



**HAL**  
open science

# Etude de deux cibles pharmacologiques dans la prévention des neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie : récepteurs AT2 et CCK2

Amandine Bernard

► **To cite this version:**

Amandine Bernard. Etude de deux cibles pharmacologiques dans la prévention des neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie : récepteurs AT2 et CCK2. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0072 . tel-04817011

**HAL Id: tel-04817011**

**<https://theses.hal.science/tel-04817011v1>**

Submitted on 3 Dec 2024

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

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



**Université de Limoges**

**ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)**

**UR20218 NeurIT- Neuropathies et innovations thérapeutiques**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Spécialité Neurosciences

Présentée et soutenue par  
**Amandine Bernard**

Le 10 novembre 2022

**Etude de deux cibles pharmacologiques dans la prévention des  
neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie :  
récepteurs AT2 et CCK2**

Thèse dirigée par le Dr Claire Demiot et le Pr Sylvie Bourthoumieu

**JURY :**

Président du jury

M. Laurent Magy, PU-PH, Service de neurologie, CHU de Limoges

Rapporteurs

M. David Balayssac, PU-PH, Université Clermont-Auvergne

M. Jérôme Busserolles, MCU, Université de Clermont-Auvergne

Examineurs

M. Flavien Bessaguet, MCU, Université d'Angers

Mme. Sylvie Bourthoumieu, PU-PH, Université de Limoges

Mme. Claire Demiot, MCU, Université de Limoges

A ma famille,

*"C'est dur, hein, d'avoir un cerveau..."*

**Jean Yanne**

## Remerciements

---

Tout d'abord, je souhaite remercier le **Pr Franck Sturtz**, directeur de l'UR20218-Neurit, pour son accueil au sein du laboratoire pendant ces trois années, sa disponibilité et ses nombreux conseils. Un grand merci au **Pr Laurent Magy**, codirecteur du laboratoire, pour son accueil chaleureux et sa bienveillance, mais également pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse tous mes remerciements au **Dr David Balayssac**, ainsi qu'au **Dr Jérôme Busserolles**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux et pour leurs observations qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce mémoire.

Je tiens également à remercier, le **Dr Flavien Bessaguet** pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, et pour son humour et sa bienveillance.

J'adresse mes sincères remerciements à mes directrices de thèse, le **Dr Claire Demiot** et le **Dr Sylvie Bourthoumieu**. Je vous remercie de m'avoir encadrées et soutenues durant ces trois années. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je souhaite également remercier tout le laboratoire pour m'avoir supporté moi et mon hoquet chronique pendant ces 3 années.

Je remercie la team « Chimio Panda/Lama » **Hichem** merci de m'avoir transmis le flambeau des neuropathies chimio-induites, merci pour ta patience, ton humour. **Aurore**, je ne te remercierai jamais assez pour ton aide, ton soutien, ton écoute aussi bien sur le plan personnel et professionnel, et tous ces moments de craquage dans l'Open Space. **Momo**, c'est maintenant à toi de reprendre le flambeau de la team Chimio. Merci pour ton aide précieuse, ton soutien, ton humour et ta bonne humeur. **Simon**, merci pour ta bonne humeur et bon courage pour la suite entre ton statut de médecin et celui de thésard en Sciences ça va surement être très speed pour toi.

**Nesrine**, c'est également bientôt la fin de cette aventure de thèse pour toi. Les galères de manip seront bientôt derrière toi, tout va bien se passer accroche toi ! Merci pour tout, nos discussions, ta bonne humeur malgré tout. **Ioanna**, tes jeux de mots un peu bancales vont me manquer, ta bonne humeur, tes délires, nos discussions, merci pour tout. **Fede**, merci d'avoir été là pendant cette thèse, malgré la distance. Merci pour ta

bonne humeur et ton soutien. Merci les filles pour ce voyage à Miami qui restera inoubliable ! Grâce au bon et moins bon moment passer là-bas (les cucarachas).

Merci **Camille** pour ton grain folie qui me fait bien rire, merci pour ces bons moments passés ensemble, et bon courage pour cette thèse qui s'annonce sportive. **Angélique**, merci pour ton incroyable travail au sein de l'équipe sans toi le labo tournerait beaucoup moins rond, tu mériterais beaucoup plus de reconnaissance ! Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse, ton aide et ta bonne humeur. **Laetitia**, merci pour ta gentillesse, ton dynamisme et ta bonne humeur. Tu mériterais également une meilleure reconnaissance pour tout le travail que tu fournis au 4<sup>ème</sup>. Je remercie également **Paco** et **PAF** pour leurs humours, leurs bonnes humeurs et leurs gentillesse. Merci, pour toutes ces « réunions » du vendredi, synonyme de partage, de bonnes humeurs et de lâcher prise.

Je souhaite également remercier, le labo de neurologie du CHU pour m'avoir accueilli pour mes nombreuses manip d'immuno, j'espère que je n'étais pas trop encombrante. Merci **Laurence**, pour tes nombreux conseils, ta franchise et ta bienveillance. **Fanny**, **Alice** merci de m'avoir laisser squatter le cryostat pendant ces 3 ans, je suis une pro des coupes maintenant !

**Lucie**, merci à toi pour ton soutien, ta bonne humeur et pour toute ces conversations dans les escaliers ou dans le hall, pour nos sorties resto et pour tout le reste. J'espère que tout se déroulera bien pour toi avec ton poste d'ATER et ta fin de thèse.

**Michelle** merci pour ta gentillesse et ton travail exceptionnel, ton « salut les jeunes » me manquera. J'espère de tu profiteras de ta future retraite comme il se doit !

Ces 3 années se terminent, vous allez tous me manquer, vous et tous nos moments de rigolade, nos sorties et nos moments plus sérieux. Après ces 3 années passées à vos côtés, je vous considère bien plus comme des amis que comme de simples collègues. Je n'aurais pas pu rêver meilleure ambiance pour faire cette thèse, merci à vous tous.

Je souhaiterais également remercier **ma famille, mes parents, mes frères et ma sœur**. Merci pour votre soutien durant ces 3 années. Malgré qu'on soit tous dispatcher en France, on trouve quand même le moyen de se retrouver tous ensemble et ça fait du bien. Je ne vous le dis peut-être pas assez mais je vous aime.

Je remercie également **Tony**, qui a été présent pour me soutenir durant ces 3 ans et bien avant, je sais que je pourrais toujours compter sur toi quoi qu'il arrive, merci d'être là.

Et Merci à tous ceux auxquels je pense sans les nommer !

Enfin, merci aux lecteurs de ce mémoire...

Je remercie

L'Université de Limoges



Le Centre Hospitalier Universitaire de Limoges



Le Cancéropôle Grand Sud-Ouest



Et Trio Medicines Ltd



## Liste des publications

---

Danigo A, Rovini A, Bessaguet F, Bouchenaki H, **Bernard A**, Sturtz F, Bourthoumieu S, Desmoulière A, Magy L, Demiot C. **The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System?** Pharmaceuticals (Basel). 2021 Feb 24;14(3):175. doi: 10.3390/ph14030175. PMID: 33668331; PMCID: PMC7996246.

Bouchenaki H, Danigo A, **Bernard A**, Bessaguet F, Richard L, Sturtz F, Balayssac D, Magy L, Demiot C. **Ramipril Alleviates Oxaliplatin-Induced Acute Pain Syndrome in Mice.** Front Pharmacol. 2021 Jul 19;12:712442. doi: 10.3389/fphar.2021.712442. PMID: 34349658; PMCID: PMC8326755.

**Bernard A**, Danigo A, Bourthoumieu S, Mroué M, Desmoulière A, Sturtz F, Rovini A, Demiot C. **The Cholecystinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management.** Pharmaceuticals (Basel). 2021 Nov 19;14(11):1185. doi: 10.3390/ph14111185. PMID: 34832967; PMCID: PMC8618735.

Bouchenaki H\*, **Bernard A\***, Bessaguet F, Frachet S, Richard L, Sturtz F, Magy L, Bourthoumieu S, Demiot C, Danigo A. **Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse MODEL of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy.** Pharmaceuticals. 2022 Apr 12;14(4):848. doi: 10.3390/pharmaceutics14040848. PMID: 35456682; PMCID: PMC9030366. \*Both authors contributed equally to this work.

## Liste des communications

---

### Communications orales :

**Bernard A**, Bourthoumieu S, Bessaguet F, Richard L, Duchesne M, Sturtz F, Magy L, Demiot C, Danigo A. **Blockade of cholecystinin type 2 receptor prevents vincristine-induced sensory neuropathy in mice.** PNS Virtual event, 12-13 & 25-27 June 2021.

Bouchenaki H, **Bernard A**, Danigo A, Bessaguet F, Bourthoumieu S, Duchesne M, Richard L, Sturtz F, Magy L, Demiot C. **Ramipril prevents paclitaxel-induced peripheral neuropathy through AT2R involvement.** PNS Virtual event, 12-13 & 25-27 June 2021

**Bernard A**, Bourthoumieu S, Boyce M, Rovini A, Desmoulière A, Richard L, Sturtz F, Danigo A, Demiot C. **Netazepide is neuroprotective in a mouse model of vincristine-induced sensory neuropathy.** 2022 PNS Meeting, 14-17 June 2022, Miami, USA

### Communications affichées :

Danigo A, **Bernard A**, Sturtz F, Bourthoumieu S, Demiot C. Transcriptomic analysis of dorsal root ganglia in a mouse model of vincristine-induced peripheral neuropathy. Peripheral Nerve Society (PNS) Meeting. 22-26 June 2019. Genoa, Italy.

**Bernard A**, Bourthoumieu S, Bessaguet F, Richard L, Duchesne M, Sturtz F, Magy L, Demiot C, Danigo A. **Blockade of cholecystinin type 2 receptor prevents vincristine-induced sensory neuropathy in mice.** PNS Virtual event, 12-13 & 25-27 June 2021.

Bouchenaki H, **Bernard A**, Danigo A, Bessaguet F, Bourthoumieu S, Duchesne M, Richard L, Sturtz F, Magy L, Demiot C. **Ramipril prevents paclitaxel-induced peripheral neuropathy through AT2R involvement.** PNS Virtual event, 12-13 & 25-27 June 2021

**Bernard A**, Bourthoumieu S, Boyce M, Rovini A, Desmoulière A, Richard L, Sturtz F, Danigo A, Demiot C. **Netazepide is neuroprotective in a mouse model of vincristine-induced sensory neuropathy.** 2022 PNS Meeting, 14-17 June 2022, Miami, USA

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Remerciements .....	4
Liste des publications .....	8
Liste des communications .....	9
Table des matières .....	11
Abréviations .....	14
Table des illustrations .....	17
Table des tableaux .....	19
Introduction .....	20
Partie I. Revue bibliographique.....	23
I.1. Le Système Nerveux Périphérique.....	23
I.1.1. Généralités .....	23
I.1.2. Les cellules du système nerveux périphérique .....	25
I.1.2.1. Le neurone.....	25
I.1.2.1.1. Morphologie générale .....	25
I.1.2.1.2. Classification des neurones .....	27
I.1.2.1.3. Fonctions de l'axone.....	28
I.1.2.2. Les cellules gliales périphériques.....	29
I.1.3. Les Fibres amyéliniques et myélinisées.....	31
I.1.3.1. Les fibres amyéliniques.....	31
I.1.3.2. Les fibres myélinisées.....	31
I.1.4. Le nerf périphérique .....	32
I.1.5. Les ganglions spinaux .....	33
I.2. Les voies sensibles .....	34
I.2.1. Généralités .....	34
I.2.2. La proprioception.....	36
I.2.3. Le système sensitif non douloureux (voie lemniscale) .....	37
I.2.4. La voie de la douleur (voie spinothalamique).....	38
I.2.5. La douleur .....	40
I.2.5.1. La douleur nociceptive .....	41
I.2.5.2. La douleur neuropathique .....	41
I.3. Neuropathies périphériques .....	42
I.3.1. Généralités .....	42
I.3.2. Symptômes .....	43
I.3.3. Examens cliniques.....	44
I.3.4. Neuropathies toxiques.....	46
I.4. Neuropathies périphériques chimio-induites.....	47
I.4.1. Neuropathie induite par la Vincristine .....	48
I.4.1.1. Généralités et symptômes.....	48
I.4.1.2. Principaux mécanismes neurotoxiques induits par la vincristine.....	49
I.4.1.2.1. Microtubules et transport axonal.....	49
I.4.1.2.2. Homéostasie calcique.....	50
I.4.1.2.3. Neuroinflammation .....	51
I.4.1.2.4. Les opioïdes .....	51
I.4.1.3. Modèles animaux de la neuropathie induite par la VCR .....	52

I.4.2. Neuropathie induite par le Paclitaxel .....	53
I.4.2.1. Généralités .....	53
I.4.2.2. Principaux mécanismes neurotoxiques du PTX .....	54
I.4.2.2.1. Microtubules et transport axonal.....	54
I.4.2.2.2. Impact sur les mitochondries et le stress oxydant.....	54
I.4.2.2.3. Homéostasie ionique .....	55
I.4.2.2.4. Neuroinflammation .....	55
I.4.2.3. Modèles animaux de la neuropathie induite par le PTX.....	57
I.5. Prise en charge de la douleur neuropathique.....	58
I.5.1. Première intention .....	59
I.5.2. Deuxième intention.....	60
I.5.3. Troisième intention .....	62
I.5.4. Prises en charges des neuropathies chimio-induites .....	62
I.6. Nouvelles cibles thérapeutiques pour un traitement préventif.....	63
I.6.1. Le système Rénine-Angiotensine .....	63
I.6.1.1. Généralités .....	63
I.6.1.2. SRA et douleur.....	66
I.6.1.3. SRA et neuroprotection/neurorégénération .....	68
I.6.2. La cholécystokinine et CCK2R .....	85
I.6.2.1. Généralités .....	85
I.6.2.2. CCK2R et douleur .....	87
Partie II. Objectifs généraux .....	103
II.1. Objectif 1 : Evaluer l'effet du ramipril en préventif sur la survenue de la NPIP chez la souris.....	103
II.2. Objectif 2 : Evaluer l'effet d'antagonistes de CCK2R en préventif sur la survenue de la NPIV et de la NPIP chez la souris.....	104
Partie III. Travail expérimental .....	107
III.1. Protocoles expérimentaux.....	107
III.1.1. Animaux .....	107
III.1.2. Traitements et molécules neurotoxiques .....	107
III.1.2.1. Les molécules neurotoxiques.....	107
III.1.2.2. Modulateur du système SRA.....	107
III.1.2.3. Antagonistes du récepteur à la cholécystokinine de type 2 .....	108
III.1.3. Chronologie des protocoles.....	108
III.1.3.1. Protocole 1. Effets du ramipril dans la prévention de la NPIP chez la souris .....	108
III.1.3.2. Protocole 2. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la vincristine.....	109
III.1.3.3. Protocole 3. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par la vincristine.....	110
III.1.3.4. Protocole 4. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par le paclitaxel.....	111
III.1.4. Test Comportementaux .....	112
III.1.4.1. Test du von Frey .....	112
III.1.4.2. Plaque chaude .....	113
III.1.5. Analyse histologique.....	113
III.1.5.1. Prélèvements .....	113

III.1.5.2. Etude de l'innervation cutanée par immunofluorescence.....	114
III.1.5.3. Etude des neurones des GS et des nerfs sciatiques par immunofluorescence .....	114
III.1.5.4. Etude de la morphologie des fibres nerveuses du nerf sciatique par microscopie électronique .....	116
III.1.6. Etude de l'expression génique.....	116
III.1.6.1. Prélèvement et extraction ARN .....	116
III.1.6.2. Analyse transcriptomique.....	117
III.1.6.3. Validation par RT-PCRq.....	117
III.2. Effet du ramipril dans la prévention des neuropathies induites par le paclitaxel .....	118
III.2.1. Objectifs.....	118
III.2.2. Résultats principaux .....	118
III.3. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la VCR et le PTX.....	134
III.3.1. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la vincristine .....	134
III.3.1.1. Objectifs.....	134
III.3.1.2. Résultats principaux.....	134
III.4. Effet du NTZ dans la prévention des neuropathies périphériques induites par la VCR et le PTX.....	173
III.4.1. Introduction.....	173
III.4.2. Matériels et méthodes .....	174
III.4.3. Résultats .....	174
III.4.3.1. L'ARNm de CCK2R est surexprimé dans les GS des souris exposées au PTX .....	174
III.4.3.2. Le NTZ à 2 et 5 mg/kg prévient l'allodynie mécanique induite par la VCR et le PTX .....	175
III.4.3.3. Le NTZ restaure la densité en FNIE et la densité en neurones dans les GS .....	176
III.4.3.4. Effets du Nétazépide sur la densité en fibres myélinisées et la morphologie du nerf sciatique. ....	178
III.4.3.5. Le NTZ ne modifie pas l'activité anticancéreuse du PTX sur des lignées cellulaires de cancers de poumon et de sein.....	181
III.4.4. Discussion .....	181
Partie IV. Discussion générale.....	187
Partie V. Conclusions et perspectives .....	196
V.1. Conclusions.....	196
V.2. Perspectives.....	196
Références bibliographiques .....	199

