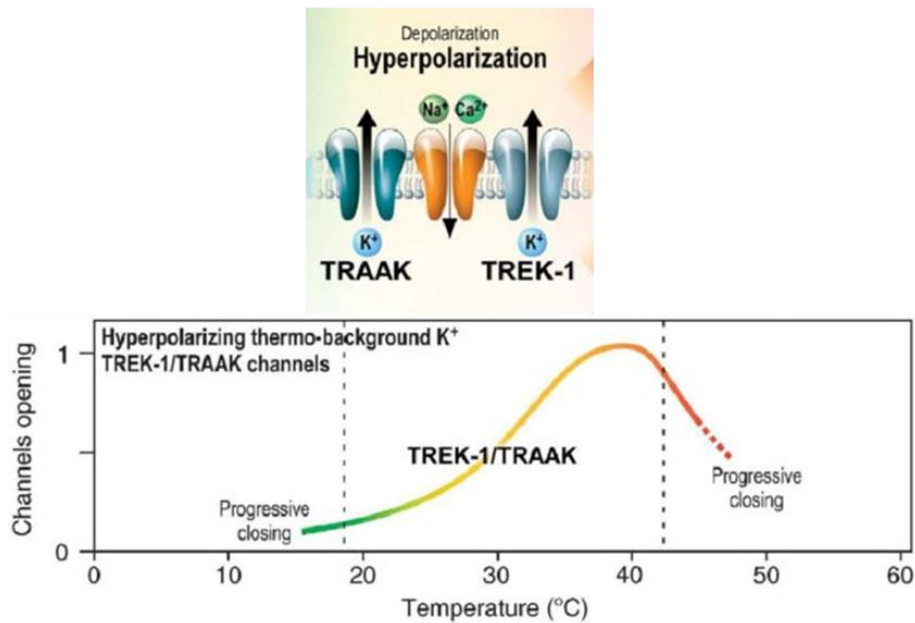


Figure 25: Thermosensibilité du canal TREK-1

Implication des canaux TREK-1 et TRAAK dans la thermosensation. Dans la partie haute de la figure est représentée l'activité des canaux TREK-1 et TRAAK. L'hyperpolarisation induite par les canaux K²P est dominante à température physiologique entre 22°C et 42°C. (Adapté de Noël et al. 2009).

En revanche, pour des températures plus extrêmes, l'inhibition ou la diminution de l'activité de TREK-1 conduit à une dépolarisation des fibres, augmentant leurs activités. C'est pourquoi la thermosensibilité du canal TREK-1 et son action de contrôle sur la décharge des fibres thermosensibles en fait un acteur important du processus de thermosensation. Cette régulation de TREK-1 par la température s'effectue au niveau de son domaine C-terminal. De plus, la thermosensibilité de TREK-1 requiert la présence de partenaires cytosoliques car il a été montré qu'une configuration « inside-out » en patch-clamp entraîne également la perte de thermosensibilité du canal TREK-1 (Maingret et al. 2002).

3.3. Variation du pH

L'activité du canal TREK-1 est également régulée par une variation du pH intracellulaire ou extracellulaire. L'ouverture du canal est ainsi favorisée par une acidose intracellulaire ou une alcalose extracellulaire (Sandoz et al. 2009). Inversement, une acidification extracellulaire inhibe fortement le canal (pK 7,4)(Noël, Sandoz, and Lesage 2011). Il possède deux sites jouant le rôle de « senseur de proton », le premier est une glutamine en position 306 (dans le domaine C-ter) et le second une histidine en position 126 (dans la boucle TMD1P1). Il a été montré qu'une mutation d'un de ces sites mimant une protonation engendre une activité constitutive

du canal TREK-1 (Honoré et al. 2002). Comme décrit précédemment, la sous-famille TREK comprend TREK-1, TREK-2 et TRAAK. Malgré 78% d'homologie entre TREK-1 et TREK-2, ces deux canaux K^+ mécano-activés sont régulés de manière différentes. Des études récentes ont montré que les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK se co-assemblent facilement. TREK-1 et TREK-2 peuvent chacun s'hétérodimériser avec TRAAK, mais le font moins efficacement que l'un avec l'autre. Fait intéressant, l'hétérodimère TREK-1-TREK-2 présente de faibles niveaux d'activité à pH externe physiologique. Cependant, contrairement à leurs homodimères correspondants, ce complexe semble activé à la fois dans des conditions externes alcalines et acides. L'hétérodimère TREK-1-TRAAK montre, quant à lui, une activation à la fois par acidification et alcalinisation intracellulaire (Levitz et al. 2016). Il est important de noter que la sensibilité au pH du canal TREK-1 a un effet direct sur la fonctionnalité du canal par modification du potentiel de membrane, du transport d'ions, de la régulation du volume et l'homéostasie du Ca^{2+} , essentiels pour la réponse physiologique des cellules (Sauter et al. 2016).

3.4. Phospholipides

L'activité du canal TREK-1 est aussi régulée par des phospholipides via une enzyme la phospholipase D2. Cette enzyme est capable d'interagir avec le domaine C-ter du canal et ainsi moduler son activité via une production d'acide phosphatidique. C'est ce phospholipide qui est capable d'activer directement le canal TREK-1 mais, il possède une durée de vie très courte et est rapidement métabolisé (Comoglio et al. 2014). Il est également régulé par le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2). Cette régulation implique une interaction entre la membrane plasmique et la partie polybasique du domaine C-ter de TREK-1. Les charges positives portées par le domaine polybasique sont ainsi attirées au niveau des têtes du PIP_2 qui est chargé négativement. C'est cette modification conformationnelle qui entraîne l'activation du canal TREK-1 (Chemin et al. 2007).

3.5. Neurotransmetteurs et RCPG

L'activité du canal TREK-1 est également modulée par ses partenaires protéiques. Il est régulé positivement ou négativement par différents RCPG, couplés à leurs protéines Gs, Gq ou Gi, sur lesquels se fixent différents neurotransmetteurs tels que le GABA, le glutamate ou la sérotonine (Mathie 2007; Sandoz et al. 2012). L'activation des RCPG Gs ou Gq entraîne une activation sous-jacente des protéines kinases A et C (PKA et PKC). La partie C-ter du canal TREK-1 est la cible des PKA et PKC sur différents sites de phosphorylation (Ser 300, Glu 306

et Ser 333). L'activité du canal TREK-1 est inhibé à la suite de ces phosphorylations (Murbartián et al. 2005; Patel et al. 1998). Inversement, l'activation des RCPG couplés aux protéines Gi, tels que le récepteur métabotropique au glutamate de type 4 (mGluR4) (Cain et al. 2008) ou le récepteur opioïde μ (Devilliers et al., 2013), entraîne une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase suivie d'une diminution de la voie PKA réduisant la phosphorylation du domaine C-ter du canal TREK-1 et favorisant ainsi son état actif.

3.6. Autres protéines modulatrices

Une approche protéomique basée sur l'immunoprécipitation et une analyse spectrophotométrique de masse de complexe natifs a permis d'établir que la protéine d'échafaudage AKAP150 (A-Kinase Anchoring Protein) était un constituant des canaux TREK-1 capable de le moduler (Sandoz and Lesage 2008). En effet, c'est une protéine impliquée dans l'organisation des complexes de signalisation précédemment décrit et plus particulièrement dans la cascade de signalisation de la PKA et la PKC. L'association AKAP150/TREK-1 engendre un fort courant de fuite, transformant le canal de faible activité en canal très actif (Sandoz et al. 2006). De plus, cette modification rend alors le canal insensible aux stimuli tels que l'étirement membranaire, l'acidification du pH intracellulaire ou l'acide arachidonique. Paradoxalement, AKAP150 favorise l'inhibition de TREK-1 par les RCPG de type Gs en rapprochant ces deux partenaires membranaires et permettant ainsi une phosphorylation rapide par la PKA (Noël, Sandoz, and Lesage 2011). Cette même approche protéomique a permis d'identifier la protéine Mtap2 ou MAP2 (*Microtubule Associated Protein 2*) comme partenaire du canal TREK-1. Mtap2 est une protéine d'échafaudage pour la localisation de complexes de signalisation dans les dendrites, en particulier près des épines. Mtap2 ne modifie pas la propriété des canaux TREK-1 mais augmente leurs densités au niveau de la membrane plasmique nécessitant une liaison simultanée de Mtap2 et de la tubuline à TREK-1 pour obtenir cet effet. Les protéines Mtap2 et AKAP150 ont des sites d'interaction distincts permettant aux deux protéines de se fixer simultanément (Sandoz et al. 2008). De même, la protéine β -COP (beta coatomer protein), appartenant au complexe COP1, est colocalisée avec TREK-1 à la membrane, augmentant l'expression de surface du canal. Elle participe donc à l'augmentation de la densité du courant TREK-1 (E. Kim et al. 2010).

Une autre protéine partenaire du canal TREK-1 est la sortiline ou récepteur 3 de la neurotensine (NTSR3). Elle est essentiellement localisée dans l'appareil de Golgi où elle est impliquée dans le trafic de protéines intracellulaires. Mais, elle se trouve également au niveau

de la membrane plasmique en tant que récepteur ou corécepteur. Le complexe NTSR3/sortiline lie directement le canal TREK-1 dans le réseau trans-golgien augmentant le trafic de TREK-1 à la membrane plasmique et la densité de courant comme le fait β -COP. Cependant, la régulation de l'expression de TREK-1 à la membrane par NTSR3/sortiline est bidirectionnelle. En effet, le processus de maturation sur le domaine N-ter extracellulaire de NTSR3 libère un polypeptide qui se lie directement au complexe TREK-1-NTSR3/sortiline déclenchant l'endocytose du canal TREK-1 (Mazella et al. 2010). Un polypeptide dérivé du NTSR3, appelée Spadine, favorise également l'internalisation du canal [Figure 26].

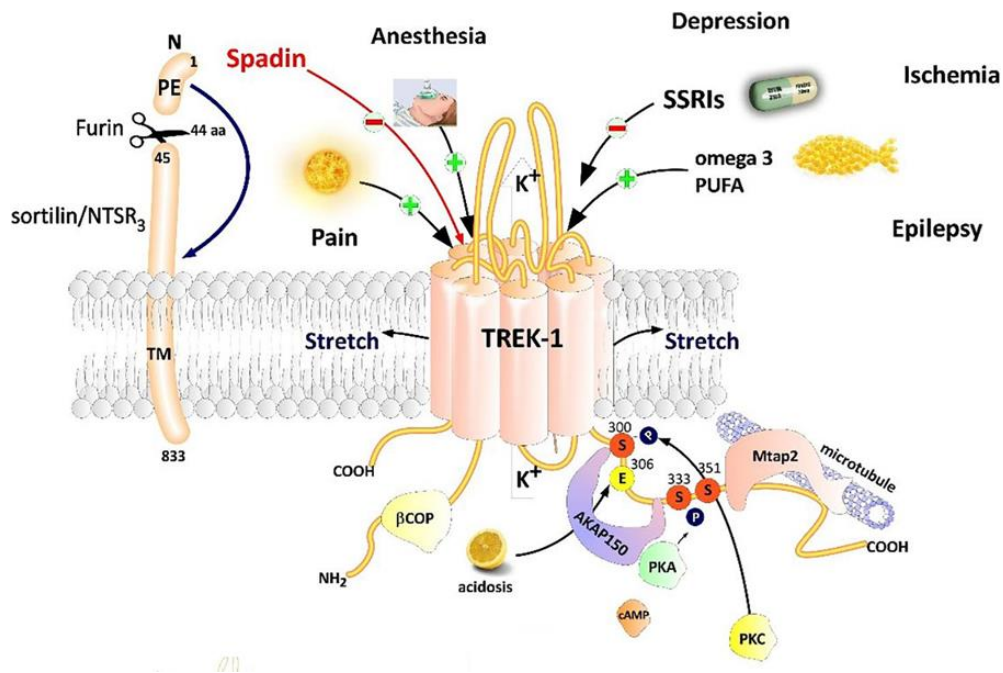


Figure 26: Régulation du canal TREK-1

TREK-1 est un canal multirégulé par une grande variété de stimuli physiques et chimiques. Il possède différents partenaires protéiques tels que AKAP150, β -COP, Mtap2 et la sortiline. La sortiline interagit avec TREK-1 et l'adresse à la membrane plasmique. La spadine est un peptide synthétique dérivé de la sortiline dont l'efficacité d'inhibition de TREK-1 a été démontré avec une grande affinité. La diversité de réponses aux stimuli fait de TREK1 un canal impliqué dans de nombreuses pathologies du système nerveux central telles que la dépression, l'ischémie, l'épilepsie et la douleur. (Adapté de Djillani, Mazella, et al. 2019).

4. Rôles physiologiques du canal TREK-1

Son expression dans l'endomyocarde confère au canal TREK-1 un rôle dans la synchronisation des contractions cardiaques, et son expression dans le myomètre lui donne un rôle dans la gestation (Monaghan et al. 2011; L. na Zhao et al. 2011). Son expression dans les muscles lisses de la vessie impliquant la propriété mécanosensible du canal TREK-1 permet

ainsi la miction (Pineda et al. 2017). Comme dit précédemment, le canal TREK-1 est également largement distribué dans le système nerveux central et périphérique. Dans le système nerveux, TREK-1 est largement impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la dépression, la neuroprotection, la douleur, l'anesthésie. Il est également impliqué dans les processus d'homéostasie cellulaire comme le développement des cellules cancéreuses. Les connaissances acquises sur la participation de TREK-1 à ces différents processus physiologiques découlent d'étude sur des cellules ou des animaux invalidés génétiquement pour le gène codant ce canal (KO TREK-1 ou TREK-1^{-/-}) (C. Heurteaux et al. 2004) ou bloqué par « silencing ». Ces invalidations de gène ont été réalisées par recombinaison homologue *in vivo* permettant de générer des souris en bonne santé, fertiles et sans anomalie morphologique visibles, ou par l'utilisation d'outil génétique tel que des siRNA, shRNA *in vitro*.

4.1. TREK-1 et anesthésie générale

L'activation du canal TREK-1 par les anesthésiques généraux volatils tel que le chloroforme, l'éther diéthylique, l'halotane et l'isoflurane induisent une hyperpolarisation des cellules (Patel et al. 1999). Il a été montré que les souris TREK-1^{-/-} étaient significativement moins sensibles à ces anesthésiques volatils que les souris sauvages (Franks and Honoré 2004; C. Heurteaux et al. 2004; Patel et al. 1999). Effectivement, les souris KO pour le canal sont même insensibles à une concentration d'halothane qui s'est montré suffisante pour anesthésier 100% des souris sauvage possédant le canal TREK-1 (C. Heurteaux et al. 2004). Cette sensibilité est tout de même conservée mais pour des concentrations beaucoup plus élevées, qui est probablement dû à la sensibilité à ces anesthésiques volatiles d'autres canaux K₂P comme les canaux TASK.

4.2. TREK-1 et neuroprotection

Les souris TREK^{-/-} ont également montré une plus forte propension au développement d'ischémie et d'épilepsie par rapport aux souris sauvages (Franks and Honoré 2004; C. Heurteaux et al. 2004). Un agent activateur des récepteurs glutamatergiques, le kaïnate, ou le pentylenetrazol, un inhibiteur des récepteur GABA ont montré qu'après leurs injections, le taux de mortalité des souris KO était considérablement augmenté par rapport à celui des souris sauvages. De même, le taux de mortalité des souris TREK-1^{-/-} après induction d'ischémies commune avec des clips anévrysmaux ou par un clampage de l'arc aortique, de l'artère sous-

clavière gauche et de l'artère mammaire interne respectivement, s'est révélé nettement supérieur à celui des souris sauvages.

Il a également été montré qu'une injection intracérébroventriculaire ou intraveineuse d'acide linoléique ou de lysophosphatidylcholine avait un effet neuroprotecteur contre l'ischémie globale et les crises induites par le kaïnate (Blondeau et al. 2002; Lang-Lazdunski et al. 2003; Lauritzen et al. 2000). Cet effet est totalement perdu chez les souris TREK-1^{-/-} (Franks and Honoré 2004; C. Heurteaux et al. 2004) montrant que le canal TREK-1 est essentiel à l'effet neuroprotecteur des lipides polyinsaturés. Les souris KO pour le canal TREK-1 sont plus vulnérables à l'épilepsie et l'ischémie cérébrale. Cette vulnérabilité semble être dû à l'inhibition de TREK-1 diminuant l'hyperpolarisation des cellules neuronales nécessaire dans le phénomène de neuroprotection. Le canal TREK-1 prévient cette mort neuronale en inhibant l'excitotoxicité glutamatergique dépendante du récepteur NMDA induite par l'ischémie (Buckler and Honoré 2005; Dedman et al. 2009). Les astrocytes jouent un rôle fondamental dans la pathogenèse de la mort neuronale ischémique. Le fonctionnement optimal des transporteurs et échangeurs astrocytaires électrogéniques pour certaines fonctions homéostatiques cérébrales astrocytaires bien définies dépend de la présence de canaux K⁺ dans les membranes cellulaires et du potentiel de membrane hyperpolarisée. La présence du canal TREK-1 aux niveaux de ces astrocytes et l'augmentation de son expression dans ces cellules après une ischémie induite *in vitro* démontre que le canal TREK-1 est nécessaire aux cellules astrocytaires afin de maintenir cet état d'hyperpolarisation des astrocytes (X. Wu et al. 2013). Une activation par des molécules ayant un effet neuroprotecteur comme le riluzole, l'oxyde nitrique et le xénon peut être utilisé dans ces conditions physiopathologiques (Duprat et al. 2000; Gruss et al. 2004).

4.3. TREK-1 et dépression

La créations des souris TREK-1^{-/-} n'a mis en évidence aucun défaut majeur de leurs réflexes ou fonctions cognitives (C. Heurteaux et al. 2004; Catherine Heurteaux et al. 2006). Cependant, le canal TREK-1 semble jouer un rôle essentiel dans le contrôle de l'humeur. En effet, les souris KO TREK-1 présentent une neurotransmission par la sérotonine accrue entraînant une résistance à la dépression. Dans des tests comportementaux évaluant l'état dépressif des animaux, les souris KO TREK-1 présente une résistance équivalente à celle d'animaux ayant reçu un antidépresseur tel que la fluoxétine (Catherine Heurteaux et al. 2006). TREK-1 semble donc être un acteur important dans cette pathologie. L'implication du canal a

été confirmée par des études cliniques qui concluent positivement à l'implication du canal TREK-1 dans la pathologie dépressive mais également dans l'implication du canal TRPA1 à la réponse aux traitements des patients (Liou et al. 2009; Perlis et al. 2008). Le mécanisme d'action impliquant TREK-1 dans la dépression passerait par une modulation de la voie sérotoninergique. Ce phénotype est cohérent avec les régulations connues de TREK-1 et son pattern d'expression cérébrale. Comme décrit précédemment, une forte expression de TREK-1 a été mise en évidence dans les neurones sérotoninergiques du raphé et de plusieurs zones cérébrales impliquées dans la dépression et la gestion des émotions telles que le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hypothalamus (Catherine Heurteaux et al. 2006). L'utilisation de la spadine, bloqueur de TREK-1, a démontré un effet antidépresseur chez des animaux sains (Mazella et al. 2010) et chez des animaux modèle de stress chronique léger imprévisible utilisé pour induire des comportements de type anxieux et dépressifs (Ye et al. 2015). Cependant, des ajustements stratégiques sur la séquence de la spadine sont encore nécessaires afin d'augmenter sa stabilité *in vivo* qui ne dure pas >7h (Djillani, Pietri, et al. 2019). Ces études ont permis de démontrer le rôle majeur du canal TREK-1 dans la dépression faisant de lui une cible intéressante pour le traitement de cette pathologie.

4.4. TREK-1 et perception douloureuse

Par sa sensibilité aux divers stimuli physico-chimiques et sa présence dans les DRG, il est facile de supposer que le canal TREK-1 peut être impliqué dans la perception polymodale de la douleur. La première implication de TREK-1 dans la réponse aux stimuli nociceptifs a également été mise en évidence grâce à des animaux invalidés pour le canal. Les animaux TREK-1^{-/-} présentent un seuil douloureux plus bas que les animaux sauvages, les rendant hypersensibles aux stimuli thermiques et mécaniques (Alloui et al. 2006; Noël et al. 2009).

En plus de l'implication de TREK-1 dans la réponse aux stimuli thermique et mécanique, il a été montré que le canal serait également impliqué dans la transmission du signal nociceptif en contexte inflammatoire. Effectivement, chez un modèle murin d'inflammation induit par injection de carragénine au niveau intraplantaire, on retrouve une hyperalgie mécanique qui est moins importante chez les animaux TREK-1^{-/-} que chez les animaux sauvages (Alloui et al. 2006). TREK-1, comme son canal parent TREK-2, est aussi impliqué dans la perception d'un stimulus osmotique et dans sa sensibilisation par la PGE2, mimant une condition inflammatoire. L'injection d'une solution saline hypertonique crée un stimulus osmotique qui excite les nocicepteurs, entraînant une sensation douloureuse augmentée après sensibilisation avec la

PGE2. Cette douleur est amoindrie chez les animaux KO TREK-1 ou 2 par rapport aux animaux sauvages. TREK-1 semble donc en partie impliqué dans la sensibilisation des fibres nociceptives en réponse à l'inflammation (Alloui et al. 2006; V. Pereira et al. 2014). Les souris TREK1^{-/-} ont montré une réponse inflammatoire exacerbée après une lésion de la moelle épinière (SCI). En outre, l'absence du canal TREK-1 a augmenté l'astroglie, l'apoptose neuronale, la démyélinisation et le retard de récupération motrice chez ces animaux (Fang et al. 2017). Une diminution de l'expression du canal TREK-1 dans les DRG innervant le côlon d'un modèle murin d'inflammation colique participerait à son implication dans la mécano-hypersensibilité du côlon (La and Gebhart 2011). La douleur neuropathique qui survient après constriction chronique du nerf sciatique (CCI) engendre une augmentation de l'expression de TREK-1 dans les DRG (Han et al. 2016). L'injection intrathécale de microARN miR-183 a soulagé cette douleur neuropathique dans ce même modèle avec une diminution de l'expression de TREK-1 (D. N. Shi et al. 2018). A l'inverse, il a été observé au laboratoire que la douleur neuropathique induite par un médicament de chimiothérapie anticancéreuse, l'oxaliplatine, entraîne une sous expression de l'ARNm du canal corrélée à l'hypersensibilité douloureuse dont l'acmé apparaît 4 jours après l'injection de la drogue (Descoeur et al., 2011). Toutefois, comme nous l'avons dit précédemment, le riluzole, activateur TREK-1 non spécifique prévient les déficits sensoriels et proprioceptifs induits par l'oxaliplatine (Poupon et al. 2018). Très récemment, une étude de C3001a, un activateur de l'hétérodimère TREK-1-TREK-2, ciblant uniquement les canaux du système nerveux périphérique, a montré une réduction de l'excitabilité des neurones nociceptifs et un soulagement de la douleur spontanée, l'hyperalgésie au froid mais également de l'allodynie mécanique et de l'inflammation chez un modèle de pancréatite aiguë (Qiu et al. 2020). Enfin, des études du laboratoire ont rapporté une contribution du canal TREK-1 dans l'effet analgésique de la morphine sans qu'il soit impliqué dans les effets indésirables qui limitent bien souvent la prescription de cet antalgique (Devilliers et al. 2013). L'idée d'une activation directe du canal, sans activer les récepteurs à la morphine, afin de produire un effet antalgique sans les effets indésirables des opiacés a donc conduit le laboratoire, en collaboration avec des chimistes Clermontois, à mener un programme de recherche d'activateurs du canal. Ainsi, récemment l'acide (2E)-2-cyano-3-(furane-3-yl) prop-2-énoïque (RNE28), une molécule activatrice spécifique du canal TREK-1, a démontré une activité anti nociceptive chez les rongeurs naïfs et dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Busserolles et al. 2020).

L'ensemble de ces études démontrent l'implication du canal TREK-1 dans la transmission du signal nociceptif mécanique et thermique. Il apparaît comme un modulateur important de l'activité des nocicepteurs, très certainement en s'opposant à leur dépolarisation provoquée en partie par l'ouverture de canaux excitateurs comme les canaux TRP, et comme une cible pharmacologique pour le développement d'antalgiques efficaces et bien tolérés.

4.5. TREK-1 et cancer

La littérature est pauvre et controversée concernant le rôle du canal TREK-1 dans la tumorigenèse. En effet, dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas, l'activation du canal TREK-1 a démontré un effet antiprolifératif impliquant principalement le rôle du canal TREK-1 dans l'homéostasie du pH et l'importance du potentiel de la membrane plasmique (V_m) nécessaire au bon développement des cellules tumorales. Cette étude a démontré qu'une hyperpolarisation de V_m induit par l'activation de TREK-1 inhibe la prolifération cellulaire du cancer du pancréas (Sauter et al. 2016). Inversement, dans le CaP, deux études suggèrent une influence négative de l'activation du canal TREK-1. L'une des études a constaté que des tissus de CaP présentaient des niveaux d'expression de TREK-1 supérieurs aux tissus normaux en plus d'une corrélation positive associés au score de Gleason. Le knockdown de TREK-1 dans des cellules PC3, établit à partir de métastases osseuse de grade IV de CaP humain, a montré une inhibition de leur prolifération par l'induction d'un arrêt du cycle de division en G1/S (G. M. Zhang et al. 2015). De même une seconde étude a démontré que le canal TREK-1 est fortement exprimé dans les lignées cellulaires du CaP (PC3 et LNCaP), mais il n'est pas détectable dans les cellules épithéliales normales de la prostate. Il démontre également qu'une surexpression de TREK-1 *in vitro*, conduit à une augmentation significative de la prolifération tumorale (Voloshyna et al. 2008).

Chapitre IV : Objectifs de la thèse

L'ensemble des données rapportées dans l'introduction bibliographique met en évidence un manque de prise en charge de la douleur osseuse dont souffrent les patients de CaP de haut grade. C'est dans ce contexte pathologique que c'est inscrit mon projet de thèse qui a eu pour but :

- i. La modélisation et la caractérisation d'un modèle murin de douleur osseuse de CaP
Nous avons choisi d'utiliser un modèle murin de douleur osseuse induite par une injection unilatérale de cellules humaines de CaP PC3 dans le tibia d'animaux immunodéprimés SCID. Ce modèle nous a permis d'évaluer à la fois des symptômes de douleur provoquée par stimulation mécanique et de douleur spontanée, la progression tumorale et le remodelage osseux par des techniques d'imagerie en collaboration avec l'UMR IMoST.
- ii. L'évaluation de l'effet du riluzole sur la douleur osseuse, la progression tumorale et le remodelage osseux chez ce modèle animal de CaP. Des études de viabilité cellulaire et fonctionnelles ont également été réalisées sur les cellules PC3.
- iii. Enfin, l'investigation de l'implication éventuelle du canal TREK-1 dans les effets antalgique et antiprolifératif du riluzole.

PARTIE B : Résultats

I. Effet antalgique du riluzole dans un modèle murin de douleur prostatique

Dans le but de tester l'effet du riluzole sur les douleurs osseuses, nous avons tout d'abord mis en place un modèle murin de douleurs osseuses mimant les symptômes rapportés par les patients. Nous avons donc reproduit le modèle de douleur osseuse induite par injection unilatérale de cellules humaines de CaP précédemment publié par l'équipe du Pr.Philippe Clezardin (Lyon) (Fradet et al. 2013). Ce modèle est connu pour induire une lyse osseuse au niveau du tibia des souris à la suite d'une injection de cellules PC3 qui sont des cellules humaines métastatiques de CaP.

1. Caractérisation du modèle de douleur osseuse de CaP

1.1. Caractérisation phénotypique et validation pharmacologique

La première expérience (notée Exp1 par la suite) réalisée consistait à caractériser phénotypiquement la douleur chez des animaux SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) à la suite d'une injection unilatérale de cellules cancéreuses de CaP dans le tibia durant 40 jours. Pour cela, les animaux injectés (animaux PC3) ou non (animaux sham) sont soumis au test de Von Frey. Ce test permet d'évaluer la douleur ressentie suite à la suite d'une stimulation mécanique de la face plantaire des pattes postérieures des animaux. En pratique l'application sous-plantaire de filaments de diamètres calibrés, donc de forces connues, est réalisée 5 fois consécutivement sur chaque patte postérieure de l'animal. Le nombre de réactions (retrait, léchage de la patte) est comptabilisé. Les résultats obtenus lors de cette première expérience montrent que des seuils à J0 un peu hauts et une diminution du nombre de retrait de la patte au cours de l'expérience chez les souris sham suggérant que les animaux SCID nécessiteraient une habitude plus importante à l'environnement du test. Une autre explication peut être dû au jeune âge des souris à J0 (5 à 6 semaines), leur croissance peut expliquer cette diminution de sensibilité aux stimuli mécanique observée au cours des semaines de test. En effet, leur patte étant plus petite au départ, la force exercée se répartit sur une plus faible surface. Cela dit, il apparaît surtout que les animaux injectés avec les cellules de CaP développent une hypersensibilité douloureuse induite par une stimulation mécanique dès J21 pour la patte injectée (ipsilatérale) mais également, à partir de J28, pour la patte controlatérale, suggérant une sensibilisation centrale induite par l'injection des cellules cancéreuses. [Figure 27A-B].

Cette hypersensibilité mécanique, qui persiste jusqu'à J35, n'est pas observée chez les souris sham.

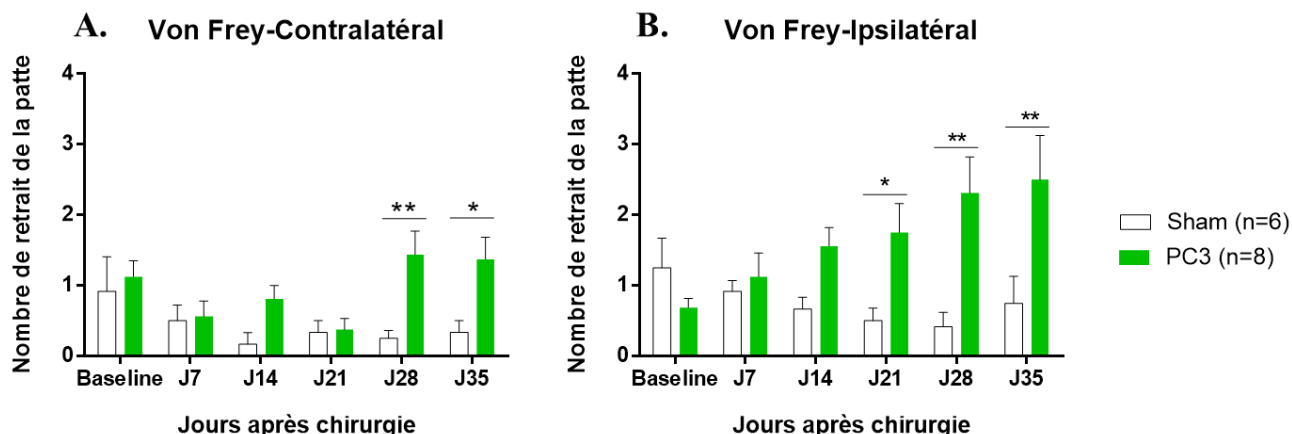


Figure 27 : Evaluation de l'hypersensibilité mécanique induite par l'injection intra-tibiale de cellules tumorales de CaP (Exp1)

Les résultats obtenus avec le test de Von Frey montrent le développement d'une hypersensibilité mécanique significative chez les animaux PC3 A. dès J28 sur la patte qui n'a pas reçu de cellules (patte controlatérale) et B. dès J21 sur la patte lésée (patte ipsilatérale). Moyenne \pm SEM * p <0.05 ; ** p <0.01 vs Sham, Anova 2 voies suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Nous avons également souhaité évaluer la douleur spontanée chez ces animaux. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé le test de static weight bearing (SWB) qui consiste à mesurer la pression appliquée par les pattes arrière de la souris grâce à deux capteurs de pression afin d'évaluer la distribution pondérale de l'animal sur ses pattes arrière. À la suite de l'injection des cellules de CaP ou de véhicule, nous suivons l'évolution de cette distribution pondérale. Les souris Sham présentent une distribution équilibrée sur leurs pattes arrière (=50%) tout au long de l'expérience. À l'inverse, nous pouvons noter l'apparition d'un déséquilibre postural dès J21 chez les animaux ayant reçu les cellules PC3, signe du développement d'une douleur spontanée chez ces animaux [Figure 28].

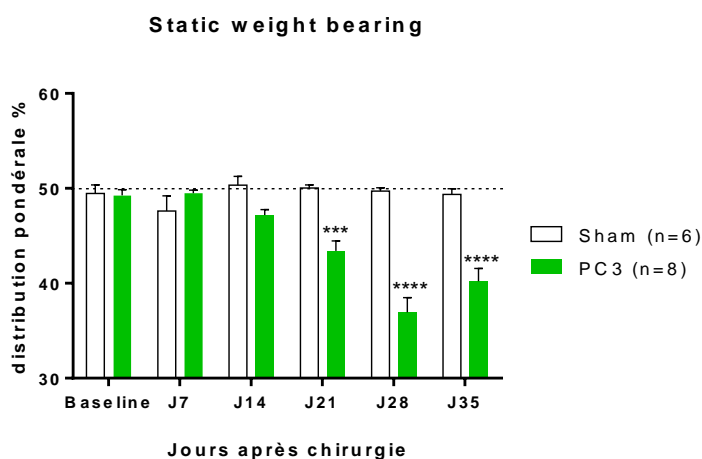


Figure 28 : Impact de l'injection de cellules tumorales de CaP sur la distribution pondérale (Exp1)

Les résultats obtenus avec le test du static weight bearing (SWB) révèlent le développement de symptômes douloureux spontanés chez les animaux injectés avec les cellules tumorales PC3 dès J21 contrairement aux animaux sham qui conservent une distribution pondérale équilibrée (=50%) tout au long de l'expérience. Moyenne \pm SEM *** p <0.001 et **** p <0.0001 vs Sham, Anova 2 voies suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Durant cette Exp1, nous avons également évalué, avant le sacrifice à J40, le comportement spontané des souris durant 20h grâce au Phénotyper. Ce système de suivi de l'activité spontanée par video-tracking de l'animal dans une cage permet d'obtenir des mesures automatisées du comportement de l'animal. Ce système ne nécessite pas d'habituation car il permet également d'observer le comportement d'exploration de l'animal dans un nouvel environnement [**Figure 29A**]. Il permet de mesurer de nombreux paramètres tels que la distance parcourue, la vitesse de déplacement de l'animal, la fréquence de visite de zones définies (par exemple la *shelter zone*, correspondant à la boîte noire qui est une zone de refuge pour les animaux), l'allongement du corps mais également la reconnaissance de comportements plus complexes comme le toilettage (*grooming*), l'alimentation (*feeding*), les sauts (*hopping*), le fait de renifler l'environnement (*sniffing*), l'élévation de l'animal sur ses pattes arrière en prenant appui sur un support (*rearing supported*), telle que la paroi de la cage, ou sans appui (*rearing unsupported*). Les données enregistrées sont ensuite analysées par le logiciel Ethovision XT14 (Noldus). Comme attendu, quel que soit le groupe, les souris sont plus actives sur la période nocturne [**Figure 29C-D**]. Néanmoins, les souris PC3 semblent moins actives que les souris sham, comme l'illustre la diminution de la distance totale parcourue sur les 20h d'enregistrement [**Figure 29B**]. De plus, des différences significatives ont été observées sur certains paramètres. Les animaux PC3 passent moins de temps dans la zone où ils peuvent s'alimenter (*feeding*) [**Figure 30A**], et plus de temps dans la zone de refuge (*shelter zone*) que les animaux sham [**Figure 30B**]. De même, l'injection des cellules de CaP semble fortement diminuer les comportements exploratoires des animaux PC3. On observe une diminution significative de la capacité des souris à se lever sur leurs pattes arrière (*rearing*) et une forte diminution du reniflement de l'environnement (*sniffing*) [**Figure 30C-D**].

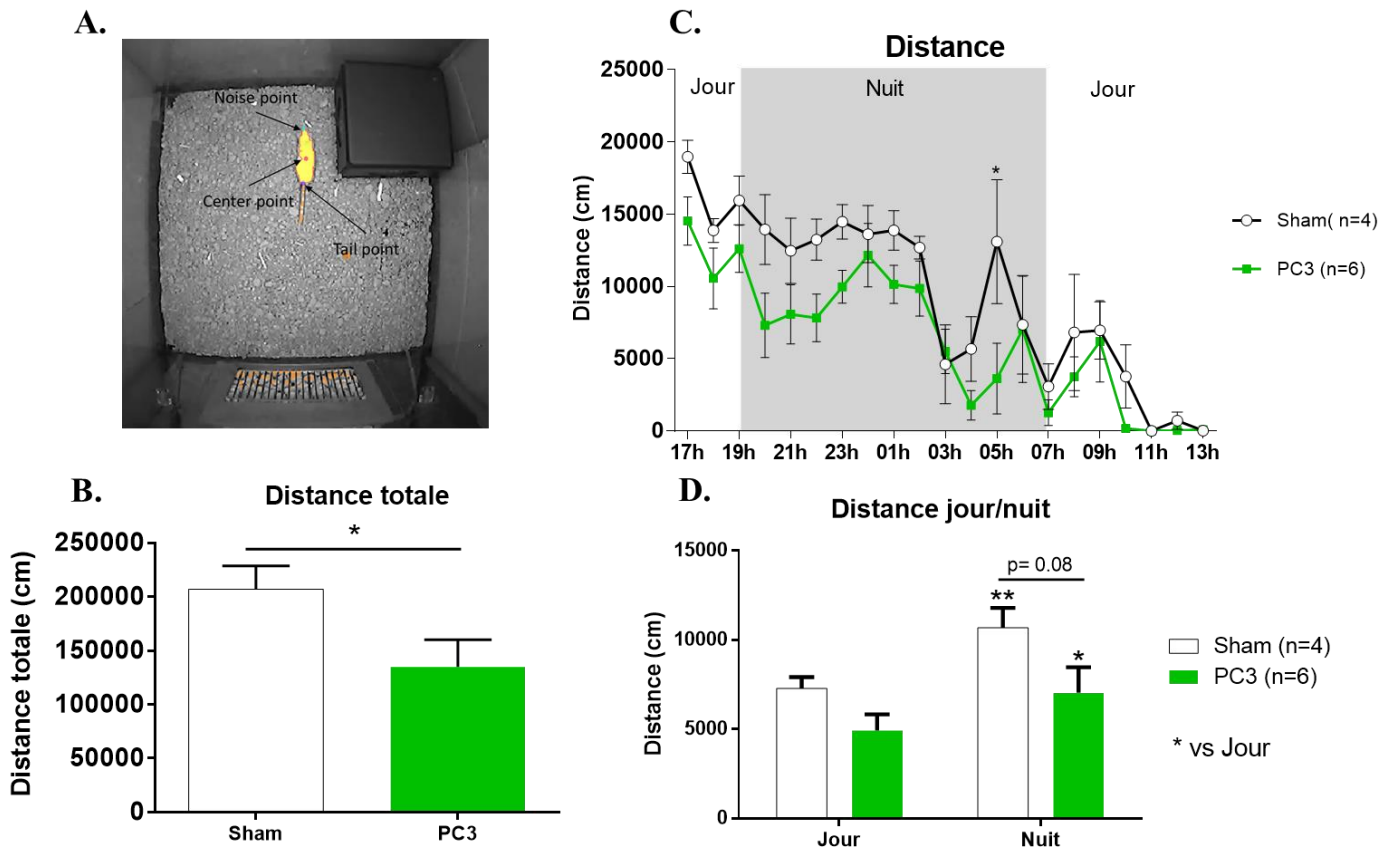


Figure 29: Impact de l'injection intratibiale de CaP sur la distance parcourue par les animaux évaluée par videotracking (Exp1)

A. Image obtenue lors du traitement des données par Ethovision XT14 (Noldus), la souris est représentée sous forme de pixel. B. Distance totale parcourue ou C. heure par heure ou D. de nuit et de jour durant les 20h d'enregistrement. Les comportements ont été évalués avant sacrifice à J40 à l'aide du système d'enregistrement vidéo par MediRecorder puis par analyse grâce à Ethovision XT14 (Noldus) pour chaque souris dans une cage Phénotyper (Noldus). Moyenne \pm SEM n=4-6 animaux par groupe B. * $p < 0.05$ vs Sham Test de student. C. * $p < 0.05$ vs Sham Anova 2 voies test post hoc de Sidak D. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ différence jour vs nuit $p = 0.08$ vs Sham Anova 2 voies test post hoc de Sidak.

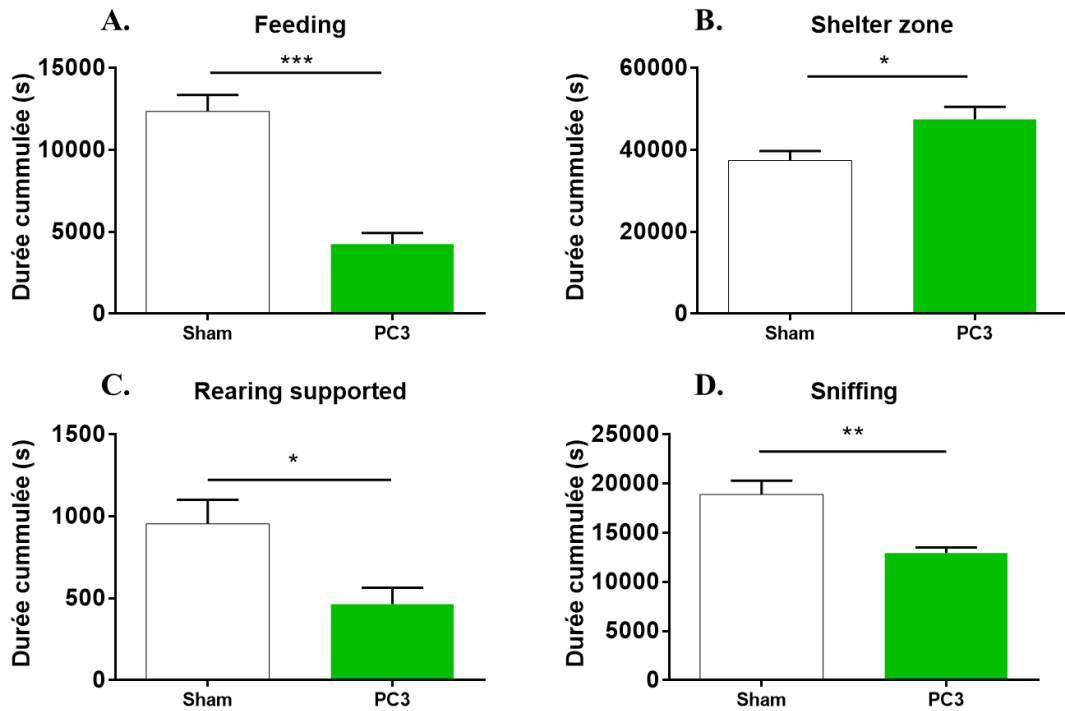


Figure 30: Impact de l'injection de cellules PC3 sur le comportement spontané des animaux analysé par videotracking (Exp1)

Temps total passé par l'animal dans la zone d'alimentation (A) dans la zone de refuge (B) à se lever sur ses pattes arrière (C) ou renifler l'environnement (D) durant les 20h d'enregistrement. Les comportements sont filmés avant sacrifice à J40 à l'aide du système d'enregistrement vidéo par MediRacorder puis analysés grâce à Ethovision XT14 (Noldus) pour chaque souris dans une cage Phénotyper (Noldus). Moyenne \pm SEM n=4-6 animaux par groupe * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs Sham Test de student.

Des données cliniques et bibliographiques ont montré que la morphine, utilisée à une dose normalement antalgique pour soulager des douleurs inflammatoires, n'était pas ou peu efficace dans le cadre des douleurs osseuses. En effet, en 2002 l'équipe de Mantyh a démontré, dans un modèle murin de douleur osseuse induite par l'injection de cellules de sarcomes, qu'il fallait des doses 3 à 10 fois supérieures aux doses normalement utilisées pour soulager les douleurs inflammatoires (3mg/kg). Une dose de 10 mg/kg de morphine est nécessaire pour soulager les douleurs dites évoquées et jusqu'à 30 mg/kg afin d'obtenir un effet antalgique sur des douleurs spontanées générées par la présence de métastases osseuses (Luger et al. 2002). Nous avons voulu vérifier si, dans notre modèle, la morphine se révélait également inefficace à une dose faible connue pour son effet antalgique dans des modèles de douleurs inflammatoires. Nous avons donc réalisé une injection aiguë de morphine à 3 mg/kg sur un groupe d'animaux ayant reçu une injection intratibiale de cellules PC3. L'évaluation comportementale a été réalisée 28 et 35 jours après l'injection des cellules tumorales respectivement pour le test de SWB et le test de Von frey. La morphine, à la dose utilisée, s'est révélée inefficace, tout au long

de la cinétique (jusqu'à 45 minutes après l'injection de morphine), quel que soit le test. En effet, il n'y a pas de différence entre les deux groupes d'animaux lors du test de von frey qui évalue la douleur évoquée [Figure 31A]. De même, la douleur spontanée évaluée par le test de static weight bearing n'est pas soulagée (pas de retour à une distribution pondérale normale 50%) après l'injection de morphine [Figure 31B].

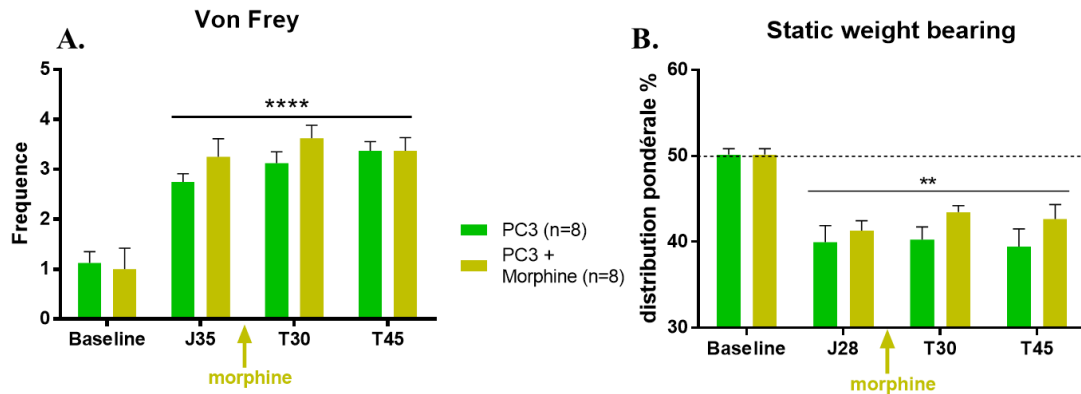


Figure 31: Evaluation de l'effet antalgique de la morphine sur le modèle de douleur osseuse (Exp1)

La morphine (3mg/kg, i.p.) n'a pas démontré d'efficacité 30 et 45 minutes (T30, T45) après son injection sur la sensibilité mécanique (test de Von Frey, 35 jours après l'injection des cellules PC3 chez les animaux, seuls les résultats pour la patte ipsilatérale sont présentés) (A) ni sur la douleur spontanée évaluée par le test de static weight bearing (SWB) 28 jours après l'injection des cellules PC3 (B). Moyenne \pm SEM ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$ vs baseline Anova 2 voies test post hoc de Tukey.

Nous avons par la suite quantifié l'expression du récepteur μ à la morphine dans les DRGs des souris prélevées en fin d'Exp1 (J41) par qPCR. Une diminution significative de l'expression de l'ARNm du récepteur μ est retrouvée dans les DRG L₄ à L₆ (DRG rassemblant les corps cellulaires de la plupart des afférences cutanées de la patte) ipsilatéral et controlatéral [Figure 32]. Ceci avait déjà été montré sur des modèles de douleur osseuse induite par une injection de cellules cancéreuses de sarcome chez la souris ou de seins chez le rat (Yao et al. 2016; C. Zhu et al. 2017).

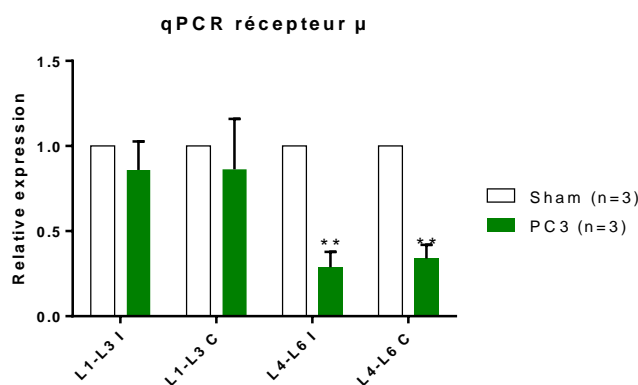


Figure 32 : Expression du récepteur aux opiacés μ dans les DRG de souris porteuses de métastases de CaP (Exp1)

Au 40^{ème} jour suivant l'inoculation intratibiale des cellules de CaP (PC3), la PCR quantitative a révélé une diminution significative des niveaux d'ARNm du récepteur μ dans les ganglions dorsaux de la moelle épinière (DRG par rapport à ceux des animaux sham). Moyenne \pm SEM pool de 2 animaux par conditions. ** $p < 0.01$ vs sham Anova 2 voies Interaction $p < 0.05$ DRG $p < 0.05$ PC3 $p < 0.0001$ test post-hoc de Sidak.

Nous ne retrouvons cependant pas de différences dans les DRG L₁ à L₃ (innervant l'os), alors qu'une sous-expression a déjà été mise en évidence dans la littérature. La plus forte variabilité et le faible nombre d'animaux peut expliquer ce résultat.

1.2. Données immunohistochimiques :

Suite au sacrifice des animaux de l'Exp1, nous avons prélevé les tibias et réalisé un certain nombre de marquages immunohistochimiques afin d'évaluer l'impact de l'injection de cellules de CaP sur l'innervation sensitive du tibia des souris. Pour cela nous avons réalisé des coupes transversales de tibia des souris SCID après décalcification et réalisé un immunomarquage avec un anticorps anti-CGRP qui marque les fibres sensorielles peptidergiques. Chez les souris Sham, les fibres CGRP⁺ présentes dans l'espace médullaire ont une longueur moyenne de 191 μm ($\pm 33 \mu\text{m}$) et on en dénombre en moyenne 11 par coupe. En revanche, une désorganisation des fibres nerveuses peptidergiques apparaît 35 jours après l'injection des cellules PC3. Nous observons une augmentation importante du nombre de fibres que l'on retrouve dans l'espace médullaire mais également au niveau du périoste chez les animaux PC3. Comme décrit précédemment (Juan M. Jimenez-Andrade et al. 2010), les fibres nerveuses sensorielles CGRP⁺ subissent une germination marquée caractérisée par des fibres nerveuses très ramifiées dont la taille moyenne est de 62 μm ($\pm 6 \mu\text{m}$) et par une forte densité de fibres (en moyenne 47 fibres $\pm 4,5$) [**Figure 33**]. Des expérimentations supplémentaires sont en cours afin de quantifier d'autres marqueurs de cette germination tant sur des fibres sensorielles (TrkA, NF200) que sur des fibres sympathiques (GAP43, VACHT, TH) afin d'étudier par la suite l'effet du riluzole sur la mise en place de ce « sprouting » observé dans le modèle de douleur osseuse.

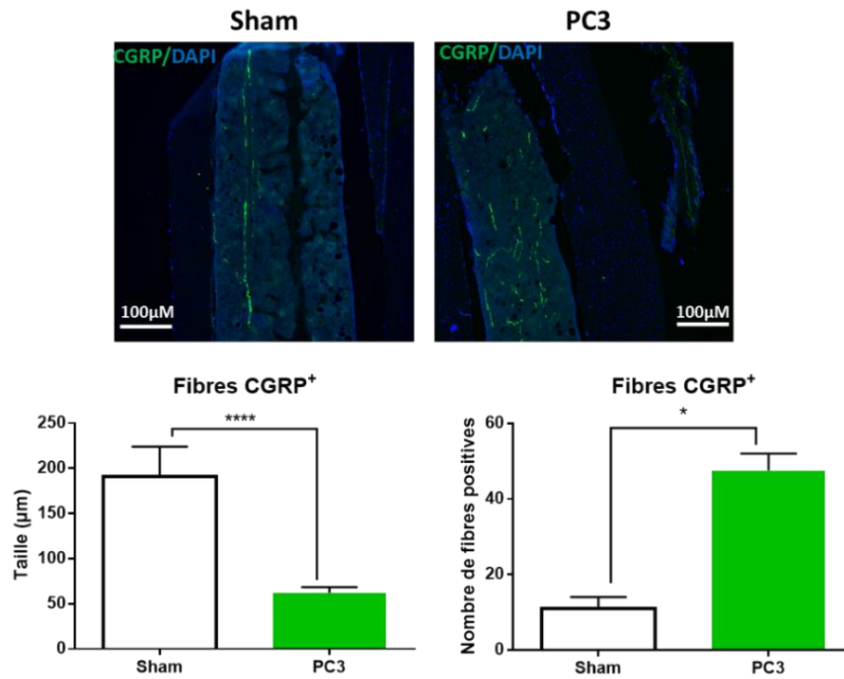


Figure 33: Les cellules cancéreuses de la prostate PC3 provoquent la germination des fibres nerveuses sensorielles (Exp1)

Coupes transversales d'os de tibia (16 μm d'épaisseur) de souris sham et de souris PC3 prélevée en fin d'expérience 40 jours après l'injection des cellules de CaP. Sur ces images, les noyaux colorés par DAPI apparaissent en bleu et les fibres nerveuses sensorielles CGRP+ apparaissent en vert. La longueur des fibres CGRP+ est diminuée chez les souris PC3 : 62 μm en moyenne ± 6 μm contre 191 μm en moyenne ± 33 μm pour les souris sham. Inversement, le nombre de fibre CGRP+ est augmenté chez les souris PC3 47 fibres en moyennes ± 4,5 contre 11 fibres en moyenne ± 3 pour les souris sham. Moyenne ± SEM * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ vs Sham Test de student.

2. Caractérisation de la progression tumorale et du remodelage osseux

Afin de compléter les données phénotypiques obtenues et de les comparer au développement tumoral, nous avons réalisé une seconde expérimentation (notée Exp2 par la suite) d'imagerie sur un petit nombre ($n = 6$) de souris en collaboration avec le laboratoire IMoST (UMR 1240, INSERM, UCA). De plus, ces analyses nous ont permis de vérifier si les injections tibiales étaient correctement réalisées. Afin de quantifier la croissance tumorale, des images de bioluminescence ont été réalisées 2 à 3 fois par semaine sur des animaux recevant une injection intratibiale de cellules PC3-luc (cellules PC3 codant pour le gène de la luciférase). Le remodelage osseux a été visualisé une fois par semaine par imagerie scintigraphique à l'aide d'un radiotracer ostéoarticulaire couramment utilisé en clinique chez l'Homme : l'hydroxyméthylène diphosphonate radiomarqué au Technetium 99 métastable ($^{99m}\text{Tc-HMDP}$).

Ces images scintigraphiques sont couplées à une imagerie par tomодensitométrie (TEMP-TDM) permettant d'imager le squelette de la souris et ainsi vérifier l'injection intratibiale et la lyse osseuse provoquée par les cellules métastatiques de CaP. Le design complet de l'étude est présenté en [Figure 34].

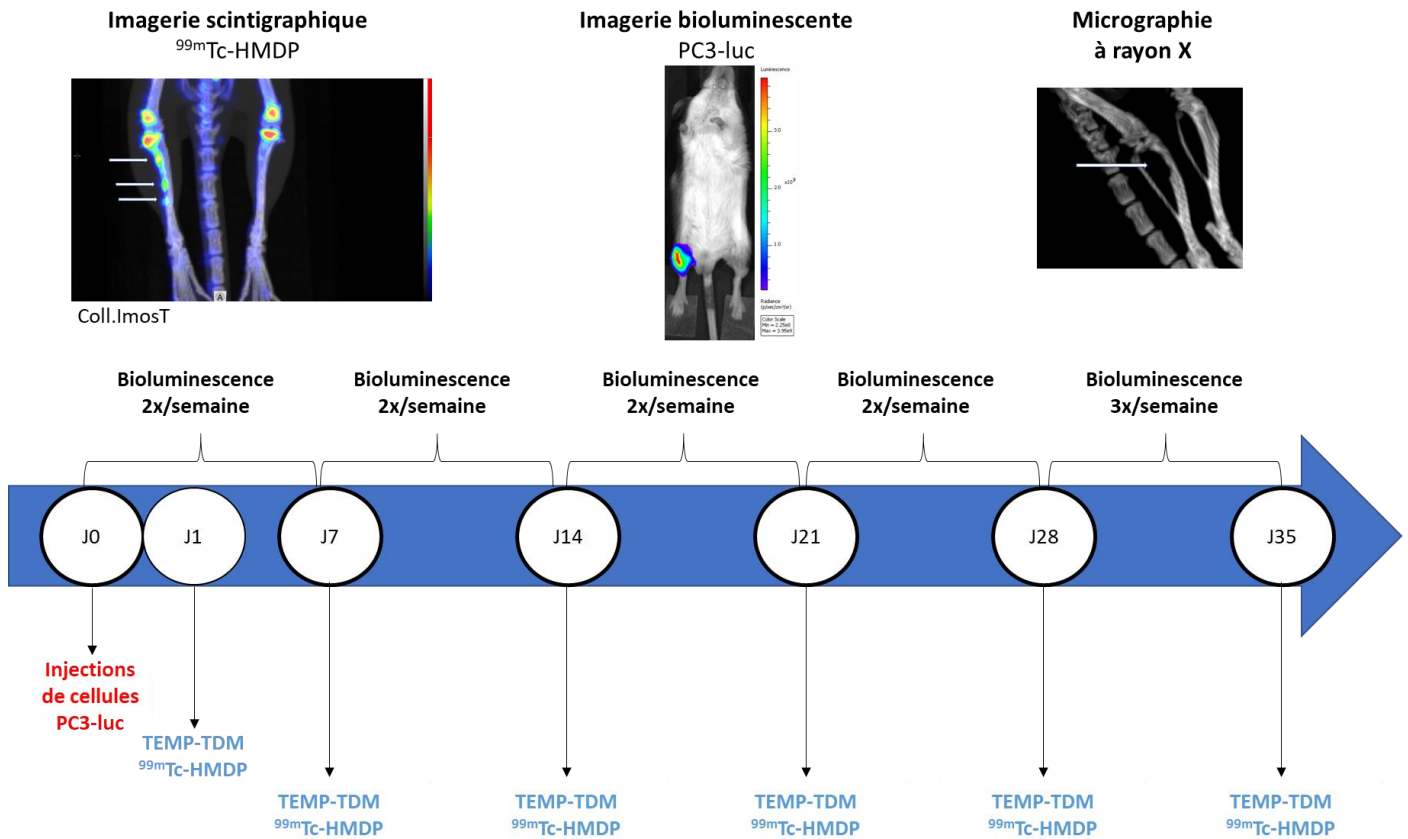


Figure 34 : Design de l'expérimentation de caractérisation de la croissance tumorale et du remodelage osseux in vivo (Exp2)

Design de l'expérience. Des souris SCID ayant reçu une injection intratibiale de cellules humaines de CaP portant le gène codant pour la luciférase (PC3-luc) sont imagées 2 à 3 fois par semaine par bioluminescence afin de suivre l'évolution de la croissance tumorale. Des images radioactives au technétium 99m (^{99m}Tc) couplées à de l'imagerie par tomодensitométrie (TEMP-TDM) sont prises une fois par semaine afin d'évaluer le remodelage osseux.

La bioluminescence effectuée 1 jour après l'injection des cellules PC3-luc a permis de valider l'injection intratibiale chez tous les animaux de l'étude (n=6). La croissance tumorale révélée par bioluminescence est significativement augmentée dans la patte ipsilatérale par rapport à la patte controlatérale 35 jours après l'injection des cellules PC3-luc [Figure 35A]. De la même manière, le remodelage osseux est significativement plus important 35 jours après l'injection des cellules de CaP par rapport à la mesure effectuée le lendemain de l'injection [Figure 35B].

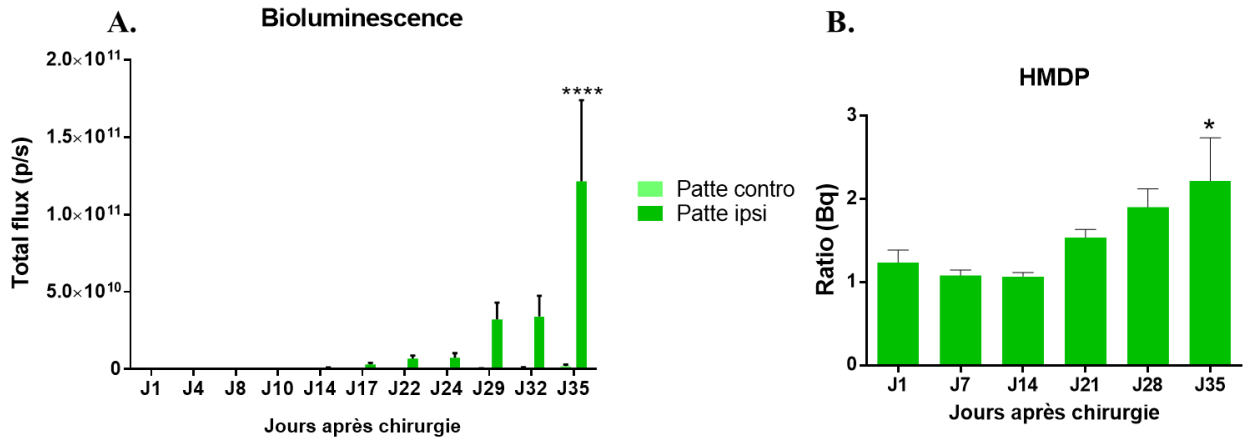


Figure 35 : Progression tumorale et remodelage osseux évalués dans le modèle de douleur osseuse après injection de cellules de CaP (Exp2)

A. Quantification du flux total en photons par seconde obtenu par imagerie bioluminescente sur les animaux ayant reçu une injection intratibiale unilatérale de cellules PC3-luc. Le remodelage osseux est évalué par scintigraphie par incorporation de ^{99m}Tc et tomодensitométrie une fois par semaine à partir de J14 après l'injection des cellules de CaP (PC3-luc). L'accumulation du radiotracteur au niveau du tibia injecté est ainsi mesurée B. Quantification du signal du radiotracteur exprimé en ratio patte ipsi/patte contro. L'ensemble des expérimentations ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire IMoST. Moyenne \pm SEM **** $p < 0,0001$ vs J1 ANOVA 2 voies Interaction $p < 0,0001$ Temps $p < 0,0001$ PC3 $p < 0,05$ Test post hoc de Sidak (A) * $p < 0,05$ vs J1 Anova une voie Test post-hoc de Dunnett (B).

Les données obtenues lors de ces premières expérimentations (Exp1 et Exp2) semblent indiquer que le modèle mis en place est conforme aux données publiées. L'apparition des douleurs diffère selon le modèle de douleur osseuse induite par le cancer utilisé et l'agressivité des tumeurs inoculées. Certains modèles d'injection de cellules de sarcome voient les douleurs osseuses apparaître 21 jours après l'injection des cellules (Guedon et al. 2016; Majuta et al. 2017). Des modèles d'injections de cellules ACE-1, cellules métastatiques provenant d'un chien atteint de CaP, dans le fémur voient les douleurs osseuses apparaître 10 à 21 jours après inoculations des cellules (Halvorson et al. 2005; Juan Miguel Jimenez-Andrade et al. 2011). De la même manière, dans notre modèle, ces douleurs osseuses surviennent 3 semaines (soit 21 jours) après l'injection des cellules PC3 quelle que soit la douleur évaluée et semblent être corrélées avec l'augmentation du remodelage osseux. Le modèle étant maintenant bien caractérisé, nous avons ensuite testé l'effet du riluzole sur ces douleurs.

3. Effet du riluzole dans la physiopathologie de la douleur du CaP

Une troisième expérience (notée Exp3 par la suite) a été réalisée afin d'évaluer l'effet analgésique du riluzole dans notre modèle de douleur osseuse induite par l'injection intratibiale de cellules PC3. Les souris ont été traitées ou non avec le riluzole à 60 µg/ml administré dans l'eau de boisson à partir du 7^{ème} jour après l'injection des cellules [Figure 36A]. L'administration en eau de boisson a été choisie afin de minimiser le stress que pourrait induire des gavages répétés ou des injections quotidiennes nécessaires pour une administration chronique. La dose de 60 µg/ml a déjà été utilisée au laboratoire dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induit (Poupon et al. 2018) et précédemment décrite (Gurney et al. 1996) comme correspondant à une administration de 13,2 mg/kg/jour. Cela correspond après correction de la surface corporelle à une dose de 1,07 mg/kg/jour chez l'homme, soit une administration de 85,5 mg/jour pour un homme de 80 kg. La posologie recommandée dans le traitement de la SLA étant de 100 mg/jour (50 mg 2 fois par jour). Les tests comportementaux évaluant la douleur évoquée et spontanée ont été réalisés une fois par semaine durant 5 semaines. L'hyperalgie mécanique est retrouvée 21 jours après l'injection des cellules PC3 dans la patte ipsilatérale et à 28 jours dans la patte controlatérale [Figure 36A-B]. La douleur spontanée est retrouvée à J21 chez les animaux PC3 ne recevant pas le riluzole. Le riluzole a induit un effet analgésique chez les animaux ayant reçu les cellules PC3 quelle que soit la douleur évaluée. L'effet du riluzole sur la douleur spontanée semble toutefois perdu dans la dernière semaine lorsque atteintes osseuses sont trop importantes [Figure 36C].

Résultats

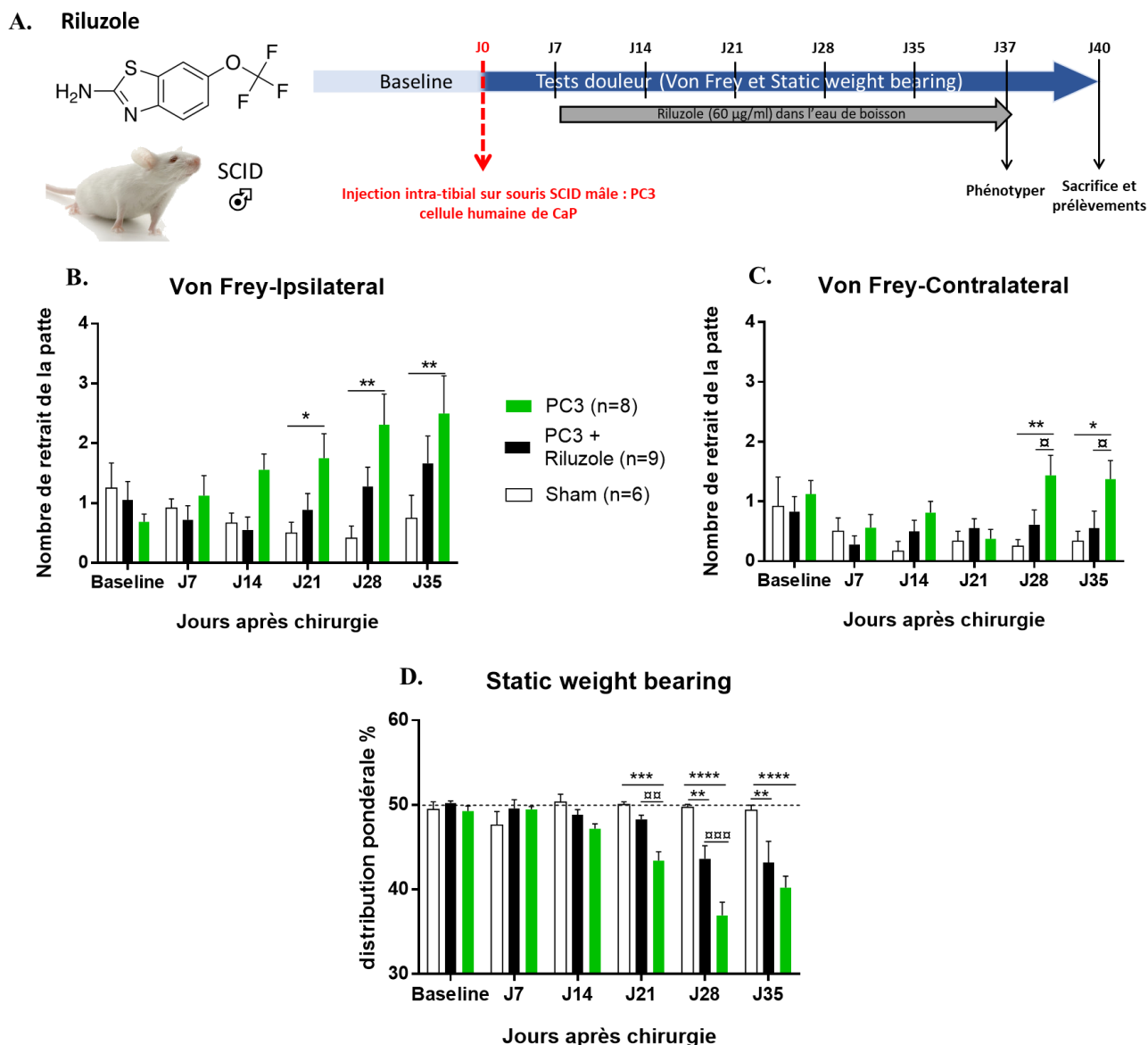


Figure 36: Evaluation de l'effet du riluzole sur la douleur osseuse (Exp3)

A. Design de l'expérience. Des souris SCID ayant reçu une injection intratibiale de cellules humaines de CaP (PC3) ont été soumises au test de Von frey et au test du static weight bearing. Les animaux ont été traité ou non avec du riluzole (60µg/ml dans l'eau de boisson) de J7 à J37. **B.** Le test de Von Frey montre l'apparition d'une hyperalgie mécanique dès J21 pour la patte ipsilatérale chez les animaux PC3 ne recevant pas le riluzole et dès J28 pour la patte controlatérale. Le riluzole prévient l'apparition de cette douleur évoquée **C.** Le test du static weight bearing (SWB) révèle le développement de douleurs spontanées chez les animaux injectés avec les cellules tumorales PC3 dès J21 contrairement aux animaux sham qui ont une distribution pondérale équilibrée (=50%). Le riluzole a un effet antalgique significatif sur ces douleurs spontanées jusqu'à 28 jours après l'injection des cellules tumorales. Moyenne \pm SEM * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$ vs Sham, $\mp p < 0.05$ $\mp\mp p < 0.01$; $\mp\mp\mp p < 0.001$ vs Riluzole Anova 2 voies Interaction $p < 0.05$, Temps $p < 0.05$, Riluzole $p < 0.05$ suivi d'un test post-hoc de Tukey (A) Anova 2 voies Interaction $p < 0.0001$, Temps $p < 0.0001$, Riluzole $p < 0.0001$ suivi d'un test post-hoc de Tukey (B).

Comme lors de l'Exp1, nous avons étudié la « qualité de vie » des animaux avant le sacrifice par vidéotracking et l'effet d'un traitement au riluzole sur les différents paramètres décrits précédemment. Le nombre de cage de phénotyper étant limité à 6 et le temps d'acquisition très chronophage nous avons choisie de réaliser ce test uniquement sur les animaux PC3 traités ou non au riluzole. Nous n'avons donc pas réévalué le comportement des animaux sham pour ce test durant cette expérimentation. Les souris ayant reçu le traitement au riluzole montrent une activité supérieure aux souris PC3. La distance totale parcourue durant les 20h d'analyse est significativement augmentée pour les souris traitées au riluzole [Figure 37A]. L'analyse heure par heure nous permet de voir que les souris traitées avec le riluzole explorent beaucoup plus leur environnement en début de session contrairement aux souris PC3 qui parcourent peu de distance durant les premières heures d'exploration de la cage [Figure 37B]. En revanche, l'analyse ne montre pas de différences significatives entre les deux groupes pour ce qui concerne la capacité des souris à s'alimenter (*feeding*), le temps passé dans la zone refuge (*shelter zone*), la capacité des souris à se lever sur ses pattes arrière contre un support (*rearing supported*) et l'exploration de son environnement par reniflement (*sniffing*) [Figure 38A-D].

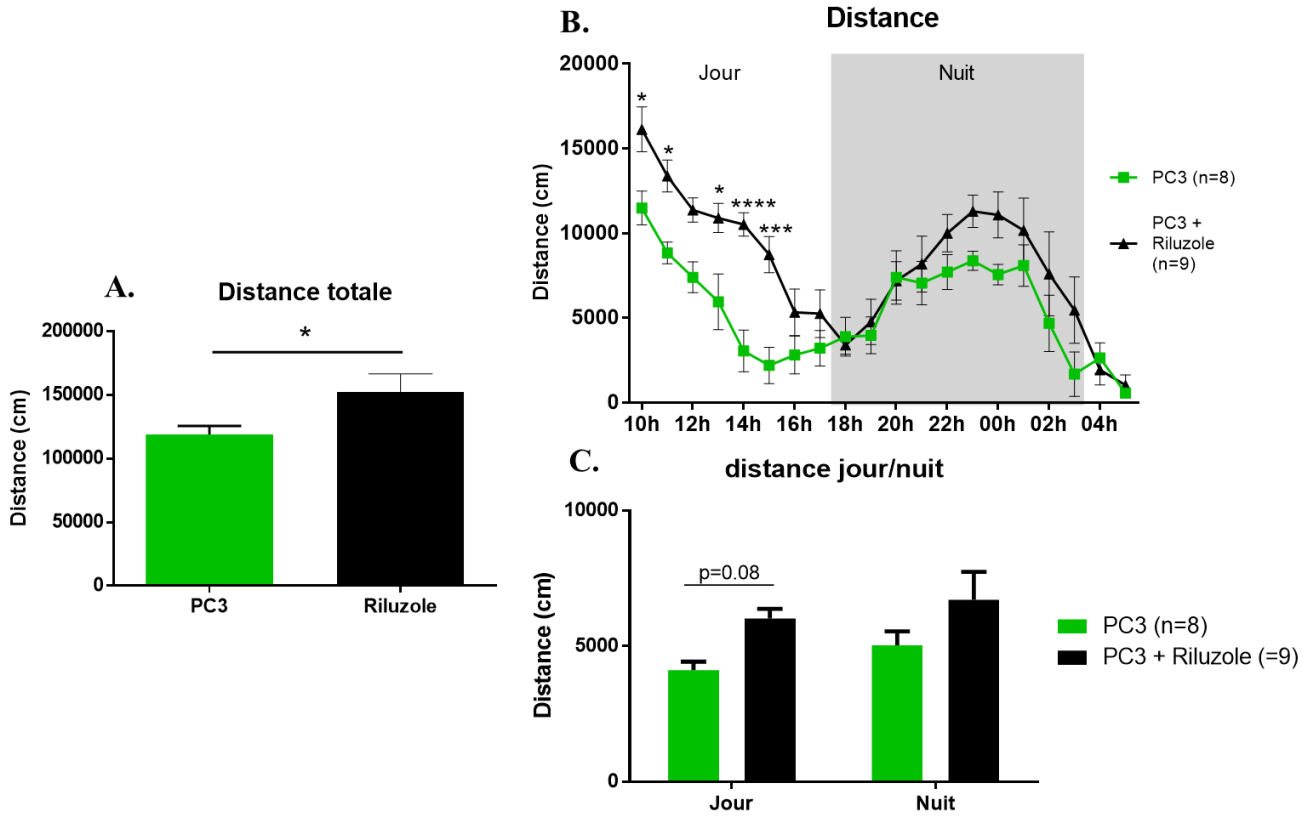


Figure 37: Effet du riluzole sur la distance parcourue par les animaux porteur de tumeur évalué par videotracking (Exp3)

A. Distance totale parcourue ou B. heure par heure ou C. de nuit et de jour durant les 20h d'enregistrement. Les comportements ont été évalués avant sacrifice à J37 à l'aide du système d'enregistrement vidéo par MediRacorder puis par analyse grâce à Ethovision XT14 (Noldus) pour chaque souris dans une cage Phénotyper (Noldus). Moyenne \pm SEM n=8-9 animaux par groupes * $p < 0.05$ vs Sham Test de student (A) * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ vs Sham Anova 2 voies Interaction $p = 0.45$ Temps $p < 0.0001$ Riluzole $p < 0.001$ test post-hoc de Sidak (B) $p = 0.08$ vs Sham Anova 2 voies Interaction $p = 0.85$ Temps $p = 0.21$ Riluzole $p < 0.01$ test post-hoc de Sidak (D).