## Abréviations

---

ACF : adjuvant complet de Freund

AT1R : récepteur à l'angiotensine II de type 1

AT2R : récepteur à l'angiotensine II de type 2

ATC : antidépresseurs tricycliques

ATP : adénosine tri-phosphate

ASCO : american society of clinical oncology

BHE : barrière hémato-encéphalique

CCI : constriction chronique du nerf sciatique

CCK : cholécystokinine

CCK2R : récepteur de type 2 à la cholécystokinine

Ccl2 : chimiokine ligand 2

Ccr2: récepteur à la chimiokine 2

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CGS : cellules gliales satellites

CPA : cellules présentatrices d'antigène

CS : cellules de schwann

CX<sub>2</sub>CR<sub>1</sub> : récepteur à la chemokine CX3R1

DLK : double leucine kinase

ECA : l'enzyme de conversion I

EFNS : european federation of neurological societies

EM1 : endomorphine 1

EM2 : endomorphine 2

EMA : l'agence européenne du médicament

ENMG : électroneuromyographie

FDA : food and drug administration

FNIE : fibres nerveuses intra-épidermiques

FRAP : fluoride resistant-acid phosphatase

GDNF : glial cell-derived neurotrophic factor

GDNFR  $\alpha$ -1-4 : glial cell-derived neurotrophic factor receptor

GFAP : acide fibrillaire gliale

GFP : green fluorescent protein

GS : ganglions spinaux

HAS : haute autorité de la santé

HTM : high threshold mechanical nociceptors

IASP : international association of study of pain

IB4 : isolectine B4

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion

INCa : institut national du cancer

I.p : intrapéritonéal

IPS : induced pluripotent stem cells

IRSN : inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

Kv : canaux potassiques voltage-dépendants

MCO : médecine chirurgie obstétrique

NF 200 : neurofilament 200

NMNAT : nicotinamide mononucléotide adénylytransférase

NO : monoxyde d'azote

NPIC : neuropathie périphérique induite par la chimiothérapie

NPIO : neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine

NPIP : neuropathie périphérique induite par le paclitaxel

NPIV : neuropathie périphérique induite par la vincristine

NRG1-III : Neureguline 1

NTS : noyau tractus solitarius

NTZ : nétazépide

PGP 9.5 : protein gene product 9.5

PTX : paclitaxel

RCPG : récepteur couple aux protéines G

ROS : reactive oxygen species

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

SRA : système rénine-angiotensine

STZ : streptozotocine

TRK : tropomyosine receptor kinase

TRPA1 : transient receptor potential ankyrin subtype 1 protein

VCR : vincristine

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

## Table des illustrations

---

Figure 1. Schéma représentatif du système nerveux.....	23
Figure 2. Classification fonctionnelle du système nerveux.....	24
Figure 3. Organisation anatomique et fonctionnelle du système nerveux périphérique (Tortora and Grabowski, 2001).....	25
Figure 4. Structure du neurone.....	27
Figure 5. Classification structurale des neurones.....	28
Figure 6. Schéma représentant les cellules de Schwann myélinisante et non-myélinisante .	30
Figure 7. Organisation structurale d'une fibre myélinisée (Adapté de Tortora and Derrickson, 2009).....	32
Figure 8. Organisation anatomique d'un nerf périphérique (adapté de Kuliasha et al, 2018) .	33
Figure 9. Ganglion spinal.....	34
Figure 10. Les composants du système nerveux sensitif.....	35
Figure 11. Voies sensitives.....	36
Figure 12. Les différents types de récepteurs sensitifs cutanés (Widmaier et al., 2013) .....	38
Figure 13. Immunofluorescence d'une coupe de peau d'une souris témoin par un marquage de PGP9.5.....	45
Figure 14. Règles de comptage des fibres nerveuses intraépidermiques selon l'EFNS.....	46
Figure 15. Schéma simplifié du SRA.....	64
Figure 16. Schéma voie alternative SRA.....	65
Figure 17. Structure en acides aminés des différentes formes de la cholécystokinine humaine .....	85
Figure 18 : Chronogramme du protocole 1. Effets du ramipril sur la prévention des neuropathies périphériques induites par le PTX. ....	109
Figure 19. Chronogramme du protocole 2 : Effet du blocage CCK2R par le proglumide et le Ly225910 sur la neuropathie périphérique induite par la VCR.....	110
Figure 20. Chronogramme du protocole 3. Effet du Nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par la VCR.....	111
Figure 21. Chronogramme du protocole 4. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par le PTX. ....	112
Figure 22. Expression relative en ARNm de <i>Cck2r</i> après la dernière injection de PTX à J6. ....	174
Figure 23. Effets du NTZ sur l'allodynie mécanique induit par la VCR chez la souris. ....	175
Figure 24. Effets du NTZ sur l'allodynie mécanique induit par le PTX chez la souris. ....	176
Figure 25. Effets du nétazépide sur la perte des terminaisons nerveuses sensitives et des neurones des GS induit par la VCR.....	177

Figure 26. Effets du nétazépide sur la perte des terminaisons nerveuses sensibles et des neurones des GS induit par le PTX. ....	178
Figure 27. Analyse quantitative du nerf sciatique par microscopie électronique, modèle NPIV. ....	179
Figure 28. Analyse quantitative du nerf sciatique par microscopie électronique, modèle NPIP. ....	180
Figure 29. Effets du nétazépide sur la cytotoxicité du PTX sur les lignées cancéreuses humaines A549 et MDA-MB 231. ....	181

## Table des tableaux

---

Tableau 1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des fibres proprioceptives .....	37
Tableau 2. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des fibres sensibles cutanées non douloureuses.....	37
Tableau 3. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des petites fibres véhiculant la douleur .....	39
Tableau 4. Anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence .....	115
Tableau 5. Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence.....	115
Tableau 6. Liste des amorces utilisées en PCRq.....	117

## Introduction

---

Depuis 30 ans, le nombre de nouveaux cas de cancer en France ne cesse d'augmenter. L'Institut national du cancer (INCa) estime qu'en 2018, 382 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France métropolitaine. Cela s'explique par le vieillissement de la population, mais aussi par l'amélioration des méthodes de diagnostic. La chirurgie, l'hormonothérapie, la radiothérapie et la chimiothérapie font partie des traitements mis en place dans la prise en charge d'un cancer. En France, la chimiothérapie anticancéreuse représentait près de 40,8 % des prises en charges pour un cancer dans les établissements MCO (Médecine Chirurgie Obstétrique) en 2017, soit 2 709 710 séances et 256 980 séjours (Defossez et al., 2019).

La chimiothérapie présente un grand nombre d'effets indésirables parmi lesquels des nausées, des vomissements, une toxicité hématologique, des infections, des pertes de cheveux. Plus spécifiquement, elle induit une neurotoxicité qui est le second effet indésirable le plus fréquent après l'hématotoxicité. Comparativement au système nerveux central, le système nerveux périphérique (SNP) est plus souvent atteint par les agents de chimiothérapie en raison de leur faible passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Leur toxicité est donc principalement concentrée au niveau des nerfs périphériques et plus particulièrement au niveau des ganglions spinaux (GS), qui accueillent les corps des neurones sensitifs. Cette toxicité nerveuse est à l'origine de neuropathies périphériques dites chimio-induites (NPIC).

De par ce fait, les symptômes associés aux NPIC sont principalement de types sensitifs (douleurs, fourmillements, sensations d'engourdissement, altération de la sensibilité thermique) bien que des atteintes motrices ou autonomes puissent également se développer. Les neuropathies périphériques liées aux chimiothérapies anticancéreuses sont typiquement dépendantes de la dose et du type de chimiothérapie. Les agents de chimiothérapie les plus couramment impliqués sont les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les dérivés de platine.

La symptomatologie clinique des NPIC est à l'origine d'une forte altération de la qualité de vie des patients et limite l'utilisation des traitements anticancéreux. Elle nécessite de diminuer les doses et/ou d'espacer les cycles de chimiothérapies, voire de changer d'agent anticancéreux. Un tiers des patients présentant une neuropathie périphérique décrivent les symptômes associés, notamment la douleur, comme l'effet secondaire le

plus handicapant au quotidien parmi l'ensemble des effets indésirables en lien avec leur cancer (Pereira et al., 2015).

A ce jour, le traitement symptomatique des NPIC repose essentiellement sur l'utilisation de médicaments indiqués dans la prise en charge des douleurs neuropathiques. La plupart de ces molécules se révèlent cependant inefficaces dans le cadre des NPIC. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en curatif et en préventif spécifiques des NPIC représentent un enjeu majeur pour une meilleure prise en charge des patients traités par chimiothérapie anticancéreuse.

Des études précliniques ont montré dans des modèles de douleurs des effets prometteurs. Le blocage du récepteur de type 2 à la cholécystokinine (CCK2R) montre des effets analgésiques dans un modèle de brûlure chez le rat (Yin et al., 2016) et dans un modèle de neuropathie diabétique chez la souris (Kamei and Zushida, 2001).

D'autre part, les modulateurs du système rénine angiotensine (SRA) ont montré des effets neuroprotecteurs associés à des effets antalgiques dans des modèles de neuropathies périphériques induites par la vincristine (NPV) et par l'oxaliplatine (NPO), modèles développés au sein de mon équipe de recherche (Bessaguet et al., 2018; Bouchenaki et al., 2021).

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont été :

- 1- d'évaluer l'effet d'un traitement préventif au ramipril, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, sur le développement de la neuropathie périphérique induite par le paclitaxel (NPIP).
- 2- de mettre en évidence les effets bénéfiques du blocage de CCK2R dans la survenue des NPIC induites par la vincristine (VCR) et par le paclitaxel (PTX).

# Partie I. Revue bibliographique

# Partie I. Revue bibliographique

## I.1. Le Système Nerveux Périphérique

### I.1.1. Généralités

Le système nerveux se compose en deux parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNP comprend tous les éléments nerveux (nerfs, ganglions) situés hors de l'encéphale et de la moelle spinale, qui eux composent le SNC. Le SNP relie le SNC aux tissus périphériques comme la peau, les muscles, les viscères ou encore les vaisseaux sanguins. Il permet de relayer les informations entre la périphérie et l'encéphale *via* la moelle spinale (Figure 1).

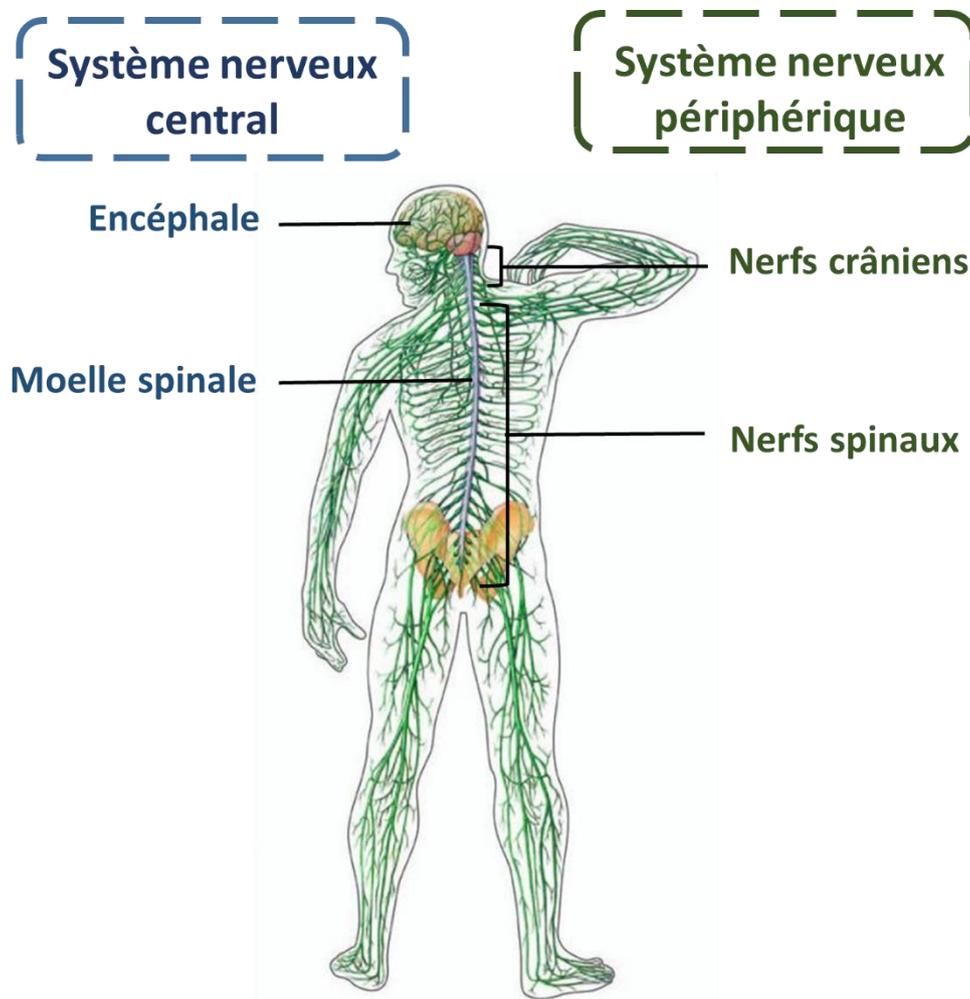


Figure 1. Schéma représentatif du système nerveux.

Le SNP est divisé en deux parties, une partie autonome et une partie somatique. Le système nerveux autonome, responsable des fonctions involontaires de l'organisme comprend le système nerveux parasympathique et sympathique. Le système sympathique est responsable de l'augmentation des rythmes cardiaques et respiratoires, des apports énergétiques et de la tension musculaire. Le système parasympathique est responsable du ralentissement de la fréquence cardiaque, de l'augmentation des sécrétions digestives et de la mobilité du tractus gastro-intestinal. Le système nerveux somatique rassemble les systèmes nerveux moteur et sensitif (somesthésique) (Figure 2).

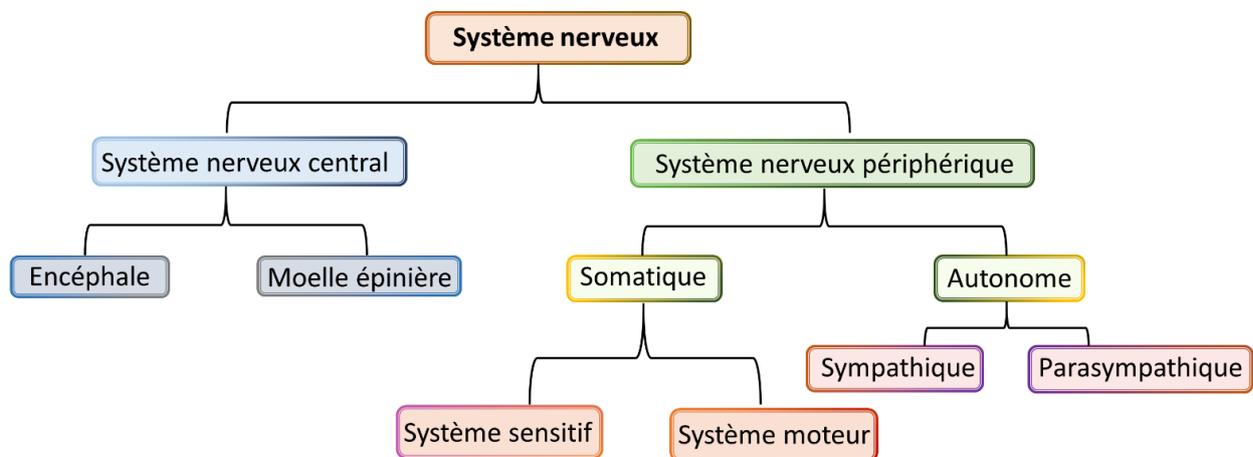


Figure 2. Classification fonctionnelle du système nerveux

La voie motrice ou voie efférente est constituée de neurones moteurs dont l'origine des influx vient du SNC. Les fibres motrices innervent les muscles et les tendons par des fuseaux nerveux pour assurer des mouvements volontaires coordonnés.

La voie sensitive ou voie afférente est constituée de neurones sensitifs somatiques et viscéraux. Les neurones sensitifs captent l'information au niveau de la peau, des glandes, des muqueuses, des organes internes et des articulations par des terminaisons libres ou capsulées.

Les fibres motrices sortent du SNC *via* les racines ventrales, leurs corps cellulaires sont situés dans la corne ventrale de la moelle spinale. Les fibres sensibles pénètrent le SNC *via* les racines dorsales, leurs corps cellulaires se trouvant au niveau du ganglion spinal (GS) situé au niveau de la racine dorsale (Figure 3). Chaque nerf spinal regroupe une combinaison de fibres motrices, sensibles et autonomes.