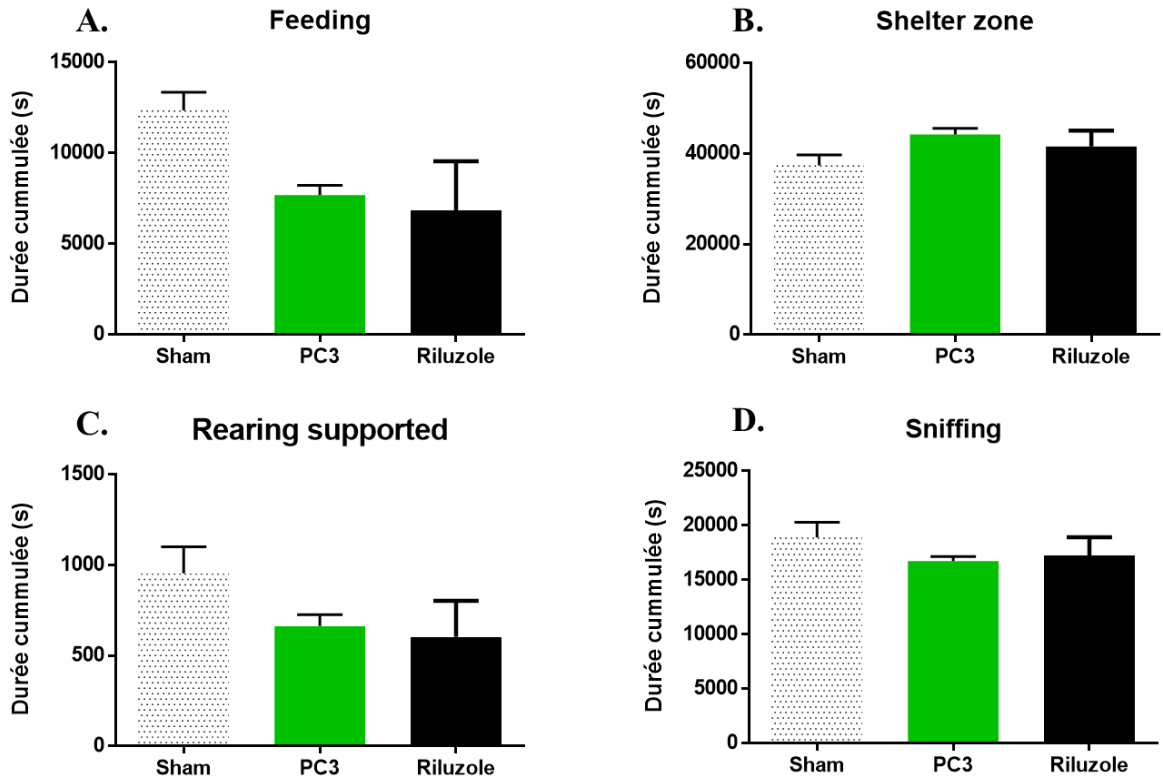


Figure 38 : Effet d'un traitement au riluzole sur le comportement spontané des animaux analysé par videotracking (Exp3)

Temps total passé par l'animal dans la zone d'alimentation (A) dans la zone de refuge (B) à se lever sur ses pattes arrière (C) ou renifler l'environnement (D) durant les 20h d'enregistrement. Les comportements sont filmés avant sacrifice à J37 à l'aide du système d'enregistrement vidéo par MediRacorder puis analysés grâce à Ethovision XT14 (Noldus) pour chaque souris dans une cage Phénotyper (Noldus). Les valeurs obtenues pour les souris sham dans l'expérimentation précédente (Exp1) sont indiquées en pointillé. Moyenne \pm SEM n=8-9 animaux par groupes.

4. Implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole

Des données du laboratoire ayant montré l'implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole sur un modèle de douleur neuropathique (Poupon et al. 2018), nous avons donc recherché si le canal TREK-1 pouvait également être impliqué dans l'effet antalgique du riluzole dans notre modèle de douleur osseuse durant une quatrième expérience (notée Exp4 par la suite). Pour cela, nous avons reproduit l'expérience précédente et avons ajouté 2 groupes d'animaux recevant de la spadine, un bloqueur sélectif du canal TREK-1, seule ou en association avec le riluzole chez des animaux PC3 [Figure 39A]. Tous les animaux, exceptées les souris sham, ont reçu une injection intratibiale de cellules PC3-luc, dans le but de réaliser une évaluation de la croissance tumorale en fin d'expérimentation (initialement prévue à J35) par bioluminescence. Par souci de lisibilité, seuls les traitements sont notés dans les résultats. Les points limites éthique fixés (perte de poids >15% du poids initiale, volume tumorale >5%, état générale dégradé) étant atteint plus précocement pour le groupe d'animaux recevant la spadine seule, nous avons décidé de cesser l'expérimentation une semaine plus tôt (J28) (Thibault-Duprey et al. 2011). Les précédentes expériences mesurant la croissance tumorale n'ayant donné des résultats significatifs que pour J35, la bioluminescence n'a finalement pas été évaluée chez ces animaux. L'hyperalgie observé à J21 chez les animaux PC3 dans les précédentes expériences est retrouvée. Cette hyperalgie est significative chez les animaux qui ont reçu des injections de spadine seule dès J14, sans toutefois qu'il n'y ait de différence avec le groupe PC3. Le riluzole prévient toujours l'apparition de cette douleur évoquée jusqu'à 28 jours après l'injection des cellules [Figure 39B]. De plus, le test de static weight bearing montre l'apparition d'une douleur spontanée toujours 21 jours après l'injection des cellules chez les animaux PC3. Cette douleur est retrouvée à J21 chez les animaux PC3+spadine et les animaux PC3+spadine+riluzole. L'effet antalgique du riluzole sur ces douleurs spontanées est donc perdu lors de l'ajout de la spadine (Groupe PC3+spadine+riluzole) [Figure 39C]. Le canal TREK-1 est donc bien impliqué dans l'effet antalgique du riluzole dans le modèle de douleur osseuse.

Résultats

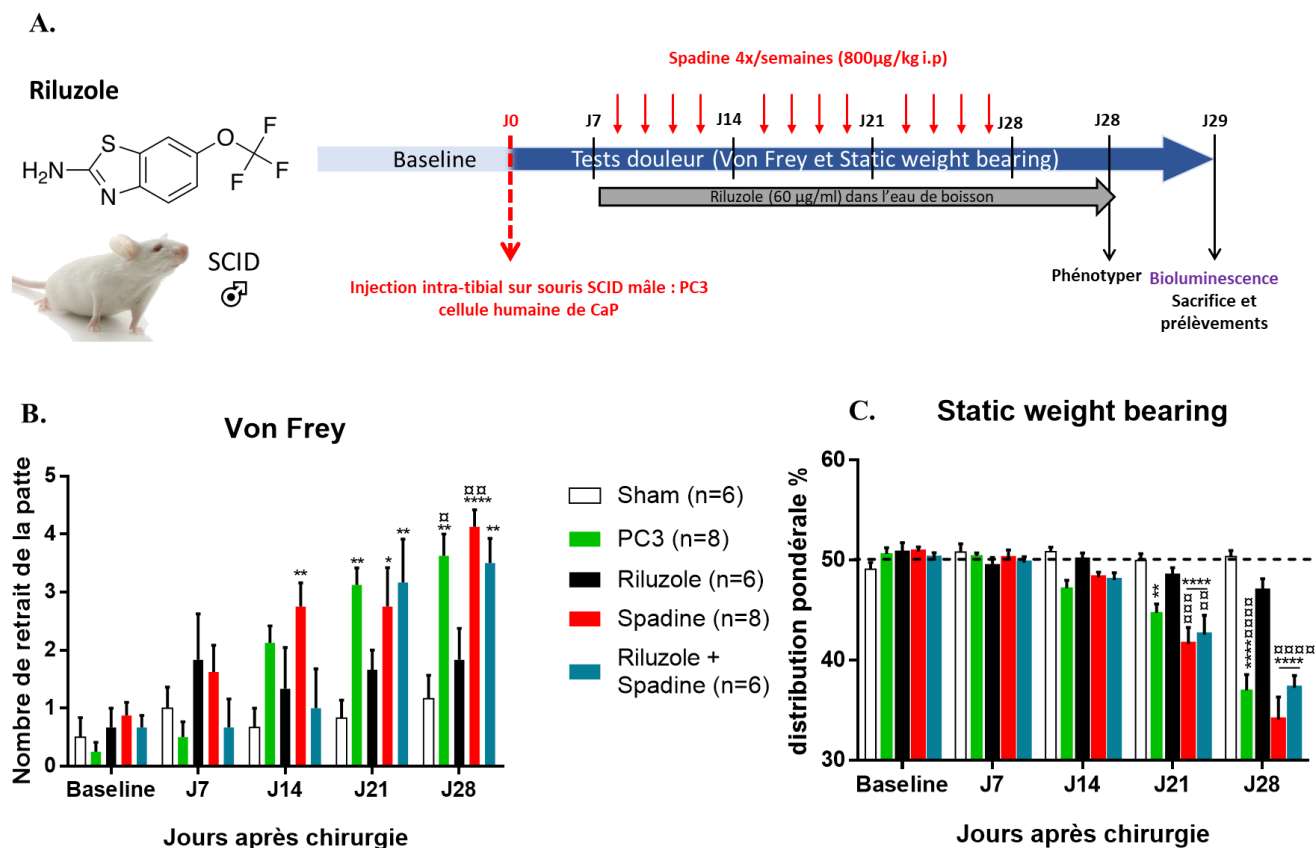


Figure 39: Implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole (Exp4)

A. Design de l'expérience. Des souris SCID ayant reçu une injection intratibiale de cellules humaines de CaP (PC3) ont été soumises au test de Von frey et au test du static weight bearing une fois par semaine. Les animaux ont été traités ou non avec du riluzole (60 µg/ml dans l'eau de boisson) associé ou non à la spadine (800 µg/kg i.p 4 fois par semaines pendant 3 semaines), un bloqueur du canal TREK-1. **B.** Le test de Von Frey (seules les données de la patte ipsilatérale sont présentés) montre l'apparition d'une hyperalgie mécanique significative dès J14 chez les animaux PC3 recevant de la spadine. Cette hyperalgie est significative chez les animaux PC3 et PC3 recevant à la fois du riluzole et de la spadine dès J21. Le riluzole prévient l'apparition de cette douleur évoquée jusqu'à 28 jours après l'injection des cellules PC3 **C.** Le test du static weight bearing (SWB) révèle le développement d'une douleur spontanée chez les animaux injectés avec les cellules tumorale PC3, les animaux PC3 + spadine et les animaux PC3 traité avec l'association riluzole + spadine dès J21 contrairement aux animaux sham et riluzole qui ont une distribution pondérale équilibrées (=50%). Le riluzole a un effet antalgique significatif sur ces douleurs spontanées jusqu'à 28 jours après l'injection des cellules tumorales. Moyenne ± SEM * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ vs Sham ☒ $p < 0,05$ ☒☒ $p < 0,01$ vs Riluzole ANOVA 2 voies Interaction $p < 0.001$ Temps $p < 0.0001$ Traitement $p < 0.001$ Test post hoc de Tukey (B) ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ vs Sham ☒☒ $p < 0,01$ ☒☒☒ $p < 0.001$ ☒☒☒☒ $p < 0.0001$ vs Riluzole ANOVA 2 voies Interaction $p < 0.0001$ Temps $p < 0.0001$ Traitement $p < 0.0001$ Test post hoc de Tukey

Résultats

De la même manière que pour les études précédentes, nous avons évalué l'influence de la modulation du canal TREK-1 sur la « qualité de vie » des animaux par vidéotracking. Il est important de noter que l'arrêt précoce de l'expérimentation nous a obligé à réaliser ce test une semaine plus tôt (J28) par rapport aux expérimentations précédentes. Il n'y a aucune différence entre les groupes quel que soit le traitement reçu par les animaux sur la distance totale parcourue [Figure 40A-C]. De même, aucune différence n'a été retrouvée entre les groupes d'animaux concernant l'analyse des comportements de *feeding*, de *rearing* et *sniffing* (données non montrées). L'absence de différence peut être expliquée par le fait que ce test n'est peut-être pas assez sensible sur ces comportements lorsqu'il est utilisé précocement dans notre modèle. En effet, nous avons observé l'apparition de différences significatives uniquement quand les animaux présentaient des tumeurs importantes voir parfois même des fractures. En accord, dans la littérature, l'équipe du professeur Mantyh a étudié les comportements douloureux chez des animaux atteint d'ostéosarcome avec ce système de vidéotracking, et montré des différences sur le comportement spontané uniquement à des stades très avancés du développement de la tumeur (Majuta et al. 2017).

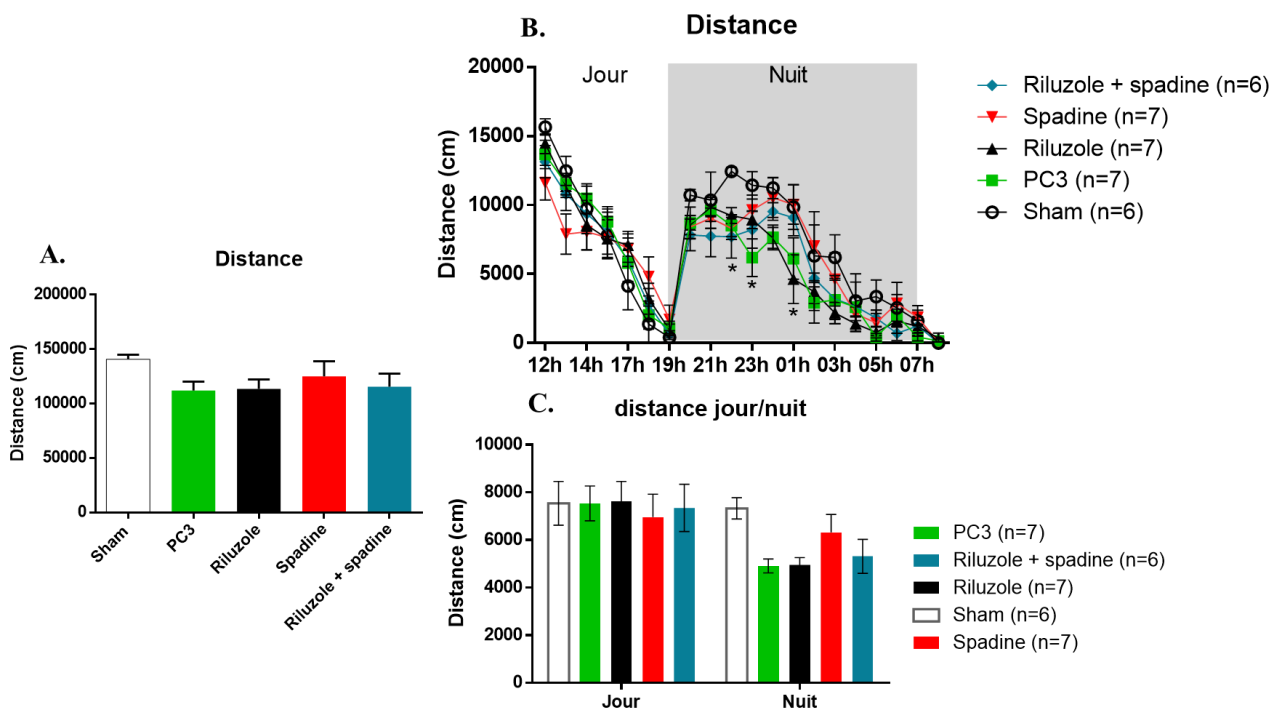


Figure 40 : Implication du canal TREK-1 sur la douleur spontanée influençant les déplacements des animaux porteurs de tumeur évalué par vidéotracking (Exp4)

A. Distance totale parcourue ou B. heure par heure ou C. de nuit et de jour durant les 20h d'enregistrement. Les comportements ont été évalués avant sacrifice à J28 à l'aide du système d'enregistrement vidéo par MediRacorder puis par analyse grâce à Ethovision XT14 (Noldus) pour chaque souris dans une cage Phénotyper (Noldus). Moyenne \pm SEM n=6-7 animaux par groupes. C. * $p < 0.05$ vs Sham Anova 2 voies test post hoc de Sidak.

Mieux comprendre le rôle du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole et donc dans les voies de la douleur osseuse implique d'étudier sa localisation au niveau des fibres sensibles qui innervent les os. Une première expérience avec un marqueur rétrograde, le fluorogold, nous a permis de localiser les neurones qui innervent spécifiquement le tibia. Conformément aux données bibliographiques (Kucharczyk et al. 2020), nous observons un marquage principalement dans les DRG lombaires 1 à 3 chez un animal sain [Figure 41].

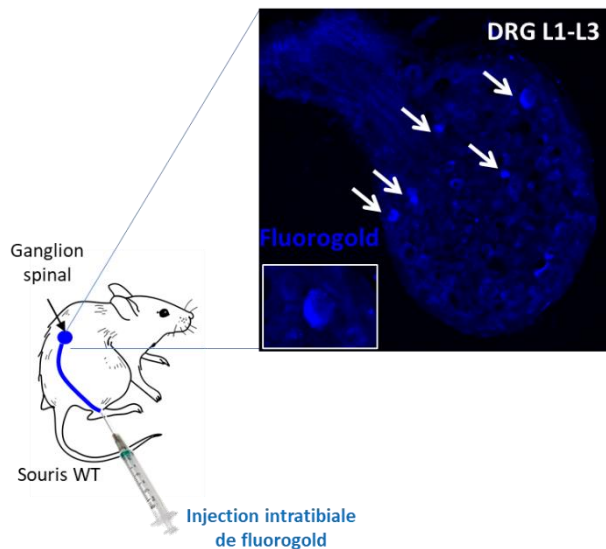


Figure 41 : Identification des neurones de DRG innervant le tibia de souris après injection intra-tibiale du traceur rétrograde Fluorogold.

Identification des fibres innervant le tibia par rétro-marquage à la suite d'une injection de fluorogold chez un animal SCID sain. Le marquage est retrouvé principalement dans les DRG L₁-L₃.

Puis, nous avons recherché la présence du canal TREK-1 dans les neurones périphériques chez un animal sain également. Les anticorps permettant de mettre en évidence le canal TREK-1 étant peu spécifiques, nous avons choisi d'utiliser la technique du RNAscope qui est un nouveau test d'hybridation *in situ* pour la détection d'ARN cible dans les cellules. Ce test utilise des sondes spécifiques (sonde en Z), afin d'amplifier les signaux cibles tout en diminuant le bruit de fond d'une hybridation non spécifique. L'hybridation *in situ* des sondes dirigées contre le canal TREK-1 a mis en évidence une forte présence d'ARNm codant pour ce canal dans les DRG lombaire L₁ à L₃. Une co-expression du canal TREK-1 et de CHRNA3, sous unité alpha 3 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine qui est un marqueur de nocicepteurs silencieux (Prato et al. 2017), est observé dans ces DRG [Figure 42]. Le marquage RNAscope étant punctiforme, des échelles de quantifications seront mises en place afin de définir les neurones positifs de nos cibles dans notre modèle de douleur osseuse (Erben and Buonanno 2019).

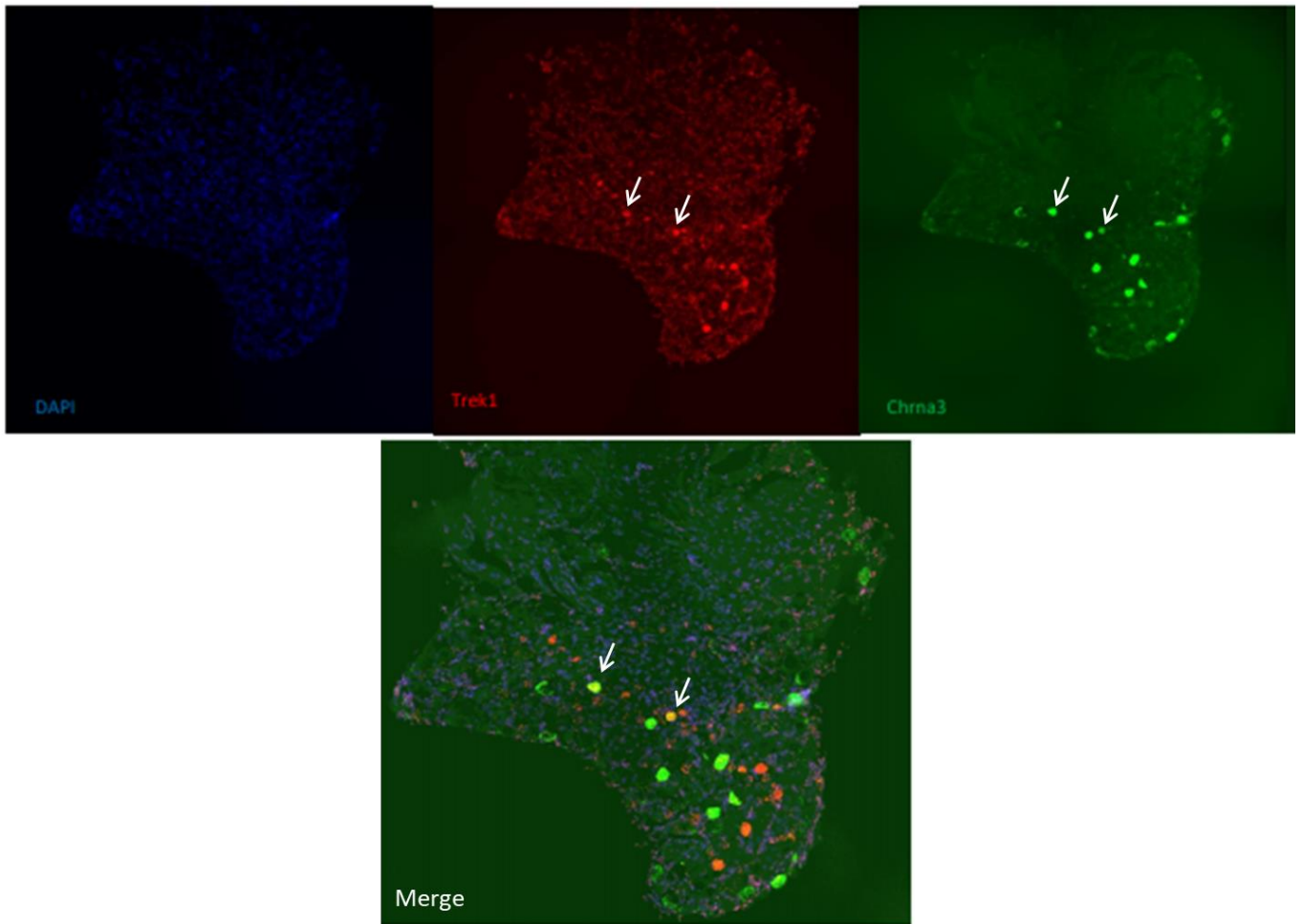


Figure 42: Localisation des neurones innervant spécifiquement le tibia et localisation de TREK-1 par RNAscope chez des animaux sains

Mise en évidence de la présence d'un double marquage d'ARNm du canal TREK-1 (en rouge) dans des neurones exprimant CHRNA3, marqueur de nocicepteur silencieux activés en contexte pathologique (en vert) dans les neurones de ganglion dorsaux lombaire L1 à L3 (marquage des noyaux en bleu-DAPI) innervant le tibia d'un animal sain. Expérimentation réalisée avec l'aide du Dr Youssef Aissouni.

En attendant les échantillons de l'expérimentation *in vivo*, nous avons commencé par quantifier l'expression de transcrite codant pour le canal TREK-1 dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris (cellules ND7/23) traité avec des doses croissantes de riluzole. La quantification par qPCR a révélé une augmentation de l'expression du canal TREK-1 dans les cellules ND7 avec des doses de riluzole de 25 à 50 μ M [Figure 43].

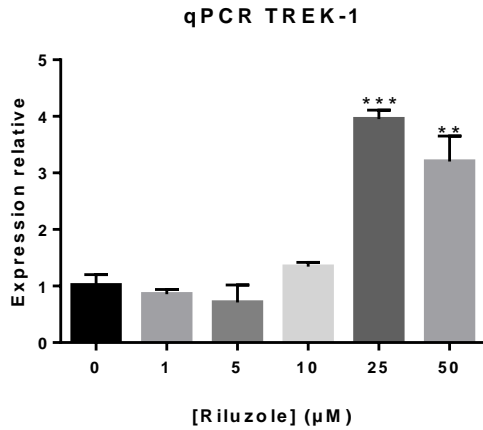


Figure 43: Quantification de l'expression du canal TREK-1 dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris

Quantification des transcrits codant pour le canal TREK-1 après un traitement 48h avec un effet dose de riluzole dans les cellules ND7/23. Moyenne \pm SEM (n=3) Anova 1 voie ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs sans traitement (cellules traitées avec du DMSO).

L'expression du canal TREK-1 a ensuite été quantifiée dans les DRG des animaux du modèle de douleur osseuse induite par les métastases de CaP afin de rechercher si le riluzole influence ou non leur expression *in vivo*. Contrairement au récepteur μ à la morphine, il n'y a pas de différence d'expression du canal TREK-1 dans les DRG chez les animaux PC3-luc. De plus, contrairement aux données obtenues *in vitro*, le riluzole et la spadine n'ont pas modifiés l'expression du canal TREK-1 dans les DRG [Figure 44].

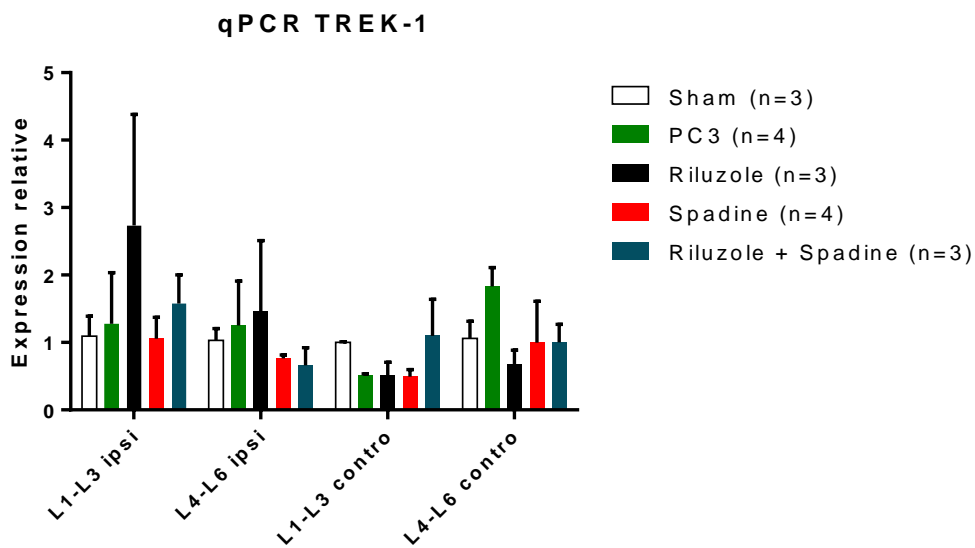


Figure 44 : Quantification de l'expression du canal TREK-1 dans les DRG de souris modèle de douleur osseuse de CaP traitées au riluzole et/ou à la spadine (Exp4)

28 jours après l'inoculation intratibiale des cellules de CaP (PC3-luc), l'expression du canal TREK-1 a été évaluée dans les ganglions dorsaux de la moelle épinière (DRG) chez les animaux traités avec du riluzole et/ou la spadine. Un pool de deux animaux a été fait afin d'obtenir une quantité d'ADNc suffisante. Moyenne \pm SEM Anova 2 voies Interaction $p=0.66$ Traitement $p=0.69$ DRG $p=0.13$ test post-hoc de Tukey.

II. Effet du riluzole vis-à-vis des métastases osseuses du CaP ?

Le riluzole ayant démontré un effet antalgique non seulement vis-à-vis de la douleur provoquée par stimulation mécanique mais aussi et surtout sur un test de douleur spontanée, la question suivante était de rechercher la tolérance de la molécule. Compte tenu du contexte pathologique, nous nous sommes demandé si le riluzole avait un effet bénéfique ou, du moins, non prolifératif sur les cellules de CaP. Pour cela, la viabilité cellulaire a été évaluée *in vitro* sur les cellules de CaP (PC3 et PC3-luc) à la suite d'un traitement au riluzole. L'effet du riluzole a également été évalué *in vivo* dans le modèle d'injection unilatérale intratibiale de cellule PC3-luc par imageries.

1. Caractérisation de l'effet anti-cancéreux du riluzole

1.1. Effet du riluzole sur la viabilité des cellules de CaP

Afin de vérifier l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules PC3 et PC3-luc, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire en utilisant le test de MTT. Le principe du test est basé sur l'évaluation de l'activité mitochondriale des cellules. Celle-ci est corrélée avec la conversion du sel de tétrazolium MTT en cristaux de formazan que l'on peut mesurer par spectrophotométrie. Ainsi, toute diminution ou augmentation du nombre de cellules viables peut être mesurée grâce à cette technique. Lors des premières expérimentations, les traitements ont été mis en contact des cellules 24h, 48h et 72h avant le test de MTT (seuls les résultats pour 48h sont montrés). Les essais ont été réalisés avec des doses croissantes de riluzole (1-100 μ M) seul ou en association avec une dose fixe de docétaxel (15 nM). Comme prévu, le docétaxel a induit une diminution importante de la viabilité cellulaire à faible dose (environ 50%) [**Figure 45B**]. Le riluzole seul a également réduit de manière significative la viabilité des cellules PC3-luc dès 25 μ M [**Figure 45A**]. Les cellules PC3 classique ne codant pas pour le gène de la luciférase semblent moins sensibles au riluzole, néanmoins l'effet antiprolifératif du riluzole est toujours présent dès 50 μ M (données non montrées). L'expérience importante consistait bien sûr à évaluer l'effet combiné du docétaxel et du riluzole sur la viabilité des cellules. Quelle que soit la lignée cellulaire (PC3 ou PC3-luc) le riluzole n'a pas affecté l'effet antiprolifératif du docétaxel. Au contraire, on observe une synergie d'effet antiprolifératif du riluzole dès 25 μ M en présence de docétaxel [**Figure 45B**].

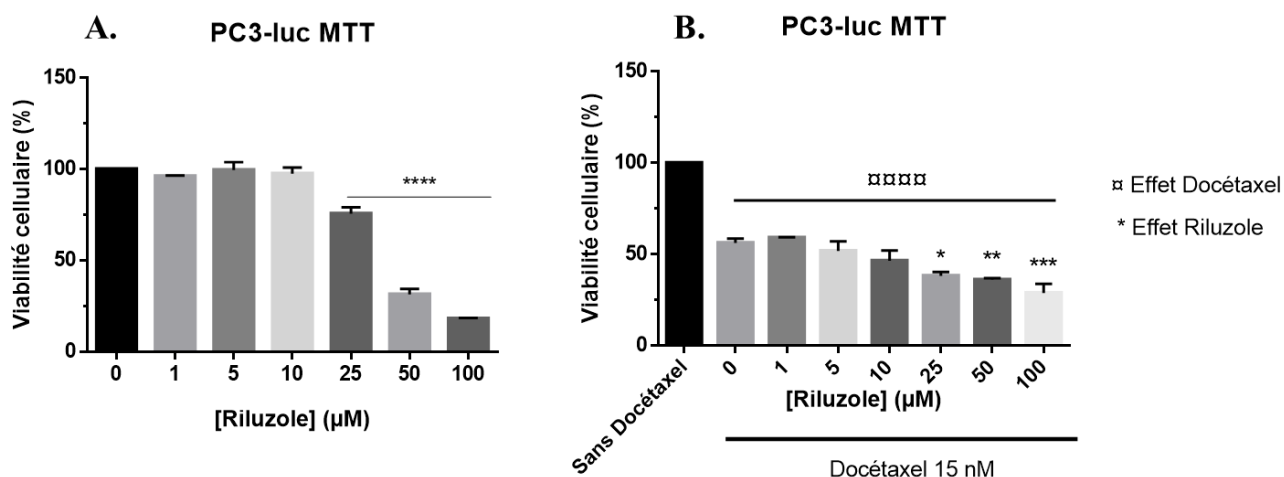


Figure 45: Etude de l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules de CaP PC3-luc

Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules PC3-luc à la suite d'un traitement (48h) de riluzole associé ou non au docétaxel, Le riluzole n'affecte pas l'effet cytotoxique induit par le docétaxel dans cette lignée cellulaire de CaP A. Traitement des cellules PC3-luc avec 6 doses croissantes de riluzole. Le riluzole seul a un effet antiprolifératif sur les cellules PC3-luc. B. Traitement des cellules PC3-luc avec 6 doses croissantes de riluzole associé à un traitement au Docétaxel (15nM). Nous observons un effet antiprolifératif synergique du docétaxel et du riluzole dès 25µM. Les résultats d'au moins trois expériences indépendantes sont présentées. Moyenne ± SEM, Anova une voie, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ effet riluzole. □□□□ $p < 0.0001$ effet docétaxel.

Nous avons également étudié l'effet du riluzole sur la migration cellulaire grâce au test de cicatrisation, nous permettant d'évaluer le temps de fermeture d'une plaie réalisée à l'aide d'une pointe de cône sur un tapis cellulaire formé par les cellules PC3-luc. Nous avons ensuite photographié ce tapis cellulaire 0,18,24,42 et 67h après la cicatrice. Le milieu et les traitements ont été renouvelés toutes les 48h. La surface cicatricielle (aire sans cellules) est ensuite calculée grâce au logiciel NIS-element, nous permettant de calculer le pourcentage de fermeture de la blessure pour chaque temps. Le riluzole à 50 µM diminue significativement le temps de fermeture de la cicatrice qui est pratiquement complète au bout des 67h d'analyse alors que la cicatrice est totalement refermée pour les cellules non traitées au bout de 24h seulement [Figure 46].

Résultats

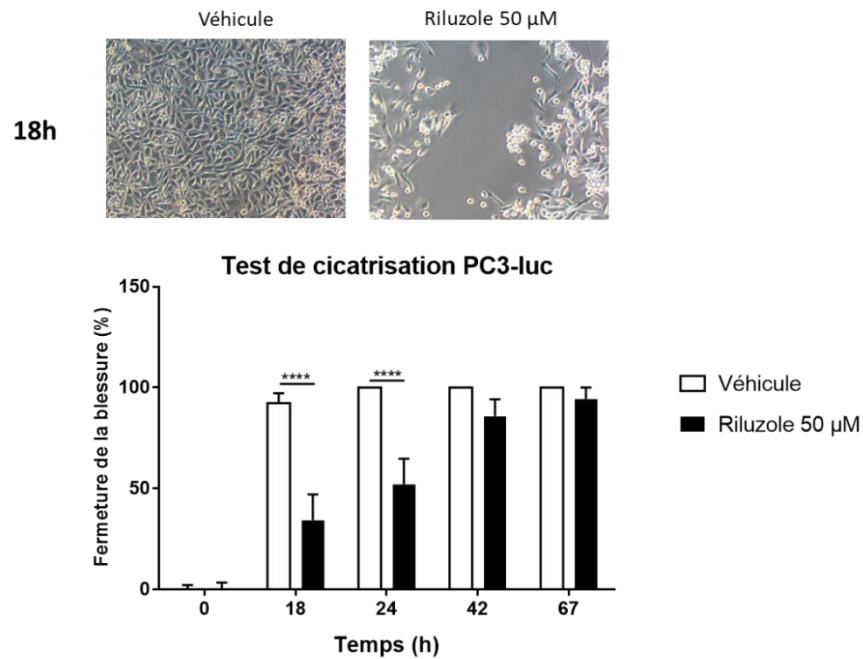


Figure 46 : Effet du riluzole sur la migration des cellules de CaP

Evaluation de la migration des cellules (test de la blessure) PC3-luc pendant un traitement au riluzole à 50µM. Les images ont été enregistrées au temps 0,18,24,42, et 67h après la blessure. Le milieu et les traitements ont été changé toutes les 48h 48h après la blessure. Des images représentatives sont montrées au temps 18h, les zones manquantes non recouvertes de cellules sont les zones de la cicatrice (ImageJ). Valeurs du pourcentage de fermeture de la plaie (%) \pm SEM (n=3) : **** $p < 0.0001$ vs véhicule Anova 2 voies Interaction $p < 0.0001$ Temps $p < 0.0001$ Riluzole $p < 0.01$ test post-hoc de Sidak.

1.2. Effet du riluzole sur la croissance tumorale dans le modèle murin de douleur osseuse

Pour évaluer l'effet du riluzole sur la prolifération tumorale *in vivo*, nous avons utilisé les cellules PC3-luc dans le modèle de douleur osseuse durant une cinquième expérience (notée Exp5) afin de réaliser un suivi par bioluminescence en collaboration avec le laboratoire d'imagerie IMoST (UMR 1240, INSERM, UCA). Les animaux suivis ont été traités ou non avec le riluzole (à 60 µg/ml dans l'eau de boisson) et imagés une fois par semaine pendant 5 semaines [Figure 47A]. Un seul animal du groupe PC3-luc ne présentait pas de signal de bioluminescence 1 jour après injection, il a donc été retiré des analyses. L'imagerie par bioluminescence a révélé une augmentation rapide de la croissance tumorale dans le groupe d'animaux n'ayant reçu que les cellules PC3-luc contrairement aux animaux ayant reçu les cellules et le traitement au riluzole. Les données obtenues montrent que le riluzole diminue significativement la progression tumorale *in vivo* 35 jours après l'injection des cellules [Figure 47B].

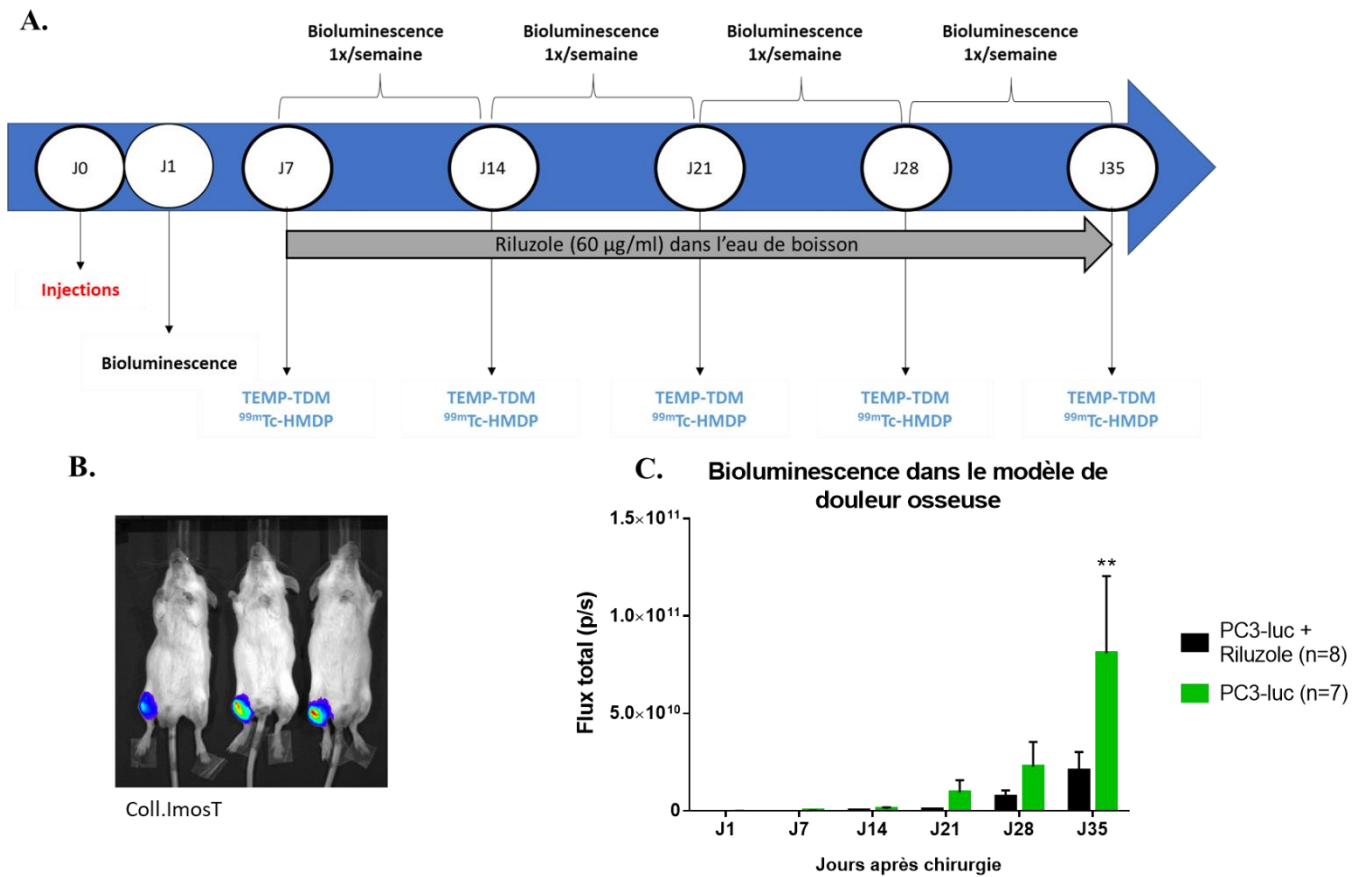


Figure 47: Evaluation de l'effet du riluzole sur la croissance tumorale dans le modèle de douleur osseuse (Exp5)

A. Design de l'expérience. Des souris SCID ayant reçu une injection intratibiale de cellules PC3-luc sont imagés 1 fois par semaine par bioluminescence et par imagerie radioactive au technétium ^{99m}Tc afin de suivre l'évolution de la croissance tumorale et du remodelage osseux. Les animaux sont traités ou non par le riluzole durant cette expérience. **B.** Exemple d'image de bioluminescence obtenu sur des animaux PC3 (non traités au riluzole) 28 jours après l'injection des cellules PC3-luc. **C.** Quantification du flux total en photons par seconde obtenu par imagerie bioluminescente sur les animaux traités ou non avec le riluzole. L'ensemble des expérimentations ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire IMoST. Moyenne \pm SEM ** $p < 0,01$ vs PC3-luc ANOVA 2 voies Interaction $p < 0,05$ Temps $p < 0,0001$ Riluzole $p = 0,15$ Test post hoc de Sidak.

Le rôle du glutamate dans le développement tumoral, agissant comme un facteur de croissance et un médiateur de signalisation est étudié depuis quelques années. En effet, des études ont rapportées que des niveaux tissulaires élevés de glutamate étaient présent chez 12 patients atteints de CaP contrairement à des tissus de patients souffrant d'hyperplasie bénigne de prostate (Taylor et al. 2008). De plus, l'équipe du Dr. Koochekpour a démontré une corrélation positive entre le taux sérique de glutamate et le score de Gleason chez des patients atteints de CaP (Koochekpour et al. 2012). Le glutamate a récemment été la cible de recherches pour son implication dans la carcinogénèse et la propagation de maladie malignes. L'inhibition

de la libération de glutamate extracellulaire ou l'activation de récepteurs du glutamate par des antagonistes compétitifs ou non compétitifs diminue la croissance, la migration, l'invasion et induit l'apoptose dans certains cancers dont le cancer de la prostate. Le riluzole étant une molécule anti glutamatergique, nous avons mesuré son influence sur la libération de glutamate *in vitro*. Pour cela, nous avons recueilli le milieu cellulaire (dépourvu d'indicateur de pH, de SVF et l'apport en glutamate est remplacé par le glutamax afin de n'avoir aucune interaction indésirable avec les réactifs du kit) de chaque puits après un traitement des cellules avec des doses croissantes de riluzole pendant 48h. La concentration en glutamate a été déterminée à l'aide d'un kit AMPLEX™ red glutamic acid en suivant les recommandations du fournisseur. Le principe du test repose sur l'oxydation de l'acide L-glutamique par la glutamate oxydase qui va produire de l' α -cétoglutarate, du NH_3 et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). C'est ce peroxyde d'hydrogène généré qui réagit avec le réactif Amplex®red dans un rapport stoechiométrique de 1 :1 dans une réaction catalysée par la peroxydase de raifort (HRP) pour générer la résorufine qui est hautement fluorescente. La lecture de fluorescence est ensuite réalisée à l'aide du lecteur Flex Station 3. Nous avons ainsi pu montrer que la diminution de ce relargage de glutamate entraînée par un traitement au riluzole était corrélée à la diminution de la viabilité des cellules PC3 [Figure 48].

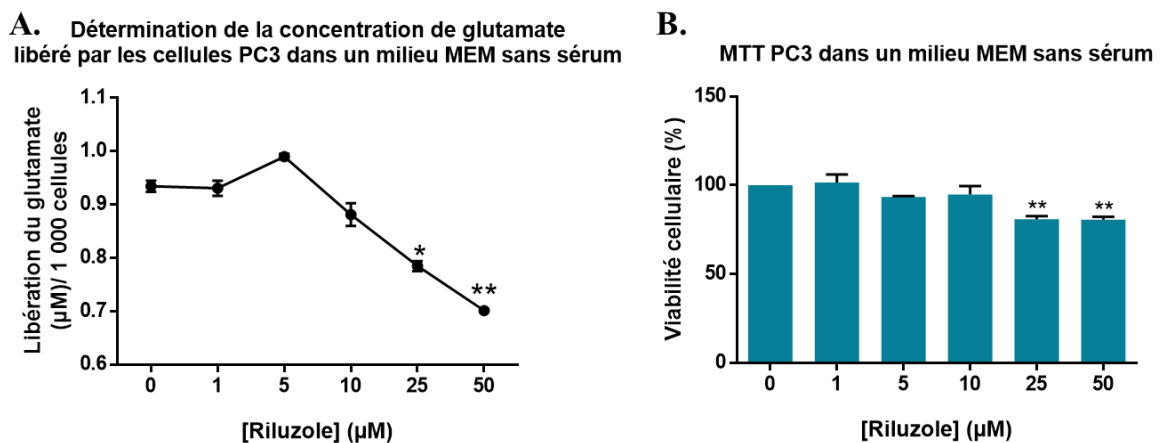


Figure 48 : Effet du riluzole sur la libération de glutamate par les cellules PC3 dans leur milieu

Le glutamate a été dosé à l'aide du kit AMPLEX™ red glutamic acid (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont chargées en plaques 96 puits opaque à fond clair dans un milieu MEM essentiel dépourvu de sérum, d'indicateur de pH et de glutamate (car ils interagissent avec les réactifs du kit). A. Le riluzole diminue significativement la libération de glutamate dans le milieu cellulaire. B. L'effet antiprolifératif du riluzole est retrouvé dans ce milieu. Moyenne \pm SEM * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs 0 (= sans traitement) ANOVA une voie test post hoc de Dunnett.

Des études préliminaires sur le dosage sérique du glutamate et d'exsudat de tibia d'échantillons récupéré sur les animaux de modèle de douleur osseuse à la suite de l'Exp5. Malheureusement nous ne possédions pas d'échantillon de souris sham afin de comparer les valeurs obtenues en contexte pathologique face à des valeurs physiologiques. Le dosage de glutamate n'a pas révélé de différence entre les animaux PC3-luc et les animaux traités au riluzole dans le sérum et dans les extrudats de tibia. Néanmoins, une augmentation significative de la concentration de glutamate dans le tibia ipsilatéral des animaux et retrouvé par rapport au tibia controlatéral [Figure 49].

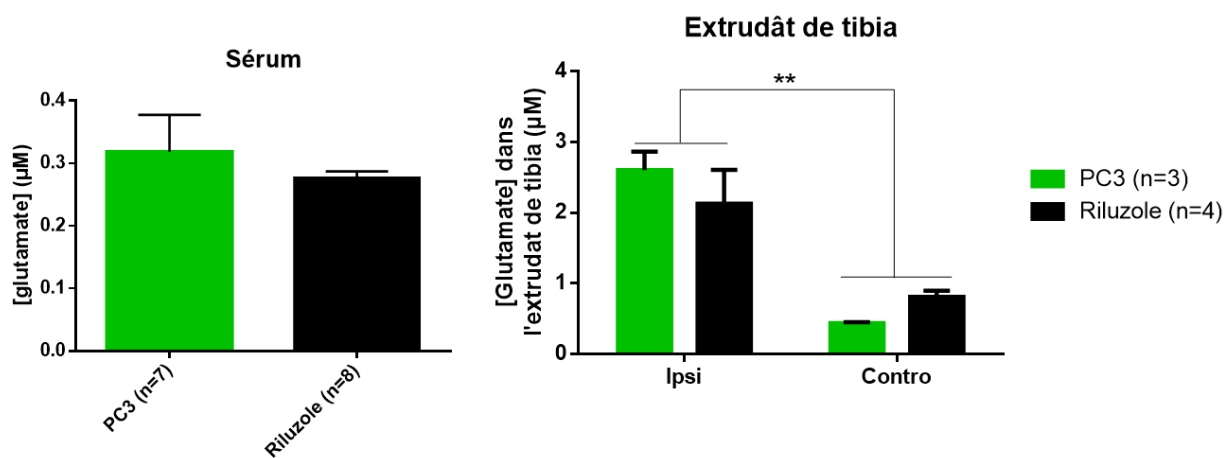


Figure 49 : Effet du riluzole sur la concentration en glutamate dosé dans le sérum et l'exsudat de tibia d'animaux modèle de douleur osseuse de CaP

Le glutamate a été dosé à l'aide du kit AMPLEX™ red glutamic acid (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. Le sérum a été obtenu par prélèvement sanguin par ponction intra-cardiaque sur des animaux ayant reçu une injection intratibiale de cellules PC3-luc (J35). De même, les extrudat de tibia ont été obtenus sur ces animaux par « flush » de moelle osseuse avec une solution de PBS contenant des anti-protéases comme décrit dans l'article de (Slosky et al. 2016). Le dosage des extrudat a été réalisé sur un pool de 2 animaux. Moyenne \pm SEM ** $p < 0,01$ différence patte ipsi vs patte contro. ANOVA 2 voies Interaction $p = 0.20$ Patte $p < 0.001$ Riluzole $p = 0.86$ test post-hoc de Sidak.

2. Evaluation de l'effet du riluzole sur le remodelage osseux

Des études récentes ont montré que le riluzole pouvait avoir un effet néfaste à forte dose (150 et 450 ng/ml, alors que la concentration retrouvé chez les patients SLA traités au riluzole est en moyenne de 54 ng/ml) sur le remodelage osseux via son effet sur les cellules stromales et les ostéoblastes (Schroeder et al. 2016, 2019). Nous avons donc voulu vérifier si la dose de riluzole utilisée dans notre modèle avait un impact sur le remodelage osseux. Pour cela, lors de l'expérimentation évaluant la bioluminescence, nous avons également réalisé, une fois par

semaine à partir de J14, des images par tomoscintigraphie osseuse à l'aide d'une injection au technétium 99m (^{99m}Tc) couplé à des images de tomодensitométrie afin de visualiser les lésions osseuses (TEMP-TDM) [Figure 47A]. Cette scintigraphie osseuse repose sur la fixation dans les structures osseuses de molécules phosphatées marquées au ^{99m}Tc . Le traceur injecté par voie intraveineuse, circule dans le sang puis il est capté par le squelette. Plus le remodelage osseux est intense, plus le signal de ^{99m}Tc sera important. Nous avons également évalué la perte osseuse dans le tibia des souris grâce aux images μCT obtenues par scanner. Les images d'HMDP montrent bien l'accumulation du radiotracer au niveau de la patte injecté des animaux quel que soit le groupe [Figure 50A]. La quantification du signal obtenu montre que le signal augmente significativement au cours du temps (Anova temps $p < 0.0001$) mais qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes (Anova riluzole $p = 0.37$) [Figure 50B]. De même, pour la quantification du pourcentage de perte osseuse, on retrouve un effet temps global de l'anova ($p < 0.0001$) mais il n'y a pas de différence observée entre les deux groupes (Anova riluzole $p = 0.22$) [Figure 50C]. La dose de riluzole utilisée dans notre modèle n'affecte donc pas le remodelage et la perte osseuse.

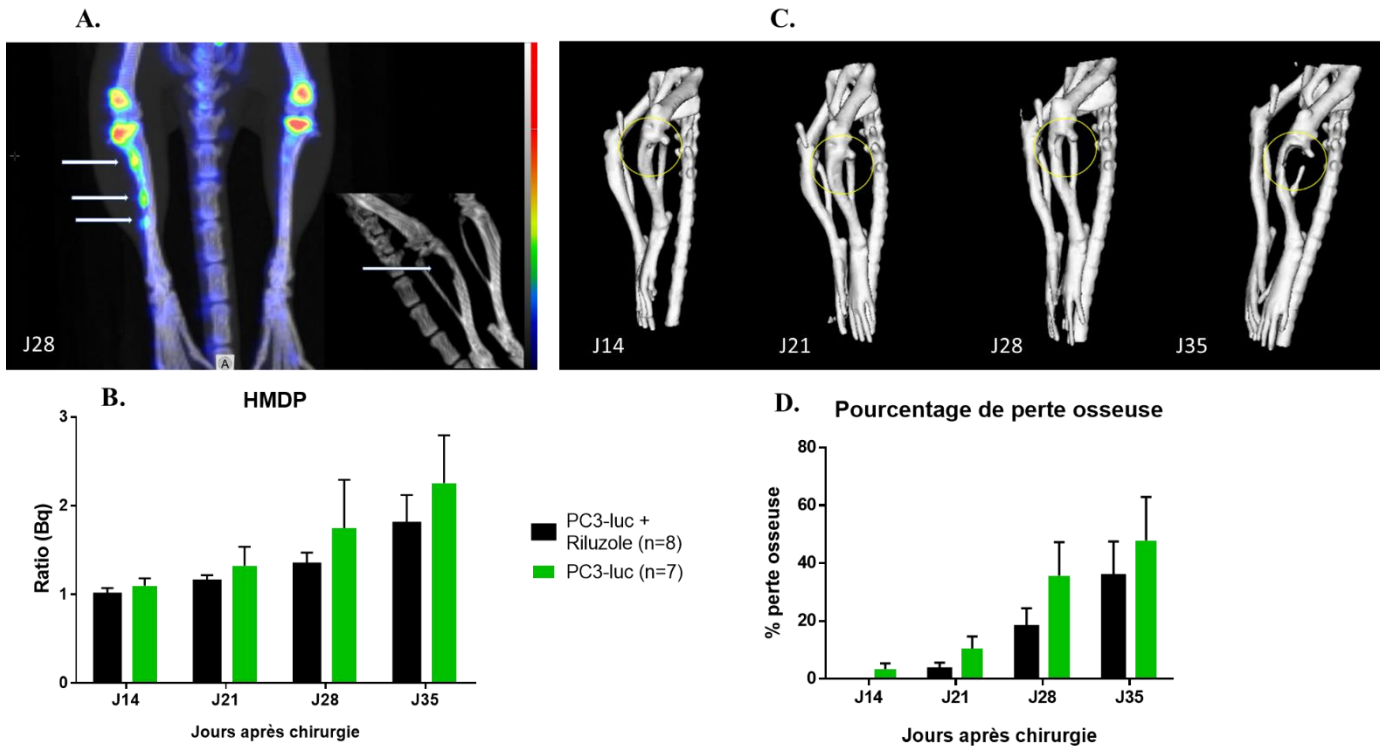


Figure 50: Evaluation de l'effet du riluzole sur le remodelage osseux dans le modèle de douleur osseuse (Exp5)

Le remodelage osseux est évalué par scintigraphie par incorporation de ^{99m}Tc et tomographie par densitométrie une fois par semaine à partir de J14 après l'injection des cellules de CaP (PC3-luc). L'accumulation du radiotracteur au niveau du tibia injecté est ainsi mesurée A. Image obtenue après injection du radiotracteur chez une souris PC3-luc. B. Quantification du signal du radiotracteur exprimé en ratio patte ipsi/patte contra. C. Dégradation osseuse dans le modèle de douleur osseuse obtenue par μCT . D. Quantification de la perte osseuse après l'injection unilatérale de cellules de CaP. L'ensemble des expérimentations a été réalisé en collaboration avec le laboratoire IMoST. Moyenne \pm SEM Anova 2 voies Interaction $p=0.83$ Temps $p<0.001$ Riluzole $p=0.37$ (B) Anova 2 voies Interaction $p=0.79$ Temps $p<0.0001$ Riluzole $p=0.22$ (D).

3. Le canal TREK-1 est-il impliqué dans l'effet anti-prolifératif du riluzole ?

Des données obtenues *in vitro* sur les cellules PC3-luc à la suite d'un traitement pendant 48h à la spidine montrent que le canal TREK-1 est impliqué dans l'effet antiprolifératif du riluzole. En effet, alors que le blocage du canal TREK-1 par la spidine seule n'a aucune influence sur la viabilité cellulaire [Figure 51A], l'effet antiprolifératif du riluzole est réversé de façon dose-dépendante par la spidine [Figure 51B]. Ces données montrent donc que l'activation du canal TREK-1 par le riluzole est nécessaire à l'effet antiprolifératif du riluzole sur ces cellules de CaP.

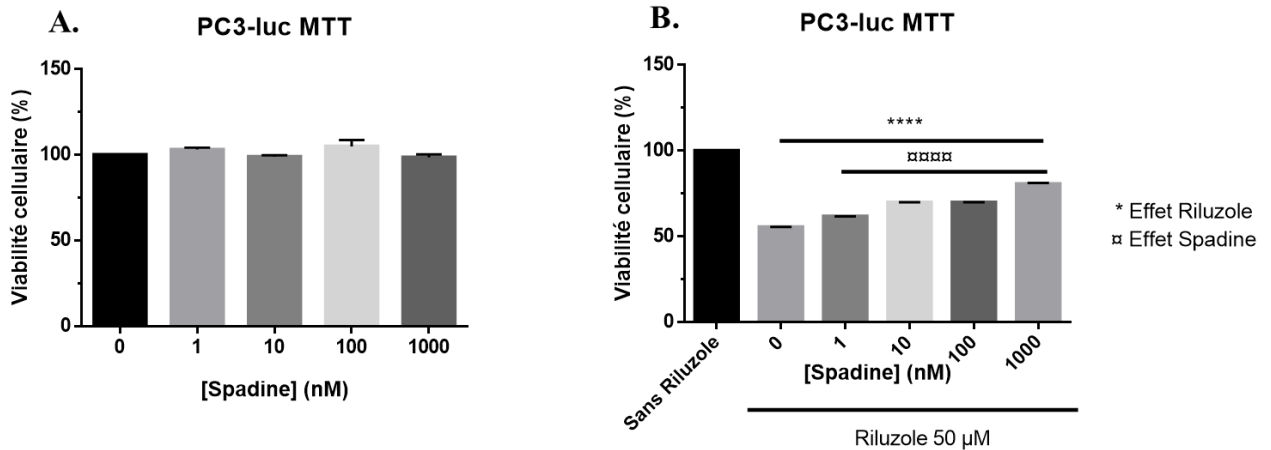


Figure 51: Etude de l'implication du canal TREK-1 sur l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules PC3-luc.

Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules PC3-luc à la suite d'un traitement (48h) de riluzole associé ou non à la spadine. A. Traitement des cellules PC3-luc avec 5 doses croissantes de spadine. La spadine seule n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules. B. Traitement des cellules PC3-luc avec 5 doses croissantes de spadine associé à un traitement fixe de riluzole (50 µM) produisant une diminution de la viabilité cellulaire de 50%. La spadine réverse significativement l'effet antiprolifératif du riluzole, de façon dose-dépendante. Les résultats d'au moins trois expériences indépendantes sont présentés. Moyenne ± SEM, Anova une voie, **** $p < 0.0001$ effet riluzole. □□□□ $p < 0.0001$ effet spadine.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'effet du riluzole sur l'expression du canal TREK-1 dans ces cellules de CaP. Pour cela, nous avons quantifié l'expression des transcrits codant pour le canal TREK-1 par qPCR. Un traitement à une dose de 50µM de riluzole entraîne une augmentation significative du nombre de transcrits codant pour le canal TREK-1 [Figure 52A]. En revanche, la spadine seule n'affecte pas l'expression du canal et elle n'inhibe pas l'effet du riluzole [Figure 52B]. Ces résultats concernant la spadine étaient attendus, car son mécanisme d'action est connu pour bloquer l'activité de 80% des canaux TREK-1 en entraînant leurs internalisations sans en affecter leur expression (Mazella et al. 2010).

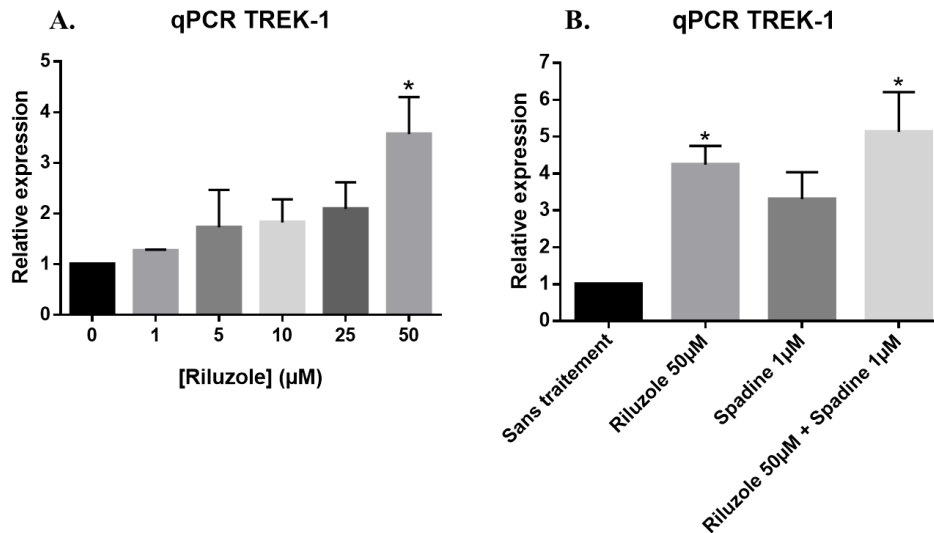


Figure 52 : Effet du riluzole sur l'expression de TREK-1 dans les cellules de CaP (PC3-luc)

Le riluzole à forte dose augmente l'expression des ARNm codant pour le canal TREK-1. La spadine ne modifie pas l'effet du riluzole sur l'expression des transcrits codant pour TREK-1. A. Quantification des transcrits codant pour le canal TREK-1 après un traitement (48h) avec un effet dose de riluzole dans les cellules PC3-luc. B. Quantification de l'expression de TREK-1 après un traitement au riluzole à 50 µM associé ou non à la spadine à 1 µM. Moyenne ± SEM Anova 1 voie * $p < 0.05$ vs sans traitement (cellules traitées avec du DMSO).

Des données de la littérature suggérant un effet prolifératif du canal TREK-1 sur des cellules de CaP (Voloshyna et al. 2008; G. M. Zhang et al. 2015), nous avons cherché à comprendre pourquoi nous obtenons des résultats qui semblent contradictoires sur ces mêmes cellules. Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, nous savons que le canal TREK-1 est fortement impliqué dans le maintien du potentiel de membrane (V_m) au repos des cellules. Avant d'évaluer l'effet du riluzole sur le V_m des cellules PC3, et compte tenu des nombreuses cibles moléculaires décrites pour cette molécule, nous avons cherché à savoir si le riluzole pouvait avoir un impact direct sur les flux de potassium nécessaires au bon développement des cellules tumorales. En effet, selon la littérature, plus les cellules cancéreuses sont dans un état d'hyperpolarisation, moins elles sont capables de se développer (Sauter et al. 2016). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord utilisé un test au thallium qui permet de réaliser un suivi du flux de potassium des cellules. Le principe du test repose sur la capacité de libre circulation des ions thallium à travers les canaux potassiques ouverts, il agit alors comme substitut du K^+ . Lorsque le canal potassique est stimulé, le thallium entre dans la cellule et se lie à la sonde FluxOR™ préalablement mis au contact et internalisé par les cellules, générant un signal fluorescent, proportionnel à l'activité du canal. Le riluzole ayant un effet antiprolifératif sur les cellules, la fluorescence obtenue a été rapporté à la viabilité cellulaire (un

test de MTT est réalisé après lecture de thallium). Le riluzole augmente significativement l'entrée de potassium dans les cellules dès 25 μM [Figure 53A-B].

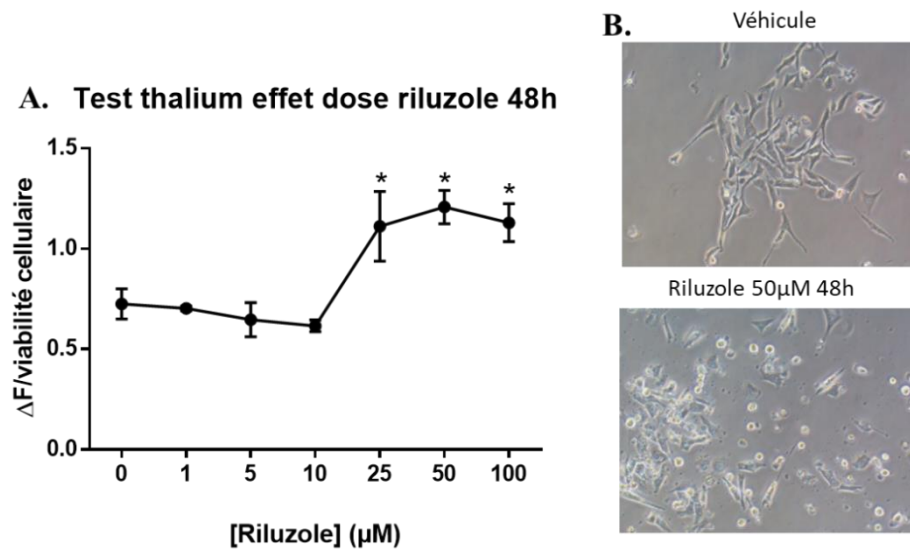


Figure 53: Effet du riluzole sur les courants potassiques impliqués dans le développement des cellules tumorales de CaP.

A. Effet dose du riluzole sur les courants K^+ globaux révélé par flux de thallium. Le riluzole augmente l'entrer de potassium dans les cellules de CaP dès 25 μM produisant une hyperpolarisation des cellules limitant leur développement. B. Photo de la morphologie des cellules PC3-luc après traitement au riluzole à 50 μM pendant 48h.

Des manipulations supplémentaires ont été réalisées afin de déterminer si l'effet du riluzole sur la conductance potassique implique spécifiquement le canal TREK-1. Pour cela, des tests au thallium ont été effectués sur les cellules PC3-luc en présence de bloqueurs pharmacologiques des canaux K^+ . Le tétraéthylammonium (TEA), connu comme bloqueur des canaux K^+ , est utilisé à 20 mM (concentration bloquant les canaux TRESK et TASK-3 sans bloquer le canal TREK-1 pour lequel l' IC_{50} est de 60mM)(Piechotta et al. 2011). La Quinine, bloqueur non sélectif de TREK-1 est utilisée à 50 μM . Le ruthenium red, inhibiteur TASK-3, est utilisé à 2 μM et enfin le médicament antiarythmique Carvédilol, inhibiteur TASK-1, est utilisé à 5 μM comme décrit précédemment (Sauter et al. 2016). Le riluzole seul active significativement les courants K^+ . L'effet activateur du riluzole sur les courants K^+ est significativement plus faible en présence de tous les inhibiteurs. Cependant, tous les inhibiteurs K_2P diminuent significativement les courants K^+ . De fait, il est difficile de conclure sur l'implication de ces différents canaux dans l'effet du riluzole sur la conductance potassique des cellules PC3 [Figure 54A-E].

Résultats

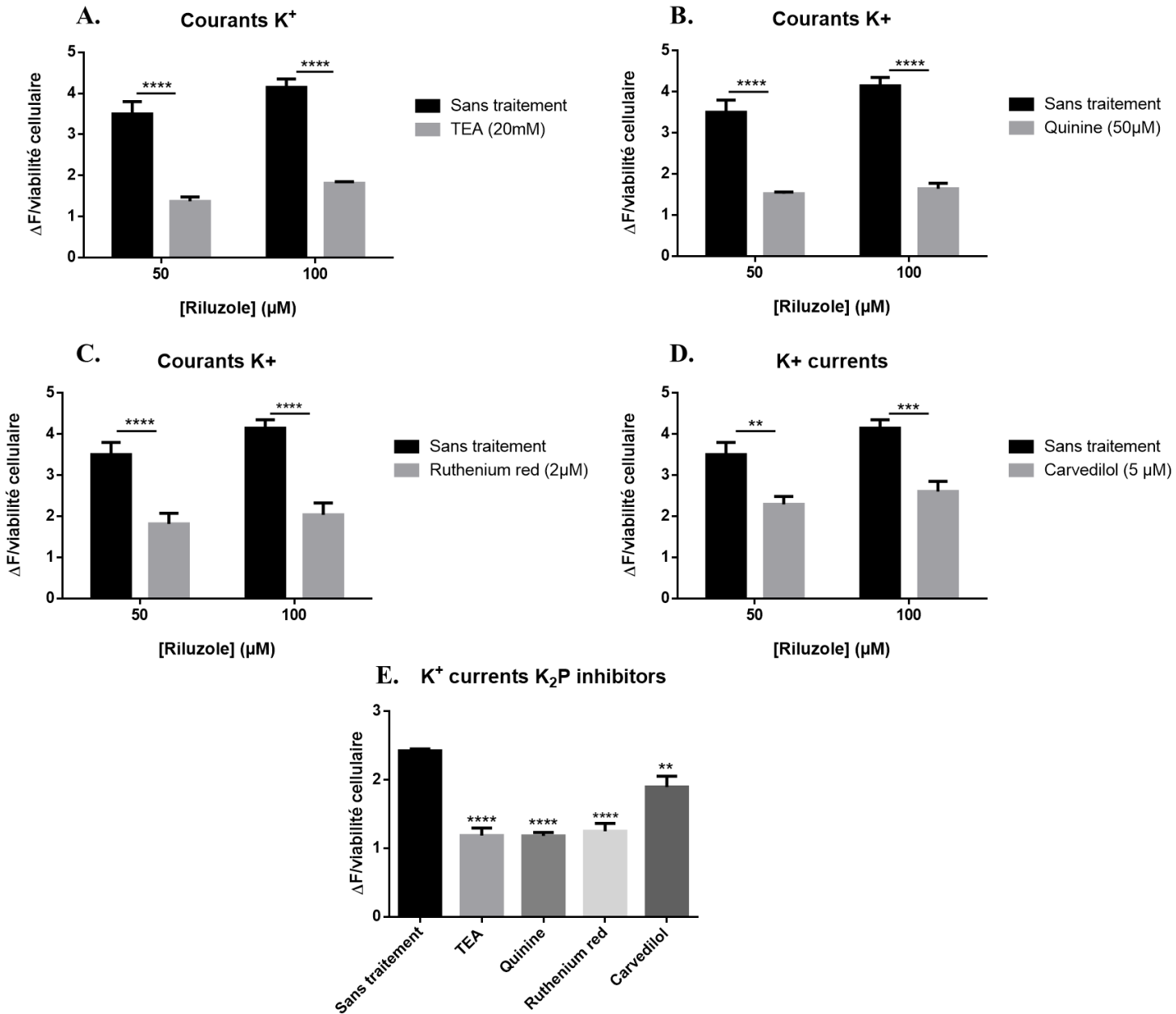


Figure 54 : Effet d'inhibiteur K₂P sur l'activation des courants potassique par le riluzole

Evaluation de l'augmentation des courants K⁺ dans les cellules PC3-luc par un traitement au riluzole modulé par des inhibiteurs de canaux K₂P. Courants K⁺ globaux dans des cellules PC3-luc traitées avec 2 doses de riluzole (50 et 100μM) et A. du TEA (20mM) ou B. de la Quinine (50μM) ou C. du Ruthenium red (2μM) ou D. du Carvédilol (5μM). Moyenne ± SEM (n=3) Anova 2 voies Interaction p=0.6 Riluzole p<0.01 TEA p<0.0001 (A) Interaction p=0.19 Riluzole p=0.06 Quinine p<0.0001 (B) Interaction p=0.043 Riluzole p=0.11 Ruthenium red p<0.0001 (C) Interaction p=0.49 Riluzole p=0.059 Carvédilol p<0.0001 (D). Anova une voie test post-hoc de Dunnett (E).

Résultats

Nous avons également évalué l'effet de ces inhibiteurs de canaux K^+ sur la viabilité des cellules PC3-luc. Comme attendu, la viabilité des cellules PC3-luc est significativement diminuée après un traitement au riluzole. Une inhibition des canaux K_2P par le TEA, le ruthénium red et le Carvédilol diminue aussi significativement la viabilité des cellules PC3-luc. L'effet antiprolifératif du riluzole à 50 μM est perdu après l'ajout de Quinine à 50 μM (inhibiteur TREK-1 et autres canaux) alors qu'il est conservé après l'ajout de TEA (inhibiteur des canaux K^+ sauf TREK-1), de ruthénium red ou de carvédilol [Figure 55A-D].

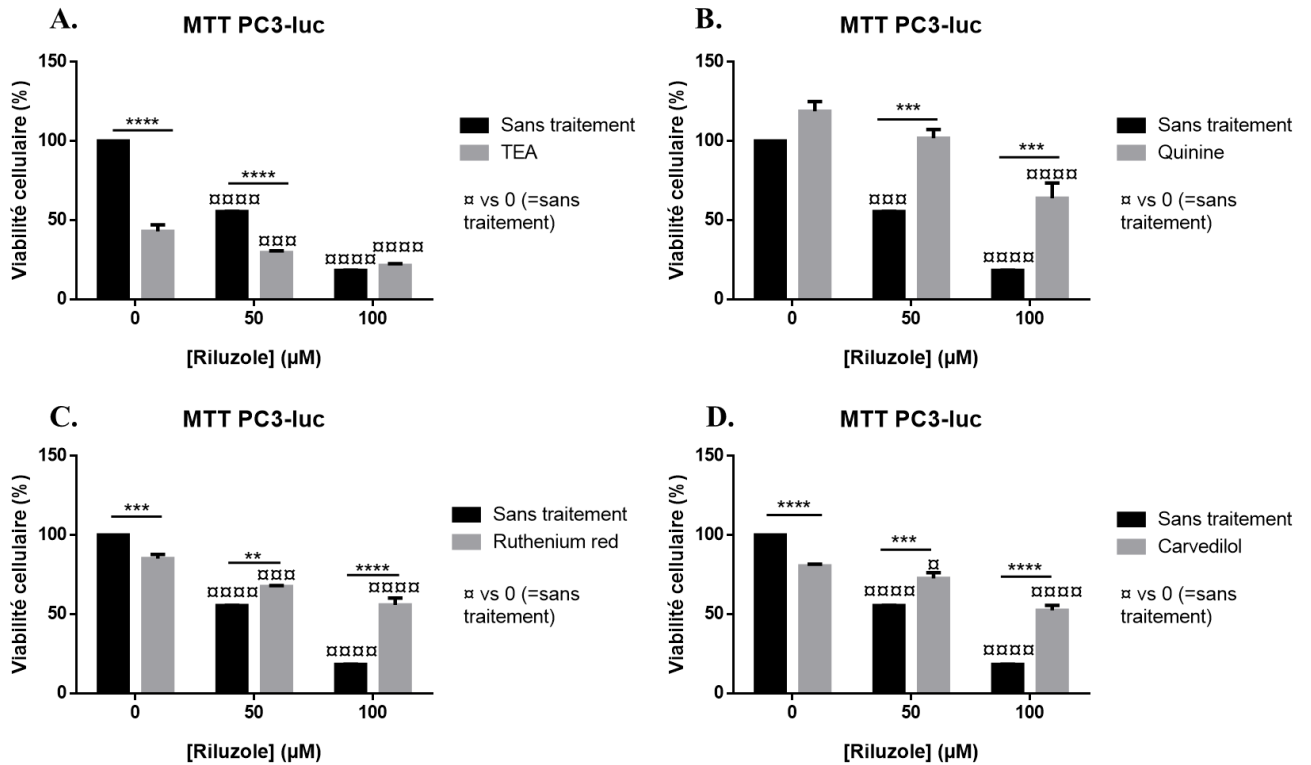


Figure 55 : Effet d'inhibiteur K_2P sur l'effet antiprolifératif du riluzole

Evaluation de l'effet antiprolifératif du riluzole, sur les cellules PC3-luc, modulé par des inhibiteurs de canaux K_2P . Viabilité cellulaire des cellules PC3-luc à la suite d'un traitement au riluzole et A. de TEA (20mM) ou B. de Quinine (50 μM) ou C. de Ruthénium red (2 μM) ou D. de Carvédilol (5 μM). Moyenne \pm SEM (n=3) Anova 2 voies Interaction $p < 0.0001$ Riluzole $p < 0.0001$ TEA $p < 0.0001$ (A) Interaction $p = 0.27$ Riluzole $p < 0.0001$ Quinine $p < 0.001$ (B) Interaction $p < 0.0001$ Riluzole $p < 0.0001$ Ruthénium red $p < 0.0001$ (C) Interaction $p < 0.0001$ Riluzole $p < 0.0001$ Carvédilol $p < 0.0001$ (D).