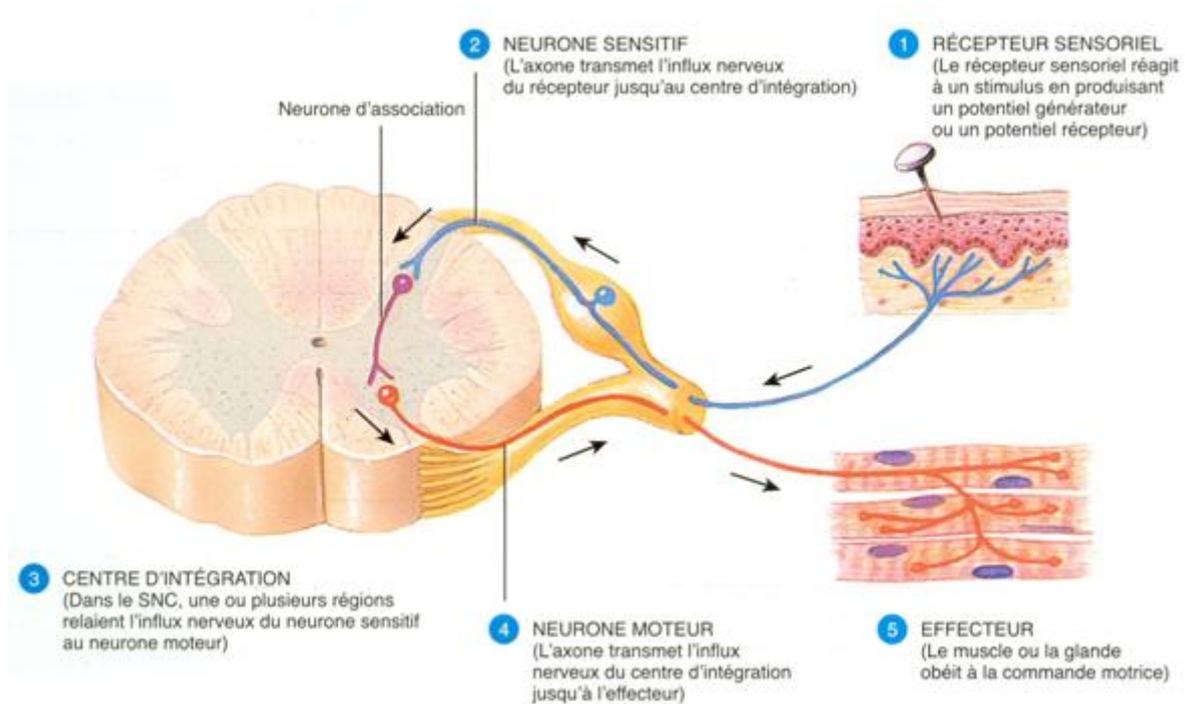


Figure 3. Organisation anatomique et fonctionnelle du système nerveux périphérique (Tortora and Grabowski, 2001)

On distingue 31 paires de nerfs spinaux répartis en 8 nerfs spinaux cervicaux (de C1 à C8), 12 nerfs spinaux thoraciques (de T1 à T12), 5 nerfs spinaux lombaires (de L1 à L5), 5 nerfs spinaux sacrés (de S1 à S5) et 1 nerf spinal coccygien (Co1).

### **1.1.2. Les cellules du système nerveux périphérique**

Le SNP se compose de plusieurs types cellulaires organisés selon une architecture très particulière.

#### **1.1.2.1. Le neurone**

Le neurone est une cellule excitable qui constitue l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Le neurone convertit les stimulations électriques en impulsions nerveuses puis transmet ces dernières sous formes d'influx nerveux. Le neurone est spécialisé dans la communication interneurones par l'intermédiaire des synapses.

##### **1.1.2.1.1. Morphologie générale**

Anatomiquement, le neurone se présente sous de nombreuses formes et tailles différentes, mais dans leur forme la plus basique, il se compose de trois éléments :

- Un corps cellulaire (soma), qui contient le noyau, le cytoplasme et d'autres organites intracellulaires concernés en particulier par la synthèse des protéines qui vont être sécrétées (la sécrétion se fait le plus souvent au niveau axonal).
- Les dendrites sont des prolongements cytoplasmiques généralement multiples dont le nombre, la morphologie et la localisation varient en fonction du neurone. Ils conduisent l'influx nerveux de manière centripète, généré au niveau synaptique vers le corps cellulaire. Sur le plan morphologique, les dendrites sont très ramifiées s'étendant à partir du corps cellulaire. Elles peuvent être recouvertes de petites épines.
- L'axone est un prolongement cytoplasmique généralement unique qui se différencie des dendrites par son aspect lisse et son diamètre uniforme le long de son trajet. L'axone transmet l'information de manière centrifuge : il conduit l'influx nerveux vers les cellules effectrices avec lesquelles il est en relation par l'intermédiaire de ses terminaisons présynaptiques. Les axones peuvent s'étendre sur quelques millimètres seulement jusqu'à une cellule voisine ou, sur plusieurs mètres comme dans le cas des motoneurones qui alimentent les muscles éloignés de la moelle spinale. Bien que les neurones possèdent le plus souvent un seul axone, sa terminaison est très ramifiée, ce qui lui permet un contact avec plusieurs autres neurones. Le long de l'axone, l'influx nerveux est transmis sous forme de potentiels d'action générés au niveau du cône d'émergence de l'axone (ou trigger zone) (Figure 4). La présence d'une gaine de myéline permet une propagation saltatoire de l'influx nerveux, augmentant ainsi considérablement sa vitesse de transmission.

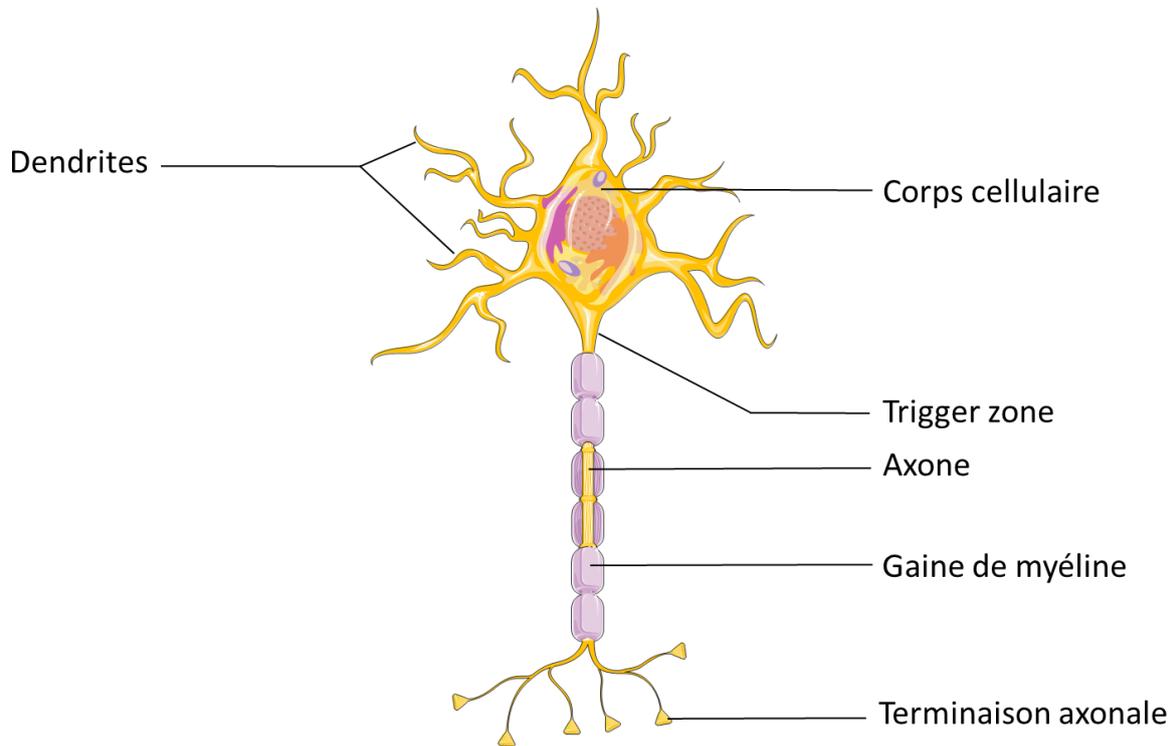


Figure 4. Structure du neurone

Les neurones possèdent deux caractéristiques électrophysiologiques majeures : l'excitabilité et la conductivité. Au repos, le neurone est doté d'un potentiel électrique transmembranaire négatif dit « potentiel de repos ». Lorsque le neurone est excité ou stimulé au-delà d'un certain seuil, apparaît un « potentiel d'action » qui se propage le long de l'axone pour atteindre les terminaisons nerveuses et entraîner une libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, qui iront se lier aux récepteurs post-synaptiques qui modifieront le potentiel membranaire de la cellule neuronale suivante.

#### I.1.2.1.2. Classification des neurones

En général, les neurones peuvent être classés selon trois principaux types, en fonction en grande partie de la position et du nombre de dendrites et de la position du cône d'émergence de l'axone.

- Les neurones multipolaires présentent un axone et de nombreuses dendrites. Ce sont les types de neurones les plus courants, ils se trouvent majoritairement dans le cerveau et la moelle spinale (Figure 5A).
- Les neurones bipolaires ont un seul axone et une seule dendrite, qui se ramifie seulement à son extrémité. Ceux-ci sont relativement rares et se trouvent presque tous

dans les organes sensoriels. Un exemple est fourni par les cellules bipolaires trouvées dans la rétine de l'œil (Figure 5B).

- Les neurones pseudo-unipolaires possèdent un seul prolongement, qui se divise en deux prolongements axonaux central et périphérique. Les neurones pseudo-unipolaires les plus courants sont les neurones sensitifs du SNP, qui transmettent des signaux de la périphérie vers la moelle spinale (vers le SNC). Le corps cellulaire de ces neurones se trouvent dans les GS au niveau de la racine dorsale (Figure 5C).

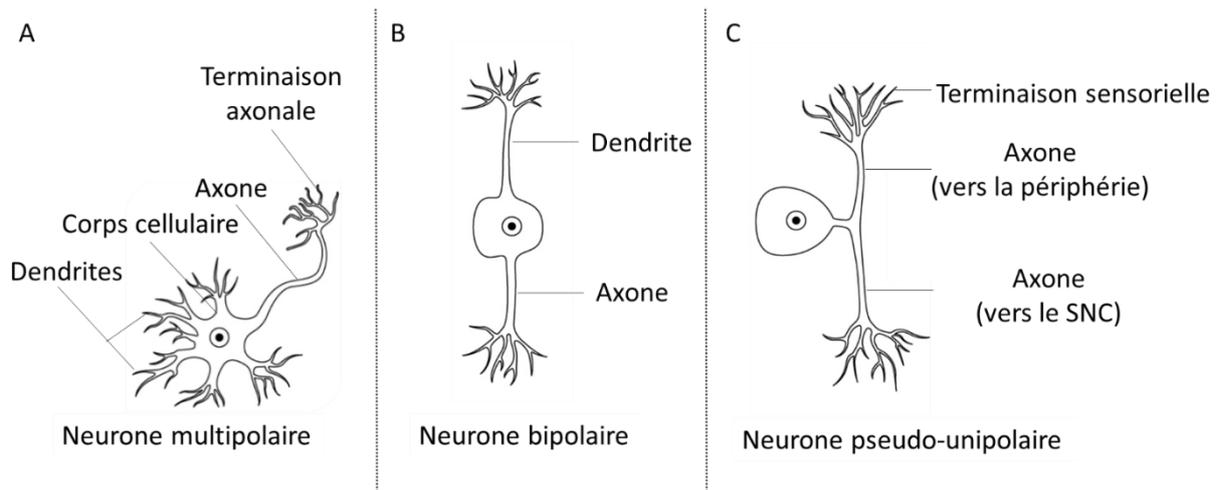


Figure 5. Classification structurale des neurones

#### I.1.2.1.3. Fonctions de l'axone

Le rôle principal de l'axone est la transmission des influx nerveux. Les axones propagent des signaux sous forme de potentiels d'actions, qui sont de légères impulsions électrochimiques se propageant rapidement le long de l'axone.

Le potentiel d'action se définit par sa rapidité (1 ms) et son caractère transitoire ; il répond au mécanisme du « tout ou rien ». Chaque potentiel d'action a essentiellement la même taille et la même forme de signal. Cette caractéristique du « tout ou rien » permet au potentiel d'action d'être transmis tout au long de l'axone sans aucune réduction d'amplitude.

Morphologiquement, l'axoplasme, le cytoplasme de l'axone, est délimité par une membrane constituée d'une bicouche lipidique, l'axolemme, en contact avec les cellules de Schwann (CS) (cf. I.1.2.2. **Les cellules gliales périphériques**). Cette membrane joue un rôle essentiel dans le maintien du potentiel de membrane et la

propagation de l'influx nerveux *via* le mouvement passif et actif d'ions entre les milieux intra- et extracellulaires.

Le cytosquelette du neurone est constitué de microtubules constitués de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  formant des structures cylindriques creuses, de microfilaments d'actine et de filaments intermédiaires appelés neurofilaments, qui forment l'essentiel de l'axone. Ce cytosquelette, notamment les microtubules, sont essentiels au transport axonal. En effet, dépourvu de ribosomes, l'axone est incapable d'assurer sa propre synthèse protéique, il ne peut donc pas renouveler ses macromolécules constitutives, ni assurer la synthèse des neurotransmetteurs qu'il libère. Les organites intracellulaires, protéines, enzymes ou encore neurotransmetteurs synthétisés dans le corps cellulaire sont ainsi transportés le long de l'axone par transport antérograde (vers la terminaison de l'axone) rapide le long des microtubules, grâce à des protéine motrices appelées kinésines.

Les éléments à recycler sont retournés de la même manière par transport rétrograde (vers le corps cellulaire) grâce aux dynéines.

Un transport antérograde plus lent, mécanisme à l'heure actuel inconnu, permet le renouvellement de 80 % des protéines totales de l'axone.

### ***1.1.2.2. Les cellules gliales périphériques***

Les neurones ne représentent que 10 % des cellules du SNP. L'essentiel du SNP est composé de cellules gliales. Elles se définissent comme des cellules de soutien en contact direct avec les neurones. Leur fonction de soutien à l'égard des neurones comprend à la fois un rôle nourricier et protecteur.

Les corps cellulaires neuronaux dans les GS et dans les ganglions sympathiques et parasympathiques sont recouverts de cellules de forme aplaties appelées cellules gliales satellites (CGS). Les axones sont enveloppés par les CS, les plus connues de toutes les cellules gliales périphériques. Récemment un nouveau type de cellule gliale a été mis en évidence, la glie périneurale présente dans le périnèvre (Poplawski et al., 2018).

Les CS, aussi appelées neurolemmocytes, dérivent des cellules de la crête neurale qui ont proliférées, migrées et se sont différenciées pour former les futures fibres nerveuses. Les CS myélinisantes encerclent et forment la gaine de myéline des axones de large diamètre ( $> 1 \mu\text{m}$ ). La membrane plasmique des CS myélinisantes

s'enroulent en multicouches autour de l'axone isolant ainsi l'axone du milieu extérieur. Chaque CS ne myélinise qu'une partie d'un seul axone. Plusieurs CS s'organisent en chapelet autour d'un seul axone, l'étranglement délimité entre chaque CS s'appelle le nœud de Ranvier. La zone délimitée par deux nœuds de Ranvier est appelée espace internodal. Les axones de plus petit diamètre ( $< 1 \mu\text{m}$ ) sont engainés dans la membrane de CS non-myélinisante. Une CS non-myélinisante entoure plusieurs axones sans constituer de gaine de myéline, on dit alors que ces axones sont amyélinisés (ou amyéliniques) (Figure 6).

La différenciation entre CS myélinisante et non-myélinisante est contrôlée par la quantité de Neureguline 1 (NRG1-III) axonale, dont l'expression est corrélée au diamètre de l'axone.