Ces résultats montrent que des bloqueurs de canaux K^+ (sauf le bloqueur des canaux TREK-1) ont un effet antiprolifératif sur les cellules PC3-luc. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour savoir si à l'inverse, des activateurs de ces canaux peuvent avoir un effet pro-prolifératif sur ces cellules. Cela, renforce l'intérêt du canal TREK-1 qui a été précédemment décrit comme important dans la régulation du potentiel de membrane au repos des cellules.

Afin de rechercher si l'effet du riluzole sur la conductance potassique influençait le potentiel membranaire des cellules PC3-luc, nous avons mesuré le potentiel de membrane au repos des cellules de CaP. Pour cela, le Dr. Mathieu Méleine a réalisé des enregistrements électrophysiologiques en configuration cellule entière (*whole cell patch clamp*) à la suite d'un traitement de 48h avec le riluzole et/ou la spadine. Les traitements ne sont pas présents lors de l'enregistrement nous permettant d'observer uniquement l'effet pharmacologique chronique des molécules. Le potentiel membranaire au repos des cellules est significativement réduit pour les cellules traitées au riluzole [**Figure 56A**]. De même, le traitement au riluzole augmente le courant sortant enregistré. En effet, l'intensité du courant à 0 mV est significativement augmentée après un traitement chronique au riluzole alors qu'elle n'est pas modifiée avec la spadine [**Figure 56B**]. De plus, cette expérience montre qu'il existe une corrélation entre le potentiel de membrane des cellules au repos et le courant sortant (hyperpolarisant). Autrement dit, les cellules qui ont une plus forte augmentation de courant sortant sont les cellules les plus hyperpolarisées (dont le potentiel de membrane est le plus faible) au départ [**Figure 56C**].

Résultats

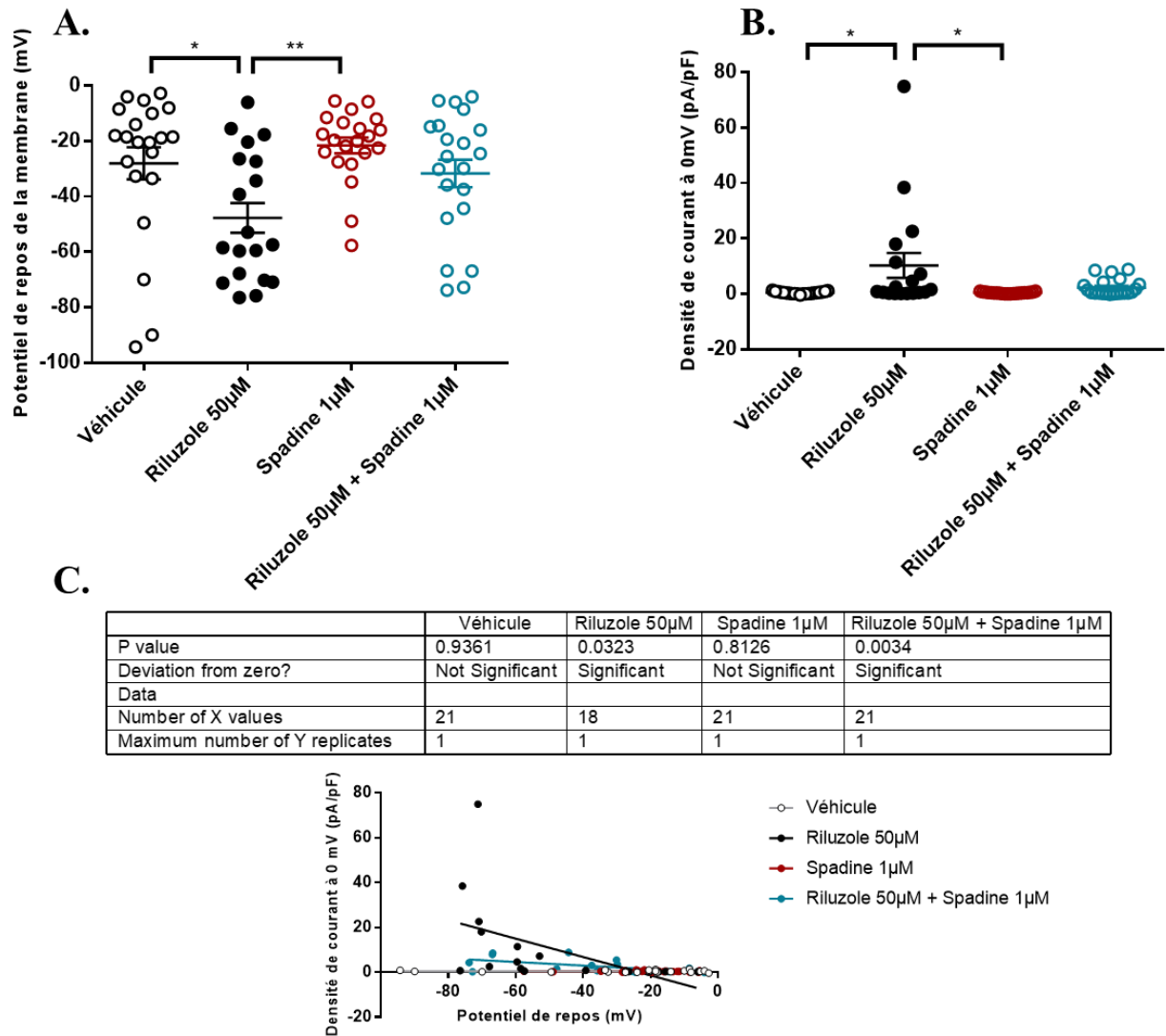


Figure 56: Effet du riluzole sur le potentiel de membrane au repos et la réponse à une stimulation électrique dépolarisante sur des cellules PC3-luc

Enregistrement par patch-clamp en configuration cellule entière (PC3-luc). A. Mesure du potentiel membranaire au repos des cellules. Un traitement chronique au riluzole (48h) diminue significativement le potentiel de membrane au repos des cellules de CaP. B. Mesure de l'intensité du courant à 0 mV à la suite de l'application d'une rampe de tension de -100 à +60 mV sur 400 ms, appliquée toutes les 5s. La densité des courants enregistrés est significativement augmentée pour les cellules traitées au riluzole. C. Corrélation entre l'intensité du courant et le potentiel de membrane au repos des cellules PC3 réalisée pour chaque traitement. Le nombre de cellules enregistrées est donné dans le tableau récapitulatif (C) Anova 1 voie test post hoc de Kruskal-Wallis. (A-B) Régression linéaire avec un intervalle de confiance à 95% (C).

Il a été montré qu'un taux élevé de $[Ca^{2+}]_i$ participe à la prolifération, à la transition épithélio mésenchymateuse, à la migration et à la colonisation osseuse des cellules de CaP (Ardura et al. 2020). Une étude a démontré que le blocage d'un canal potassique (SK3), qui

contrôle l'entrée constitutive de Ca^{2+} et donc la migration des cellules cancéreuses, altère cette capacité migratoire des cellules (Chantôme et al. 2013). Nous avons voulu voir si la diminution de la capacité de prolifération des cellules PC3-luc induite par le riluzole était ou non corrélée à des modifications d'entrée de Ca^{2+} dans ces cellules. Pour cela, nous avons mesuré l'entrée de calcium dans les cellules PC3-luc préalablement mises en plaque et traitées (48h) avec des doses croissantes de riluzole. Les données préliminaires obtenues, suggèrent que le riluzole diminue l'entrée de calcium des cellules PC3 [Figure 57]. D'autres manipulations sont en cours afin de rechercher si la spadine bloque ou non cet effet et donc si le canal TREK-1 est impliqué dans cet effet.

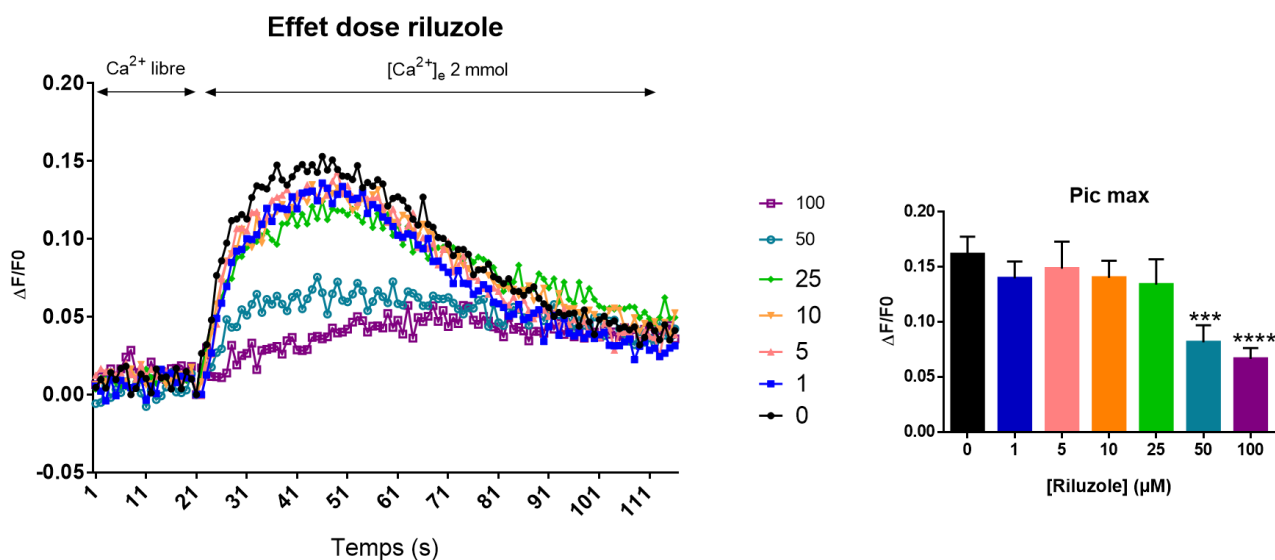


Figure 57 : Effet du riluzole sur le flux calcique des cellules de CaP

Le riluzole à forte dose diminue l'entrée de calcium dans les cellules de CaP à la suite d'une stimulation par augmentation de la concentration de calcium extracellulaire. Le flux de calcium est mesuré grâce au kit FLIPR Calcium 6. Le riluzole a réduit l'entrée constitutive de Ca^{2+} . Mesure de fluorescence rapporté à la fluorescence basale des cellules (à gauche) et pic maximum de fluorescence (à droite) dans les cellules PC3-luc traitées avec des doses croissantes de riluzole pendant 48h. Moyenne \pm SEM (n=3) *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ vs 0 (sans traitement) Anova une voie test post-hoc de Dunnett.

PARTIE C : Discussion

I. Effet antalgique du riluzole chez un modèle animal de douleur osseuse induite par l'injection intratibiale de cellules PC3

La douleur osseuse induite par des métastases de cancer de la prostate, comme pour d'autres cancers ayant un tropisme osseux, se caractérise par le développement de symptômes douloureux, provoqués par des mouvements et spontanés, participant à une altération importante de la qualité de vie des patients. La première question à laquelle nous avons dû répondre consistait à choisir un modèle permettant non seulement de mimer le développement de métastases osseuses de CaP mais également d'évaluer la/les douleur(s) induite(s).

1. Choix et caractérisation du modèle

Différents modèles de douleur osseuse induite par le cancer existent, se différenciant par le type de cellule de CaP utilisé, le type de greffe, l'espèce animale utilisée (rats, souris, chiens), la voie d'injection, la durée du modèle et l'impact des cellules sur le remodelage osseux (ostéoblastique ou ostéolytique), ont préalablement été publiés (Berish et al. 2018; Fradet et al. 2013; Hurwitz et al. 2001; Power et al. 2009; Simmons et al. 2015). Tous ces modèles ont des avantages et des inconvénients, le choix du modèle repose alors sur les objectifs expérimentaux préalablement définis. Pour notre part, nous cherchions un modèle capable de mimer au mieux ces douleurs polymodales que sont les douleurs osseuses retrouvées chez les patients et que ces douleurs soient faciles à évaluer chez l'animal. Au début de ma thèse, les modèles syngéniques décrits dans la littérature étaient peu nombreux et de mise en place difficile. En effet, le modèle transgénique le plus connu et le mieux caractérisé était le modèle d'adénocarcinome de la prostate de souris (TRAMP). Dans ce modèle, les métastases se produisent fréquemment dans les poumons et les ganglions lymphatiques mais très rarement dans l'os, ce qui limite l'étude de la douleur osseuse. Nous avons donc choisi un modèle murin de douleur osseuse induite par l'injection intratibiale de cellules humaines de cancer de la prostate (PC3) chez des animaux immunodéficients (SCID) décrit par l'équipe du Pr. Clézardin (Fradet et al. 2013). Ce modèle permet en effet un développement tumoral localisé avec un pourcentage de prise de 100%, qui mime le stade clinique de plus haut grade existant dans le CaP et permet surtout une évaluation plus aisée des symptômes douloureux induits par des métastases osseuses chez l'animal. Nous avons fait le choix des cellules PC3, connues pour induire des lésions à prédominance ostéolytique alors que les cellules de CaP sont décrites comme ayant une activité mixte chez l'homme. En effet, peu d'études montraient alors l'utilisation de cellules de CaP n'exprimant pas le récepteur aux androgènes et provoquant des lésions mixtes chez un modèle d'injection

intratibiale sur souris SCID. A notre connaissance, un article décrivait l'utilisation de cellules humaines de CaP « homono-indépendantes », les cellules PC3c (cellules dérivées de cellules PC3) sélectionnées par l'équipe du Pr. Clézardin (Fradet et al. 2013) et un autre les cellules IGR-CaP1 sélectionnées par le Pr. Chauchereau (Nakouzi et al. 2012). Cependant, ces cellules n'induisaient des modifications osseuses que 10 semaines après leur injection dans l'os et aucunes données concernant la douleur n'étaient disponibles. Nous avons donc choisi d'utiliser les cellules PC3 beaucoup mieux caractérisées *in vitro* et *in vivo*. Les premières expérimentations réalisées n'ont pas montré de modification du poids et de l'état général des souris. Les points limites n'étant donc pas atteints, éthiquement nous avons pu suivre les animaux jusqu'à 35 jours après l'injection des cellules, ce qui laisse suffisamment de temps pour les analyses pharmacologiques. Dans notre cas, on observe le développement de douleurs évoquées et spontanées 21 jours après l'injection des cellules. Nos résultats suggèrent que ces douleurs surviennent précocement par rapport à l'apparition d'une lyse osseuse importante détectable seulement en fin de maladie à J35 [**Figure 35**] comme cela a déjà été montré dans un modèle d'injection intra-fémoral de cellules canine de CaP (ACE-1)(Thompson et al. 2015). Celle-ci engendre une augmentation du remodelage osseux qui, lui aussi, n'est détectable qu'à J35 dans notre modèle [**Figure 47**]. Au cours de la dernière décennie, il y a eu une augmentation significative de nos connaissances sur les mécanismes qui entraînent la douleur osseuse cancéreuse (P. W. Mantyh 2019). Comme je l'ai décrit en introduction, nous savons que lorsque la tumeur envahit initialement le tissu osseux alors les fibres nerveuses qui innervent normalement ce tissu sont d'abord activées, puis sensibilisées puis endommagées par une multitude de facteurs libérés par les cellules cancéreuses et les cellules stromales, inflammatoires et immunitaires environnantes. L'acidification du microenvironnement tumoral, et la présence de nombreux médiateurs algogènes sont des acteurs sensibilisants des fibres nerveuses périphériques. Nous avons vu que les concentrations en glutamate dans l'exsudat osseux est 6 fois plus important dans la patte lésée des animaux PC3 par rapport à la patte saine en point final [**Figure 49**]. Il serait intéressant d'avoir des informations à des temps intermédiaires afin de corrélérer la symptomatologie douloureuse à des données biochimiques du microenvironnement tumoral afin de mieux comprendre comment les fibres nerveuses périphériques sont sensibilisées. Bien que nos résultats montrent l'apparition d'une germination de fibres sensibles dans notre modèle [**Figure 33**], plusieurs mécanismes restent à explorer. Nous ne savons pas notamment si des mécanismes fondamentaux différents sous-tendent le développement d'une douleur spontanée persistante par rapport à une douleur évoquée et pourquoi il existe une faible corrélation entre la charge tumorale et la gravité des douleurs

observées. Nous nous demandons aussi s'il existe une implication fonctionnelle des fibres sympathiques et parasympathiques innervant l'os dans le développement des douleurs osseuses. Effectivement l'implication du système nerveux autonome dans le développement et la croissance tumorale est maintenant bien établi (Magnon 2015; Mauffrey et al. 2019). En revanche les données concernant l'implication de ces fibres dans les douleurs osseuses sont peu nombreuses. Le test de douleur évoquée ayant révélé l'apparition d'une hypersensibilité de la patte controlatérale dès J28 laisse à supposer qu'une sensibilisation centrale se met en place dans les semaines suivant la sensibilisation périphérique. Bien que nous ne connaissions pas encore les mécanismes exacts qui génèrent une sensibilisation centrale suite à une lésion osseuse (tel que la présence de métastases), nous savons qu'une lésion du squelette est plus susceptible d'induire une sensibilisation centrale par rapport à une lésion cutanée ou musculaire (Woolf and Wall 1986; Yanagisawa et al. 2010). Néanmoins, le micro-environnement tumoral dans l'os, favorisant une sensibilisation des fibres périphériques et un état d'hyperexcitabilité générale des neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière semble être un acteur important de la physiopathologie des douleurs osseuses. Comme nous l'avons décrit lors du second chapitre, il existe des changements neurochimiques uniques dans la corne dorsale suggérant que ces changements dans les neurones et les cellules gliales de la corne dorsale induisent des mécanismes séparés mais qui peuvent se chevaucher avec d'autres états de douleur chronique. Les neurones de la moelle épinière dans les modèles de douleur osseuse induite par le cancer montrent des réponses améliorées aux stimuli évoqués, reflétant une hyperexcitabilité générale des neurones (T. Donovan-Rodriguez, Dickenson, and Urch 2004). De plus, il y a une augmentation du champ réceptif pour les neurones dans la corne dorsale superficielle et une altération du rapport entre les neurones nociceptifs spécifiques et les neurones à large plage dynamique (WDR), caractéristiques de la sensibilisation centrale. Les animaux souffrant de douleurs osseuses induites par le cancer présentent un nombre accru de neurones WDR dans la corne dorsale superficielle, ce qui entraîne une probabilité accrue de réponse aux entrées périphériques à bas seuil. En revanche, les neurones WDR dans la corne dorsale plus profonde présentent des changements moins prononcés, bien que les réponses aux stimuli thermiques et électriques soient considérablement augmentées (Tansy Donovan-Rodriguez, Dickenson, and Urch 2005). Même chez les animaux traités de façon chronique à la morphine, le taux anormalement élevé de cellules WDR persiste, ce qui suggère qu'il reste un accès plus large aux stimuli à bas seuil, ce qui peut être lié au problème du contrôle de l'allodynie et des accès douloureux paroxystiques en clinique. Une réorganisation neurobiologique comme celle-ci semble propre à la douleur osseuse induite par le cancer et

n'est pas observée dans les modèles inflammatoires ou neuropathiques (Urch et al. 2005). De plus, des études précliniques sur les relais supra-spinaux de ces douleurs osseuses ont suggéré une implication des monoamines sur les contrôles descendants. Le blocage du récepteur de la sérotonine 5-HT₃ atténue les contrôles excitateurs descendants du cerveau à la moelle épinière et réduit la réponse des cellules WDR de la corne dorsale superficielles sur des stimuli thermiques et mécaniques (T. Donovan-Rodriguez, Dickenson, and Urch 2004). Ces modifications suggèrent que les changements centraux sont importants dans les modèles de douleur osseuse induite par le cancer et, bien sûr, ils peuvent être en partie dus à des changements limbiques, eux-mêmes sous-jacents aux comorbidités courantes chez les patients, telles que la peur, les problèmes de sommeil et la dépression. La quantification de l'expression par immunomarquage de c-Fos (marqueur de la sensibilisation neuronale), de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (marqueur de l'activation astrocytaire) et de la molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 (Iba1) (marqueur de l'activation microgliale) dans les cornes dorsales de la moelle épinière ipsilatérales sont envisagés afin de vérifier si cette augmentation d'hypersensibilité dans la patte controlatérale est bien dû à une sensibilisation centrale.

Sur le plan clinique, les opioïdes restent le seul traitement pharmacologique ayant une efficacité, toutefois limitée, contre les douleurs intenses résultant d'une tumeur maligne osseuse. Les opioïdes sont connus pour avoir un mécanisme d'action préférentiellement central. Dans notre modèle, quel que soit le test utilisé et en accord avec les données de la bibliographie (Luger et al. 2002), nous n'observons aucun effet antalgique de la morphine, à la dose utilisée (3mg/kg). Cette inefficacité de la morphine peut être expliquée par une modification de l'expression du récepteur μ aux opioïdes. Nous avons pu mettre en évidence dans notre modèle une diminution significative de l'expression du récepteur μ dans les DRG L₄ à L₆ (qui innervent principalement l'os du tibia). En effet des données publiées ont rapporté que la morphine perdait son efficacité en fin de maladie. Des doses importantes (variant de 15mg/ à 40mg/kg) sont nécessaires afin de soulager significativement les douleurs spontanées des animaux modèle de douleur osseuse induite par le cancer (Luger et al. 2002; El Mouedden and Meert 2007; Vermeirsch et al. 2004) [**Figure 58**].

		MORPHINE EFFICACY					
Pain Type	TEST	SALINE	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	
SARCOMA	Ongoing	Guarding (sec)	7.58	3.96	8.80	2.93	2.82
		Flinching (#)	6.17	5.5	10.38	5.25	7.00
	Touch-Evoked	Limb Use (4-0)	3.0	3.63	2.6	3.71	3.75
		Von Frey (grams)	0.30	0.96	0.45	1.32	1.32
		Palp-induced Guarding (sec)	5.32	6.87	4.51	1.43	2.32
		Palp-induced Flinching (#)	8.57	10.13	9.8	3.57	0.00
CFA	Ongoing	Guarding (sec)	11.44	1.40	1.65		
		Flinching (#)	16.17	4.8	4.6		
	Touch-Evoked	Von Frey (grams)	0.29	0.82	1.92		

p < 0.05

Figure 58 : Tableau résumant les doses efficaces de morphine pour soulager les douleurs osseuses face aux douleurs inflammatoires

Les animaux sarcomes (modèle de douleur osseuse) et les animaux injectés d'adjuvant complet de Freund (CFA) (modèle de douleur inflammatoire) ont présenté des réponses d'ampleur comparable pour les tests de comportement de gardiennage et de von Frey. Cependant, les animaux porteurs de sarcomes ont eu besoin de dose de morphine beaucoup plus importante pour réduire la douleur, ce qui suggère une différence fondamentale dans les mécanismes qui génèrent le cancer des os et la douleur inflammatoire. La case grise indique la significativité à $p < 0,05$, ANOVA à sens unique. Une analyse statistique a été effectuée sur le pourcentage de changement pour les données relatives aux animaux sarcomes sur les valeurs moyennes pour les animaux CFA (Luger et al. 2002).

Les résultats phénotypiques, pharmacologiques et d'imagerie obtenus sur le modèle choisi semblent donc en accord avec les données de la bibliographie. Nous avons donc cherché à évaluer l'effet du riluzole sur la douleur chez ce modèle animal de CaP.

2. Effet antalgique du riluzole

Le riluzole, une molécule anti glutamatergique, possédant une AMM pour le traitement de la SLA a été choisi comme molécule d'intérêt pour le traitement des douleurs osseuses de CaP du fait de ses effets antalgiques sur un bon nombre de modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques comme nous l'avons décrit en introduction. Son administration en eau de boisson à 60 µg/ml chez des animaux -modèles de douleur osseuse induite par le CaP entraîne un soulagement, jusqu'à des stades tardifs, des symptômes douloureux aussi bien évoqués que spontanés. En effet, le riluzole diminue significativement la douleur évoquée dès J21 dans la patte injectée avec les cellules tumorales et dès J28 dans la patte non injectée [Figure 36]. Le glutamate est également le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux, faisant de lui une cible intéressante dans la modulation des mécanismes de la douleur. Bien que les mécanismes de signalisation glutamatergique aient été principalement caractérisés au niveau central, les preuves soutiennent également un rôle modulateur du glutamate et de ses récepteurs

dans la nociception et la sensibilisation périphériques (Seidlitz et al. 2009; Y. F. Zhu et al. 2016). Une étude récente établit un lien clair entre la signalisation du glutamate et des modifications spécifiques de la sensibilisation nerveuse périphérique. En outre, les neurones mécanorécepteurs ont démontré une excitabilité accrue en réponse à une injection intramusculaire de glutamate (16mg/kg) près de la tête fémorale, ce qui correspond à l'emplacement de l'injection de cellules cancéreuses pour induire le modèle de douleur osseuse induite par le cancer. Par conséquent, la signalisation glutamatergique contribue à la douleur cancéreuse et peut être un facteur de sensibilisation périphérique et d'hypersensibilité tactile induite par les douleurs osseuses (Y. F. Zhu et al. 2020). En effet, nous avons effectué une mesure du relargage du glutamate par les cellules PC3 qui est inhibé par le riluzole [Figure 48]. Cependant, les dosages préliminaires *in vivo* sur le sérum et les extrudats de moelle osseuse de tibia issu d'animaux PC3 traités ou non avec du riluzole n'ont pas révélé de différence [Figure 49]. Néanmoins, ces résultats restent à compléter avec un dosage du glutamate en contexte physiologique sur des animaux Sham. Ces données suggèrent donc que le riluzole semble avoir un effet au niveau périphérique mais également central. Comme nous l'avons discuté précédemment, l'apparition d'une douleur dans la patte controlatérale est le signe qu'un mécanisme de sensibilisation central se met en place dans le modèle à la suite de l'injection intratibiale de cellules de CaP. L'enjeu majeur chez ces patients étant le soulagement des douleurs spontanées, nous montrons ici que le riluzole est une molécule capable d'avoir un effet antalgique significatif sur ces douleurs jusqu'à un stade tardif de la maladie. En effet, d'après le test du static weight bearing, l'effet du riluzole est retrouvé dès J21 sur la douleur spontanée et persiste jusqu'à J28. Il est malheureusement perdu à J35 [Figure 36]. De plus, l'étude de la distance parcourue évaluée par videotracking a mis en évidence que les souris traitées au riluzole avaient tendance à parcourir plus de distance que les souris PC3, ce qui est un signe d'un soulagement significatif de la douleurs (principalement provoqué par le mouvement) chez ces animaux [Figure 37]. Cependant, les mesures de comportements par le videotracking n'ont pas révélé de différences 37 jours après l'injection des cellules. Les valeurs des souris PC3 semblent moins altérées que lors de l'Exp1 qui ont été évaluées 40 jours après l'injection des cellules. Cela laisse supposer que les quelques jours de décalage de l'observation de ces paramètres ont une influence sur les résultats. Ces résultats sont aussi en accord avec la plus faible efficacité du riluzole observée sur la douleur spontanée à J35 avec le test de static weight bearing.

L'implication de la germination de fibres sensibles dans la mise en place et la chronicisation des douleurs osseuses est maintenant bien établie et nous l'avons retrouvée dans notre modèle [**Figure 33**]. Nous souhaitons évaluer l'effet du riluzole sur ce phénomène. En effet, pour le moment nous ne savons pas si l'effet antalgique du riluzole est dû à son effet d'inhibition de la sensibilisation des fibres sensibles ou s'il a un effet inhibiteur de cette germination qui induirait à fortiori une diminution de la douleur ressentie ou si c'est un cumul de ces deux effets. Nous avons tout de même remarqué que la croissance tumorale n'est pas corrélée au seuil de douleur des animaux. En effet, ce ne sont pas nécessairement les animaux présentant les tumeurs les plus importantes qui avaient des seuils de douleurs les plus augmentés. Ceci a déjà été mis en évidence précédemment (Mercadante 1997). Ceci est probablement le résultat de différents équilibres entre les mécanismes périphériques et centraux et la capacité des systèmes modulateurs centraux à réduire l'activité périphérique, qui peuvent tous deux varier selon les animaux. Des études d'immunomarquage de fibres osseuses sensibles (TrkA, CGRP et GAP43 impliqué dans la germination et la régénération nerveuse), mais également des marqueurs de fibres sympathiques (TH) et parasympathiques (VaChT) sont en cours sur des coupes de tibia issu des animaux de l'Exp4 afin de rechercher un effet potentiel du riluzole sur cette germination.

Comme nous l'avons dit, l'effet antalgique du riluzole observé chez un modèle de douleur neuropathique chimio-induite par l'oxaliplatine implique l'activité du canal TREK-1. Nous avons donc cherché à savoir si tel était le cas également pour son effet antalgique chez les animaux modèle de douleur osseuse de CaP. Chez ce modèle de CaP, les animaux étant immunodéprimés, nous ne pouvions utiliser des animaux KO pour TREK-1. Nous avons donc décidé d'utiliser la spadine, un bloqueur sélectif du canal TREK-1. Les animaux ont donc reçus des injections 4 fois par semaine à partir de J7 (afin de laisser le temps à la greffe de cellule de CaP de prendre au niveau de l'os) pendant 3 semaines (l'Exp4 étant stoppé une semaine plus tôt) à 800 µg/kg en injection intrapéritonéale (Pietri et al. 2019). Les données obtenues montrent que, quel que soit le test de douleur utilisé, l'effet antalgique du riluzole est bloqué par la spadine, suggérant ainsi l'implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique du riluzole sur les douleurs osseuses induite par des métastases de CaP [**Figure 39 ; Figure 40**]. Pour cette expérience l'évaluation de la « qualité de vie » des animaux par le système de viedotraking, ne montre pas de différences entre le groupe sham et le groupe PC3, et donc à fortiori pas d'effet du riluzole et ou de la spadine. Le test a été réalisé à J28, un temps pour lequel la douleur évoquée et spontanée est pourtant bien installée. Il semble donc que ce test, par ailleurs

chronophage, ne révèle une modification de l'activité locomotrice et des comportements spontanés des animaux que lorsque la tumeur est un stade très avancé, avec des altérations osseuses majeures, pouvant aller jusqu'à des fractures. Ces résultats sont en accord avec les données de la bibliographie qui montrent des différences significatives de l'activité jour/nuit dans un modèle d'ostéosarcome lorsque des lésions osseuses sont présentes. En effet, l'apparition des différences d'activité horizontale (distance parcourue) et verticale (capacité d'exploration par *rearing*) chez les souris étaient corrélées avec l'augmentation significative de la destruction osseuse qui est précoce (J14) dans ce modèle (Majuta et al. 2017). La destruction osseuse n'arrivant que tardivement dans notre modèle (J35), et la perte de l'effet du riluzole en fin de maladie peut expliquer que nous ne retrouvons pas de différence entre les groupes d'animaux évalués par videotracking. D'autres tests ou observations peuvent être utilisés pour évaluer la douleur spontanée chez l'animal. En effet, de plus en plus d'études s'intéressent à cette douleur spontanée. Le test de *guarding* du membre affecté consiste en une observation de l'animal pendant un état de repos de 2 minutes, après 30 minutes d'habituation, afin de comptabiliser le nombre de tressaillement (*flinching*) et d'immobilisation/protection du membre lésé (Lozano-Ondoua et al. 2013; Slosky et al. 2016). Nous pensons utiliser ces tests à l'avenir. Nos résultats sont toutefois très encourageants et montrent donc un effet antalgique du riluzole sur ces douleurs. Nous pensons également utiliser un modèle de souris immunocompétentes, qui nous permettrait d'évaluer l'effet du riluzole sur des animaux invalidés pour le canal TREK-1 et ainsi vérifier l'implication du canal dans l'effet antalgique du riluzole sur ces deux composantes. Ce modèle nous permettrait également de vérifier si la composante immunitaire déficitaire des animaux SCID n'est pas un biais trop important vis à vis du développement tumoral et des douleurs et si cela affecte l'activité antalgique du riluzole. Récemment, de nouveaux modèles murins de cancer de la prostate métastatique osseuse chez des souris immunocompétentes ont vu le jour (Liu et al. 2020; Simons et al. 2019). Ces modèles sont des modèles syngéniques induits par injection de cellules B6 Hi-Myc du CaP qui expriment l'oncogène Myc provoquant des lésions métastatiques avec un phénotype mixte ostéolytique/ostéoblastique. Les allogreffes de B6CaP sont dépendantes des androgènes, car ces cellules expriment le récepteur aux androgènes. Néanmoins, les tumeurs résistantes à la castration peuvent être sélectionnées car elles repoussent après 4 à 6 mois et peuvent ainsi être maintenues sous forme de clones indépendants des androgènes.

Nos données préliminaires montrent l'expression de l'ARNm du canal TREK-1 dans les DRG L₁ à L₃ (innervant le tibia). Nous avons aussi pu identifier une expression du canal dans

des nocicepteurs silencieux (marqués par la présence de CHRNA3) qui sont des nocicepteurs sensibilisés aux stimuli mécaniques par une variété de composés couramment utilisés pour induire expérimentalement une inflammation et des médiateurs inflammatoires endogènes tels que le NGF engendrant une augmentation de la douleur (Prato et al. 2017). Ces expériences préliminaires ayant été réalisées sur des coupes de DRG d'animaux sains, nous prévoyons de réaliser des hybridations *in situ* pour révéler la présence des ARNm du canal TREK-1 et CHRNA3 sur des coupes provenant d'animaux modèle de CaP. Un co-marquage avec un marqueur d'activation neuronal (pERK1/2) est également envisagé. De même, comme pour le riluzole, des études supplémentaires sont nécessaires afin de rechercher si ce canal TREK-1 est retrouvé dans les fibres qui innervent spécifiquement l'os grâce à des marqueurs de fibres osseuses sensibles (TrkA, CGRP et GAP43 impliqué dans la germination et la régénération nerveuse), mais également des marqueurs de fibres sympathiques (TH) et parasympathiques (VaChT). Nous souhaitons rechercher si l'expression de TREK-1 varie avec l'évolution de la maladie. Les résultats obtenus *in vitro* montrent une augmentation de l'expression du transcrite TREK-1 après 48h et 72h de traitement sur les cellules neuronales ND7. Outre son effet activateur du canal, qui est toutefois transitoire *in vitro* (Duprat et al., 2000), le riluzole pourrait également augmenter l'expression du canal au niveau neuronal. Il est à noter que le riluzole, de manière indirecte via l'inhibition de l'activité enzymatique de CK1d (avec une IC₅₀ de 16 µM), a déjà démontré qu'il peut moduler l'expression génique, notamment celle des transcrits codant pour le transporteur EAAT2 (*Excitatory amino acid transporter 2*) au glutamate. EAAT2 est normalement exprimé dans les cellules gliales où il est responsable de la recapture du glutamate, empêchant son accumulation et sa toxicité. Le riluzole a montré qu'il est capable d'inverser la suppression induite par la cocaïne du transporteur de glutamate EAAT2 dans le noyau accumbens, et de manière cohérente une autre étude à montrer que le riluzole entraînait une augmentation de l'expression de EAAT2 dans l'hippocampe par des études de séquençage d'ARN (Bissaro et al. 2018; A. C. Pereira et al. 2017; Sepulveda-Orengo et al. 2018). Nous nous sommes donc demandé si le riluzole pouvait également avoir un effet sur l'expression du canal TREK-1 dans les neurones de DRG provenant d'animaux de CaP. Les résultats obtenus par qPCR ne montrent pas de différences entre les groupes. Il est possible que la surexpression observée *in vitro* ne soit que transitoire. Par ailleurs, l'administration du riluzole dans l'eau de boisson à 60 µg/ml dans notre modèle correspond à une concentration circulante de riluzole proche de 5 à 10 µM. Il est difficile de connaître la concentration présente localement au niveau des fibres primaires innervant l'os. Il est possible qu'elle soit inférieure à 50 µM, concentration pour laquelle nous observons un effet *in vitro*, ce qui peut en partie expliquer les résultats

obtenus dans les DRG. De plus, comme nous l'avons décrit précédemment, les corps cellulaires des neurones innervant spécifiquement le tibia sont très peu nombreux dans les DRG (3 à 4 corps cellulaires par DRG après rétro-marquage au fluorogold [Figure 42]). La qPCR ayant été réalisée sur DRG entiers, et le canal étant par ailleurs fortement exprimé dans les DRG (environ 75% chez la souris) il est fort probable qu'une surexpression du canal dans les fibres innervant l'os ne puisse être révélée par cette technique. Une méthode d'isolement de neurones et de séquençage unique (*single cell*) a été envisagée, malheureusement le peu de fibres identifiées comme innervant l'os lors du rétro-marquage ne permet pas son utilisation. C'est pourquoi nous avons préféré nous diriger vers la recherche d'une méthode de quantification des marquages pour le RNAscope.

II. Impact du riluzole sur la progression tumorale et le remodelage osseux

Si l'effet antalgique observé chez les animaux modèle de CaP est très encourageant, le contexte particulier des patients cancéreux pose toutefois la question des conséquences de l'association du riluzole avec des thérapies anticancéreuses utilisées chez les patients atteints de métastases osseuses, notamment avec les chimiothérapies comme le docétaxel, sur la progression tumorale. Conformément aux données bibliographiques démontrant un effet antiprolifératif du riluzole sur de nombreuses lignées cellulaires de cancer, et plus récemment sur des lignées de cancer de CaP (Rizaner et al. 2020; Wadosky et al. 2019), nous confirmons un effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules métastatiques de CaP androgéno-indépendantes PC3 [Figure 45]. L'étude de Rizaner a démontré un effet anti-invasif du riluzole particulièrement efficace lorsque les cellules de CaP sont en hypoxie en diminuant l'expression du canal Nav1.7. Cette diminution du canal Nav1.7, qui est un canal hyperpolarisant, entraîne sûrement une diminution du potentiel de membrane au repos des cellules favorisant ainsi un état moins invasif comme nous le discuterons par la suite. Le test de MTT utilisé ne permet pas une analyse précise de la mort cellulaire mais reflète indirectement le nombre de cellules viables. Des études de l'effet de nos traitements vis-à-vis de l'apoptose par analyse en cytométrie en flux nous renseigneraient sur le mécanisme d'action du riluzole sur les PC3. En effet, des données bibliographiques obtenues sur des cellules de cancer du sein et des cellules de mélanome ont montré qu'un traitement au riluzole avait un effet cytostatique sur les cellules en phase M sur les cellules de cancer de seins et en phase G2/M sur les cellules de mélanome après 24h de traitement associé à une diminution significative du pourcentage de cellules en phase G1 après 48h suggérant une apoptose cellulaire (Namkoong et al. 2007; Speyer et al.

2017). De même, des données obtenues au laboratoire ont démontré un blocage de la division de cellules de cancer colorectale (HT29) en phase G2/M après 48h de traitement au riluzole. Ces données nous incitent à rechercher ce paramètre dans les cellules PC3 afin de valider une action pro-apoptotique du riluzole dans les cellules métastatiques de CaP. De plus, l'effet antiprolifératif du riluzole sur les cellules de CaP est obtenu pour des concentrations relativement élevées de riluzole ($> 25 \mu\text{M}$, alors que la concentration circulante de riluzole aux doses administrées *in vivo* est proche de 5 à 10 μM), ceci nous a conduit à rechercher si le riluzole avait ou non un effet bénéfique vis-à-vis du développement tumoral *in vivo*. Pour répondre à cette question nous avons utilisé des cellules PC3 transfectées avec le gène codant la luciférase (PC3-luc). Nous avons tout d'abord confirmé l'effet antiprolifératif du riluzole sur ces cellules *in vitro*. De plus, les expérimentations d'imagerie *in vivo* menées en collaboration avec l'UMR1240 révèlent une croissance tumorale moins importante chez les souris traitées au riluzole [Figure 47]. En concordance avec ces résultats, des études réalisées sur les ostéosarcomes montrent un effet positif du riluzole qui inhibe la prolifération, induit l'apoptose et empêche la migration des cellules d'ostéosarcomes (Liao et al. 2017; Raghbir et al. 2020).

Le mécanisme d'action antiprolifératif du riluzole pourrait impliquer son effet modulateur des concentrations locales en glutamate. En effet, de plus en plus de preuves ont montré l'implication de la signalisation du glutamate, guidée par leurs récepteurs tel que les récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluR) ou les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), dans la tumorigenèse. La dérégulation des transporteurs du glutamate, tels que le transporteur excitateur d'acides aminés et le système anti-porteur cystine/glutamate, génère également un excès de glutamate extracellulaire, qui a son tour, active les récepteurs du glutamate sur les cellules cancéreuses entraînant une augmentation rapide de leur croissance (Yi, Talmon, and Wang 2020; Yu et al. 2017). Nous avons effectué une mesure du relargage du glutamate par les cellules PC3 qui est inhibé par le riluzole [Figure 48]. Cependant, les dosages préliminaires *in vivo* sur le sérum et les extrudats de moelle osseuse de tibia issu d'animaux PC3 traités ou non avec du riluzole n'ont pas révélé de différence [Figure 49]. Néanmoins, ces résultats restent à compléter avec un dosage du glutamate en contexte physiologique sur des animaux Sham.

Cela en étant dit, compte tenu des résultats précédents démontrant l'implication du canal TREK-1 dans les effets bénéfiques sur la douleur du riluzole, et des résultats contradictoires concernant le rôle du canal TREK-1 vis-à-vis de la prolifération de cellules cancéreuses. Nous avons cherché à savoir si l'effet antiprolifératif du riluzole était lié à une activation du canal

TREK-1. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé en co-traitement avec le riluzole, un bloqueur spécifique de ce canal, la spadine, *in vitro*. Au bout de 48h, la spadine seule n'a montré aucun effet sur la prolifération des cellules de CaP. En revanche, l'effet antiprolifératif du riluzole est perdu lorsque la spadine est co-administrée [**Figure 51**], suggérant que l'activité du riluzole sur ces cellules cancéreuses de CaP est dépendante du canal TREK-1. Ces données sont indirectement en contradiction avec les données bibliographiques suggérant qu'une inhibition de ce canal est nécessaire pour observer un effet antiprolifératif sur des cellules PC3 (Voloshyna et al. 2008; G. M. Zhang et al. 2015). Cependant, les données entre ces deux publications semblent également contradictoires. En effet l'expression du canal TREK-1 a été évaluée par western blot dans plusieurs lignées cellulaires de CaP. Alors que la première étude publiée en 2008 montre une surexpression du canal dans les cellules LNCaP, la seconde ne montre aucune expression du canal dans ces cellules. De plus, la validation de l'inhibition de TREK-1 dans les cellules par un mutant TREK-1 dominant négatif (le canal est exprimé mais non actif) a été faite par analyse électrophysiologique de courant potassique sur cellule entière. Le courant TREK-1 est identifié comme le courant sensible à la sipatrigine à 50 μM . Seulement, la sipatrigine est un agent neuroprotecteur non spécifique du canal TREK-1 (IC_{50} 4 μM) puisqu'elle a été décrite comme molécule anti-glutamatergique également et nous avons vu que le riluzole a aussi un effet antiprolifératif via cette inhibition de glutamate dans les cellules PC3 (Meadows et al. 2001; Tsai 2008) [**Figure 48**]. La sipatrigine est également un inhibiteur de canaux sodique et calcique, qui sont comme on l'a vu précédemment, eux aussi impliqués dans la prolifération cellulaire (Hainsworth et al. 2000). De plus aucune de ces deux publications n'a évalué la spécificité de leur inhibition de TREK-1. Nous savons que les structures génétiques des canaux K_2P sont proches. Il pourrait y avoir une action non spécifique du siRNA sur des canaux parents comme par exemple les canaux TASK qui, nous l'avons vu, facilite la prolifération lorsqu'on les inhibe [**Figure 55**]. Une RT-PCR est envisagée pour les canaux K_2P les plus proches de TREK-1 afin de déterminer leur réelle expression dans les cellules PC3.

Nos données pourraient être en accord avec la théorie que la prolifération des cellules cancéreuses serait corrélée à leur potentiel membranaire (Furesi, Rauner, and Hofbauer 2020; Vlaeminck-Guillem 2018). En effet, comme nous avons pu le voir, les expérimentations électrophysiologiques sur les cellules de CaP ont démontrés une hyperpolarisation TREK-1-dépendante des cellules après un traitement au riluzole contrairement aux cellules de CaP non traitées [**Figure 56**]. Cette hyperpolarisation peut être expliquée de deux manières. Soit le riluzole modifie la fonctionnalité/cinétique du canal, c'est-à-dire son temps d'ouverture

entraînant ainsi une plus forte hyperpolarisation des cellules. Soit le nombre de canaux TREK-1 à la membrane est augmenté. Nous penchons pour cette seconde hypothèse au vu de l'augmentation de l'expression d'ARNm codant TREK-1 des cellules traitées à 50 μ M [Figure 52]. Une quantification protéique, cytosolique et membranaire, du canal TREK-1 dans les cellules de CaP traitées au riluzole peut être envisagé afin de valider notre hypothèse. Une des pistes afin de prolonger la vie des patients atteints de CRPCm serait donc de maintenir les cellules de CaP dans leurs états de « dormance » dans les niches pré-métastatique dans lesquelles elles acquièrent leur phénotype ostéoblastique (Furesi, Rauner, and Hofbauer 2020). A cette fin, l'activation non sélective de canaux K^+ ne semble pas représenter une stratégie efficace. En effet, alors que l'hyperpolarisation induite par le riluzole implique l'activation et/ou la surexpression du canal TREK-1, à l'inverse le blocage sélectif ou non de plusieurs canaux K^+ dont les canaux TASK diminue la viabilité des cellules PC3. Nous pouvons ainsi nous demander si des activateurs de ces canaux augmenteraient ou non la prolifération cellulaire et si leur activation influe ou non le potentiel membranaire des cellules PC3.

De plus, une autre stratégie d'inhibition du développement des cellules cancéreuses dans l'os serait de freiner au maximum le pouvoir de migration des cellules nécessaire à la formation des tumeurs. Des études ont montré que le flux calcique joue un rôle important dans la prolifération, la transition épithélio mésenchymateuse, la migration et notamment la colonisation osseuse des cellules de CaP (Ardura et al. 2020; Dejos, Gkika, and Cantelmo 2020). L'implication de cette entrée constitutive de Ca^{2+} dans le pouvoir de migration des cellules cancéreuses a déjà été démontrée (Chantôme et al. 2013). Nos données préliminaires, obtenues sur la diminution de cette entrée de calcium par le riluzole à 50 et 100 μ M dans nos cellules de CaP pose également la question de l'intérêt de l'utilisation du riluzole dans le traitement préventif des douleurs osseuses chez les patients atteints de CaP [Figure 57]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier l'implication que pourrait avoir le canal TREK-1 dans ce processus.

Outre son effet sur les cellules nerveuses et les cellules cancéreuses, le riluzole pourrait influencer sur le métabolisme osseux. En effet, récemment, GD Schroeder et al. ont démontré que des concentrations élevées de riluzole (150 et 450 ng/ml) diminuent l'expression des gènes impliqués dans l'ostéogénèse influençant négativement la formation osseuse. Cependant, cette étude a été réalisée *in vitro* avec des doses élevées, supérieures aux concentrations sériques moyenne retrouvées chez les patients traités au riluzole qui sont plus souvent de l'ordre de 54 ng/ml (Groeneveld et al. 2008). Les concentrations sériques de riluzole ont été mesurées dans

une précédente étude menée au laboratoire sur des souris présentant une neuropathie chimio-induite par l'oxaliplatine recevant comme dans mes expériences 60 µg/ml de riluzole dans l'eau de boisson (Poupon et al. 2018). La concentration sanguine de riluzole rapportée était alors en moyenne de $51,5 \pm 7.7$ ng/ mL par souris, ce qui se rapproche des concentrations faibles évaluées dans cet article qui n'ont montré aucune modification sur la formation osseuse (Schroeder et al. 2019). De plus, les résultats d'imagerie de l'os obtenus durant ma thèse ont montré que le riluzole n'affecte pas négativement le remodelage et la lyse de l'os dans notre modèle [**Figure 50**]. La riluzole diminue même significativement ce remodelage osseux ($p < 0.01$) si on ne prend pas en compte les données obtenues à J35 (jour à partir duquel l'effet antalgique du riluzole est perdu sur les douleurs spontanées) [**Figure 36**].

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le riluzole comme molécule d'intérêt pour la prise en charge des patients atteints de CaP métastatique. Nos données montrent clairement qu'il est efficace sur la douleur osseuse, notamment sur la douleur spontanée, chez un modèle murin de douleur osseuse du CaP. Le riluzole possède une AMM pour la prise en charge de patients atteints de SLA et c'est une molécule bien tolérée chez ces patients. Les effets indésirables les plus couramment rapportés lors du traitement sont le développement d'une asthénie, de nausées, de constipation et une augmentation des enzymes hépatiques. Dans de rares cas, le riluzole semble induire une pancréatite et un arrêt du traitement peut éviter la récurrence de cet effet indésirable (Falcão de Campos and de Carvalho 2017; Rilutek | European Medicines Agency n.d.). Les données de la bibliographie et les données que nous avons obtenues suggèrent également un potentiel effet bénéfique de cette molécule vis-à-vis de la progression tumorale. Ainsi, à l'instar de l'étude clinique qui a récemment été lancée pour tester l'effet du riluzole dans la prévention de neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine (Kerckhove et al. 2019), nous pourrions proposer d'évaluer l'effet du riluzole sur la douleur et la qualité de vie des patients atteints de CaP métastatique.

Bien entendu, il reste un certain nombre d'expériences à réaliser afin de compléter les résultats obtenus et répondre aux nouvelles questions que suscitent ces résultats. Un certain nombre d'expérimentations sont en cours au moment de rendre ce rapport telle que l'évaluation de l'effet du riluzole sur la germination ectopique de fibres sensitives et autonomes dans le tibia des souris, qui sera associé à un marquage des cellules cancéreuses par KI67. Si ce marquage se révèle infructueux nous pourrions réaliser une expérience *in vivo* dédiée uniquement au suivi longitudinal de la croissance des cellules PC3-luc par bioluminescence. Nous souhaitons aussi mieux caractériser l'implication du canal TREK-1 dans l'effet antiprolifératif du riluzole et potentiellement les autres canaux K_2P . Pour cela, nous utiliserons des outils pharmacologiques bloqueurs ou activateurs de ces canaux afin d'évaluer leur implication dans les effets du riluzole sur les variations de calcium intracellulaire, les variations du potentiel de membrane et l'activité sécrétrice des cellules PC3. L'utilisation de cellules PC3 invalidées pour le canal TREK-1, grâce à la technique de crispr-cas9, est envisagée afin de conforter les résultats obtenus *in vitro* avec les bloqueurs pharmacologiques des canaux.

Conclusion générale

Si les résultats à venir confortent le canal TREK-1 comme cible pour le traitement des douleurs osseuses du CaP, outre le riluzole, nous pourrions tester l'effet d'activateurs directs du canal TREK-1 sur l'ensemble des paramètres (douleur osseuse, prolifération cellulaire, remodelage osseux) chez des modèles de cancer métastatiques osseux, notamment sur des modèles immunocompétents. Ces modèles nous permettraient également de vérifier si l'effet du riluzole est conservé lorsque l'environnement immunitaire n'est pas subdéprimé. Enfin, une dernière perspective à très long terme pourrait être la modification galénique du riluzole afin d'améliorer sa biodisponibilité et ses effets neuronaux et osseux. Effectivement, une étude a déjà exploré cette piste, la délivrance de riluzole via des nanoparticules d'oxyde de fer en nanocage a démontré un effet antiprolifératif significativement supérieur chez un modèle d'ostéosarcome par rapport à une injection de riluzole « libre ». Cette meilleure efficacité semble être dû à la petite taille des cages d'oxyde de fer présentant plusieurs avantages notamment l'évasion du système immunitaire et une meilleure biodistribution (Raghubir et al. 2020).

Nous avons donc l'espoir que le riluzole puisse un jour faire partie de l'arsenal thérapeutique des cliniciens pour le traitement des douleurs osseuses induites par le cancer de la prostate.

PARTIE D : Matériel et Méthodes

I. Cultures cellulaires

1. Mise en culture et maintien de la culture

Les cellules humaines hormono-indépendantes PC3, cellules d'adénocarcinome de grades IV issus d'une métastase osseuse de cancer de la prostate, ont été achetées (ATCC® CRL-1435™) ou fournies par l'UMR1240 pour les PC3-luc, cellules PC3 transfectées avec le gène codant la luciférase. Les cellules hybrides de neuroblastome de souris et de DRG de rat ND7/23 ont été fournies par le Dr. Frédéric Carvalho (Neurodol-UMR1107). Ces cellules sont maintenues en culture dans un incubateur d'atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules PC3 ont été maintenues en culture dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 1X (Gibco, ROYAUME-UNIES) complété avec 10% de Sérum de veau fœtal (SVF) inactif, 1% d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine), 1% de vitamines et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules PC3-luc ont, elles, été mises en culture dans un milieu DMEM/F12 (1 :1) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété avec 10% de SVF inactif, 1% d'antibiotiques et 1% de L-glutamine. La puromycine a été ajoutée lors des semaines de pressions de sélection à 2µg/ml. Les cellules sont passées deux fois par semaine dès que 70% de confluence est atteinte dans les flasques. Enfin, les cellules ND7/23 ont été mises en culture dans un milieu DMEM complété avec 10% de SVF inactif, 1% d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine) et 1% de L-glutamine.

2. Traitements

Les cellules sont incubées 24h dans une étuve à 37°C et CO₂ avant toute expérimentation. Les médicaments utilisés ont été dissous dans 100% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Les traitements ont été réalisés avec une concentration ne dépassant pas 0.4% de DMSO. Le riluzole (abcam) a été testé à 5 doses : 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM et 0 µM correspondant au DMSO en co-traitement ou non avec du docétaxel (Cayman chemical company) à 15 nM. La spadine, bloqueur du canal TREK-1 (Tocris, Bristol, Royaume-Uni), a été testée à 4 doses : 1000 nM, 100nM, 10 nM, 1nM et 0 nM en co-traitement ou non avec le riluzole à 50 µM.

3. Evaluation de la viabilité cellulaire

Les tests de MTT (Bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) ont été réalisés selon le protocole du fabricant (Life Technologies). Sur des plaques 96 puits, 10 000 cellules par puits ont étéensemencés à l'aide du Countess II FL (ThermoFisher

Scientific®) pour les différents traitements durant 48h. À la fin du traitement, le milieu est aspiré, puis 10µl d'une solution de MTT à 5 mg/ml dilués dans du PBS (*phosphate buffered saline*) (Gibco, ROYAUME-UNIES) ainsi que 100µl de milieu de culture sont déposés dans chaque puits. Après 2h d'incubation dans l'étuve, 80µl de la solution sont retirés de chaque puits afin d'ajouter 100µl de DMSO pour dissoudre les cristaux de formazan (violet) créés par la succinate déshydrogénase mitochondriale en métabolisant le MTT. Une lecture de densité optique est réalisée à 564 nm grâce à un lecteur de plaque (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT). L'absorbance des cellules traitées par le véhicule (DMSO seul) a été désignée comme étant le 100% et la survie des cellules est ensuite exprimée en pourcentage de cette valeur. Les données indiquées représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triple exemplaire.

4. Test de la cicatrice

La migration des cellules a été analysée par un test de cicatrisation comme décrit précédemment (Hu et al. 2018). En bref, les cellules PC3-luc sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 1×10^6 cellules/puits quelques jours avant assurant 95 à 100% de confluence de cellules en monocouche. Une blessure à l'aide d'un cône de pipette stérile (200µl) a été réalisée. Les débris cellulaires ont été enlevés par 2 lavages successifs au PBS. Le milieu contenant les traitements est alors mis en contact des jusqu'à l'obtention d'un recouvrement complet de la plaie avec un changement toutes les 48h. Des images ont été acquises à 0,18,24,42 et 47h après la plaie. La capacité de migration des cellules a été évaluée en mesurant le pourcentage de recouvrement de la plaie à l'aide du logiciel NIS-element.

II. Tests comportementaux

Des souris mâles CB17 (Laboratoire Janvier, Le Genest Saint Isle, France) de 5 semaines le jour de l'expérimentation sont utilisées dans toutes les expérimentations décrites dans ce mémoire. Elles portent la mutation SCID (*severe combined immunodeficiency*) responsable chez ces animaux d'une incapacité à différencier et maturer les lymphocytes T ou B ainsi que certains composants du système du complément. Cette faiblesse est largement utilisée pour le développement de xénogreffe de cellules dérivées de tumeurs humaines. Les animaux sont stabulés par groupes de 8 par cage en cycle jour / nuit 12h / 12h dans une animalerie EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Les animaux reçoivent un régime alimentaire standard avec nourriture et eau *ad libitum*. Les expérimentations sont réalisées après au moins une semaine d'acclimatation aux conditions de stabulation de

l'animalerie. Les expérimentations ainsi que le nombre de tests douloureux subis par chaque animal sont planifiés afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Toutes les expériences sont réalisées au calme par le même expérimentateur en condition aveugle pour les traitements. Les expérimentations sont réalisées en accord avec le texte de loi régissant l'expérimentation animale en Europe, "European Community guiding in the care and use of animals"(86/609/CEE). Les recommandations du comité d'éthique de l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) ont également été suivies (Zimmermann 1983). La certification à expérimenter sur les animaux vivants n° 63-109 a été délivrée par la préfecture du Puy-de-Dôme. Enfin, les protocoles utilisés ont tous fait l'objet d'une validation par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne (APAFIS n°3773).

1. Evaluation de la douleur induite par l'injection de cellule de cancer de prostate métastatique

1.1. Injection intra-tibiale de cellules PC3 ou PC3-luc

La technique d'injection intra-tibiale de cellules PC3, apprise auprès de l'équipe du Dr Philippe Clézardin (Lyon) (Fradet et al. 2013), a été choisie afin de modéliser un développement tumoral osseux de cellules de cancer de prostate. Les injections ont été réalisées après la première semaine d'acclimatation des animaux, donc à 5 semaines. Ils ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale (i.p) de Kétamine (100 mg/kg) et Xylazine (10 mg/kg). Le tibia de l'animal est ensuite perforé à l'aide d'une aiguille stérile de 26G^{1/2} au niveau de l'épiphyse de celui-ci en passant par l'articulation du genou (maintenu fléchi lors de l'intervention). L'aiguille est délicatement ôtée puis les cellules PC3 ou PC3-luc (à raison de 5x10⁵ cellules pour 10µl de PBS) sont injectées à l'aide d'une seringue Hamilton préalablement préparée. Les animaux sham reçoivent uniquement 10 µl de PBS lors de l'injection intra-tibiale.

1.2. Tests de douleur évoquée

1.2.1 Le test du Von Frey : (Bioseb, France)

Ce test permet d'évaluer la sensibilité des animaux à une stimulation mécanique appliquée sur une partie du corps de l'animal (dans notre cas la patte postérieure de l'animal). L'expérimentateur observe l'apparition ou non d'un comportement douloureux de l'animal : le retrait de la patte, un saut, léchage lors de l'application du filament de nylon sur la face plantaire entre les coussinets des pattes arrière de la souris. Une habitude préalable 3 fois durant 1h la

première semaine et 30 minutes avant les expériences est réalisée dans les racks de Von Frey afin de limiter l'anxiété chez les animaux. Un filament de nylon de force 0,6g a été appliqué sous chaque patte arrière à 5 reprises durant 5 secondes avec une force suffisante pour faire plier le filament. Le nombre de réponses est comptabilisé pour les 5 applications successives. Une augmentation du nombre de réponses traduit l'apparition d'un phénomène douloureux chez l'animal (Deuis, Dvorakova, and Vetter 2017).

1.3. Tests de douleur spontanée

1.3.1 Le test d'incapacitance ou distribution pondérale statique (static weigh bearing – SWB) : (Bioseb, France)

Ce test permet d'évaluer la répartition pondérale de l'animal sur ses membres postérieurs et donc son équilibre postural. Durant l'expérience, l'animal est placé dans un support en plastique transparent qui le maintient confortablement pendant que ses pattes arrière reposent sur deux capteurs à plaques séparées. Une habituation à ce support est faite durant la première semaine jusqu'à ce que les animaux se sentent à l'aise afin de réduire leur anxiété. La valeur de poids appliquée sur chaque capteur est affichée sur l'écran LCD de l'unité de contrôle dès que l'utilisateur déclenche la mesure. Ce temps de mesure est réglable, il a été fixé à 3 secondes pour toutes nos expériences. Un pourcentage de répartition du poids est calculé afin d'éliminer le paramètre de prise de poids des souris au cours de l'expérience. Plus ce pourcentage est proche de 50%, plus la souris est équilibrée. Ce test permet donc d'évaluer l'inconfort de l'animal dû à l'injection et au développement des cellules cancéreuses dans le tibia et ainsi vérifier l'influence des traitements pharmacologiques sur cet inconfort (Rivat et al. 2008).

1.3.2 Vidéotracking par phénotyper (Noldus, France) :

Un enregistrement vidéo par le logiciel MédiaRecorder est lancé sur 20h puis analysé grâce au logiciel Ethovision XT14 (Noldus) qui est un outil de traitement des données permettant de mesurer de nombreux paramètres tels que la distance parcourue, la vitesse de déplacement de l'animal, la fréquence de visite de zones définies (par exemple la *shelter zone*, correspondant à la boîte noire qui est une zone de refuge pour les animaux), l'allongement du corps mais également la reconnaissance de comportements plus complexes comme le toilettage (*grooming*), l'alimentation (*feeding*), les sauts (*hopping*), le fait de renifler l'environnement (*sniffing*), l'élévation de l'animal sur ses pattes arrière en prenant appui sur un support (*rearing*

supported), telle que la paroi de la cage, ou sans appui (*rearing unsupported*). La reconnaissance de ces comportements par le logiciel Ethovision XT14 repose sur plusieurs facteurs comme l'emplacement de l'animal mais également le mouvement du nez, du point central et la base de sa queue. Les comportements sont alors identifiés en fonction de leur probabilité d'apparition selon les facteurs préalablement définis (Robinson and Riedel 2014).

1.4. Administration des molécules et design des expériences

Toutes les expériences ont été numérotées (de 1 à 5) et leur design d'études est rapporté dans la partie résultat. Les molécules suivantes ont été utilisées : riluzole (Abcam, Tocris), bloqueur sélectif du canal TREK-1 : spadine (Tocris), morphine (Cooper, Melun, France). La morphine a été utilisée à 3mg/kg. Nous avons choisi d'administrer le riluzole dans l'eau de boisson afin d'éviter le stress que pourrait engendrer un gavage journalier. Il a été donné à une concentration de 60 µg/ml, comme décrits précédemment (Gurney et al. 1996; Poupon et al. 2018) correspondant à 13,2 mg/kg/jour. Nous avons mesuré deux fois par semaine la consommation d'eau des souris traitées ou non avec le riluzole (n=8 par groupes) en pesant leurs biberons. La consommation moyenne n'était pas significativement différente entre les groupes (2,02 ± 0,27 ml/souris pour le groupe Sham, 2,11 ± 0,45 ml/souris pour le groupe PC3, 1,77 ± 0,05 ml/souris pour le groupe riluzole, 1,94 ± 0,005 ml/souris pour le groupe Spadine et 1,77 ± 0,05 ml/souris pour le groupe riluzole + spadine). La spadine en traitement chronique débute 7 jours après l'injection des cellules de CaP, elle est administrée par injection intrapéritonéale (*i.p*) 4 fois par semaine pendant 5 semaines à 800 µg/kg (Pietri et al. 2019).

Le traitement au riluzole débute 7 jours après l'injection des cellules cancéreuses PC3. Les tests de von frey, immersion de la patte et static weight bearing sont effectués une semaine avant l'injection des cellules afin d'avoir une valeur de base pour chaque animal et une fois par semaine après l'injection des cellules PC3. Le poids des souris est suivi tout au long de l'expérience car celui-ci est un point limite de notre évaluation : si l'animal perd plus de 15% de son poids en une semaine alors celui-ci est sacrifié. L'évaluation de la qualité de vie des animaux par le phénotyper est faite en fin d'expériences 35 jours après l'injection des cellules.

Pour l'évaluation de l'implication des canaux TREK-1 dans l'effet du riluzole nous avons conduit une expérience (Exp5) associant le riluzole et un bloqueur des canaux TREK-1 : la spadine en administration chronique dans notre modèle. Pour cela, cinq groupes d'animaux ont été utilisés : les animaux ne recevant qu'une injection de PBS (animaux Sham), les animaux recevant uniquement les cellules (animaux PC3), les animaux recevant les cellules et un

traitement au riluzole (PC3+riluzole), les animaux recevant les cellules et la spadine (PC3+spadine) et enfin les animaux recevant les cellules, le riluzole et la spadine (PC3+riluzole+spadine).

III. Imagerie

1. Bioluminescente

Les expériences d'imagerie bioluminescente ont été menées à l'UMR 1240 INSERM/UCA à l'aide de Mme Leslie Mazuel (ingénieur de recherche).

La croissance tumorale a été observée dans le modèle de douleur osseuse une fois par semaine par bioluminescence. Les souris ont reçu une injection de luciférine (i.p ; 150 μ L/souris d'une solution à 25mg/ml) 5 minutes avant l'acquisition de bioluminescence. L'acquisition a été réalisée sous isoflurane dans un système IVIS (*in vivo imaging system*), 40 minutes après anesthésie. La bioluminescence détectée dans la patte injectée avec les cellules PC3-luc est normalisée par le signal contenu dans la patte contrôle dans la région d'intérêt (cette zone est définie au sein de chaque tibia). Ce calcul permet d'obtenir le flux total (p/s) enregistré dans chaque tibia.

2. Scintigraphique par ^{99m}Tc -HMDP

Le remodelage osseux a été évalué *in vivo* par scintigraphie osseuse à l'aide d'un radiotracer ostéoarticulaire couramment utilisé en clinique chez l'Homme : l'hydroxyméthylène diphosphonate radiomarqué au ^{99m}Tc (HMDP). Les images ont été acquises 2h et demie après l'injection intrapéritonéale de 10 MBq par souris de ^{99m}Tc -HMDP (Osteocys[®], IBA). L'acquisition a été réalisée pendant 5 minutes (fenêtre de 15% à 140 KeV) de l'animal placé sur le dos sur un collimateur parallèle (20mm/1.8/0.2) d'une gamma-caméra pour petit animal (γ Imager[®], Biospace) sous anesthésie à l'isoflurane (Isoflurane, 1%). L'analyse quantitative des images scintigraphique a été réalisée avec le logiciel Gammavision+ (Biospace) en utilisant des régions d'intérêt 3D (ROI) en se basant sur l'image μ CT de l'os du tibia pour chaque animal. Un ratio patte ipsilatérale sur patte controlatérale a été fait pour chaque signal obtenu (Bq). Le pourcentage de perte osseuse a également été quantifié à l'aide de ce logiciel.

IV. Dosage du glutamate

Les niveaux de glutamate ont été mesurés en utilisant le kit de dosage Amplex Red Glutamic Acid/ Glutamate oxydase qui fournit une méthode ultrasensible pour une détection continue de l'acide glutamique ou de l'activité de la glutamate oxydase dans une variété d'échantillons biologiques dans un lecteur microplaques à fluorescence ou un fluoromètre (Flex Station 3, Molecular Devices). Dans l'essai, l'acide L-glutamique est oxydé par la glutamate oxydase pour produire l'acétoglutarate, du NH_3 et du H_2O_2 . L-Alanine et L-glutamate-pyruvate transaminase sont inclus dans le kit pour régénérer l'acide L-glutamique par la transaminase de l' α -cétoglutarate ce qui entraîne plusieurs cycles de la réaction initiale et une amplification significative de H_2O_2 produit. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec 10-acétyl-3,7-dihydrophénazine (réactif Amplex Red) dans une stœchiométrie 1 :1 dans une réaction catalysée par peroxydase de raifort (HRP : Horseradish peroxidase) pour générer un produit fluorescent, résorufine. Du fait que ce produit ait des longueurs d'onde maximale d'absorption et d'émission d'approximativement 571 nm et 585 nm respectivement, il y a peu d'interférence de l'autofluorescence dans la plupart des échantillons biologiques.

1. *In vitro*

Les cellules PC3 ont été incubées dans un milieu MEM sans glutamate, sans glutamine, sans rouge de phénol et sans sérum, il est complétement uniquement avec du glutamax afin de limiter les interactions avec le kit de dosage. Les cellules ont été traitées pendant 48h avec des doses croissantes de riluzole. Le dosage a ensuite été réalisé sur les surnageants de cultures cellulaires en plaque 96 puits opaque en suivant les recommandations du fabricant. La lecture a été faite en lecteur microplaques à fluorescence (Flexstation3, Molecular Devices).

2. *In vivo*

Les tibias des animaux de l'Exp5 ont été recueillis 35 jours après l'inoculation des cellules PC3-luc. Les extrémités proximale et distale du tibia ont été coupées et le contenu intramédullaire a été rincé dans un falcon avec une solution de PBS 0.1 M contenant un cocktail d'inhibiteur de protéase et de l'EDTA (CompleteTM ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Les contenus tibiaux de 2 animaux par traitement ont été regroupés par échantillon. La concentration de glutamate a été déterminée à l'aide du kit AMPLEX[®] red glutamic acid.

V. Marquage de cibles *ex vivo*

1. Préparation des tissus

Les animaux sont anesthésiés grâce à une injection intrapéritonéale (i.p) de Kétamine (100 mg/kg) et Xylazine (10 mg/kg) et rapidement perfusés par voie transcardiaque avec du sérum physiologique suivi d'une perfusion de paraformaldéhyde (PFA) 4%. Après cette perfusion, les DRGs L₁-L₂-L₃ et L₄-L₅-L₆ sont excisés en différenciant le côté ipsilatéral (correspondant à la patte injectée) du côté controlatéral (patte non injectée). Ils sont ensuite post-fixés 4h pour les DRG et 24h pour les tibias dans le même fixateur de perfusion puis ils sont ensuite cryoprotégé à l'aide d'un bain de 30% de saccharose dilué dans un tampon phosphate 0,1M pendant au moins 48h à 4°C. Les tibias sont également prélevés et nettoyés des muscles les entourant afin d'améliorer la décalcification qui se fait après une post-fixation de 48h dans le PFA 4%. Ils sont ensuite placés dans des bains successifs d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, pH 7,6, Sigma) pendant deux semaines à 4 °C pour une décalcification optimale comme décrit précédemment (G Castañeda-Corral et al, 2011 ; Velot, 2011) puis cryoprotégé (PB-Saccharose 30%) pendant au moins 48h. Tous les échantillons sont ensuite congelés dans un milieu de congélation de tissu (O.C.T). Des sections transversales de DRG (10µm) et de tibia (15µm) ont été coupées au cryostat (Leica, CM1950) puis fixées sur des lames super frost puis séchées pendant 30 minutes à température ambiante et enfin stockées à -20°C quelques jours avant la manipulation.

2. Immunohistochimie

Les sections de tibia ont été colorées comme suit : après saturation des sites aspécifiques dans une solution de blocage (PBS contenant 0,2% de triton X-100 et 1% d'albumine de sérum bovin BSA) pendant 1h, les sections ont été incubées pendant la nuit à température ambiante dans une chambre humide avec les anticorps primaires. Les fibres nerveuses sensorielles riches en peptides ont été marquées avec de l'anti-CGRP de lapin (1 : 2000, Calbiochem, #PC205L) dilués dans du PBS/Triton 0,2% BSA 1%. Après 5 lavages de 5 minutes chacun dans le PBS, les sections ont été incubées avec les anticorps secondaires appropriés (1 : 1000, AlexaFluor®488), dilués dans le même diluant que l'anticorps primaire pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Une contre-coloration a été effectuée avec du DAPI nucléaire (diamidino-2-phényl-indole, dihydrochlorure, 1 : 4000) pendant 5 minutes et lavée trois fois au PBS. Les sections ont ensuite été recouvertes avec un milieu de montage fluorescent (Dako) et enfin observées avec le microscope Nikon Eclipse Ni-E. Des analyses

quantitatives ont été effectuées avec le logiciel NIS-Elements sur au moins 5 à 6 sections par patte par animal (n=6 par groupes) ont été quantifiées en mesurant la longueur des fibres marquées ainsi que leur nombre dans la moelle osseuse des tibias.

3. RNAscope

Une injection intratibiale d'un marqueur rétrograde des neurones, le fluorogold (Santa Cruz Biotechnology), a été utilisé afin de marquer spécifiquement les fibres innervant l'os des souris. Il est injecté à raison de 10 µl une semaine avant le sacrifice d'animaux SCID naïf (temps nécessaire pour un marquage optimal des DRG) (Schmued and Fallon 1986). Les DRG L₁ à L₆ prélevés ont révélé un marquage plus présent du fluorogold dans les DRG L₁ à L₃ (4 à 6 neurones marqués) face au DRG L₄ à L₆ (1 à 2 neurones marqués). La suite des expériences a donc été faite sur les DRG L₁ à L₃. Les tissus ont été préparés selon le protocole décrit dans [RNAscope® Multiplex Fluorescent V2](#) (ACDBio, San Francisco, CA). Des coupes de 12 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat juste avant de lancer l'hybridation in situ RNAscope. La technologie RNAscope est basée sur l'utilisation des sondes ARN spécifiques disponibles dans le commerce auprès d'Advanced Cell Diagnostics (ACD). En effet, ACDBio dispose d'une très large bibliothèque de sondes validées pour les gènes de souris, humains et rats, il est également possible de faire la demande de sondes personnalisées. En règle générale, les sondes RNAscope contiennent 20 paires de sondes Z (12-25b/sonde) couvrant ~ 1000b. Avant d'appliquer la technique RNAscope sur nos coupes d'intérêt, nous avons tout d'abord validé la procédure sur des coupes d'animaux sauvages en utilisant des sondes de contrôle positif et négatif fournies par le fabricant. La sonde de contrôle positif correspond au gène Polr2a (Sous unité A de l'ARN polymérase II), tandis que la sonde de contrôle négatif correspond au gène DapB (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase de *Bacillus subtilis*).

Nous avons opté pour une visualisation par fluorescence en utilisant le kit RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (référence 323100, ACDBio). Afin de visualiser une co-expression de TREK-1 et CHRNA3, le RNAscope Multiplex a été réalisé conformément aux directives du fournisseur. En bref, les lames ont été rincées dans du PBS 1X puis les sections déshydratées à l'éthanol 50%, 70% et 100% respectivement avec un temps d'incubation de 5 minutes chacun. Après une étape de démasquage, les lames ont été rincées et les sections déshydratées à l'éthanol à 100% et séchées à l'air avant de créer une barrière hydrophobe en utilisant le stylo barrière hydrophobe Immedge™. La détection d'hybridation in situ RNAscope a été réalisée par des incubations à 40 °C dans un four d'hybridation en utilisant le plateau de

contrôle d'humidité (HybEZ™Oven, ACDBio). Pour chaque section, six à huit gouttes de chacune des solutions de réactifs ont été utilisées pour couvrir les sections des tissus, suivies de trois rinçages avec du tampon de lavage à température ambiante. Les sections ont été incubées avec de la protéase III pendant 30 minutes et lavées dans de l'eau désionisée trois fois pendant 2 minutes chacune. Les sections ont ensuite été incubées avec les sondes TREK-1 et CHRNA3 pendant 2 h à 40°C, suivies séquentiellement par des étapes d'amplification avec Amp1 pendant 30 min, Amp2 pendant 30 min et Amp3 pendant 15 min. Les sections ont par la suite été incubées avec HRP-Ch1 pendant 15 min, TSA-Fluorescein (1 : 1000, PerkinElmer) pendant 30 min et HRP-Blocker pendant 15 min (canal 1 = Alexa 488). Ensuite, les sections ont été incubées avec HRP-Ch2 pendant 15 min, TSA-Cyanine3 (1 : 1000, PerkinElmer) pendant 30 min et HRP-Blocker pendant 15 min (canal 2 = Atto 550). Les sections ont ensuite été contre-colorées avec du DAPI puis couvertes avec de le réactif Prolong Gold Antifad et une lamelle). Les images ont ensuite été visualisées et prises avec le microscope Nikon Eclipse Ni-E le lendemain de la manipulation.