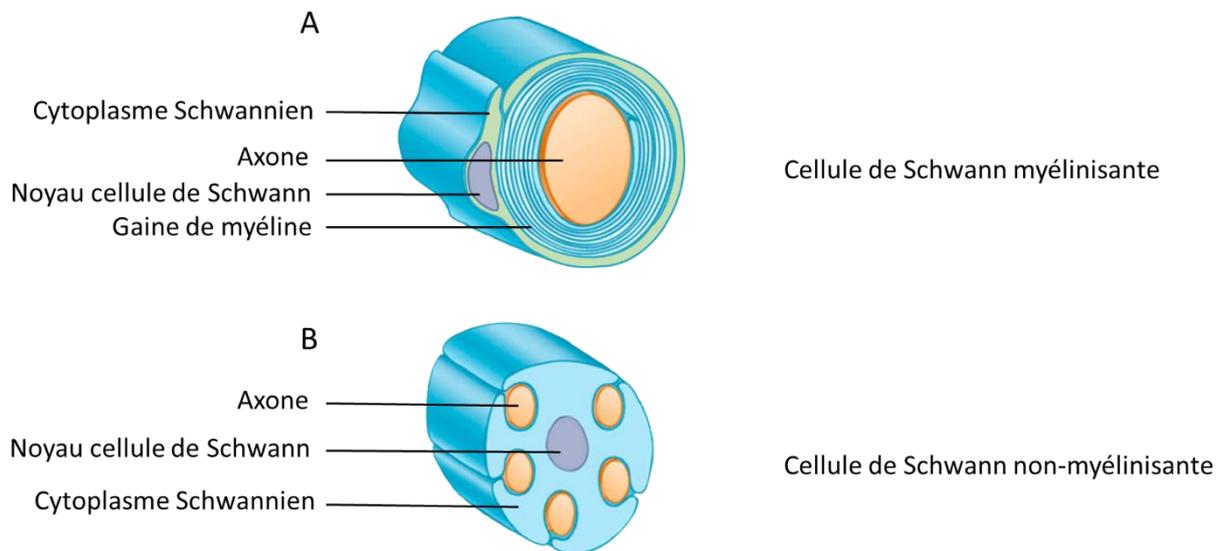


Figure 6. Schéma représentant les cellules de Schwann myélinisante et non-myélinisante

Les CS aident également à la survie neuronale, à la guidance axonale et participent aux processus de dégénérescence-régénérescence axonale. Elles sont capables de se différencier lors d'une lésion et d'aider au processus de régénération. En produisant des cytokines, elles recrutent des macrophages pour digérer la myéline et les débris. Les CS sont également capables de digérer leur propre myéline dans un processus appelé myélinophagie (Reed et al., 2021).

### **I.1.3. Les Fibres amyéliniques et myélinisées**

#### ***I.1.3.1. Les fibres amyéliniques***

Les axones non myélinisés représentent un quart des afférences cutanées. Une fibre amyélinique est composée de plusieurs axones de petit diamètre (0,15 – 1  $\mu\text{m}$ ) enveloppés par le cytoplasme d'une CS non-myélinisante, formant ainsi un faisceau de Remak.

Au cours du développement, le cytoplasme de la CS s'invagine et entoure les axones amyéliniques, les isolant ainsi les uns des autres. Les extrémités des invaginations du cytoplasme Schwannien se rapprochent pour former le mésaxone, constitué d'une double couche de membrane plasmique de 15 à 20 nm. Un espace se forme entre les axones et les membranes Schwanniennes, appelé l'espace périaxonal. Cette formation permet le passage des ions pour la propagation du potentiel d'action. Dans les fibres amyéliniques, l'influx est continu (non saltatoire) et la vitesse de conduction maximale est de 15 m/s (Rigoard et al., 2009).

#### ***I.1.3.2. Les fibres myélinisées***

Les axones d'un diamètre supérieur à 1  $\mu\text{m}$  sont entourés de CS myélinisante. Ces axones sécrètent un taux plus important de NRG1-III que les axones de moindre taille, activant ainsi la CS myélinisante. Celle-ci s'enroule entièrement autour de l'axone et forme une spirale cytoplasmique. Le cytoplasme est ensuite éliminé de cette spirale qui est composée d'un empilement concentrique de membranes. Les couches de membrane, qui peuvent être au nombre de quelques centaines, constituent la myéline compacte. La myéline est constituée principalement de lipides et de protéides assurant la jonction entre les différents feuillets membranaires. La myéline a pour caractéristique principale d'être un isolant électrique. Dans les fibres myélinisées, l'influx se propage donc par mouvement ionique entre chaque CS, au niveau du nœud de Ranvier (Figure 7). Ce mode de propagation est dit saltatoire et permet une conduction plus rapide que dans les fibres amyéliniques (jusqu'à 120 m/s). Chaque CS possède une lame basale externe nette qui la sépare de l'endonèvre.

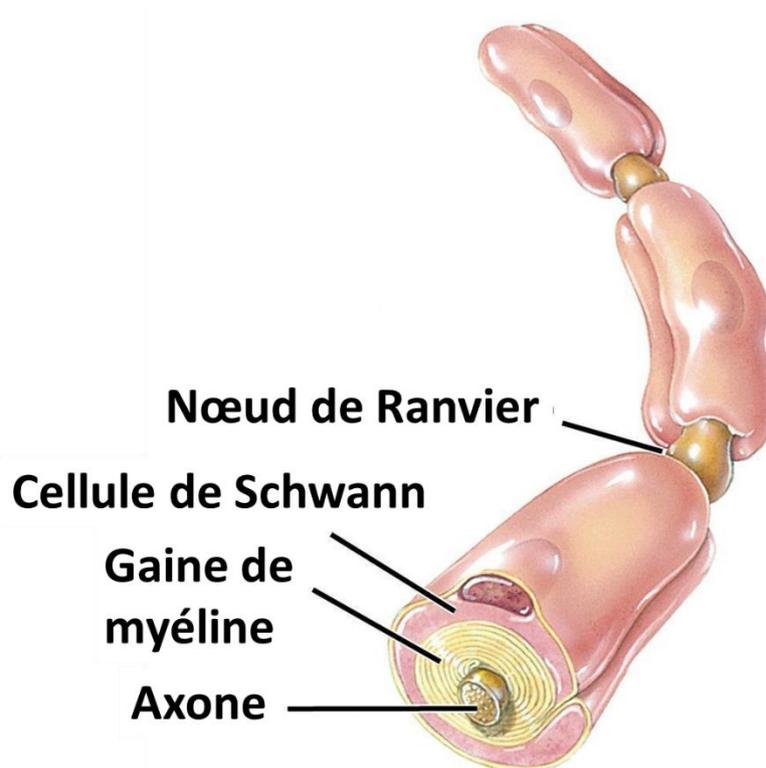


Figure 7. Organisation structurale d'une fibre myélinisée (Adapté de Tortora and Derrickson, 2009)

#### **I.1.4. Le nerf périphérique**

Le nerf périphérique est constitué de fibres nerveuses myélinisées et amyéliniques. Une fibre nerveuse se compose d'un axone, qui est un prolongement cytoplasmique du corps cellulaire (ou soma) du neurone, et de CS, qui sont les cellules gliales spécifiques du SNP. La fibre nerveuse est entourée de l'endonèvre, un tissu conjonctif lâche. Les fibres se regroupent sous forme de fascicules entourés du périnèvre. L'épinèvre recouvre l'ensemble des fascicules et des vaisseaux sanguins présents dans le nerf périphérique. La cohésion, la résistance et l'élasticité d'un nerf dépendent étroitement de ces trois tissus (Figure 8).

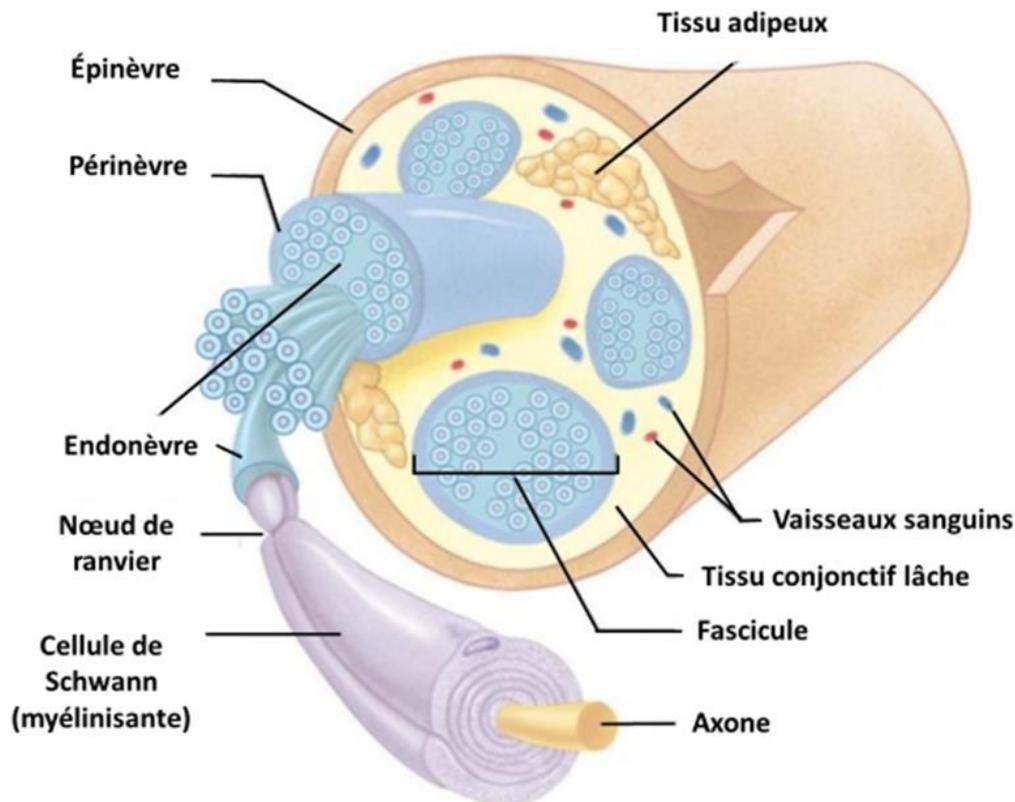


Figure 8. Organisation anatomique d'un nerf périphérique (adapté de kuliasha et al, 2018)

### I.1.5. Les ganglions spinaux

Les GS se situent aux niveaux des foramens intervertébraux de chaque racine dorsale de la moelle spinale et forment un élargissement de la racine dorsale (Haberberger et al., 2019). Les GS sont exposés à une perméabilité élevée des vaisseaux sanguins. Cette perméabilité est cliniquement très importante car elle permet aux médicaments de diffuser facilement et d'agir sur les GS.

Les GS abritent les corps cellulaires des neurones sensitifs, donnant naissance à l'ensemble des fibres constituant la racine dorsale d'un nerf spinal.

En plus de ces neurones, on retrouve également les cellules gliales satellites (CGS) (Figure 9). Les CGS sont des cellules aplaties qui entourent les corps cellulaires neuronaux, formant dans la plupart des cas une enveloppe complète. Les CGS se trouvent exclusivement dans les ganglions périphériques (ganglions sensoriels, parasymphatiques et sympathiques). Un espace d'environ 20 nm est présent entre les CGS et la surface neuronale. Cette organisation permet des interactions mutuelles étroites entre neurone et CGS appelée « unité neurone-gliale ». Dans la plupart des cas, les neurones sont enveloppés individuellement de plusieurs CGS, mais il peut

arriver que plusieurs neurones des GS partagent une enveloppe gliale commune, formant ainsi un « cluster » avec un ou deux autres neurones (Hanani and Spray, 2020). Les CGS sont très peu étudiées, leur rôle dans le SNP est encore peu connu. Elles auraient un rôle dans l'homéostasie neuronale.

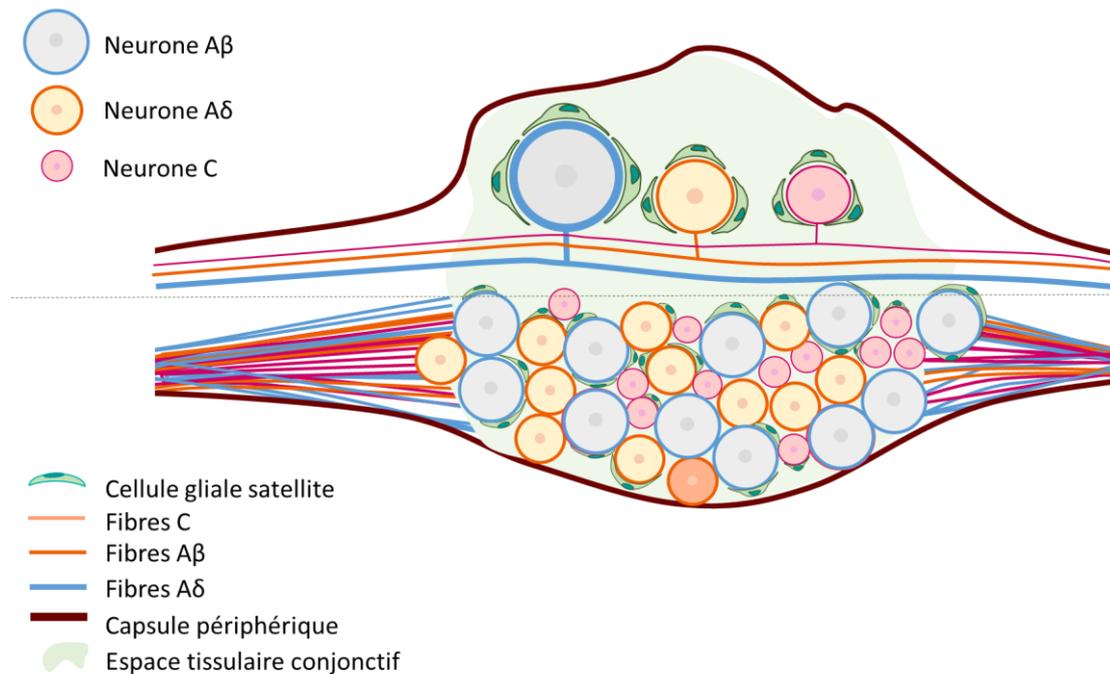


Figure 9. Ganglion spinal

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié spécifiquement le système nerveux sensitif périphérique et notamment les voies sensibles dont l'atteinte est la cause principale des NPIC.

## I.2. Les voies sensibles

### I.2.1. Généralités

Le système sensitif est constitué de fibres nerveuses afférentes dont les terminaisons périphériques se ramifient dans la peau, les muscles, les articulations et les viscères. Les corps cellulaires des neurones sensitifs se situent soit dans les ganglions trigéminaux sur le trajet des nerfs crâniens (pour la sensibilité de la tête), soit dans les GS situés au niveau de la racine sensitive dorsale des nerfs spinaux (pour la sensibilité du corps). Les GS sont des structures critiques dans la transduction, la modulation sensitive et la transmission de la douleur.

La transduction des stimuli est effectuée par des récepteurs spécialisés exprimés par les terminaisons nerveuses périphériques. Ils permettent à l'organisme de détecter une large gamme de sensations comme la position des membres dans l'espace (proprioception), la sensibilité non douloureuse (pression, vibration, température) et la douleur (Figure 10).

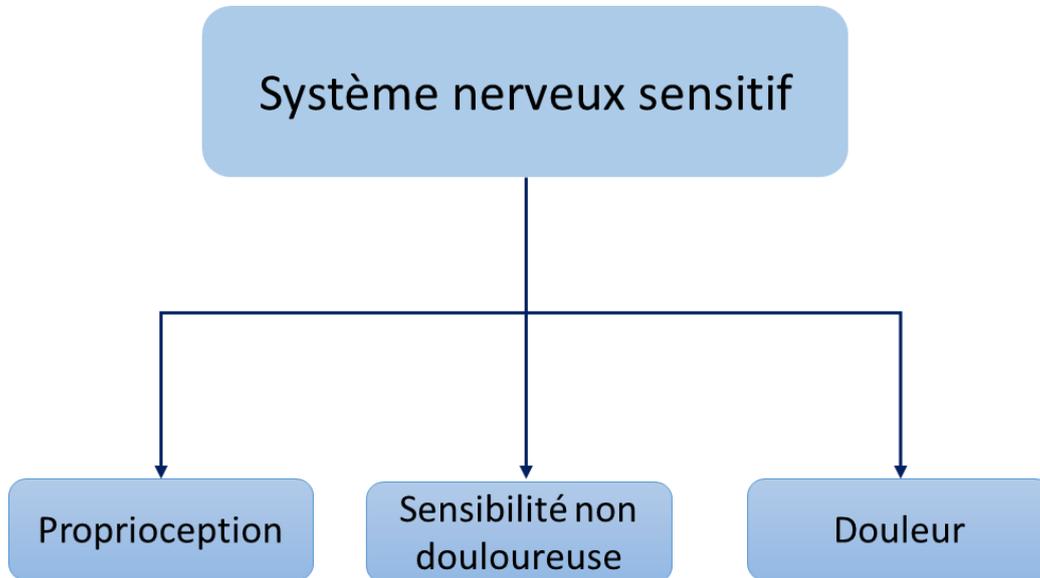


Figure 10. Les composants du système nerveux sensitif

L'acheminement de l'information sensitive de la périphérie vers le SNC se fait par codage du message sensoriel. Les récepteurs présents dans les terminaisons nerveuses convertissent les signaux reçus en signaux électriques. Les signaux sont ensuite transmis par les fibres nerveuses, et transportés jusqu'au 2<sup>nd</sup> neurone :

- Les fibres A $\alpha$  et A $\beta$  (fibres myélinisées de gros diamètre) se projettent dans la moelle spinale et font synapses avec le 2<sup>nd</sup> neurone au niveau du bulbe rachidien (noyau cunéiforme pour les membres inférieurs, noyau gracile pour les membres supérieurs, la tête et le tronc). Le 2<sup>nd</sup> neurone croise la ligne médiane et se projette dans le Thalamus où il fait synapse avec le 3<sup>rd</sup> neurone au niveau du noyau ventro-postéro-latéral du thalamus (Figure 11 A). Cette voie est appelée voie lemniscale, elle englobe la voie de sensibilité au toucher (sensibilité non douloureuse) et la proprioception consciente.
- Les fibres A $\delta$  et C (fibres faiblement myélinisées et amyéliniques) passent par la corne dorsale se projettent dans la corne ventrale où elles font synapses avec le 2<sup>nd</sup> neurone au niveau médullaire. Après décussation, le 2<sup>nd</sup> neurone se projette vers le noyau ventral postéro-latéral du thalamus pour les fibres situés dans les couches I et

Il de la moelle spinale (voie néo-spinothalamique), ou vers les noyaux médians du thalamus pour les fibres situées dans la couches V (voie paléo spinothalamique), où il fait synapses avec le 3<sup>rd</sup> neurone. La voie spinothalamique est la principale voie de transmission de la douleur (Figure 11 B).