Un neurone est considéré positif pour un marqueur (TREK-1, CHRNA3) si l'expérimentateur peut observer au moins quatre à six structures en forme de clusters ou point selon la directive de quantification proposée par le fournisseur ACDBio.

VI. RT-PCR quantitative

1. Extraction d'ARN et rétrotranscription

Les animaux sont sacrifiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Les DRG sont rapidement prélevés, comme décrit précédemment, en séparant le côté ipsi du côté controlatéral puis plongé dans l'azote liquide et enfin stockés à -80°C. Pour assurer une quantité d'ARN suffisante, chaque échantillon est le résultat d'un pool de DRG issu de 2 animaux différents. Les ARN sont extraits grâce au kit Quick-RNA Microprep (Zymo) selon les instructions fournies, en incluant une étape de traitement à la DNase I (Zymo) afin de dégrader l'ADN génomique.

Les cellules (PC3-luc et ND7) sont incubées en plaque 12 puits (5×10^4 cellules/puits). Elles sont laissées en adhésion pendant 24h en étuve à 37°C et CO₂. Des traitements ont été réalisés avec une dose croissante de riluzole : 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM et 0 µM correspondant au DMSO. Au bout de 48h les culots secs ont été récupérés puis les ARN sont extraits grâce au kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen®) selon les instructions fournies.

Les ARN purifiés sont ensuite quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm (A260) et 280nm (A280) sur un spectrophotomètre V-550 (Jasco). La qualité des ARN est évaluée par l'analyse des ratios A260/A280 et A260/A230, et leur intégrité est évaluée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5% en sélectionnant aléatoirement 5 échantillons par manipulation. La rétrotranscription est ensuite effectuée avec le Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems®). Les dNTPs, les amorces random (hexamères), le tampon, la reverse transcriptase et l'eau *Rnase-free*, contenus dans le kit, ont été ajoutés aux ARN totaux extraient à partir des DRG ou des cellules, pour constituer un volume final de 20 µl de mélange réactionnel [Tableau 1]. Le programme utilisé pour la transcription inverse était : 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C et 10 min à 4°C. Les ADN complémentaire (ADNc) générés ont été conservés à -20°C.

Tableau 1: Mix réactionnel de la transcription inverse.

Les amorces random sont des hexamères de nucléotides qui s'hybrident aléatoirement sur l'ARN.

Réactifs Transcription inverse (AppliedBiosystems®)	Concentration finale	Volume pour une réaction
Tampon 10X	1X	2 µl
dNTP 100mM	4nM	0.8 µl
Amorces random 10X	1X	2 µl
Reverse Transcriptase	-	1 µl
H ₂ O Rnase-free	-	4.2 µl
Volume final Mix		5 µl
ARN totaux		5 µl
Volume final réactionnel		20 µl

2. qPCR

Les qPCR ont été réalisées avec les ADN obtenus par reverse transcription. Cette technique repose sur l'utilisation d'un intercalant fluorescent de l'ADN, le SyberGreen, permettant la quantification des produits de PCR néo synthétisés. Les amplifications de PCR

sont réalisées sur une thermocycler eppendorf®. Tous les échantillons sont analysés en tripliquas dans un volume final de 10µl contenant 5µl d'ADNc dilués de manière qu'1µl apporte 1ng d'ADNc. Le kit LightCycler FastStart DNA SyberGreen I (Roche®) contient le MgCl₂, le SyberGreen, la Taq polymérase et l'eau *nuclease free*, nécessaires au mélange réactionnel ajouté au 5ng d'ADNc et au 5 µM d'amorces forward + 5 µM d'amorce reverse du gène d'intérêt [**Tableau 2**].

Tableau 2: Mix réactionnel de la qPCR

Le SyberGreen est un intercalant de l'ADN. Lors de la réaction de PCR, après l'étape d'élongation, il s'intercale dans les produits double brins néo synthétisés et émet de la fluorescence. Cette fluorescence est proportionnelle au nombre de produits amplifiés.

Réactifs qPCR (Roche ®)	Concentration finale	Volume pour 1 réaction
MgCl ₂ (25mM)	3mM	1,2µl
Amorces à 5µM	0.5 µM	1 µl
SyberGreen (10X)	1X	1 µl
Taq polymérase	-	0,1 µl
H2O <i>nuclease free</i>	-	1,7 µl
Volume final Mix		5 µl
ADNc 1ng/µl	5ng	5µl
Volume final réactionnel		10µl

Avant la PCR, une étape d'activation de la polymérase est réalisée pendant 7 minutes à 95°C. Le protocole d'amplification consiste en 15s de dénaturation à 95°C, 15s d'hybridation à la température T_h (Tableau 3), et 15s d'élongation à 72°C, répété pendant 45 cycles. La température d'hybridation optimale est déterminée expérimentalement par la réalisation d'un gradient de température. La spécificité de l'amplification est ensuite vérifiée par analyse de la courbe de fusion (acquise sur une rampe de 95°C à 58°C en 20 min, avec suivi de la fluorescence en temps réel) et par électrophorèse sur gel d'agarose 3%. Les couples d'amorces [voir **Tableau 3**] sont issus de la bibliographie (Descœur et al. 2011). La quantification des transcrits a été faite avec la méthode du $\Delta\Delta C_t$. Elle correspond au calcul du ratio d'expression d'un gène cible entre deux échantillons en normalisant avec un gène de référence (soit le 18S, soit la β -actine). Cette méthode prédit que les efficacités des deux gènes sont égales à 100% (à chaque cycle de la phase exponentielle, la concentration en produit de PCR est doublée). Pour

cela, à partir des Ct (cycle threshold) obtenus, les ΔCt (échantillon) et ΔCt (contrôle) sont calculés afin d'obtenir le $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{contrôle}} - \Delta Ct_{\text{échantillon}}$. Ce facteur est ensuite utilisé pour calculer l'expression relative qui est égale à $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 3: Amorces utilisées pour la qPCR

Espèce	Transcrit	RefSeq	Séquences primers 5' →3'	Th (°C)	Taille amplicon (pb)
Souris	ARN 18S	NR_003278	For : GCCGCTAGAGGTGAAATTCT Rev : CATTCTGGCAAATGCTTTCG	60	129
Souris	TREK-1ex4	NM_010607	For : CCCAAGTCTGCTGCTCAGAACT Rev : ACGGTGGGTTTGAGGAGAAT	64	59
Souris	MOR (récepteur μ)	NM_001304955	For : TGTCGGAGAACTGAGAGC Rev : CCTGAACTGTGGAAGGAAGC	60	147
Humaine	β -actine	NM_001101	For : CTCCATCATGAAGTGTGACG Rev : TGCTTGGTGATCCACATCTG	59	240
Humaine	TREK-1	NM_001017424	For : CAACGTCACAGCCGAATTCA Rev : GGCCCGCTGGAACCTTGT	61	73

VII. Imagerie potassique

Des cellules PC3-luc ont étéensemencées dans des plaques 96 puits opaques à fond clair Greiner Poly-D-Lysine (PDL) à raison de 50 000 cellules par puits, puis laissées pour adhésion des cellules 24h. Le lendemain, les cellules sont traitées avec des doses croissantes de riluzole pendant 48h. Le dosage de canaux ioniques de potassium est effectué grâce au kit FluxOR™ (Thermofisher). Le jour du test, les cellules sont chargées avec un colorant FluxOR™ non fluorescent, spécifique au thallium pendant 1h à l'obscurité à 37°C. Le thallium a été préparé en plaque 96 puits à fond en V Greiner et des pointes FlexStation 3 (noires) ont été utilisées pour le transfert. L'expérience est réalisée en lecteur FlexStation3 en mode « flex » maintenu à 37°C. Les ions thallium ajoutés circulent librement à travers les canaux potassiques ouverts, agissant comme un substitut du K^+ . Lorsque le canal potassique est stimulé, le thallium s'écoule dans la

cellule et se lie au colorant FluxOR™, générant un signal fluorescent, proportionnel à l'activité du canal, dans des conditions physiologiques [Figure 59].

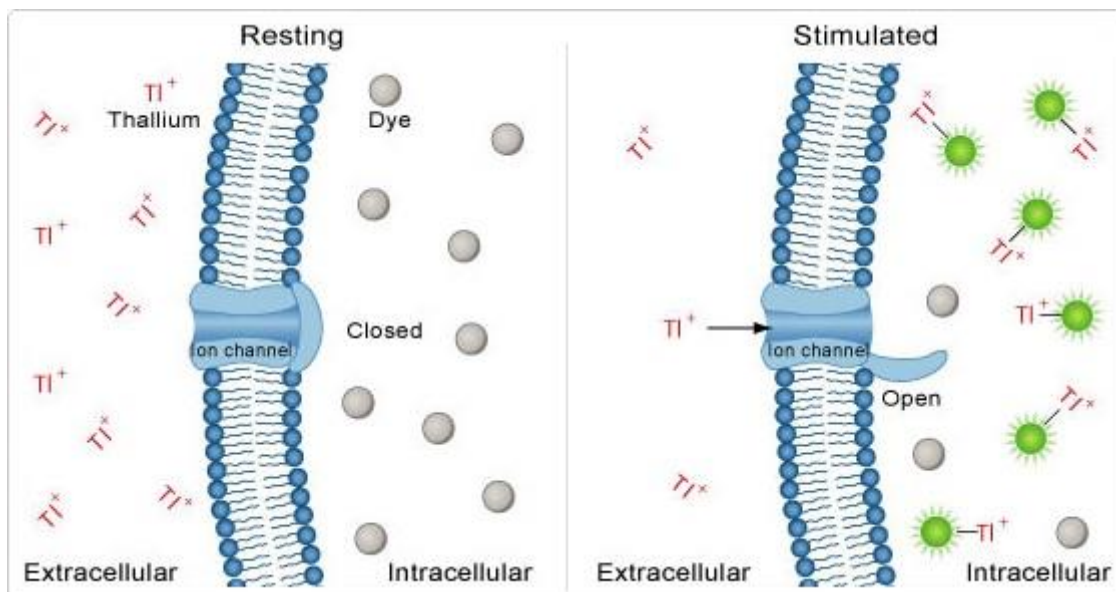


Figure 59 : Principe du test FluxOR™

La fluorescence basale des cellules chargées avec le colorant FluxOR™ est faible, comme indiqué dans le panneau de gauche, jusqu'à ce que les canaux potassiques soient stimulés. Lorsque le thallium est ajouté au test avec le stimulus, le thallium s'écoule vers le bas de son gradient de concentration dans les cellules, activant le colorant comme indiqué dans le panneau de droite (FluxOR Potassium Ion Channel Assay - FR n.d.).

La valeur de base du signal fluorescent est enregistrée pendant 20 secondes avant l'ajout de thallium, puis un enregistrement d'une minute par puit est réalisé après l'ajout de thallium. Le signal fluorescent après traitement avec des inhibiteurs de canaux K₂P, TEA à 20mM (Abcam), Quinine à 50μM (Sigma-Aldrich), Ruthénium red à 2μM (Tocris) et Carvedilol à 5μM (Tocris), est ainsi enregistré est rapporté sur la viabilité cellulaire obtenue par test de MTT à la suite de cette expérience (Sauter et al. 2016).

VIII. Electrophysiologie

Les expériences d'électrophysiologies sont réalisées au sein du laboratoire par le Dr. Mathieu Méleine.

Des cellules PC3 luciférase ont étéensemencées en boîtes de Petri de 35mm de diamètre 3 jours avant d'incuber les cellules avec les différents traitements (Riluzole 50μM, Spadine 1μM, Riluzole 50μM + Spadine 1μM ou véhicules) pendant 48h. Les potentiels de membrane au repos (V_m) et les courants en mode cellule entière ont été enregistrés à l'aide d'un amplificateur de type Axopatch 200B (Axon instruments) associé à une interface d'acquisition

de type Digidata 1440A (Axon Instruments). Le logiciel Clampex 8.2 a été utilisé pour les enregistrements de potentiels et de courants et les paramètres de stimulation. Les micropipettes d'enregistrement ont été réalisées par étirement de capillaires de borosilicate et avaient une résistance comprise entre 1,5 et 2,5 M Ω . La solution intracellulaire dont étaient remplies les micropipettes contenaient (en mM) : 130 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 4 MgATP, 0.4 NaGTP, 2 EGTA, 10 HEPES (pH 7.35 ajusté avec du KOH, Osmolarité 310 mOsm ajustée avec du sucrose). La solution extracellulaire contenait (en mM) : 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 D-Glucose, 10 HEPES (pH 7.4 ajusté avec du NaOH, Osmolarité 305mOsm ajustée avec du sucrose). Les données obtenues ont été filtrées à 1 kHz et enregistrées à une fréquence de 10 kHz. Pour les enregistrements de courants en mode cellule entière, un potentiel de maintien de -80mV était appliqué pendant 200 ms avant stimulation par une rampe de voltage allant de -100 à +60 mV pendant 400 ms puis le potentiel de maintien était de nouveau appliqué. Dix traces de courants ont été enregistrées pour chaque cellule et la moyenne des densités de courants à 0 mV a été calculée à l'aide du logiciel Clampfit.

IX. Imagerie calcique

Le kit FLIPR Calcium 6 (Molecular Devices) a été utilisé pour mesurer les flux de calcium dans les cellules PC3-luc. Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits opaques à fond clair Greiner PDL à raison de 50 000 cellules par puits, puis laissées pour adhésion 24h. Le lendemain, les cellules sont traitées avec des doses croissantes de riluzole pendant 48h. La veille du test, les solutions sont préparées ainsi : la solution de HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) contenait (en mM) : 1.3 CaCl₂, 0.5 MgCl₂-6H₂O, 0.4 MgSO₄-7H₂O, 5.3 KCl, 0.4 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 138 NaCl, 0.3 Na₂HPO₄-2H₂O, 5.6 D-Glucose, 20 HEPES (pH 7.5 ajusté avec du NaOH, Osmolarité 300 mOsm ajustée avec du sucrose), la solution de stimulation HBSS Ca²⁺ 10X était identique à la solution d'HBSS (seule la quantité de CaCl₂ est ajustée pour une concentration finale de 2 mM) et la solution d'HBSS Ca²⁺ free ne contenait pas de CaCl₂. Le jour de la manipulation, les traitements sont dilués dans les solutions de HBSS adéquat et mis à incuber avec la sonde du kit selon les recommandations du fabricant pendant 2h à 37°C. La plaque de composé est préparée avec 300 μ l/puits avec la solution de stimulation dans notre cas la solution d'HBSS Ca²⁺ 2mM. La lecture est effectuée en FlexStation3 en mode « flex » avec une lecture de fluorescence par le bas, à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 525 nm. Les cellules ont été stimulées avec une augmentation de concentration de Ca²⁺ extracellulaire à 2 mM avec 50 μ l/puits tandis que les changements d'intensité de fluorescence ont été suivis en temps réel. Les résultats obtenus sont

exprimés en delta de fluorescence sur la fluorescence basale des cellules pour la cinétique et le pic maximal de fluorescence a été obtenu grâce au logiciel SoftMax[®]Pro.

X. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 7.0. Par souci de clarté, le test statistique utilisé est indiqué dans la légende de chaque figure. Toutes les valeurs sont représentées sous la forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM).

PARTIE E : Références bibliographiques

- Abarca, Carolina et al. 2000. "Neurochemical Changes after Morphine, Dizocilpine or Riluzole in the Ventral Posterolateral Thalamic Nuclei of Rats with Hyperalgesia." *European Journal of Pharmacology* 403(1–2): 67–74.
- Abate-Shen, Cory, and Michael M. Shen. 2000. "Molecular Genetics of Prostate Cancer." *Genes and Development* 14(19): 2410–34.
- Alavanja, Michael C.R. et al. 2003. "Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort." *American Journal of Epidemiology* 157(9): 800–814.
- Albertsen, Peter C., James A. Hanley, and Judith Fine. 2005. "20-Year Outcomes Following Conservative Management of Clinically Localized Prostate Cancer." *Journal of the American Medical Association* 293(17): 2095–2101.
- Algarté-Génin, Michèle, Olivier Cussenot, and Pierre Costa. 2004. "Prevention of Prostate Cancer by Androgens: Experimental Paradox or Clinical Reality." *European Urology* 46(3): 285–95.
- Alloui, Abdelkrim et al. 2006. "TREK-1, a K⁺ Channel Involved in Polymodal Pain Perception." *EMBO Journal* 25(11): 2368–76.
- Alsibai, Kinan Drak, and Didier Meseure. 2018. "Significance of Tumor Microenvironment Scoring and Immune Biomarkers in Patient Stratification and Cancer Outcomes." In *Histopathology - An Update*, InTech.
- Amel Badri, Salma, Abdulazeez Salawu, and Janet E. Brown. 2019. "Bone Health in Men with Prostate Cancer: Review Article." *Current Osteoporosis Reports* 17(6): 527–37.
- Amundadottir, Laufey T. et al. 2006. "A Common Variant Associated with Prostate Cancer in European and African Populations." *Nature Genetics* 38(6): 652–58.
- Ardura, Juan A., Luis Álvarez-Carrión, Irene Gutiérrez-Rojas, and Verónica Alonso. 2020. "Role of Calcium Signaling in Prostate Cancer Progression: Effects on Cancer Hallmarks and Bone Metastatic Mechanisms." *Cancers* 12(5).
- Ayala, Gustavo E. et al. 2008. "Cancer-Related Axonogenesis and Neurogenesis in Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 14(23): 7593–7603.
- Balan, Sreekumar, Mansi Saxena, and Nina Bhardwaj. 2019. "Dendritic Cell Subsets and Locations." In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Elsevier Inc., 1–68.
- Basbaum, Allan I., Diana M. Bautista, Grégory Scherrer, and David Julius. 2009. "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain." *Cell* 139(2): 267–84.
- Bayliss, Douglas A., and Paula Q. Barrett. 2008. "Emerging Roles for Two-Pore-Domain Potassium Channels and Their Potential Therapeutic Impact." *Trends in Pharmacological Sciences* 29(11): 566–75.
- Benbrahim-Tallaa, Lamia, and Michael P. Waalkes. 2008. "Inorganic Arsenic and Human Prostate Cancer." *Environmental Health Perspectives* 116(2): 158–64.
- Bensimon, G., L. Lacomblez, and V. Meininger. 1994. "A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *New England Journal of Medicine* 330(9): 585–91.

- Berish, Richard B. et al. 2018. "Translational Models of Prostate Cancer Bone Metastasis." *Nature Reviews Urology* 15(7): 403–21.
- Berrier, Catherine et al. 2013. "The Purified Mechanosensitive Channel TREK-1 Is Directly Sensitive to Membrane Tension." *Journal of Biological Chemistry* 288(38): 27307–14.
- Berthold, Dominik R. et al. 2008. "Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer: Updated Survival in the TAX 327 Study." *Journal of Clinical Oncology* 26(2): 242–45.
- Binder-Foucard, F., A. Belot, and P. Delafosse. 2013. "Estimation Nationale de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1980 et 2012. Etude à Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim - Partie 1 : Tumeurs Solides." *Institut de Veille Sanitaire* (juillet): 122.
- Bissaro, Maicol et al. 2018. "Targeting Protein Kinase CK1 δ with Riluzole: Could It Be One of the Possible Missing Bricks to Interpret Its Effect in the Treatment of ALS from a Molecular Point of View?" *ChemMedChem* 13(24): 2601–5.
- Bissell, M. J., P. A. Kenny, and D. C. Radisky. 2005. "Microenvironmental Regulators of Tissue Structure and Function Also Regulate Tumor Induction and Progression: The Role of Extracellular Matrix and Its Degrading Enzymes." In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 343–56.
- Bjurholm, A., A. Kreicbergs, E. Brodin, and M. Schultzberg. 1988. "Substance P- and CGRP-Immunoreactive Nerves in Bone." *Peptides* 9(1): 165–71.
- Blackburn-Munro, Gordon, Nete Ibsen, and Helle K. Erichsen. 2002. "A Comparison of the Anti-Nociceptive Effects of Voltage-Activated Na⁺ Channel Blockers in the Formalin Test." *European Journal of Pharmacology* 445(3): 231–38.
- Blondeau, N., C. Widmann, M. Lazdunski, and C. Heurteaux. 2002. "Polyunsaturated Fatty Acids Induce Ischemic and Epileptic Tolerance." *Neuroscience* 109(2): 231–41.
- Boccon-Gibod, Laurent, Peter Iversen, and Bo Eric Persson. 2009. "Degarelix 240/80 Mg: A New Treatment Option for Patients with Advanced Prostate Cancer." *Expert Review of Anticancer Therapy* 9(12): 1737–43.
- De Bono, Johann Sebastian et al. 2010. "Prednisone plus Cabazitaxel or Mitoxantrone for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Progressing after Docetaxel Treatment: A Randomised Open-Label Trial." *The Lancet* 376(9747): 1147–54.
- Bosset, Pierre-Oliver, and Alexandre De la taille. 2020. "Chapitre 16 - Tumeurs de La Prostate | Urofrance." <https://www.urofrance.org/congres-et-formations/formation-initiale/referentiel-du-college/tumeurs-de-la-prostate.html> (November 23, 2020).
- Bostwick, David G. et al. 2004. "Human Prostate Cancer Risk Factors." *Cancer* 101(10 SUPPL.): 2371–2490.
- Bousset, Laura et al. 2020. "Absence of Nuclear Receptors LXR α Impairs Immune Response to Androgen Deprivation and Leads to Prostate Neoplasia." *PLoS Biology* 18(12).

- Brazill, Jennifer M. et al. 2019. "Nerves in Bone: Evolving Concepts in Pain and Anabolism." *Journal of Bone and Mineral Research* 34(8): 1393–1406.
- Brookman-May, Sabine D. et al. 2019. "Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU)." *European Urology Focus* 5(5): 756–87.
- Buckler, Keith J., and E. Honoré. 2005. "The Lipid-Activated Two-Pore Domain K⁺ Channel TREK-1 Is Resistant to Hypoxia: Implication for Ischaemic Neuroprotection." *Journal of Physiology* 562(1): 213–22.
- Bussard, Karen M., Carol V. Gay, and Andrea M. Mastro. 2008. "The Bone Microenvironment in Metastasis; What Is Special about Bone?" *Cancer and Metastasis Reviews* 27(1): 41–55.
- Busserolles, Jérôme et al. 2020. "TREK1 Channel Activation as a New Analgesic Strategy Devoid of Opioid Adverse Effects." *British Journal of Pharmacology* 177(20): 4782–95.
- Cadaveira-Mosquera, Alba et al. 2011. "Activation of TREK Currents by the Neuroprotective Agent Riluzole in Mouse Sympathetic Neurons." *Journal of Neuroscience* 31(4): 1375–85.
- Cain, Stuart M., Helen J. Meadows, John Dunlop, and Trevor J. Bushell. 2008. "mGlu4 Potentiation of K2P2.1 Is Dependent on C-Terminal Dephosphorylation." *Molecular and Cellular Neuroscience* 37(1): 32–39.
- Calvo, Wenceslao, and Jerónimo Forteza-Vila. 1969. "On the Development of Bone Marrow Innervation in New-born Rats as Studied with Silver Impregnation and Electron Microscopy,." *American Journal of Anatomy* 126(3): 355–71.
- Chantôme, Aurélie et al. 2013. "Pivotal Role of the Lipid Raft SK3-Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases." *Cancer Research* 73(15): 4852–61.
- Chapitre I Les Os I. FONCTIONS ET ANATOMIE DES OS.*
- Chappard, Daniel et al. 2003. "Pathophysiology of Bone Metastases." *Progres en Urologie* 13(2 SUPPL. 1): 9–17.
- Chavarro, Jorge E. et al. 2008. "A Prospective Study of Trans-Fatty Acid Levels in Blood and Risk of Prostate Cancer." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 17(1): 95–101.
- Chemin, Jean et al. 2007. "Regulation of the Mechano-Gated K2P Channel TREK-1 by Membrane Phospholipids." In *Current Topics in Membranes*, Academic Press Inc., 155–70.
- Chew, Daniel J., Thomas Carlstedt, and Peter J. Shortland. 2014. "The Effects of Minocycline or Riluzole Treatment on Spinal Root Avulsion-Induced Pain in Adult Rats." *Journal of Pain* 15(6): 664–75.
- Chimal-Ramírez, G. K., N. A. Espinoza-Sánchez, and E. M. Fuentes-Pananá. 2013. "Protumor Activities of the Immune Response: Insights in the Mechanisms of Immunological Shift, Oncotraining, and Oncopromotion." *Journal of Oncology*.
- Coderre, T. J., N. Kumar, C. D. Lefebvre, and J. S.C. Yu. 2007. "A Comparison of the Glutamate

- Release Inhibition and Anti-Allodynic Effects of Gabapentin, Lamotrigine, and Riluzole in a Model of Neuropathic Pain.” *Journal of Neurochemistry* 100(5): 1289–99.
- Coleman, Robert E. et al. 2020. “Bone Metastases.” *Nature Reviews Disease Primers* 6(1): 1–28.
- “Collège Français Des Urologues.”
http://campus.cerimes.fr/urologie/enseignement/urologie_9/site/html/5_3.html (November 24, 2020).
- Comoglio, Yannick et al. 2014. “Phospholipase D2 Specifically Regulates TREK Potassium Channels via Direct Interaction and Local Production of Phosphatidic Acid.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(37): 13547–52.
- Cornford, Philip et al. 2017. “EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer.” *European Urology* 71(4): 630–42.
- Costanza, Brunella et al. 2017. “Stromal Modulators of TGF- β in Cancer.” *Journal of Clinical Medicine* 6(1): 7.
- Cowin, S. C., and D. H. Hegedus. 1976. “Bone Remodeling I: Theory of Adaptive Elasticity.” *Journal of Elasticity* 6(3): 313–26.
- Crowe, Francesca L. et al. 2008. “Fatty Acid Composition of Plasma Phospholipids and Risk of Prostate Cancer in a Case-Control Analysis Nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.” *American Journal of Clinical Nutrition* 88(5): 1353–63.
- Dalod, Marc, Rabie Chelbi, Bernard Malissen, and Toby Lawrence. 2014. “Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization through Signaling Specificity and Transcriptional Programming.” *EMBO Journal* 33(10): 1104–16.
- Dedman, Alexandra et al. 2009. “The Mechano-Gated K2P Channel TREK-1.” *European Biophysics Journal* 38(3): 293–303.
- Defossez, Gautier et al. 2019. “Estimation Nationale de l’incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1990 et 2018. Étude à Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim. Résultats Préliminaires. Synthèse.” *Saint Maurice : Santé publique France*: 20.
- Dejos, Camille, Dimitra Gkika, and Anna Rita Cantelmo. 2020. “The Two-Way Relationship Between Calcium and Metabolism in Cancer.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Denis, L. 1998. “European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Prostate Cancer Trials, 1976 - 1996.” *Urology* 51(5 SUPPL. A): 50–57.
- Descoeur, Juliette et al. 2011. “Oxaliplatin-Induced Cold Hypersensitivity Is Due to Remodelling of Ion Channel Expression in Nociceptors.” *EMBO Molecular Medicine* 3(5): 266–78.
- Deuis, Jennifer R., Lucie S. Dvorakova, and Irina Vetter. 2017. “Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 284.
- Devilliers, Maïly et al. 2013. “Activation of TREK-1 by Morphine Results in Analgesia without Adverse Side Effects.” *Nature Communications* 4.

- Djillani, Alaeddine, Mariel Pietri, et al. 2019. "Fighting against Depression with TREK-1 Blockers: Past and Future. A Focus on Spadin." *Pharmacology and Therapeutics* 194: 185–98.
- Djillani, Alaeddine, Jean Mazella, Catherine Heurteaux, and Marc Borsotto. 2019. "Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System." *Frontiers in Pharmacology* 10(APR): 379.
- Dolfi, Sonia C. et al. 2017. "Riluzole Exerts Distinct Antitumor Effects from a Metabotropic Glutamate Receptor 1-Specific Inhibitor on Breast Cancer Cells." *Oncotarget* 8(27): 44639–53.
- Donovan-Rodriguez, T., A. H. Dickenson, and C. E. Urch. 2004. "Superficial Dorsal Horn Neuronal Responses and the Emergence of Behavioural Hyperalgesia in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain." *Neuroscience Letters* 360(1–2): 29–32.
- Donovan-Rodriguez, Tansy, Anthony H. Dickenson, and Catherine E. Urch. 2005. "Gabapentin Normalizes Spinal Neuronal Responses That Correlate with Behavior in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain." *Anesthesiology* 102(1): 132–40.
- Drak Alsibai, Kinan, and Didier Meseure. 2018. "Tumor Microenvironment and Noncoding RNAs as Co-Drivers of Epithelial–Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis." *Developmental Dynamics* 247(3): 405–31.
- Driscoll, Shirley G., and Stephanie H. Taylor. 1980. "Effects of Prenatal Maternal Estrogen on the Male Urogenital System." *Obstetrics and Gynecology* 56(5): 537–42.
- Duprat, Fabrice et al. 2000. *The Neuroprotective Agent Riluzole Activates the Two P Domain K Channels TREK-1 and TRAAK*.
- Eichmann, Anne, and Jean Léon Thomas. 2013. "Molecular Parallels between Neural and Vascular Development." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(1).
- Elghany, Naima Abd et al. 1990. "Occupation, Cadmium Exposure, and Prostate Cancer." *Epidemiology* 1(2): 107–15.
- Enyeart, John J., Lin Xu, Sanjay Danthi, and Judith A. Enyeart. 2002. "An ACTH- and ATP-Regulated Background K⁺ Channel in Adrenocortical Cells Is TREK-1." *Journal of Biological Chemistry* 277(51): 49186–99.
- Erben, Larissa, and Andres Buonanno. 2019. "Detection and Quantification of Multiple RNA Sequences Using Emerging Ultrasensitive Fluorescent In Situ Hybridization Techniques." *Current Protocols in Neuroscience* 87(1).
- Fainaru, Ofer et al. 2010. "Tumor Growth and Angiogenesis Are Dependent on the Presence of Immature Dendritic Cells." *The FASEB Journal* 24(5): 1411–18.
- Falcão de Campos, Catarina, and Mamede de Carvalho. 2017. "Riluzole-Induced Recurrent Pancreatitis." *Journal of Clinical Neuroscience* 45: 153–54.
- Fang, Yongkang et al. 2017. "Deficiency of TREK-1 Potassium Channel Exacerbates Secondary Injury Following Spinal Cord Injury in Mice." *Journal of Neurochemistry* 141(2): 236–46.
- Farooq, Muhammad Tahir et al. 2017. "Automatic Gleason Grading of Prostate Cancer Using Gabor

- Filter and Local Binary Patterns.” In *2017 40th International Conference on Telecommunications and Signal Processing, TSP 2017*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 642–45.
- Fizazi, Karim et al. 2011. “Denosumab versus Zoledronic Acid for Treatment of Bone Metastases in Men with Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomised, Double-Blind Study.” *The Lancet* 377(9768): 813–22.
- “FluxOR Potassium Ion Channel Assay - FR.”
- Fradet, Anaïs et al. 2013. “A New Murine Model of Osteoblastic/Osteolytic Lesions from Human Androgen-Resistant Prostate Cancer.” *PLoS ONE* 8(9): e75092.
- Franks, Nicholas P., and Eric Honoré. 2004. “The TREK K 2P Channels and Their Role in General Anaesthesia and Neuroprotection.” *Trends in Pharmacological Sciences* 25(11): 601–8.
- Friedl, Peter, and Katarina Wolf. 2003. “Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms.” *Nature Reviews Cancer* 3(5): 362–74.
- Furesi, Giulia, Martina Rauner, and Lorenz C. Hofbauer. 2020. “Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication.” *Trends in Cancer* 0(0).
- Gartrell, Benjamin A. et al. 2014. “Toxicities Following Treatment with Bisphosphonates and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Inhibitors in Patients with Advanced Prostate Cancer.” *European Urology* 65(2): 278–86.
- Ghajar, Cyrus M. et al. 2013. “The Perivascular Niche Regulates Breast Tumour Dormancy.” *Nature Cell Biology* 15(7): 807–17.
- Gleason, D. F., G. T. Mellinger, and L. J. Ardvig. 1974. “Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging.” *Journal of Urology* 111(1): 58–64.
- Goblirsch, Michael J. et al. 2006. “Biology of Bone Cancer Pain.” *Clinical Cancer Research* 12(20 PART 2).
- Goc, Jérémy, Wolf Herman Fridman, Catherine Sautès-Fridman, and Marie Caroline Dieu-Nosjean. 2013. “Characteristics of Tertiary Lymphoid Structures in Primary Cancers.” *OncoImmunology* 2(12): 1–9.
- Goel, Shom, Andus Hon Kit Wong, and Rakesh K. Jain. 2012. “Vascular Normalization as a Therapeutic Strategy for Malignant and Nonmalignant Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(3).
- Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, and Zena Werb. 2018. “Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression.” *Genes and Development* 32(19–20): 1267–84.
- Groeneveld, G. J. et al. 2008. “An Association Study of Riluzole Serum Concentration and Survival and Disease Progression in Patients with ALS.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83(5): 718–22.
- Gross, E. 2011. “Radiothérapie Conformationnelle Du Cancer de Prostate.” *Progres en Urologie* 21(11): 801–7.

- Gruss, Marco et al. 2004. "Two-Pore-Domain K⁺ Channels Are a Novel Target for the Anesthetic Gases Xenon, Nitrous Oxide, and Cyclopropane." *Molecular Pharmacology* 65(2): 443–52.
- Grytli, Helene Hartvedt, Morten Wang Fagerland, Sophie D. Fosså, and Kristin Austlid Taskén. 2014. "Association Between Use of β -Blockers and Prostate Cancer-Specific Survival: A Cohort Study of 3561 Prostate Cancer Patients with High-Risk or Metastatic Disease." *European Urology* 65(3): 635–41.
- Guedon, Jean-Marc G. et al. 2016. "Dissociation between the Relief of Skeletal Pain Behaviors and Skin Hypersensitivity in a Model of Bone Cancer Pain." *PAIN* 157(6): 1239–47.
- Gurney, M E et al. 1996. "Benefit of Vitamin E, Riluzole, and Gabapentin in a Transgenic Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of neurology* 39(2): 147–57.
- Hainsworth, Atticus H. et al. 2000. "Sipatrigine (BW 619C89) Is a Neuroprotective Agent and a Sodium Channel and Calcium Channel Inhibitor." *CNS Drug Reviews* 6(2): 111–34.
- Halvorson, Kyle G. et al. 2005. "A Blocking Antibody to Nerve Growth Factor Attenuates Skeletal Pain Induced by Prostate Tumor Cells Growing in Bone." *Cancer Research* 65(20): 9426–35.
- Hama, Aldric, and Jacqueline Sagen. 2011. "Antinociceptive Effect of Riluzole in Rats with Neuropathic Spinal Cord Injury Pain." *Journal of Neurotrauma* 28(1): 127–34.
- Hamdi, Ouns. 2018. "Cancer de La Prostate: Fausse Polémique Du Radium 223?" <https://sante.lefigaro.fr/article/cancer-de-la-prostate-fausse-polemique-du-radium-223/> (November 24, 2020).
- Han, Hyo Jo et al. 2016. "Enhanced Expression of TREK-1 Is Related with Chronic Constriction Injury of Neuropathic Pain Mouse Model in Dorsal Root Ganglion." *Biomolecules and Therapeutics* 24(3): 252–59.
- Hanahan, Douglas, and Lisa M. Coussens. 2012. "Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment." *Cancer Cell* 21(3): 309–22.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5): 646–74.
- Haute Autorité de Santé. 2014.
- Heidenreich, Axel et al. 2008. "EAU Guidelines on Prostate Cancer." *European Urology* 53(1): 68–80.
- Heurteaux, C. et al. 2004. "TREK-1, a K⁺ Channel Involved in Neuroprotection and General Anesthesia." *EMBO Journal* 23(13): 2684–95.
- Heurteaux, Catherine et al. 2006. "Deletion of the Background Potassium Channel TREK-1 Results in a Depression-Resistant Phenotype." *Nature Neuroscience* 9(9): 1134–41.
- Honoré, Eric. 2007. "The Neuronal Background K⁺ Channels: Focus on TREK1." *Nature Reviews Neuroscience* 8(4): 251–61.
- Honoré, Eric, François Maingret, Michel Lazdunski, and Amanda Jane Patel. 2002. "An Intracellular Proton Sensor Commands Lipid- and Mechano-Gating of the K⁺ Channel TREK-1." *EMBO Journal* 21(12): 2968–76.

- Honore, P. et al. 2000. "Murine Models of Inflammatory, Neuropathic and Cancer Pain Each Generates a Unique Set of Neurochemical Changes in the Spinal Cord and Sensory Neurons." *Neuroscience* 98(3): 585–98.
- Honore, Prisca, and Patrick W. Mantyh. 2000. "Bone Cancer Pain: From Mechanism to Model to Therapy." *Pain Medicine* 1(4): 303–9.
- Hu, Shanbiao et al. 2018. "CAV3.1 Knockdown Suppresses Cell Proliferation, Migration and Invasion of Prostate Cancer Cells by Inhibiting AKT." *Cancer Management and Research* 10: 4603–14.
- Hurwitz, A. A. et al. 2001. "The TRAMP Mouse as a Model for Prostate Cancer." *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 20.
- Huynh-Le, Minh Phuong, Randall C. Shults, Michael J. Connor, and Jona A. Hattangadi-Gluth. 2020. "Adverse Events Associated With Radium-223 in Metastatic Prostate Cancer: Disproportionality Analysis of FDA Data Reflecting Worldwide Utilization." *Clinical Genitourinary Cancer* 18(3): 192-200.e2.
- Ilan, Neta, Michael Elkin, and Israel Vlodavsky. 2006. "Regulation, Function and Clinical Significance of Heparanase in Cancer Metastasis and Angiogenesis." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38(12): 2018–39.
- Ingber, Donald E. 2003. "Tensegrity I. Cell Structure and Hierarchical Systems Biology." *Journal of Cell Science* 116(7): 1157–73.
- "Institut National Du Cancer." 2020a. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-prostate> (November 6, 2020).
- . 2020b. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-prostate/Diagnostic-et-bilan-initial> (November 16, 2020).
- Ippolito, Luigi et al. 2019. "Cancer-Associated Fibroblasts Promote Prostate Cancer Malignancy via Metabolic Rewiring and Mitochondrial Transfer." *Oncogene* 38(27): 5339–55.
- Isaacsson Velho, Pedro, and Emmanuel S. Antonarakis. 2018. "PD-1/PD-L1 Pathway Inhibitors in Advanced Prostate Cancer." *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11(5): 475–86.
- Jack, R. H., E. A. Davies, and H. Møller. 2007. "Testis and Prostate Cancer Incidence in Ethnic Groups in South East England." *International Journal of Andrology* 30(4): 215–21.
- Jimenez-Andrade, Juan M. et al. 2007. "Nerve Growth Factor Sequestering Therapy Attenuates Non-Malignant Skeletal Pain Following Fracture." *Pain* 133(1): 183–96.
- . 2010. "Pathological Sprouting of Adult Nociceptors in Chronic Prostate Cancer-Induced Bone Pain." *Journal of Neuroscience* 30(44): 14649–56.
- Jimenez-Andrade, Juan Miguel et al. 2010. "Bone Cancer Pain." In *Annals of the New York Academy of Sciences*, Blackwell Publishing Inc., 173–81.
- . 2011. "Preventive or Late Administration of Anti-NGF Therapy Attenuates Tumor-Induced Nerve Sprouting, Neuroma Formation, and Cancer Pain." *Pain* 152(11): 2564–74.
- Joniau, S., L. Goeman, J. Pennings, and H. Van Poppel. 2005. "Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN):

- Importance and Clinical Management.” *European Urology* 48(3): 379–85.
- Joshua, A. M. et al. 2008. “Prostatic Preneoplasia and Beyond.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1785(2): 156–81.
- Kamal, Tania et al. 2015. “Inhibition of Glutamate Regulated Calcium Entry into Leukemic Megakaryoblasts Reduces Cell Proliferation and Supports Differentiation.” *Cellular Signalling* 27(9): 1860–72.
- Kang, Dawon, and Donghee Kim. 2006. “TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) Are Major Background K⁺ Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 291(1).
- Kerckhove, Nicolas et al. 2019. “Effectiveness Assessment of Riluzole in the Prevention of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy: RILUZOX-01: Protocol of a Randomised, Parallel, Controlled, Double-Blind and Multicentre Study by the UNICANCER-AFSOS Supportive Care Intergroup.” *BMJ Open* 9(6).
- Kim, Eunju et al. 2010. “Enhancement of TREK1 Channel Surface Expression by Protein-Protein Interaction with β -COP.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395(2): 244–50.
- Kim, Jin Man et al. 2018. “MacroH2A1.2 Inhibits Prostate Cancer-Induced Osteoclastogenesis through Cooperation with HP1 α and H1.2.” *Oncogene* 37(43): 5749–65.
- Klopp, Ann H. et al. 2011. “Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth?” *Stem Cells* 29(1): 11–19.
- Klotz, Laurence. 2006. “Combined Androgen Blockade: An Update.” *Urologic Clinics of North America* 33(2): 161–66.
- Knerr, Kerstin, Karin Ackermann, Tanja Neidhart, and Walter Pyerin. 2004. “Bone Metastasis: Osteoblasts Affect Growth and Adhesion Regulons in Prostate Tumor Cells and Provoke Osteomimicry.” *International Journal of Cancer* 111(1): 152–59.
- Kojima, Yasushi et al. 2010. “Autocrine TGF- β and Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) Signaling Drives the Evolution of Tumor-Promoting Mammary Stromal Myofibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(46): 20009–14.
- Kok, D. E.G. et al. 2011. “Blood Lipid Levels and Prostate Cancer Risk; A Cohort Study.” *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 14(4): 340–45.
- Koochekpour, Shahriar et al. 2012. “Serum Glutamate Levels Correlate with Gleason Score and Glutamate Blockade Decreases Proliferation, Migration, and Invasion and Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells.” *Clinical Cancer Research* 18(21): 5888–5901.
- Krueger, Timothy E. et al. 2019. “Tumor-Infiltrating Mesenchymal Stem Cells: Drivers of the Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Prostate Cancer?” *Prostate* 79(3): 320–30.
- Kucharczyk, Mateusz W. et al. 2020. “The Impact of Bone Cancer on the Peripheral Encoding of Mechanical Pressure Stimuli.” *Pain* 161(8): 1894–1905.

- Kumar, Vinayak, and Brandon A. Mahal. 2012. "NGF - The TrkA to Successful Pain Treatment." *Journal of Pain Research* 5: 279–87.
- La, Jun Ho, and G. F. Gebhart. 2011. "Colitis Decreases Mechanosensitive K2p Channel Expression and Function in Mouse Colon Sensory Neurons." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 301(1).
- Lang-Lazdunski, Loïc et al. 2003. "Linolenic Acid Prevents Neuronal Cell Death and Paraplegia after Transient Spinal Cord Ischemia in Rats." *Journal of Vascular Surgery* 38(3): 564–75.
- Larionova, Irina et al. 2020. "Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers." *Frontiers in Oncology* 10: 1.
- Lauritzen, Inger et al. 2000. "Polyunsaturated Fatty Acids Are Potent Neuroprotectors." *EMBO Journal* 19(8): 1784–93.
- . 2005. "Cross-Talk between the Mechano-Gated K2P Channel TREK-1 and the Actin Cytoskeleton." *EMBO Reports* 6(7): 642–48.
- Le, Maithao N. et al. 2010. "The Glutamate Release Inhibitor Riluzole Decreases Migration, Invasion, and Proliferation of Melanoma Cells." *Journal of Investigative Dermatology* 130(9): 2240–49.
- Lesage, Florian et al. 1996. "TWIK-1, a Ubiquitous Human Weakly Inward Rectifying K⁺ Channel with a Novel Structure." *EMBO Journal* 15(5): 1004–11.
- Lesage, Florian, and Michel Lazdunski. 2000. "Molecular and Functional Properties of Two-Pore-Domain Potassium Channels." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 279(5 48-5).
- "Leuprolide versus Diethylstilbestrol for Metastatic Prostate Cancer." 1984. *New England Journal of Medicine* 311(20): 1281–86.
- Levitz, Joshua et al. 2016. "Heterodimerization within the TREK Channel Subfamily Produces a Diverse Family of Highly Regulated Potassium Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(15): 4194–99.
- Liao, Sally et al. 2017. "Osteosarcoma Cell Proliferation and Survival Requires MGluR5 Receptor Activity and Is Blocked by Riluzole." *PLoS ONE* 12(2).
- Liou, Ying Jay et al. 2009. "Support for the Involvement of the KCNK2 Gene in Major Depressive Disorder and Response to Antidepressant Treatment." *Pharmacogenetics and Genomics* 19(10): 735–41.
- Litt, Annexes Glossaire. 2013. "Haute Autorité de Santé."
- Liu, Zhiqiang et al. 2020. "A Novel Immunocompetent Model of Metastatic Prostate Cancer-Induced Bone Pain." *Prostate* 80(10): 782–94.
- Locati, Massimo, Graziella Curtale, and Alberto Mantovani. 2020. "Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 15: 123–47.
- Lozano-Ondoua, Alysia N. et al. 2013. "Disease Modification of Breast Cancer-Induced Bone Remodeling by Cannabinoid 2 Receptor Agonists." *Journal of Bone and Mineral Research* 28(1):

92–107.

- Luger, Nancy M. et al. 2002. “Efficacy of Systemic Morphine Suggests a Fundamental Difference in the Mechanisms That Generate Bone Cancer vs. Inflammatory Pain.” *Pain* 99(3): 397–406.
- Lutz, Stephen et al. 2011. “Palliative Radiotherapy for Bone Metastases: An ASTRO Evidence-Based Guideline.” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 79(4): 965–76.
- Mach, D. B. et al. 2002. “Origins of Skeletal Pain: Sensory and Sympathetic Innervation of the Mouse Femur.” *Neuroscience* 113(1): 155–66.
- Magnon, Claire et al. 2013. “Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression.” *Science* 341(6142).
- . 2015. “Role of the Autonomic Nervous System in Tumorigenesis and Metastasis.” *Molecular and Cellular Oncology* 2(2).
- Maingret, François, Eric Honoré, Michel Lazdunski, and Amanda Jane Patel. 2002. “Molecular Basis of the Voltage-Dependent Gating of TREK-1, a Mechano-Sensitive K⁺ Channel.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292(2): 339–46.
- Majuta, Lisa A. et al. 2017. “Mice with Cancer-Induced Bone Pain Show a Marked Decline in Day/Night Activity.” *Pain Reports* 2(5).
- Mantovani, Alberto et al. 2002. “Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes.” *Trends in Immunology* 23(11): 549–55.
- Mantyh, Patrick. 2013. “Bone Cancer Pain: Causes, Consequences, and Therapeutic Opportunities.” *Pain*: S54-62.
- Mantyh, Patrick W. 2014a. “Bone Cancer Pain: From Mechanism to Therapy.” *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 8(2): 83–90.
- . 2014b. “The Neurobiology of Skeletal Pain.” *European Journal of Neuroscience* 39(3): 508–19.
- . 2019. “Mechanisms That Drive Bone Pain across the Lifespan.” *British Journal of Clinical Pharmacology* 85(6): 1103–13.
- Maryanovich, Maria, Shoichiro Takeishi, and Paul S. Frenette. 2018. “Neural Regulation of Bone and Bone Marrow.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8(9).
- Mathie, Alistair. 2007. “Neuronal Two-Pore-Domain Potassium Channels and Their Regulation by G Protein-Coupled Receptors.” *Journal of Physiology* 578(2): 377–85.
- Mauffrey, Philippe et al. 2019. “Progenitors from the Central Nervous System Drive Neurogenesis in Cancer.” *Nature* 569(7758): 672–78.
- Mazella, Jean et al. 2010. “Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design.” *PLoS Biology* 8(4).
- McDonald, Donald M., and Peter L. Choyke. 2003. “Imaging of Angiogenesis: From Microscope to Clinic.” *Nature Medicine* 9(6): 713–25.
- Meadows, H. J. et al. 2001. “The Neuroprotective Agent Sipatrigine (BW619C89) Potently Inhibits the

- Human Tandem Pore-Domain K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK.” *Brain Research* 892(1): 94–101.
- Medhurst, Andrew D. et al. 2001. “Distribution Analysis of Human Two Pore Domain Potassium Channels in Tissues of the Central Nervous System and Periphery.” *Molecular Brain Research* 86(1–2): 101–14.
- Mercadante, Sebastiano. 1997. “Malignant Bone Pain: Pathophysiology and Treatment.” *Pain* 69(1–2): 1–18.
- Merz, Constanze et al. 2016. “IL-6 Overexpression in ERG-Positive Prostate Cancer Is Mediated by Prostaglandin Receptor EP2.” *American Journal of Pathology* 186(4): 974–84.
- Meseure, Didier, Kinan Drak Alsibai, and Andre Nicolas. 2014. “Pivotal Role of Pervasive Neoplastic and Stromal Cells Reprogramming in Circulating Tumor Cells Dissemination and Metastatic Colonization.” *Cancer Microenvironment* 7(3): 95–115.
- Mi Hwang, Eun et al. 2014. “A Disulphide-Linked Heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 Mediates Passive Conductance in Astrocytes.” *Nature Communications* 5.
- Michaelis, M. 1996. “Silent Afferents: A Separate Class of Primary Afferents?” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23(2): 99–105.
- Michigan, University of. 2011. “Prostate Cancer Spreads to Bones by Overtaking the Home of Blood Stem Cells | EurekAlert! Science News.” https://www.eurekalert.org/pub_releases/2011-03/uom-pcs032311.php (December 15, 2020).
- Monaghan, Kevin et al. 2011. “The Stretch-Dependent Potassium Channel TREK-1 and Its Function in Murine Myometrium.” *Journal of Physiology* 589(5): 1221–33.
- Moreno-Jiménez, Elena P. et al. 2019. “Adult Hippocampal Neurogenesis Is Abundant in Neurologically Healthy Subjects and Drops Sharply in Patients with Alzheimer’s Disease.” *Nature Medicine* 25(4): 554–60.
- Morrissey, Colm, and Robert L. Vessella. 2007. “The Role of Tumor Microenvironment in Prostate Cancer Bone Metastasis.” *Journal of Cellular Biochemistry* 101(4): 873–86.
- Mottet, Nicolas, and Jacques Irani. 2008. “Place de La Surveillance Active Dans Le Cancer de La Prostate : Présentation Du Protocole Français.” *Progrès en Urologie - FMC* 18(4): F12–16.
- El Mouedden, Mohammed, and Theo Frans Meert. 2007. “The Impact of the Opioids Fentanyl and Morphine on Nociception and Bone Destruction in a Murine Model of Bone Cancer Pain.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87(1): 30–40.
- Msaouel, Pavlos, Nikos Pissimissis, Antonios Halapas, and Michael Koutsilieris. 2008. “Mechanisms of Bone Metastasis in Prostate Cancer: Clinical Implications.” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 22(2): 341–55.
- Murbartián, Janet, Qiubo Lei, Julianne J. Sando, and Douglas A. Bayliss. 2005. “Sequential Phosphorylation Mediates Receptor- and Kinase-Induced Inhibition of TREK-1 Background Potassium Channels.” *Journal of Biological Chemistry* 280(34): 30175–84.

- Nakouzi, Nader Al et al. 2012. "The IGR-CaP1 Xenograft Model Recapitulates Mixed Osteolytic/Blastic Bone Lesions Observed in Metastatic Prostate Cancer." *Neoplasia (United States)* 14(5): 376–87.
- Namkoong, J. et al. 2007. "Metabotropic Glutamate Receptor 1 and Glutamate Signaling in Human Melanoma." *Cancer Research* 67(5): 2298–2305.
- Navarro, Rocío, Marta Compte, Luis Álvarez-Vallina, and Laura Sanz. 2016. "Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity." *Frontiers in Immunology* 7(NOV).
- Noël, Jacques et al. 2009. "The Mechano-Activated K[±] Channels TRAAK and TREK-1 Control Both Warm and Cold Perception." *EMBO Journal* 28(9): 1308–18.
- Noël, Jacques, Guillaume Sandoz, and Florian Lesage. 2011. "Molecular Regulations Governing TREK and TRAAK Channel Functions." *Channels* 5(5).
- Nombela, Paz et al. 2019. "BRCA2 and Other DDR Genes in Prostate Cancer." *Cancers* 11(3).
- Ogunlewe, J. O., and D. N. Osegbe. 1989. "Zinc and Cadmium Concentrations in Indigenous Blacks with Normal, Hypertrophic, and Malignant Prostate." *Cancer* 63(7): 1388–92.
- Olschewski, Andrea et al. 2017. "TASK-1 (KCNK3) Channels in the Lung: From Cell Biology to Clinical Implications." *European Respiratory Journal* 50(5).
- Ostrand-Rosenberg, Suzanne. 2008. "Immune Surveillance: A Balance between Protumor and Antitumor Immunity." *Current Opinion in Genetics and Development* 18(1): 11–18.
- Paget, Stephen. 1889. "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST." *The Lancet* 133(3421): 571–73.
- Patel, Amanda J. et al. 1998. "A Mammalian Two Pore Domain Mechano-Gated S-like K⁺ Channel." *EMBO Journal* 17(15): 4283–90.
- . 1999. "Inhalational Anesthetics Activate Two-Pore-Domain Background K⁺ Channels." *Nature Neuroscience* 2(5): 422–26.
- Patel, Amanda J., and Eric Honoré. 2001. "Properties and Modulation of Mammalian 2P Domain K⁺ Channels." *Trends in Neurosciences* 24(6): 339–46.
- Pereira, A. C. et al. 2017. "Age and Alzheimer's Disease Gene Expression Profiles Reversed by the Glutamate Modulator Riluzole." *Molecular Psychiatry* 22(2): 296–305.
- Pereira, Vanessa et al. 2014. "Role of the TREK2 Potassium Channel in Cold and Warm Thermosensation and in Pain Perception." *Pain* 155(12): 2534–44.
- Perlis, Roy H. et al. 2008. "Pharmacogenetic Analysis of Genes Implicated in Rodent Models of Antidepressant Response: Association of TREK1 and Treatment Resistance in the STAR*D Study." *Neuropsychopharmacology* 33(12): 2810–19.
- Peyronnet, Rémi et al. 2012. "Mechanoprotection by Polycystins against Apoptosis Is Mediated through the Opening of Stretch-Activated K₂P Channels." *Cell Reports* 1(3): 241–50.
- Piechotta, Paula L. et al. 2011. "The Pore Structure and Gating Mechanism of K₂P Channels." *EMBO Journal* 30(17): 3607–19.

- Pietri, Mariel et al. 2019. “First Evidence of Protective Effects on Stroke Recovery and Post-Stroke Depression Induced by Sortilin-Derived Peptides.” *Neuropharmacology* 158: 107715.
- Pineda, Ricardo H. et al. 2017. “Altered Expression and Modulation of the Two-Pore-Domain (K2p) Mechanogated Potassium Channel TREK-1 in Overactive Human Detrusor.” *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 313(2): F535–46.
- Pommier, P. et al. 2016. “Curiethérapie Des Cancers de La Prostate.” *Cancer/Radiotherapie* 20: S210–15.
- Poupon, Laura et al. 2018. “Targeting the TREK-1 Potassium Channel via Riluzole to Eliminate the Neuropathic and Depressive-like Effects of Oxaliplatin.” *Neuropharmacology* 140: 43–61.
- Power, Carl A. et al. 2009. “A Novel Model of Bone-Metastatic Prostate Cancer in Immunocompetent Mice.” *Prostate* 69(15): 1613–23.
- Prager-Khoutorsky, Masha, Arkady Khoutorsky, and Charles W. Bourque. 2014. “Unique Interweaved Microtubule Scaffold Mediates Osmosensory Transduction via Physical Interaction with TRPV1.” *Neuron* 83(4): 866–78.
- Prato, Vincenzo et al. 2017. “Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive ‘Silent’ Nociceptors.” *Cell Reports* 21(11): 3102–15.
- Prins, G. S. 2001. “Erratum: Estrogen Imprinting of the Developing Prostate Gland Is Mediated through Stromal Estrogen Receptor α : Studies with AERKO and BERKO Mice (Cancer Research (August 15, 2001) (6089-6097)).” *Cancer Research* 61(20): 7704.
- Qiu, Yunguang et al. 2020. “TREK Channel Family Activator with a Well-Defined Structure-Activation Relationship for Pain and Neurogenic Inflammation.” *Journal of Medicinal Chemistry* 63(7): 3665–77.
- Raghubir, Marian et al. 2020. “Osteosarcoma Growth Suppression by Riluzole Delivery via Iron Oxide Nanocage in Nude Mice.” *Oncology Reports* 43(1): 169–76.
- Raja, Srinivasa N. et al. 2020. “The Revised International Association for the Study of Pain Definition of Pain: Concepts, Challenges, and Compromises.” *Pain* 161(9): 1976–82.
- Rebillard, Xavier, Jean Louis Davin, and Michel Soulie. 2003. “Traitement Par HIFU Du Cancer de La Prostate: Revue de La Littérature et Indications de Traitement.” *Progres en Urologie* 13(6): 1428–56.
- Ren, Guangwen, Mark Esposito, and Yibin Kang. 2015. “Bone Metastasis and the Metastatic Niche.” *Journal of Molecular Medicine* 93(11): 1203–12.
- Renigunta, Vijay, Günter Schlichthörl, and Jürgen Daut. 2015. “Much More than a Leak: Structure and Function of K2P-Channels.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 467(5): 867–94.
- Ridge, Sarah M. et al. 2018. “Secreted Factors from Metastatic Prostate Cancer Cells Stimulate Mesenchymal Stem Cell Transition to a Pro-Tumourigenic ‘Activated’ State That Enhances Prostate Cancer Cell Migration.” *International Journal of Cancer* 142(10): 2056–67.

- <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rilutek> (December 14, 2020).
- Risch, Nathan, François Pointeau, and Nolwenn Poquet. 2017. "Nociception." *Kinesitherapie* 17(186): 5–15.
- Rivat, Cyril et al. 2008. "Polyamine Deficient Diet to Relieve Pain Hypersensitivity." *Pain* 137(1): 125–37.
- Rizaner, Nahit et al. 2020. "Riluzole: Anti-Invasive Effects on Rat Prostate Cancer Cells under Normoxic and Hypoxic Conditions." *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 127(4): 254–64.
- Robinson, Lianne, and Gernot Riedel. 2014. "Comparison of Automated Home-Cage Monitoring Systems: Emphasis on Feeding Behaviour, Activity and Spatial Learning Following Pharmacological Interventions." *Journal of Neuroscience Methods* 234: 13–25.
- Rozet, F. et al. 2016. "CCAFU French National Guidelines 2016-2018 on Prostate Cancer." *Progres en Urologie* 27(2016): S95–143.
- Ruska, Kim M., Jurga Sauvageot, and Jonathan I. Epstein. 1998. "Histology and Cellular Kinetics of Prostatic Atrophy." *American Journal of Surgical Pathology* 22(9): 1073–77.
- Saber, Saber H. et al. 2020. "Exosomes Are the Driving Force in Preparing the Soil for the Metastatic Seeds: Lessons from the Prostate Cancer." *Cells* 9(3): 564.
- Salomon, L. et al. 2010. "Recommandations En Onco-Urologie 2010 : Cancer de La Prostate." *Progres en Urologie* 20(SUPPL. 4): S217–51.
- Sandoz, Guillaume et al. 2006. "AKAP150, a Switch to Convert Mechano-, PH- and Arachidonic Acid-Sensitive TREK K⁺ Channels into Open Leak Channels." *EMBO Journal* 25(24): 5864–72.
- . 2008. "Mtap2 Is a Constituent of the Protein Network That Regulates Twik-Related K⁺ Channel Expression and Trafficking." *Journal of Neuroscience* 28(34): 8545–52.
- . 2009. "Extracellular Acidification Exerts Opposite Actions on TREK1 and TREK2 Potassium Channels via a Single Conserved Histidine Residue." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(34): 14628–33.
- Sandoz, Guillaume, and Florian Lesage. 2008. "Protein Complex Analysis of Native Brain Potassium Channels by Proteomics." In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Methods Mol Biol, 113–23.
- Sandoz, Guillaume, Joshua Levitz, Richard H. Kramer, and Ehud Y. Isacoff. 2012. "Optical Control of Endogenous Proteins with a Photoswitchable Conditional Subunit Reveals a Role for TREK1 in GABAB Signaling." *Neuron* 74(6): 1005–14.
- Sartor, Oliver et al. 2014. "Effect of Radium-223 Dichloride on Symptomatic Skeletal Events in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer and Bone Metastases: Results from a Phase 3, Double-Blind, Randomised Trial." *The Lancet Oncology* 15(7): 738–46.
- Sauter, Daniel R.P. et al. 2016. "PH-Sensitive K⁺ Channel TREK-1 Is a Novel Target in Pancreatic Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862(10): 1994–2003.

- Schmidt, Brian L., Darryl T. Hamamoto, Donald A. Simone, and George L. Wilcox. 2010. "Mechanisms of Cancer Pain." *Molecular Interventions* 10(3): 164–78.
- Schmued, L C, and J H Fallon. 1986. "Fluoro-Gold: A New Fluorescent Retrograde Axonal Tracer with Numerous Unique Properties." *Brain research* 377(1): 147–54.
- Schroeder, Gregory D. et al. 2016. "Effect of Riluzole on Human Bone Marrow Stromal Cells and Osteoblasts." *Global Spine Journal* 6(1_suppl): s-0036-1582613-s-0036-1582613.
- . 2019. "Does Riluzole Influence Bone Formation?: An in Vitro Study of Human Mesenchymal Stromal Cells and Osteoblast." *Spine* 44(16): 1107–17.
- Schwei, Matthew J. et al. 1999. "Neurochemical and Cellular Reorganization of the Spinal Cord in a Murine Model of Bone Cancer Pain." *Journal of Neuroscience* 19(24): 10886–97.
- Scimeca, Manuel et al. 2018. "Prostate Osteoblast-Like Cells: A Reliable Prognostic Marker of Bone Metastasis in Prostate Cancer Patients." *Contrast Media and Molecular Imaging* 2018.
- Seidlitz, Eric P. et al. 2009. "Cancer Cell Lines Release Glutamate into the Extracellular Environment." *Clinical and Experimental Metastasis* 26(7): 781–87.
- Seol, Hyang Sook et al. 2016. "Glutamate Release Inhibitor, Riluzole, Inhibited Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Elevated ROS Production." *Cancer Letters* 382(2): 157–65.
- Sepulveda-Orengo, Marian T. et al. 2018. "Riluzole Impairs Cocaine Reinstatement and Restores Adaptations in Intrinsic Excitability and GLT-1 Expression." *Neuropsychopharmacology* 43(6): 1212–23.
- Shi, Dan Ni et al. 2018. "MiR-183-5p Alleviates Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain through Inhibition of TREK-1." *Neurochemical Research* 43(6): 1143–49.
- Shi, Yufang, Liming Du, Liangyu Lin, and Ying Wang. 2016. "Tumour-Associated Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Emerging Therapeutic Targets." *Nature Reviews Drug Discovery* 16(1): 35–52.
- Shiao, Stephen L., Gina Chia Yi Chu, and Leland W.K. Chung. 2016. "Regulation of Prostate Cancer Progression by the Tumor Microenvironment." *Cancer Letters* 380(1): 340–48.
- Shimoda, Masayuki, Kieran T. Mellody, and Akira Orimo. 2010. "Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Rate-Limiting Determinant for Tumour Progression." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21(1): 19–25.
- Simmons, J. K. et al. 2015. "Animal Models of Bone Metastasis." *Veterinary Pathology* 52(5): 827–41.
- Simons, Brian W. et al. 2019. "A Mouse Model of Prostate Cancer Bone Metastasis in a Syngeneic Immunocompetent Host." *Oncotarget* 10(64): 6845–54.
- Slosky, Lauren M. et al. 2016. "The Cystine/Glutamate Antiporter System Xc- Drives Breast Tumor Cell Glutamate Release and Cancer-Induced Bone Pain." *Pain* 157(11): 2605–16.
- Sperling, Swetlana et al. 2017. "Riluzole: A Potential Therapeutic Intervention in Human Brain Tumor Stem-like Cells." *Oncotarget* 8(57): 96697–709.
- Speyer, Cecilia L. et al. 2017. "Riluzole Synergizes with Paclitaxel to Inhibit Cell Growth and Induce

- Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer.” *Breast Cancer Research and Treatment* 166(2): 407–19.
- Spina, Catherine S. 2018. “Androgen Deprivation Therapy and Radiation Therapy for Prostate Cancer: The Mechanism Underlying Therapeutic Synergy.” *Translational Cancer Research* 7(6): S695–703.
- Sung, Backil, Grewo Lim, and Jianren Mao. 2003. “Altered Expression and Uptake Activity of Spinal Glutamate Transporters after Nerve Injury Contribute to the Pathogenesis of Neuropathic Pain in Rats.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(7): 2899–2910.
- Sung, Hyuna et al. 2021. “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Taylor, Barry S et al. 2008. “Humoral Response Profiling Reveals Pathways to Prostate Cancer Progression.” *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7(3): 600–611.
- Terrenoire, Cécile et al. 2001. “A TREK-1-like Potassium Channel in Atrial Cells Inhibited by β -Adrenergic Stimulation and Activated by Volatile Anesthetics.” *Circulation Research* 89(4): 336–42.
- Thibault-Duprey, Kevin et al. 2011. *Ethique, Expérimentation Animale et Recherche En Cancérologie*.
- Thompson, Michelle L. et al. 2015. “Targeting Cells of the Myeloid Lineage Attenuates Pain and Disease Progression in a Prostate Model of Bone Cancer.” *Pain* 156(9): 1692–1702.
- Tomlins, Scott A. et al. 2007. “Integrative Molecular Concept Modeling of Prostate Cancer Progression.” *Nature Genetics* 39(1): 41–51.
- Torri, Valter, and Irene Floriani. 2005. “Cyproterone Acetate in the Therapy of Prostate Carcinoma.” *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* 77(3): 157–63.
- Tracey, W. Daniel. 2017. “Nociception.” *Current Biology* 27(4): R129–33.
- Tsai, Shih Jen. 2008. “Sipatrigine Could Have Therapeutic Potential for Major Depression and Bipolar Depression through Antagonism of the Two-Pore-Domain K⁺ Channel TREK-1.” *Medical Hypotheses* 70(3): 548–50.
- Tuppin, P. et al. 2016. “Dépistage Individuel Du Cancer de La Prostate Chez Les Hommes de 40 Ans et plus, France, 2009-2015. Données Du Système National d’information Inter-Régimes de l’Assurance Maladie.” (2013): 700–706.
- Turley, Shannon J., Viviana Cremasco, and Jillian L. Astarita. 2015. “Immunological Hallmarks of Stromal Cells in the Tumour Microenvironment.” *Nature Reviews Immunology* 15(11): 669–82.
- Urch, Catherine E. et al. 2005. “Efficacy of Chronic Morphine in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain: Behavior and in Dorsal Horn Pathophysiology.” *Journal of Pain* 6(12): 837–45.
- Vermeirsch, Hilde, Rony M. Nuydens, Philip L. Salmon, and Theo F. Meert. 2004. “Bone Cancer Pain Model in Mice: Evaluation of Pain Behavior, Bone Destruction and Morphine Sensitivity.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 79(2): 243–51.

- Vlaeminck-Guillem, Virginie. 2018. "Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management." *Frontiers in Oncology* 8(JUN).
- Voloshyna, Iryna et al. 2008. "TREK-1 Is a Novel Molecular Target in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68(4): 1197–1203.
- Wadosky, Kristine M., Mojgan Shourideh, David W. Goodrich, and Shahriar Koochekpour. 2019. "Riluzole Induces AR Degradation via Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Androgen-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer Cells." *Prostate* 79(2): 140–50.
- Wang, Maonan et al. 2017. "Role of Tumor Microenvironment in Tumorigenesis." *Journal of Cancer* 8(5): 761–73.
- Watanabe, Masatoshi et al. 2000. "Comparative Studies of Prostate Cancer in Japan versus the United States: A Review." *Urologic Oncology* 5(6): 274–83.
- Weaver, Charles. 2018. "Prostate Cancer: What You Need to Know About The Gleason Score." <https://news.cancerconnect.com/prostate-cancer/prostate-cancer-what-you-need-to-know-about-the-gleason-score-P6Tew2AaP0SpkB-OZ0uOLA> (November 23, 2020).
- Whittemore, Alice S. et al. 1995. "Family History and Prostate Cancer Risk in Black, White, and Asian Men in the United States and Canada." *American Journal of Epidemiology* 141(8): 732–40.
- Willms, Eduard et al. 2018. "Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression." *Frontiers in Immunology* 9(APR).
- Winter, H. et al. 1999. "Cancer Incidence in the South Asian Population of England (1990-92)." *British Journal of Cancer* 79(3–4): 645–54.
- Wittekind, Christian, Carolyn C. Compton, Frederick L. Greene, and Leslie H. Sobin. 2002. "TNM Residual Tumor Classification Revisited." *Cancer* 94(9): 2511–16.
- Woolf, C. J., and P. D. Wall. 1986. "Relative Effectiveness of C Primary Afferent Fibers of Different Origins in Evoking a Prolonged Facilitation of the Flexor Reflex in the Rat." *Journal of Neuroscience* 6(5): 1433–42.
- Wu, Xiao et al. 2013. "Involvement of TREK-1 Activity in Astrocyte Function and Neuroprotection under Simulated Ischemia Conditions." *Journal of Molecular Neuroscience* 49(3): 499–506.
- Wu, Yongchao et al. 2013. "Delayed Post-Injury Administration of Riluzole Is Neuroprotective in a Preclinical Rodent Model of Cervical Spinal Cord Injury." *Journal of Neurotrauma* 30(6): 441–52.
- Xylinas, E. et al. 2011. "Surveillance Active Du Cancer de Prostate Ayant Des Critères de Latence Les Critères SURACAP Sont-Ils Suffisants ?" *Progres en Urologie* 21(4): 264–69.
- Yanagisawa, Yoshikazu et al. 2010. "Bone Cancer Induces a Unique Central Sensitization through Synaptic Changes in a Wide Area of the Spinal Cord." *Molecular Pain* 6.
- Yáñez-Mó, María et al. 2015. "Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions." *Journal of Extracellular Vesicles* 4(2015): 1–60.
- Yao, Peng et al. 2016. "Impacts of Anti-Nerve Growth Factor Antibody on Pain-Related Behaviors and

- Expressions of Opioid Receptor in Spinal Dorsal Horn and Dorsal Root Ganglia of Rats with Cancer-Induced Bone Pain.” *Molecular Pain* 12.
- Ye, Dongqing et al. 2015. “TREK1 Channel Blockade Induces an Antidepressant-like Response Synergizing with 5-HT_{1A} Receptor Signaling.” *European Neuropsychopharmacology* 25(12): 2426–36.
- Yi, Haowei, Geoff Talmon, and Jing Wang. 2020. “Glutamate in Cancers: From Metabolism to Signaling.” *The Journal of Biomedical Research*: 1.
- Yu, Lumeng J., Brian A. Wall, Janet Wangari-Talbot, and Suzie Chen. 2017. “Metabotropic Glutamate Receptors in Cancer.” *Neuropharmacology* 115: 193–202.
- Zajączkowska, Renata, Magdalena Kocot-Kępska, Wojciech Leppert, and Jerzy Wordliczek. 2019. “Bone Pain in Cancer Patients: Mechanisms and Current Treatment.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(23): 6047.
- Zhang, Gui Ming et al. 2015. “Prognostic Significance of the TREK-1 K_{2P} Potassium Channels in Prostate Cancer.” *Oncotarget* 6(21): 18460–68.
- Zhang, R-X et al. 2008. “Interleukin 1beta Facilitates Bone Cancer Pain in Rats by Enhancing NMDA Receptor NR-1 Subunit Phosphorylation.” *Neuroscience* 154(4): 1533–38.
- Zhang, Rui Xin et al. 2005. “Spinal Glial Activation in a New Rat Model of Bone Cancer Pain Produced by Prostate Cancer Cell Inoculation of the Tibia.” *Pain* 118(1–2): 125–36.
- Zhang, Weijie et al. 2019. “Bone Metastasis: Find Your Niche and Fit In.” *Trends in Cancer* 5(2): 95–110.
- Zhao, Huan, Leslie K. Sprunger, and Steven M. Simasko. 2010. “Expression of Transient Receptor Potential Channels and Two-Pore Potassium Channels in Subtypes of Vagal Afferent Neurons in Rat.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298(2).
- Zhao, Li na et al. 2011. “Regional Differential Expression of TREK-1 at Left Ventricle in Myocardial Infarction.” *Canadian Journal of Cardiology* 27(6): 826–33.
- Zhou, Cindy Ke et al. 2016. “Prostate Cancer Incidence in 43 Populations Worldwide: An Analysis of Time Trends Overall and by Age Group.” *International Journal of Cancer* 138(6): 1388–1400.
- Zhou, Min et al. 2009. “TWIK-1 and TREK-1 Are Potassium Channels Contributing Significantly to Astrocyte Passive Conductance in Rat Hippocampal Slices.” *Journal of Neuroscience* 29(26): 8551–64.
- Zhu, Chao et al. 2017. “Neuron-Restrictive Silencer Factor-Mediated Downregulation of μ -Opioid Receptor Contributes to the Reduced Morphine Analgesia in Bone Cancer Pain.” *Pain* 158(5): 879–90.
- Zhu, Yong Fang et al. 2016. “Differences in Electrophysiological Properties of Functionally Identified Nociceptive Sensory Neurons in an Animal Model of Cancer-Induced Bone Pain.” *Molecular Pain* 12.
- . 2020. “Bone Cancer-Induced Pain Is Associated with Glutamate Signalling in Peripheral

Sensory Neurons.” *Molecular Pain* 16.

Zimmermann, Manfred. 1983. “Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals.” *Pain* 16(2): 109–10.

Zylla, Dylan et al. 2013. “Opioid Requirement, Opioid Receptor Expression, and Clinical Outcomes in Patients with Advanced Prostate Cancer.” *Cancer* 119(23): 4103–10.

Recherche de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de la douleur osseuse du cancer de la prostate

Les cancers de la prostate (CaP), du sein et des poumons sont souvent de diagnostic difficile notamment en raison de leur caractère initial asymptomatique. Rarement douloureux aux stades primaires, ces cancers ont une forte propension à métastaser vers le microenvironnement osseux. Cliniquement, à ce stade, cela se traduit par des douleurs qui sont à la fois très invalidantes et résistantes aux traitements antalgiques de référence, y compris aux morphiniques. La difficulté provient en partie du caractère multifactoriel de ces douleurs qui associent composantes nociceptive et neuropathique. Parmi les acteurs de cette douleur, un rôle essentiel est attribué au dérèglement du système nerveux (périphérique et central) et à la croissance tumorale qui affecte tous deux le microenvironnement osseux.

Le glutamate, neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux, est récemment apparu comme une cible potentielle dans la prise en charge de certains cancers, dont le CaP. Le riluzole, une molécule anti glutamatergique, possédant déjà une autorisation de mise sur le marché dans le traitement de la SLA, a démontré un effet antalgique dans plusieurs modèles de douleur inflammatoire et neuropathique et un effet antiprolifératif *in vitro*. C'est pourquoi, nous avons recherché si cette molécule pouvait avoir des effets bénéfiques dans le traitement des douleurs osseuses induites par le CaP, et comment il pouvait influencer sur le développement du CaP métastatique osseux. Nous avons utilisé un modèle de douleur osseuse par injection intratibiale de cellules humaines de CaP, les cellules PC3-luc, et administré de riluzole dans l'eau de boisson. Chez ce modèle, le riluzole a démontré un effet antalgique significatif impliquant le canal TREK-1, canal sélectif pour l'ion potassium. De plus, le riluzole diminue significativement la viabilité des cellules *in vitro* et ralentit la croissance tumorale *in vivo* sans affecter le remodelage osseux. L'effet antiprolifératif du riluzole impliquerait une augmentation de l'expression des canaux TREK-1 dans les cellules PC3 participant à leur hyperpolarisation.

En conclusion, ce travail permet de mettre en évidence l'intérêt du riluzole en tant que molécule d'intérêt pour le traitement des douleurs osseuses du CaP dont le mécanisme d'action implique certainement le canal potassique fond TREK-1.