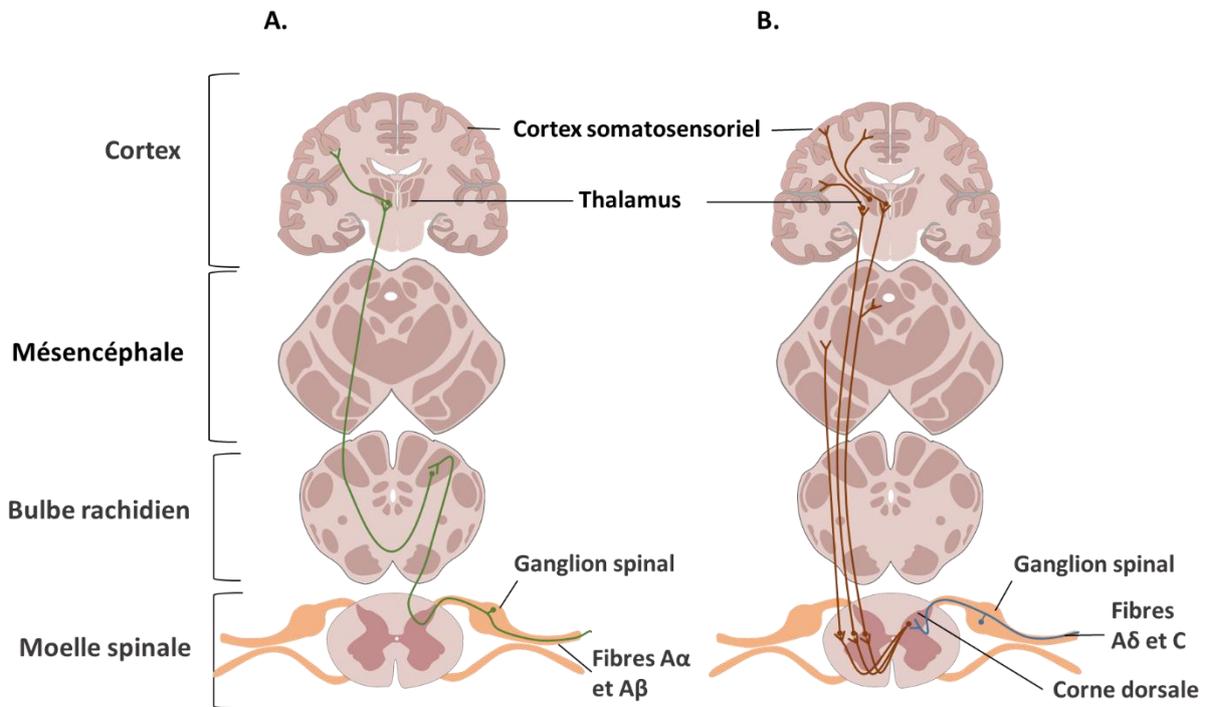


Figure 11. Voies sensibles.  
(A) voie lemniscale, (B) voie spinothalamique

### 1.2.2. La proprioception

La proprioception se définit par notre capacité à connaître la position de notre corps dans l'espace, ou de chacun de nos membres les uns par rapport aux autres, et à évaluer la résistance contre laquelle une tâche motrice est réalisée. Grâce aux propriocepteurs (récepteurs de proprioception), l'organisme est renseigné en permanence sur la position spatiale des membres. Les propriocepteurs comprennent les fuseaux neuromusculaires, les organes tendineux de Golgi et les récepteurs articulaires. Ils permettent une discrimination précise de tous les stimuli mécaniques. Les fuseaux neuromusculaires reçoivent une innervation sensitive véhiculée par les fibres afférentes A $\alpha$  et A $\beta$ , tandis que les organes tendineux de Golgi sont innervés seulement par les fibres afférentes A $\alpha$ . Ces fibres représentent des axones de grand diamètre (13-20  $\mu$ m) fortement myélinisés, donc à conduction rapide (80-120 m/s) (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des fibres proprioceptives

Fonction sensorielle	Type de récepteur	Catégorie de fibre	Diamètre de l'axone	Myélinisation	Vitesse de conduction
<b>Proprioception</b>	Fuseau neuromusculaire, organe tendineux de Golgi, récepteurs articulaires	A $\alpha$ , A $\beta$ , II	13-20 $\mu$ m	+++	80-120 m/s

### I.2.3. Le système sensitif non douloureux (voie lemniscale)

Ce système permet l'intégration des stimuli mécaniques et thermiques non douloureux au niveau cutané. Des mécanorécepteurs spécifiques pour chaque type de stimulation sont présents dans la peau. Ils comprennent plusieurs types de récepteurs encapsulés dans une gaine conjonctive et des terminaisons nerveuses libres. Les récepteurs encapsulés sont représentés par les corpuscules de Meissner, les disques de Merkel, les corpuscules de Pacini et de Ruffini. Ces récepteurs sont innervés par les fibres A $\beta$ , de diamètre inférieur à celui des fibres proprioceptives et à conduction plus lente (Tableau 2). Bien que négligés par rapport aux fibres C et A $\delta$ , ces nocicepteurs pourraient avoir un rôle important dans la douleur (Nagi et al., 2019).

Tableau 2. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des fibres sensibles cutanées non douloureuses

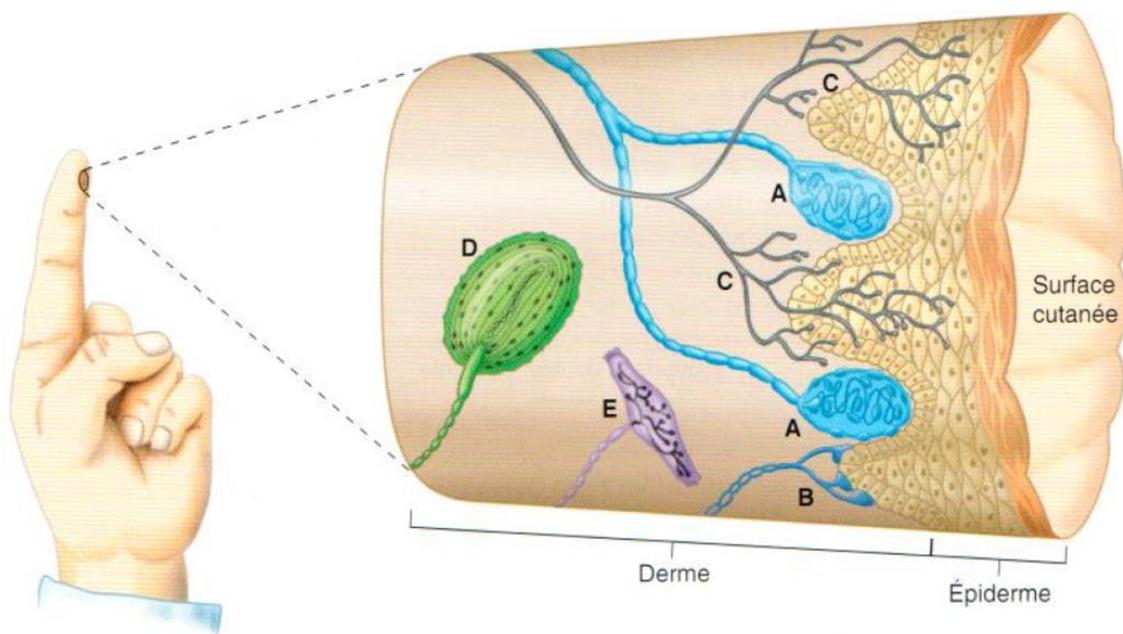
Fonction sensorielle	Type de récepteur	Catégorie de fibre	Diamètre de l'axone	Myélinisation	Vitesse de conduction
<b>Toucher</b>	Corpuscule de Merkel, Meissner, Pacini et Ruffini	A $\beta$	9-12 $\mu$ m	++	35-75 m/s

Dans leur ensemble, ces récepteurs codent les différentes modalités de la déformation cutanée (étirement, frottement, pression...). Chaque récepteur a une fonction particulière :

- Les corpuscules de Meissner (Figure 12 A) sont impliqués dans la perception de la déformation cutanée.

- Les disques de Merkel (Figure 12 B) sont impliqués dans le renseignement des formes et des textures des objets
- Les corpuscules de Pacini (Figure 12 C) sont sensibles aux vibrations.
- Les corpuscules de Ruffini (Figure 12 E) sont sensibles aux étirements et participent à la localisation précise de la peau dans l'espace à l'instar des propriocepteurs dans le système musculaire squelettique.

La voie lemniscale permet donc de véhiculer les informations sensibles issues des mécanorécepteurs de type vibrations, déformations ou picotements par exemple.



- A – Corpuscule tactile (de Meissner) – mécanorécepteur à adaptation rapide, toucher et pression
- B – Corpuscule tactile (de Merkel) – mécanorécepteur à adaptation lente, toucher et pression
- C – Terminaisons nerveuses libres – adaptation lente
- D – Corpuscule (de Pacini) – mécanorécepteur à adaptation rapide, vibration et pression profonde
- E – Corpuscule de Ruffini – mécanorécepteur à adaptation lente, étirement cutané

Figure 12. Les différents types de récepteurs sensitifs cutanés (Widmaier et al., 2013)

#### 1.2.4. La voie de la douleur (voie spinothalamique)

Une sensation de douleur apparaît lorsque les fibres à haut seuil d'activation A $\delta$  et C sont activées. Les fibres A $\delta$  et C ont la particularité d'être principalement activées par des stimuli de haute intensité, elles sont donc capables de distinguer un stimulus nociceptif d'un stimulus non-nociceptif (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des petites fibres véhiculant la douleur

Fonction sensorielle	Type de récepteur	Catégorie de fibre	Diamètre de l'axone	Myélinisation	Vitesse de conduction
<b>Douleur, Température</b>	Terminaisons nerveuses libres	A $\delta$	1-5 $\mu$ m	+	5-30 m/s
<b>Douleur, Température, Prurit</b>	Terminaisons nerveuses libres	C	0,2-1,5 $\mu$ m	-	0,5-2 m/s

Les fibres A $\delta$  sont faiblement myélinisées avec une vitesse de conduction rapide comprise entre 5 et 15 m/s. Elles sont de petit calibre (2-5  $\mu$ m) et véhiculent l'information douloureuse et la sensibilité thermique et mécanique. Généralement, l'activation des fibres A $\delta$  entraîne une douleur rapide et aiguë. Les fibres A $\delta$  représentent 10 % des afférences cutanées. Les nocicepteurs A $\delta$  sont répartis en deux sous-classes principales :

- Les nocicepteurs A $\delta$  de type I HTM (pour high threshold mechanical nociceptors) répondent à la fois aux stimuli mécaniques et chimiques, mais aussi à des seuils de chaleur relativement élevés (> 50 °C). Si, un stimulus thermique est maintenu, ces afférences répondront à des températures plus basses, et seront sensibilisées dans le cadre d'une lésion tissulaire (Basbaum et al., 2009).
- Les nocicepteurs A $\delta$  de type II ont un seuil thermique beaucoup plus bas, mais un seuil mécanique très élevé. Ces afférences sont responsables de la "première" réponse de douleur aiguë à la chaleur nocive.

Les fibres C comprennent 70 % des nocicepteurs. Ce sont des neurones de petit diamètre (< 2  $\mu$ m) non myélinisés avec une vitesse de conduction plus lente que les fibres A $\delta$  de l'ordre de 0.5 à 2 m/s (Steeds, 2016). Elles réagissent aux stimuli intenses mécaniques, thermiques et chimiques. Les fibres C contribuent aux sensations de douleurs persistantes, mal localisées et diffuses.

Il existe 2 sous-catégories de fibres C selon leurs réponses aux différents stimuli :

- Les fibres C mécano-sensibles, sont pour la plupart polymodales, et répondent donc à plusieurs types de stimuli. Elles sont activées par des stimuli inférieurs au seuil douloureux. Les fibres C mécanosensibles sont subdivisées en deux sous-catégories :

- Les fibres C-MH (pour mechano-heat) qui sont sensibles à la chaleur (~ 40°C) et au toucher,
  - Les fibres C-MHC (pour mechano-heat-cold) qui sont sensibles aux stimuli douloureux liés au toucher, à la chaleur et au froid,
- Les fibres C mécano-insensibles sont activées par des stimuli intenses chimiques ou thermique. Certains sous-type répondent uniquement après avoir été sensibilisés par un stimulus chimique.

### **I.2.5. La douleur**

La douleur a été définie comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite dans ces termes », d'après The International Association for the Study of Pain (IASP), en 1979. Cette définition a été réévaluée récemment comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle aversive généralement causée par, ou ressemblant à celle causée par, une blessure tissulaire réelle ou potentielle. » (Raja et al., 2020). La nociception représente l'ensemble des processus d'intégration des stimuli douloureux. L'intégration du message nociceptif par le SNC permet d'induire une réponse comportementale et physiologique indispensable à la survie.

La douleur peut être définie selon sa durée :

- La douleur aiguë résulte d'un stimulus nocif transitoire et produit une sensation de douleur limitée par l'activation des nocicepteurs. Lorsqu'il n'y a pas de lésion tissulaire, la sensation prend fin dès lors que le stimulus nocif en question est éliminé. Lorsque le stimulus produit une blessure, cela entraîne une modification des réponses au niveau des nocicepteurs, de la moelle spinale et des structures supra-spinales, ce qui permet au corps d'engager des mécanismes de réparation et de prévenir toute nouvelle blessure. La douleur peut alors durer de quelques jours à plusieurs semaines (Loeser and Melzack, 1999). Ce type de douleur a un rôle d'alarme et protège les individus contre les dommages physiques.
- La douleur chronique, a quant à elle perdu ce rôle d'alarme. La douleur devient alors pathologique. La douleur chronique peut se développer longtemps après la guérison de la blessure et peut survenir même en l'absence de stimulus. La

douleur est considérée chronique, de manière générale, si elle persiste au-delà de 3 mois.

La douleur peut résulter de deux mécanismes d'origine distincts. Elle peut être nociceptive, c'est à dire due à l'excitation des nocicepteurs par un stimulus potentiellement dangereux pour l'organisme, ou neuropathique liée à un dysfonctionnement du SNP et/ou du SNC.

#### ***1.2.5.1. La douleur nociceptive***

La douleur nociceptive a pour origine un stimulus qui va activer les neurones sensitifs primaires appelés nocicepteurs. Les nocicepteurs sont composés de terminaisons de fibres nerveuses libres localisées au niveau de la peau, des muscles ou des viscères ; d'un corps cellulaire et d'axones peu myélinisés (fibre A $\delta$ ) ou amyéliniques (fibres C) (Basbaum et al., 2009). Le déclenchement du signal nociceptif se fait soit directement par l'agent nociceptif (stimulus thermique, mécanique ou chimique), soit indirectement via les substances algogènes (histamine, sérotonine, bradykinine...). Ces substances sont libérées par le tissu lésé ou par les cellules qui participent à un éventuel processus inflammatoire et qui agissent sur les protéines membranaires présentes au niveau des nocicepteurs (Julius and Basbaum, 2001). Le signal nociceptif ainsi généré ou potentiel d'action est conduit par les fibres afférentes. Le potentiel d'action se propage alors le long des fibres sensibles vers la moelle spinale et le SNC. Ce processus peut entraîner initialement une hyperexcitabilité périphérique (sensibilisation périphérique) et *in fine* une sensibilisation centrale, responsables de la sensation de la douleur qui est analysée dans le cortex. A côté de cette douleur nociceptive, il existe la douleur neuropathique qui se développe fréquemment au cours des NPIC.

#### ***1.2.5.2. La douleur neuropathique***

La douleur neuropathique est définie par la IASP comme : « une douleur initiée ou causée par une lésion ou une maladie du système somatosensoriel » (Jensen et al., 2011). Les douleurs neuropathiques peuvent être causées par des lésions traumatiques (lésion médullaire, hernies discales), de l'inflammation, des infections, un cancer ou encore peut être la conséquence d'un traitement pharmacologique (chimiothérapie) ou d'une pathologie (diabète, sclérose en plaque, accident vasculaire cérébral...).

La douleur neuropathique n'est pas une simple maladie, elle doit plutôt être considérée comme un syndrome causé par différents types de maladies et de lésions, qui se manifestent par un éventail de symptômes et de signes cliniques.

Ces symptômes se caractérisent généralement par des douleurs spontanées telles que des sensations de brûlures, de décharges électriques, d'hyperalgésies (une douleur amplifiée suite à un stimuli douloureux), d'allodynies (une réponse douloureuse suit à un stimulus normalement indolore), de paresthésies (sensations de fourmillement, d'engourdissement), ou encore par de dysesthésies (sensations tactiles anormales).

## **I.3. Neuropathies périphériques**

### **I.3.1. Généralités**

Les neuropathies périphériques sont des pathologies qui résultent de dommages tissulaires ou d'atteintes fonctionnelles des corps cellulaires, des axones, ou des gaines de myéline des nerfs périphériques. Elles peuvent impacter l'ensemble des nerfs moteurs, sensitifs et autonomes, à l'origine d'un nombre important et varié de symptômes (Hanewinckel et al., 2016). Leur prévalence est de 2,4 % dans la population générale et augmente avec l'âge (Watson and Dyck, 2015). Cette prévalence est plus forte chez certaines personnes notamment chez les personnes atteintes de diabète sucré ou du VIH. Les neuropathies peuvent donc être acquises (diabète, VIH, éthylisme, chimiothérapie...) ou héréditaires (maladie de Charcot-Marie-Tooth...) (Ramchandren, 2017).

Elles peuvent être classées selon le type et la répartition des nerfs atteints:

- Les mononeuropathies impliquent une lésion d'un seul nerf périphérique. Elles sont souvent causées par des traumatismes ou des compressions. La mononeuropathie la plus courante est le syndrome du canal carpien.
- Les mononeuropathies multiples impliquent des lésions de plusieurs nerfs distincts et non contigus. Ce type de neuropathie peut progresser et mimer une polyneuropathie symétrique distale.
- La polyneuropathie la plus courante est la polyneuropathie bilatérale distale des fibres motrices et sensitives. Elle se caractérise par l'atteinte des nerfs de manière longueur-dépendante (distance par rapport au corps cellulaire du nerf).

Plus le nerf est long, plus ce dernier risque d'être atteint. Ainsi, les patients atteints vont développer des symptômes au niveau des extrémités dans un premier temps.

Parmi les polyneuropathies, il existe une différence entre neuropathies à grandes et à petites fibres, selon le diamètre des fibres atteintes. Bien que les polyneuropathies impliquent le plus souvent ces 2 types de fibres, dans certains cas l'un des 2 types est principalement affecté.

Lorsque les fibres motrices sont atteintes, il y aura apparition d'une faiblesse musculaire ou d'une atrophie musculaire chez les patients. Une perte de sensation (vibration), de la proprioception ou encore de réflexes pourra également être observée.

La sensibilité à la douleur et aux températures étant médiées par les petites fibres sensibles (A $\delta$  et C), une atteinte de ces fibres s'appelle une neuropathie des petites fibres.

Selon l'étiologie, les neuropathies sont de types axonales (dégénérescence de l'axone) ou démyélinisantes (destruction de la myéline). De ce fait, les termes axonopathies et myélinopathies sont employés.

La durée des symptômes permet de définir si la neuropathie est aiguë (inférieure à 1 mois), subaiguë (de 1 à 6 mois) ou chronique (supérieure à 6 mois) (Magy and Vallat, 2013).

Le diabète et l'alcoolisme chronique restent les principales causes de neuropathie périphérique. Malheureusement, environ 10 à 20 % des neuropathies périphériques sont encore de cause indéterminée.

### **1.3.2. Symptômes**

Les symptômes observés chez les patients sont généralement sensitivomoteurs. Dans la plupart des cas, les douleurs sont distales et symétriques et commencent dans les membres inférieurs. Elles peuvent également être asymétriques, multifocales et débiter dans les membres supérieurs. Les patients consultent généralement pour des problèmes sensitifs. Elles peuvent provoquer des sensations anormales et/ou des pertes de sensibilité.

Les symptômes moteurs se caractérisent principalement par une faiblesse musculaire et des crampes ou fasciculations.

Les signes cliniques sensitifs quant à eux sont de types « positifs » ou « négatifs ». Les troubles négatifs vont être associés à une perte de sensibilité douloureuse, des troubles de l'équilibre et des tremblements. Les symptômes positifs sont associés à une activité nerveuse anormale, ils sont de type paresthésies (fourmillements, sensation de froid, picotements, sensations de brûlure etc. en l'absence de stimulation), dysesthésies (intolérance au toucher, exemple : contact des draps), allodynies (douleur induite par un stimuli normalement indolore). Par exemple dans le cas des polyneuropathies sensorielles à petites fibres, les symptômes se manifestent par une perte de la sensibilité à la piqûre d'épingle et à la température. Ces pertes sont souvent accompagnées, de symptômes dits « positifs » (England and Asbury, 2004).

Des troubles liés à une atteinte du système nerveux autonome peuvent aussi apparaître. Des malaises orthostatiques ou post-prandiaux, des troubles de la sudation, de la miction, ou encore érectiles peuvent mettre sur la piste d'une atteinte autonome.

### **I.3.3. Examens cliniques**

La prise en charge diagnostique des neuropathies périphériques doit suivre les recommandations du rapport de la Haute Autorité de la Santé (HAS) datant de Mai 2007. Ces recommandations ont pour but de rechercher et préciser la topologie des symptômes. En complément d'un examen général, l'examen neurologique doit évaluer plusieurs paramètres : la force globale des 4 membres, distale et proximale, les réflexes ostéotendineux (achilléens, rotuliens, bicipitaux, tricipitaux...), les différents types de sensibilité : à la température, à la douleur, au toucher, à la mobilisation des articulations et à la vibration. Les sensibilités à la douleur sont également évaluées par la recherche d'une allodynie, d'une hyperalgésie ou encore d'une hyperpathie (réponse exacerbée à un stimulus répétitif). L'instabilité par déficit proprioceptif est examinée ainsi que les nerfs crâniens. Des déformations squelettiques et articulaires, hypertrophie nerveuse sont recherchées.

En général, cet examen suffit pour poser un diagnostic. Néanmoins, un examen électrophysiologie de type électroneuromyographie (ENMG) peut être demandé lorsque l'examen clinique n'est pas suffisant. Cet examen permet de mieux identifier les atteintes topologiques (distales et proximales, membres inférieurs et supérieurs, symétriques et asymétriques). Il permet également de déterminer le type de fibre

atteinte et d'identifier une axonopathie, une myélinopathie ou encore une neuropathie.

Dans certains cas, en complément des résultats de l'ENMG, une biopsie cutanée peut être réalisée. Elle est notamment très utilisée pour le diagnostic des neuropathies périphériques à petites fibres, caractérisées par des signes cliniques discrets et un ENMG normal. La biopsie cutanée est un geste peu invasif, qui permet après un immunomarquage de la protéine gene product 9.5 (PGP9.5) de quantifier la densité des fibres nerveuses intra-épidermiques (FNIE), qui correspondent aux terminaisons nerveuses des fibres A $\delta$  et C (Figure 13). La protéine PGP9.5 est présente dans le cytoplasme des neurones du SNP et du SNC.

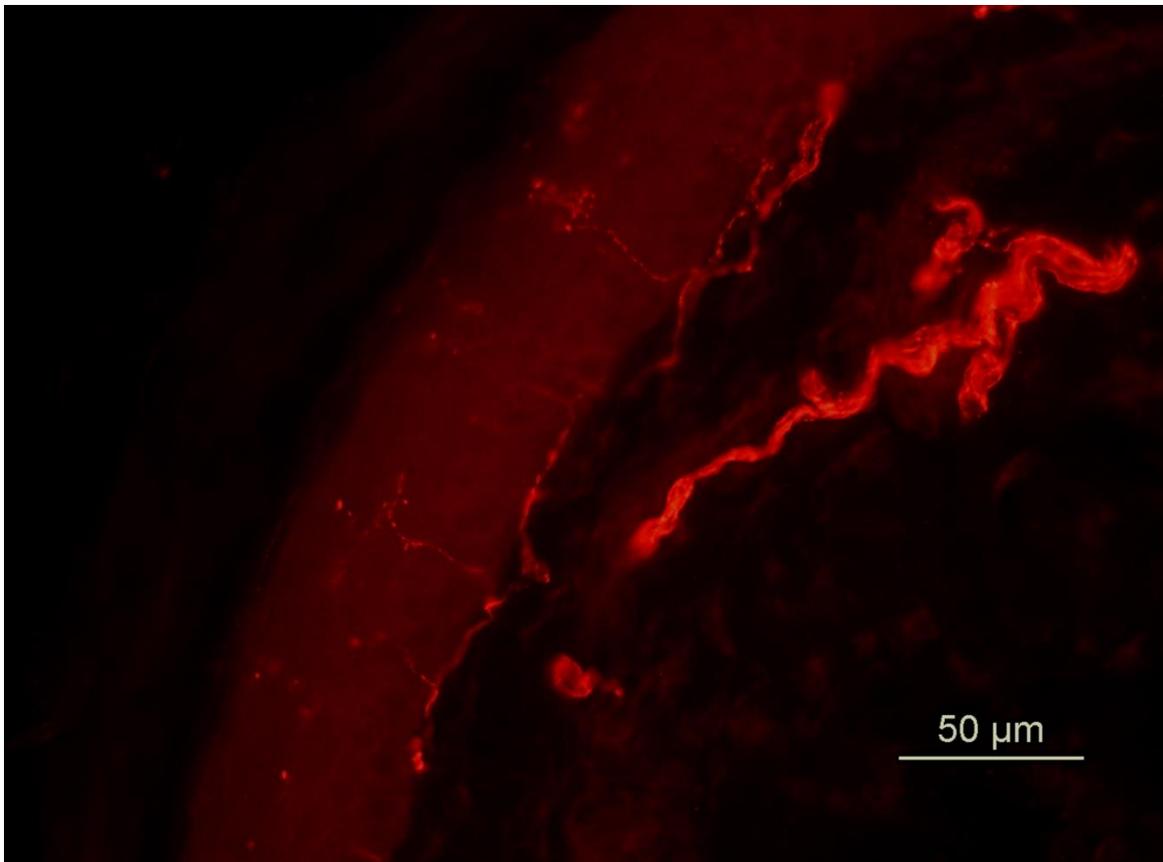


Figure 13. Immunofluorescence d'une coupe de peau d'une souris témoin par un marquage de PGP9.5

Morphologiquement, les afférences se projettent à travers le derme dans l'épiderme sous forme de fibres nerveuses épidermiques. Avant de pénétrer la lame basale (bordant les couches dermique et épidermique de la peau), ces faisceaux de fibres se projettent horizontalement et se ramifient abondamment. Ce réseau neuronal dense est appelé plexus nerveux sous-épidermique. La densité des FNIE de patients peut

être comparée à celle de donneurs sains. Les règles pour la quantification des FNIE ont été validées par l'EFNS (European Federation of Neurological Societies) pour permettre des comptages homogènes (Lauria et al., 2005) d'un centre à un autre. Par convention, seules les fibres issues de plexus nerveux sous-épidermiques qui franchissent la jonction dermo-épidermique sont comptabilisées. Les arborescences secondaires des fibres ayant franchi la jonction dermo-épidermique ne sont pas prises en compte ainsi que les fragments de FNIE isolés dans l'épiderme (Figure 14). Le comptage doit être effectué sur au moins 3 coupes successives ou prises au hasard. Le nombre de FNIE est rapporté à la longueur de l'épiderme. Le résultat est exprimé en nombre de FNIE par mm<sup>2</sup>.

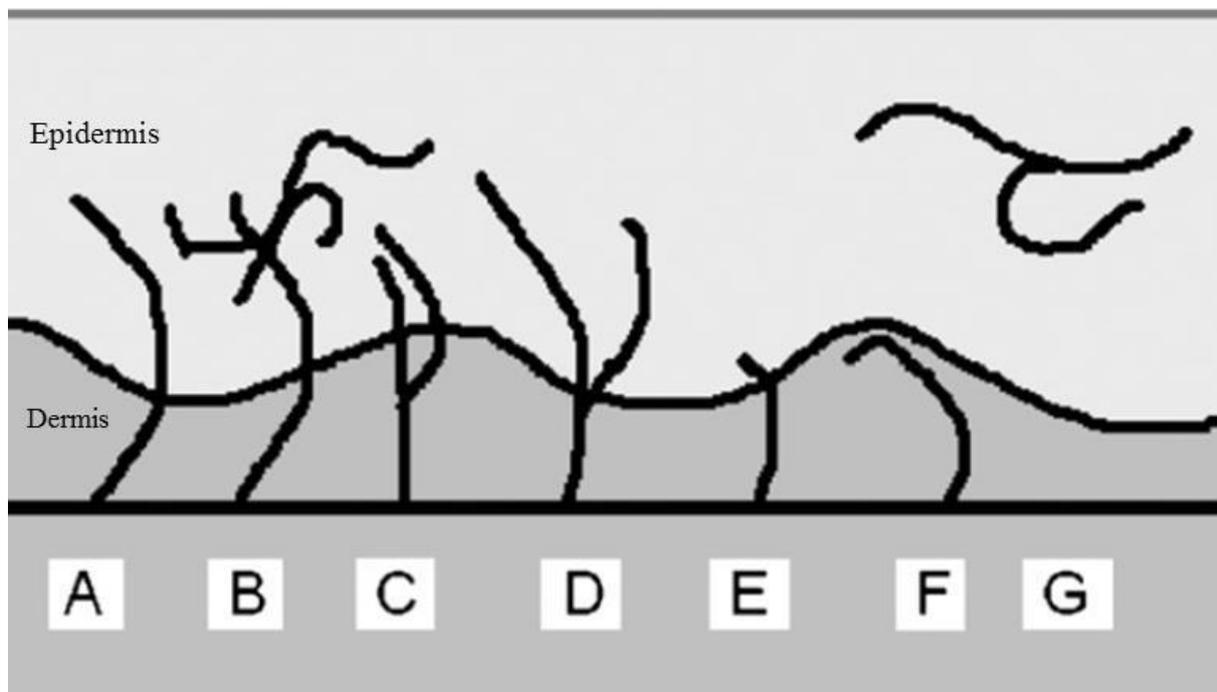


Figure 14. Règles de comptage des fibres nerveuses intraépidermiques selon l'EFNS. (Modifié d'après Lauria et al. 2005). Les fibres A, B et E sont comptées comme une seule fibre nerveuse, C et D comme deux fibres nerveuses et les F et G ne sont pas comptées.

#### **I.3.4. Neuropathies toxiques**

Les neuropathies toxiques représentent une proportion importante des polyneuropathies dites acquises. Elles peuvent être causées par:

- Alcool : une forte consommation d'alcool peut entraîner des lésions nerveuses et donc une neuropathie. Les patients présentent une atteinte des nerfs périphériques généralement symétrique, qui peut être focale, multifocale ou

diffuse. Les symptômes sont variables pouvant être positifs (hyperalgésie, allodynie) ou négatifs (hypoalgésie...).

- Métaux lourds : l'intoxication aux métaux lourds est bien connue pour être la cause de neuropathies périphériques. Une intoxication aiguë à l'arsenic se caractérise par une neuropathie périphérique douloureuse, longueur-dépendante à prédominance sensitive. Si l'intoxication est chronique, une neuropathie périphérique indolente à prédominance sensitive peut se développer. En cas d'intoxication sévère, les symptômes développés se rapprochent du syndrome de Guillain Barré, avec une polyradiculoneuropathie sensitivomotrice (Staff and Windebank, 2014). L'intoxication au plomb peut également induire des neuropathies périphériques mais cette fois-ci à dominance motrice.
- Médicaments : parmi les médicaments causant le plus de neuropathies périphériques, les agents de chimiothérapie anticancéreuse sont les plus fréquemment rapportés (**cf I.4 Neuropathies périphériques chimio-induites**). Bien d'autres molécules comme les antimicrobiens peuvent également entraîner une neuropathie périphérique. Par exemple, un traitement chronique au linézolide utilisé dans les infections Gram+ de la peau et des tissus mous peut induire une neuropathie sensitive irréversible (Zivkovic and Lacomis, 2005). Mais, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement à la neuropathie causée par la chimiothérapie.

#### **I.4. Neuropathies périphériques chimio-induites**

La NPIC est une complication courante. La prévalence des NPIC est en constante augmentation ces dernières années, notamment à cause du nombre croissant de cancers dépistés et traités et d'une amélioration du taux de survie des patients. La survenue des NPIC pendant la chimiothérapie peut nécessiter une réduction de la dose de la molécule neurotoxique, voire d'un arrêt avant la fin du traitement prévu (Flatters et al., 2017), ce qui entraîne une diminution des chances de survies face au cancer. En général, les NPIC disparaissent après l'arrêt de la chimiothérapie. Cependant, elles peuvent persister et entraîner des symptômes chroniques, des mois, voire des années plus tard, impactant considérablement la qualité de vie des patients.

De manière générale et sans distinction du type de chimiothérapie utilisée, la prévalence des NPIC un mois après la fin de la chimiothérapie est d'environ 68 %, avec une baisse à 60 % à 3 mois et une baisse à 30 % à 6 mois ou plus (Seretny et al., 2014). Le type, la dose mais également le cycle d'administration de la chimiothérapie influencent le risque de développer une NPIC.

Les NPIC se développent principalement au niveau des extrémités et sont définies comme des neuropathies en « gants » et « chaussettes », bien que dans les cas plus graves, elles se propagent de manière proximale affectant la plupart des membres. Il s'agit principalement d'une neuropathie sensitive, mais parfois la fonction autonome peut également être affectée, tout comme la motricité fine et la proprioception. D'un point de vue morphologique, une altération des fibres sensibles et une baisse de la densité des FNIE sont fréquemment rencontrées (Bessaguet et al., 2018; Boyette-Davis et al., 2011; Siau et al., 2006). Les patients vont développer des symptômes sensitifs négatifs et positifs qui peuvent être douloureux. Ils souffrent de dysesthésies, de paresthésies, d'hyperalgésie et d'allodynie au niveau distal. Selon le type de chimiothérapie (molécule, dose, fréquence d'administration) reçue et suivant l'individu (prédisposition génétique à développer des neuropathies, pathologies sous-jacentes), les symptômes peuvent être plus au moins présents. Chaque molécule de chimiothérapie anticancéreuse a sa propre toxicité, ce qui complique leur prise en charge.

Dans ce cadre, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la neurotoxicité de deux agents cytotoxiques, fréquemment utilisés et très neurotoxiques : la vincristine (VCR) et le paclitaxel (PTX). Ces derniers appartiennent respectivement à la classe des vinca-alcaloïdes et des taxanes.

#### **I.4.1. Neuropathie induite par la Vincristine**

##### ***I.4.1.1. Généralités et symptômes***

La VCR est un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar *vinca rosea* Linn (*Catharantus roseus*). Cet agent anti-cancéreux est indiqué dans le traitement des cancers hématologiques (lymphomes, leucémies aiguës lymphoblastiques...), mais également dans le traitement des rhabdomyosarcomes, des ostéosarcomes, des tumeurs embryonnaires, des sarcomes d'Ewing, des neuroblastomes et des myélomes. Du fait d'une biodisponibilité orale faible, la VCR est administrée en

intraveineuse, diffusant rapidement dans l'ensemble de l'organisme. Sa capacité à traverser la BHE est faible. La VCR est l'agent le plus neurotoxique de la classe des vinca-alcaloïdes. Cette neurotoxicité est une cause courante d'arrêt du traitement.

Les vinca-alcaloïdes se lient à la tubuline libre du cytoplasme, provoquant son agrégation en polymères non fonctionnels. La tubuline libre est alors indisponible pour être incorporée dans les microtubules (Sahenk et al., 1987), les cellules sont alors bloquées en métaphase.

Les patients traités par la VCR vont développer une polyneuropathie périphérique dose dépendante dans 35 à 45 % des cas (Windebank and Grisold, 2008). En effet, les patients traités avec une dose de 1,33 mg/semaine vont montrer des signes de neuropathie périphérique plus fréquemment et de manière plus prononcée qu'à une dose de 0,67 mg/semaine (Verstappen et al., 2005). Les effets neurotoxiques de la VCR apparaissent dès la dose cumulée de 4 mg/kg (Zajączkowska et al., 2019).

La VCR induit une neuropathie sensitivomotrice et dose-dépendante : des symptômes sensitifs tels que des dysesthésies, des paresthésies, des hyperalgésies et des allodynies tactiles ainsi que des symptômes moteurs et autonomes sont rapportés (Authier et al., 2009). Les premiers symptômes sensitifs sont des paresthésies au niveau des doigts et des pieds. Des faiblesses musculaires peuvent apparaître si le traitement est maintenu (Casey et al., 1973). Un phénomène de « coasting » peut survenir, ce phénomène se traduit par l'aggravation des symptômes dans les mois suivant l'arrêt du traitement suivie d'une amélioration (Miltenburg and Boogerd, 2014). L'arrêt du traitement par la VCR n'induit pas nécessairement la disparition des symptômes, quelques semaines, mois, voire années sont nécessaires à la disparition des symptômes.

#### ***1.4.1.2. Principaux mécanismes neurotoxiques induits par la vincristine.***

##### ***1.4.1.2.1. Microtubules et transport axonal***

L'action inhibitrice de la VCR sur la polymérisation des  $\beta$ -tubulines induit une altération des microtubules axonaux conduisant à des phénomènes de dilatation et de dégénérescence des fibres myélinisées et non myélinisées (Tanner et al., 1998). La dilatation des axones serait due à une accumulation progressive des organelles et des vésicules axoplasmiques causée par un défaut du transport antérograde (Topp et al., 2000). L'action de la VCR sur les microtubules induit une hyperexcitabilité des fibres

sensitives qui conduit à l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique (Tanner et al., 1998). L'hyperalgésie peut également être liée à la diminution du nombre de fibres provoquée par la modification de la structure tubulaire axonale. Dans un modèle de rat ayant reçu quotidiennement des injections de VCR en intrapéritonéale (i.p), une dégénérescence des FNIE a été observée (Siau et al., 2006). Les fibres en voie de dégénérescence développent une hyperexcitabilité associée à des décharges spontanées responsables d'une sensibilité mécanique à la pression exacerbée (Siau et al., 2006). Des études du nerf sciatique et du nerf saphène en microscopie électronique ont montré que la VCR diminuait la densité des fibres myélinisées et augmentait le diamètre axonal (Boehmerle et al., 2014).

La VCR en déstabilisant les microtubules pourraient également impacter les oligodendrocytes au niveau du SNC. En effet, les oligodendrocytes sont essentiellement composés de microtubules. Les oligodendrocytes, et les CS ont un rôle fondamental dans la myélinisation des fibres nerveuses. Une étude récente portant sur une co-culture de progéniteurs d'oligodendrocytes de souris et de neurone, ont mis en évidence que la VCR altérait la structure et la fonction des oligodendrocytes, avec pour conséquence une myélinisation anormale et la perte des fibres sensibles périphériques (Lee and Hur, 2020).

#### I.4.1.2.2. Homéostasie calcique

Le  $Ca^{2+}$  est un régulateur majeur de beaucoup de processus cellulaires et les concentrations intracellulaires calciques dépendent principalement de l'influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire, du relargage par le réticulum endoplasmique et de la séquestration par les mitochondries. La VCR modifie l'homéostasie cellulaire en provoquant une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les neurones. En effet, la VCR peut influencer le mouvement du  $Ca^{2+}$  à travers la membrane mitochondriale, en réduisant à la fois la quantité et le taux d'absorption du  $Ca^{2+}$  par la mitochondrie et en diminuant son efflux (Tari et al., 1986). La modification de l'entrée et donc de la concentration intra-mitochondriale de  $Ca^{2+}$  altère la fonction mitochondriale et notamment son rôle tampon (Islam et al., 2019). Ces changements mitochondriaux peuvent entraîner une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et donc induire une augmentation de l'activité neuronale et une augmentation de la fonction gliale. Dans un modèle NPV chez le rat, des molécules diminuant la disponibilité du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et extracellulaire ont

permis de diminuer les symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécanique (Siau and Bennett, 2006).

#### I.4.1.2.3. Neuroinflammation

La NPIV a une part inflammatoire, il a été démontré qu'une infiltration de macrophages avait lieu dans les GS et dans les nerfs sciatiques après traitement par la VCR (Uçeyler et al., 2006). Plusieurs études suggèrent que l'activation des macrophages serait associée à une augmentation du niveau de médiateurs inflammatoires et contribuerait à la mise en place de la neuropathie (Flatters et al., 2004; Liu et al., 2000). Une autre étude confirme une infiltration de monocytes exprimant le récepteur aux chimiokines CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> dans les nerfs, après exposition à la VCR, conduisant au relargage d'espèces oxygénées réactives (ROS) et à l'activation de TRPA1 (transient receptor potential ankyrin subtype 1 protein) dans les neurones sensitifs, induisant une douleur (Old et al., 2014). Néanmoins, chez les souris déficientes pour CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>, l'allodynie est seulement retardée.

Les cellules de Langerhans pourraient également jouer un rôle dans la mise en place de la NPIV. En effet après exposition à la VCR, leur nombre est augmenté dans la peau. Ces cellules présentatrices d'antigène (CPA), captent les antigènes au niveau cutané pour les conduire au niveau des ganglions lymphatiques. Les cellules de Langerhans pourraient participer au développement de la douleur induite par la VCR par différents mécanismes dont la libération de monoxyde d'azote (NO), de cytokines pro-inflammatoires (Qureshi et al., 1996) et de facteurs neurotrophiques (Torii et al., 1997). Ces mécanismes sont tous responsables de la sensibilisation des nocicepteurs, de décharges spontanées qui se traduisent cliniquement par une hyperalgésie mécanique.

#### I.4.1.2.4. Les opioïdes

L'endomorphine 1 (EM1) et l'endomorphine 2 (EM2) sont des peptides opioïdes endogènes, ligands des récepteurs opioïdes  $\mu$ . L'EM1 est principalement exprimée au niveau du cerveau, tandis que l'EM2 est retrouvée principalement au niveau de la moelle spinale. En effet, une étude récente utilisant des tissus de moelle spinale et de GS de rongeurs a montré que l'allodynie induite par la VCR était associée à une diminution de l'activité endogène des récepteurs opioïdes  $\mu$ , due notamment à une diminution de l'expression d'EM2 (Yang et al., 2014).

Cependant, il est important de souligner que l'administration exogène d'agonistes des récepteurs opioïdes  $\mu$  ne permet pas de traiter la douleur induite par la VCR et le PTX sur le plan clinique (Boyette-Davis et al., 2013). Cette constatation réaffirme la complexité de la compréhension des mécanismes et de l'identification de cibles pharmacologiques pour traiter les NPIC.

#### ***1.4.1.3. Modèles animaux de la neuropathie induite par la VCR***

Les modèles animaux de NPIC ont été exclusivement développés chez les rongeurs, et plus particulièrement chez le rat (Authier et al., 2009). Le modèle animal de NPIC le plus utilisé a été décrit en 1996 par l'équipe d'Aley (Aley et al., 1996). Le protocole a été ensuite adapté en 2003 par Authier au niveau de la dose et du schéma d'injection permettant de réduire la détérioration de l'état clinique du rat (Authier et al., 2003). Dans ce modèle, une injection quotidienne de VCR par voie i.v. à des doses de 20, 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  durant 2 semaines induit une allodynie et une hyperalgésie mécanique et thermique (Aley et al., 1996; Weng et al., 2003) sans modification de poids des animaux. D'autres modèles ont été développés par la suite, en privilégiant l'administration i.p. ou i.v., en jouant sur la fréquence ou encore la dose administrée (Nozaki-Taguchi et al., 2001; Siau et al., 2006; Thibault et al., 2008). Ces différents travaux ont permis de montrer qu'une dose de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  était suffisante pour induire des douleurs neuropathiques chez le rat sans détériorations cliniques.

Chez la souris, le premier modèle a été développé par Contreras et al., en 1997. La VCR était administrée en i.p. 2 fois par semaines pendant 10 semaines à la dose de 1,7  $\text{mg}/\text{kg}$ . Les animaux traités développaient une hypoalgésie thermique et une baisse de la vitesse de conduction nerveuse était observée (Contreras et al., 1997). Néanmoins, la mortalité pour ce protocole était très importante (74 %) et la sensibilité tactile n'avait pas été évaluée. Dans un autre modèle, la VCR a été injecté à 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  quotidiennement pendant 1, 7 ou 17 jours, les souris ont développé une allodynie tactile sans détérioration de leur état général (Kiguchi et al., 2008a, 2008b; Saika et al., 2009). Dans les modèles murins, les doses utilisées sont très variables. Ces différences sont principalement dues à la différence de sensibilité des souches de souris utilisées à la neurotoxicité de la VCR. Ces modèles se focalisent souvent sur les symptômes de la NPIC sans analyser les atteintes morphologiques.

## **I.4.2. Neuropathie induite par le Paclitaxel**

### **I.4.2.1. Généralités**

Le paclitaxel (PTX) appartient à la famille des taxanes. Il est principalement produit à partir d'extraits de certaines espèces d'ifs (*Taxus brevifolia*), mais peut être également extrait de champignons endophytes. Il est utilisé pour traiter différents types de cancer, notamment les cancers du sein, poumons ou de l'ovaire. Le PTX est le plus neurotoxique de la classe des taxanes. Sa neurotoxicité est dose et durée dépendante, mais également formulation dépendante. En effet, la neuropathie induite par le PTX est plus sévère lorsque sa formulation contient de l'huile de ricin polyoxyéthylée. La formulation la moins sévère est le nab-paclitaxel, synthétisé par un processus d'homogénéisation à haute pression du PTX en présence d'albumine humaine (Peng et al., 2017; Yared and Tkaczuk, 2012).

Le PTX se lie à la sous-unité  $\beta$ -tubuline des microtubules entraînant la stabilisation des microtubules et perturbant leur fonctionnement. Cette stabilisation de la polymérisation des microtubules provoque une défaillance du transport axonal entraînant une polyneuropathie. Les symptômes peuvent commencer quelques jours après la première dose. Ils sont dose-dépendants et ont tendance à s'améliorer après l'arrêt du traitement. Chez certains patients, les symptômes peuvent persister jusqu'à 1 à 3 ans après la fin du traitement et peuvent parfois ne jamais disparaître (Eckhoff et al., 2015).

L'incidence des NPIP est comprise entre 61 et 92 % (Brozou et al., 2018; Seretny et al., 2014) et dans 60 % des cas la NPIP devient chronique (Tanabe et al., 2013). La neuropathie induite par les taxanes se présente généralement comme une neuropathie à dominante sensorielle, affectant principalement les fibres sensorielles de petit diamètre. Elle se manifeste habituellement par des paresthésies, des dysesthésies, des engourdissements, une altération de la proprioception et une perte de dextérité principalement au niveau des orteils et des doigts (distribution en gants et chaussettes). Les atteintes motrices et autonomes sont moins fréquentes mais peuvent également se développer (De luliis et al., 2015).

### ***1.4.2.2. Principaux mécanismes neurotoxiques du PTX***

#### **1.4.2.2.1. Microtubules et transport axonal**

Le PTX est un agent de chimiothérapie anticancéreuse très efficace en raison de la stabilisation des microtubules dans les cellules cancéreuses. Cependant, cette stabilisation affecte également les microtubules des neurones sensitifs (GS et axones) du SNP. Il a été montré que le PTX altère le transport des protéines, des organelles, des nutriments, des neurotransmetteurs mais également des ARNm (Benbow et al., 2017; Bobylev et al., 2015; Flatters and Bennett, 2006; Tasnim et al., 2016). La stabilisation des microtubules entraîne donc une perte du transport axonal, ce qui favorise la dégénérescence axonale et aboutit à une neuropathie périphérique (Fukuda et al., 2017).

#### **1.4.2.2.2. Impact sur les mitochondries et le stress oxydant**

Le traitement par le PTX altère non seulement le transport axonal des mitochondries mais aussi leur morphologie et leur fonction. Les mitochondries des fibres myélinisées et des fibres C non-myélinisées traitées par le PTX gonflent et se vacuolisent avec la fragmentation des crêtes mitochondriales, suite à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (Bernardi et al., 2006; Flatters and Bennett, 2006). Le PTX provoque également des modifications du flux calcique, induisant des déficiences dans la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui entraîne des déficits en ATP. Ce déficit en ATP, diminue le transport axonal, ce qui favorise la rupture du gradient ionique de la membrane axonale et favorise l'hyperexcitabilité ou/et les décharges spontanées des fibres (Xiao and Bennett, 2008) La diminution d'ATP est détectable pendant la sensation de douleur induite par le PTX et persiste même après le pic de la sensation de douleur (Duggett et al., 2017). On pense que l'altération de la fonction mitochondriale entraîne en outre la dégénérescence des ramifications terminales et favorise l'apparition de la douleur neuropathique (Flatters et al., 2006).

La réponse au stress oxydant est également altérée par le traitement au PTX, ce qui augmente encore le déficit en ATP (Shim et al., 2019). Le traitement avec des antioxydants réduirait le dysfonctionnement mitochondrial, la perte de FNIE et la douleur induite par le PTX (Janes et al., 2013; Jin et al., 2008). Les dommages mitochondriaux et les ROS sont étroitement liés puisque les dommages mitochondriaux entraînent la production de ROS, notamment la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les ROS, à leur tour, endommagent les mitochondries, induisant une fragmentation de l'ADN mitochondrial et une perte de potentiel de la membrane mitochondriale (Yang et al., 2016). Les ROS sont donc des acteurs cruciaux de la réaction de stress oxydant et sont de plus en plus exprimés après un traitement au PTX (Duggett et al., 2016).

#### I.4.2.2.3. Homéostasie ionique

L'homéostasie calcique est altérée par les dommages mitochondriaux induit par le PTX mais pas seulement. Le PTX peut également stimuler la libération de  $Ca^{2+}$  par le RE : ce phénomène serait médié par le récepteur au 1,4,5-triphosphate (IP3R) (Boehmerle et al., 2006). L'augmentation de libération de  $Ca^{2+}$  par le RE est responsable d'une exacerbation de l'expression des canaux calciques CaV3.3 chez le rat, associée au développement d'hyperalgésie mécanique (Okubo et al., 2011).

La modification de l'homéostasie ionique pourrait également être causée par l'altération d'autres canaux ioniques. En effet, les canaux  $K^+$  sont exprimés dans les GS participant notamment à la régulation de l'excitabilité membranaire (Pongs, 2008). Il a été montré chez le rat que l'administration de PTX induisait une baisse de l'expression des canaux  $K^+$  à l'origine d'une activité neuronale spontanée et d'une hyperexcitabilité neuronale dans les GS (Zhang and Dougherty, 2014).

Les canaux cationiques TRPV1 et TRPA1, des modulateurs importants des voies de la douleur, sont surexprimés après injection de PTX chez le rat (Hara et al., 2013; Materazzi et al., 2012). Des antagonistes de TRPA1 montrent une diminution de l'inflammation et de l'hyperalgésie mécanique et thermique induite par le PTX chez le rat (Chen et al., 2011). L'administration de PTX est aussi associée à une augmentation de l'expression des canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.7 dans un modèle murin mais également chez l'Homme (Li et al., 2018). Le blocage de Nav1.7 dans différents modèles de douleur neuropathique permet de diminuer l'effet l'hyperalgésique du PTX chez le rat (Ghelardini et al., 2010).

#### I.4.2.2.4. Neuroinflammation

Le PTX induit un processus inflammatoire provoqué par la libération de cytokines et de chimiokines par des cellules immunitaires et l'infiltration de macrophages dans les GS, et cette réaction inflammatoire entraîne des douleurs neuropathiques (Zhang et al., 2016). La douleur induite par le PTX a pu être prévenue par l'utilisation d'un agent anti-TNF- $\alpha$  et un agoniste des récepteurs de l'IL-1 (Al-Mazidi et al., 2018). De manière

similaire, l'inhibition de l'IL-8 et de ces récepteurs a permis de diminuer l'hypersensibilité mécanique et au froid induite par le PTX (Brandolini et al., 2017).

De nombreuses chimiokines et leurs récepteurs semblent jouer un rôle dans la survenue de la NPIP (Manjavachi et al., 2019). L'expression de CXCL12 est augmentée après un traitement au PTX et est corrélée à une augmentation des courants postsynaptiques excitateurs dans les neurones de la corne dorsale spinale. L'inhibition de la voie de signalisation CXCL12 améliore l'allodynie mécanique induite par le PTX (Xu et al., 2018).

Un autre élément du système immunitaire inné, le système du complément a été associé, via l'activation du composant 3 du complément (C3), à la NPIP. *In vivo* chez le rat, l'élimination du C3 a amélioré l'hypersensibilité au toucher induite par le PTX et a restauré une densité en FNIE normale (Xu et al., 2018).

Les principaux acteurs de l'inflammation dans les GS sont les macrophages. Une surexpression de plusieurs facteurs en lien avec les macrophages a été observée, notamment CD163, un marqueur des macrophages, et également MMP-3, une métalloprotéine matricielle-3. La MMP-3 peut digérer la matrice extracellulaire et attirer les macrophages (Nishida et al., 2008). Une autre chimiokine, CCL2 et son récepteur CCR2 ont vu leur expression augmentée dans un autre modèle de NPIP au niveau des neurones des GS (Zhang et al., 2013). La surexpression de CCR2 induit une augmentation des pics de calcium dans les neurones CCR2-positifs, la déplétion des macrophages empêche l'expression accrue de CCR2 et inverse la perte de FNIE et l'hypersensibilité mécanique (Zhang et al., 2016).

D'autres données suggèrent une activation des macrophages dans les GS et dans les nerfs sciatiques après une perfusion intraveineuse de PTX. En effet, une augmentation du nombre de macrophages activés est observée grâce au marquage CD68. Le CD68 est un marqueur de protéine lysosomale présente dans les macrophages activés (Peters et al., 2007).

Dans plusieurs études, une augmentation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) dans les CGS a été mise en évidence, après exposition au PTX (Peters et al., 2007; Warwick and Hanani, 2013). GFAP est un marqueur de l'activation gliale, l'augmentation de son expression suggère un rôle des CGS dans la survenue des

NPIP. Cette augmentation est corrélée à une augmentation des jonctions gaps entre les CGS, et favorise la production d'ATP. Les auteurs supposent que l'augmentation des jonctions lacunaires et de la sensibilité à l'ATP augmente la communication entre CGS et neurones, conduisant à l'hyper-excitation neuronale. Les cytokines libérées par les CGS contribueraient également à la sensibilisation et à l'excitation neuronale (Warwick and Hanani, 2013). L'administration de carbenoxolone, un inhibiteur des jonctions gaps produit un effet analgésique sur les souris traitées par le PTX (Warwick and Hanani, 2013).

#### ***1.4.2.3. Modèles animaux de la neuropathie induite par le PTX***

Les modèles animaux de NPIP ont été développés dans un premier temps chez le rat et la souris. Chez le rat, des injections sous-périneurales étaient utilisées (Röyttä and Raine, 1985; Röyttä and Raine, 1986). Ces modèles ont vite été remplacés par des modèles utilisant la voie i.p plus proche du mode d'administration utilisé chez l'Homme. L'utilisation d'une dose cumulée de PTX inférieure ou égale à 10 mg/kg est suffisante pour induire des douleurs de type hyperalgésie mécanique et allodynie mécanique chez le rat (Dina et al., 2001; Flatters and Bennett, 2004; Gauchan et al., 2009a, 2009b; Hopkins et al., 2016; Polomano et al., 2001; Smith et al., 2004). D'autres études utilisent des doses cumulées plus fortes (supérieures à 10 mg/kg) et montrent des signes de neurodégénérescence marquée avec des atteintes morphologiques. Les symptômes de types déficits moteurs et hypoalgésie thermique apparaissent également (Apfel et al., 1991; Authier et al., 2000; Cavaletti et al., 1997; Wang et al., 2002). Dans le modèle de Cavaletti *et al*, cinq jours d'injection quotidienne de 5 mg/kg de PTX (dose cumulée : 25 mg/kg) induisent une atteinte axonale du nerf sciatique.

Dans les modèles murins de NPIP, l'administration d'une dose cumulée d'environ 130 mg/kg chez la souris CD1 induit une importante hypoalgésie thermique associée à une déplétion en substance P dans les neurones des GS (Apfel et al., 1991). Des études plus récentes privilégient des doses de PTX plus modérées (1 à 2 mg/kg/j), couplées à une fréquence d'injection plus rapprochée, permettant de préserver l'état général des animaux (Ruiz-Medina et al., 2013).

Il existe également des modèles non-mammaliens comme la drosophile (ou mouches des fruits), *C. elegans* (ver de la famille des nématodes), ou encore le poisson zèbre plus communément appelé « zebrafish » (poisson de la famille des cyprinidés). Ils sont

surtout utilisés en recherche dans le but de mieux comprendre les mécanismes de dégénérescence des axones sensitifs induit par le PTX.

Des études sur la drosophile ont permis de mettre en évidence certains mécanismes et acteurs moléculaires potentiellement responsables de la neurotoxicité du PTX (Bhattacharya et al., 2012). Les larves de drosophile étant transparentes au troisième stade larvaire, il est très simple de pouvoir suivre la dégénérescence des axones sensitifs induite par le PTX. L'exposition des larves au PTX ont mis en évidence des atteintes neuronales similaires à celles observées chez les mammifères, à savoir des gonflements axonaux, la fragmentation et la formation de débris, ainsi que la perte d'axone (Gornstein and Schwarz, 2014). L'utilisation de la microscopie électronique à transmission a montré une diminution du nombre d'axones et la présence de grands trous dans les nerfs périphériques, seuls les axones sensitifs semblaient être affectés.

Le zebrafish peut également aider à comprendre les mécanismes de la neurotoxicité périphérique induite par le PTX (Lisse et al., 2016). Une analyse poussée de la peau des zebrafish a révélé la formation de niveaux accrus de peroxyde d'hydrogène dans les kératinocytes et la régulation à la hausse de la matrice-métalloprotéinase, MMP-13, spécifiquement dans la couche basale des kératinocytes. L'inhibition pharmacologique de la MMP-13 prévient la dégénérescence des axones sensitifs et la formation de lésions induites par le PTX, et corrige également les défauts de cicatrisation induits par le PTX (Lisse et al., 2016).

Ces modèles ont permis et permettent d'explorer les mécanismes de neurotoxicité induite par la VCR et le PTX avec la mise en lumière de potentielles cibles thérapeutiques neuroprotectrices ou neurorégénératrices du nerf périphérique. Les modèles murins, système intégratif de l'ensemble des fonctions physiologiques, nous ont semblé pour nos travaux plus adaptés pour tester l'effet bénéfique préventif de nouvelles thérapies pour la prise en charge de la douleur neuropathique et des atteintes morphologiques induite par la chimiothérapie.

## **1.5. Prise en charge de la douleur neuropathique**

Les douleurs associées aux neuropathies périphériques de manière générale, ne répondent pas ou trop peu aux antalgiques utilisés classiquement dans les traitements des douleurs comme le paracétamol ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens. De ce fait de nombreux patients ne reçoivent pas de traitement antalgique adapté (Finnerup

et al., 2015a). Il est donc nécessaire d'explorer d'autres approches pharmacologiques pour améliorer la prise en charge des douleurs neuropathiques, et en particulier celles causées par les NPIC.

Il existe néanmoins des recommandations qui permettent de classer les traitements selon le niveau de preuve de leur efficacité et ainsi établir des lignes de traitements.

### **I.5.1. Première intention**

Utilisé initialement comme traitement anticonvulsivant, la FDA (food and drug administration) a approuvé l'utilisation de la gabapentine dans le traitement des douleurs neuropathiques post-zostériennes (Dworkin et al., 2007). Elle dispose également d'une AMM en France dans le traitement des douleurs neuropathiques périphériques notamment la neuropathie diabétique. La HAS a également émis un avis favorable quant à l'utilisation en première intention de la gabapentine dans le traitement des douleurs neuropathiques dans leur ensemble et plus particulièrement dans le traitement des douleurs post-zostériennes. L'effet bénéfique de la gabapentine dans les douleurs neuropathiques serait dû à une baisse d'influx calciques dans les neurones entraînant une baisse de la libération de glutamate (Luo et al., 2001, 2002). Les analogues de la gabapentine disposent globalement d'un assez bon profil d'acceptabilité. Les effets indésirables les plus fréquents sont une prise de poids, une somnolence, une asthénie, des maux de tête, ou encore une sécheresse buccale (Dworkin et al., 2007).

Nous comptons aussi parmi les traitements de première ligne les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) notamment la duloxétine (Finnerup et al., 2015b). La duloxétine est indiquée dans le traitement des douleurs neuropathiques périphériques et a fait l'objet d'une approbation spécifique de la FDA et de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) dans le traitement des douleurs liées aux polyneuropathies diabétiques. Les mécanismes d'action de la duloxétine restent mal connus. Néanmoins, il semblerait que son effet bénéfique puisse être médié par le système opioïde périphérique et plus particulièrement par les récepteurs opioïdes  $\delta$  (Ceredig et al., 2018).

La venlafaxine, un autre IRSN, est également recommandé en première ligne dans le traitement des douleurs neuropathiques. L'effet anti-nociceptif de la venlafaxine serait médié par le recrutement des voies noradrénergiques descendantes ainsi que par les

récepteurs opioïdes  $\kappa$  et  $\mu$  (Schreiber et al., 1999). Cependant la venlafaxine ne fait l'objet d'aucune AMM en France ni d'approbation de la FDA dans le traitement des douleurs neuropathiques chez l'adulte.

Les IRSN sont à l'origine de nombreux effets indésirables généraux tels que des nausées, une somnolence, des insomnies ou encore une baisse de la libido.

Enfin, parmi les recommandations dans le traitement de première ligne des douleurs neuropathiques, on retrouve les antidépresseurs tricycliques (ATC) et plus particulièrement l'amitriptyline bénéficiant d'une AMM dans le traitement des douleurs neuropathiques périphériques chez l'adulte. Tous les ATC sont considérés comme ayant une efficacité comparable sur différents types de douleurs neuropathiques comme celles associées aux neuropathies diabétiques ou aux névralgies post-zostériennes. L'effet thérapeutique des ATC passerait par le blocage de canaux sodiques voltage-dépendants, l'inhibition de la recapture de la sérotonine ainsi que le blocage des récepteurs glutamatergiques à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Watanabe et al., 1993). Il a également été reporté que les récepteurs opioïdes pourraient être impliqués dans l'effet bénéfique des ATC (Benbouzid et al., 2008). Parmi de nombreux effets indésirables fréquents provoqués par les ATC, on retrouve par exemple la sécheresse buccale, une rétention urinaire, des nausées ou encore des palpitations. L'utilisation des ATC est donc contre-indiquée chez les patients atteints de troubles cardiaques ou de glaucome. Ces effets indésirables limitent leur utilisation, malgré des effets thérapeutiques plus importants comparés aux autres traitements de première intention (Attal et al., 2010).

### **I.5.2. Deuxième intention**

Depuis 2021, la prégabaline a été rétrogradée en traitement de 2<sup>ème</sup> intention contre les neuropathies périphériques (Moisset et al., 2021). Bien que la prégabaline soit un analogue structural de la gabapentine et que son mécanisme d'action soit similaire, son efficacité à réduire la douleur semble plus faible comparé à la nortriptyline (ATC) et la duloxétine (IRSN) (Barohn et al., 2021). En outre, le risque d'abus est également un problème majeur avec la prégabaline (Evoy et al., 2021; Hägg et al., 2020) et ce médicament est actuellement la cause la plus fréquente de prescription falsifiée (Tambon et al., 2021). Par conséquent, depuis le 24 mai 2021, il est devenu obligatoire

de prescrire la prégabaline sur des ordonnances sécurisées en France et la prescription doit être renouvelée au moins une fois tous les 6 mois.

Les patchs de capsaïcine à 8 % disposent d'une AMM dans le traitement des neuropathies périphérique en monothérapie ou associés à d'autres thérapies. La capsaïcine, qui fait partie de la famille des vanilloïdes, provoque des sensations de brûlure et d'irritation suivant son ingestion ou son application topique. La capsaïcine est un agoniste direct des récepteurs TRPV1, récepteurs ionotropiques qui s'activent en réponse à des stimuli thermiques supérieurs à 44°C. L'application d'un patch provoque des douleurs de type brûlure pendant environ 15 minutes dû à la libération de substance P au niveau des terminaisons nociceptives activées par la capsaïcine (Crawford and Xu, 2017). Cette libération de substance P désensibilise les terminaisons nerveuses, ce qui provoque un effet analgésique pendant environ 3 mois, 24 à 48 heures après application (Crawford and Xu, 2017).

Les patchs de lidocaïne 5 % font également partie des traitements pharmacologiques recommandés en seconde intention. La lidocaïne est un anesthésique local de la famille des amino-amides. Son mécanisme d'action serait lié à une stabilisation des membranes neuronales entraînant une diminution de l'activité de canaux sodiques induisant une diminution de la sensation douloureuse. Les patchs de lidocaïne 5 % ont actuellement une AMM uniquement pour les douleurs post-zostériennes.

Enfin, parmi les molécules recommandées dans les douleurs neuropathiques en seconde intention est retrouvé le tramadol. Le tramadol a une action agoniste sur les récepteurs opioïdes de type  $\mu$ . De façon intéressante, il possède également une action pharmacologique proche de celle d'un antidépresseur puisqu'il s'agit d'un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. En France, le tramadol ne dispose d'aucune AMM pour le traitement des douleurs neuropathiques. Néanmoins, une efficacité modérée a été établie dans le traitement des douleurs liées aux polyneuropathies d'origine diabétique (Finnerup et al., 2015b). Cependant, son utilisation n'est pas à privilégier en raison de ses nombreux effets indésirables (Finnerup et al., 2015b). En effet, le tramadol est à l'origine de vertiges, de nausées, de constipation et peut augmenter le nombre de crises chez les patients épileptiques.

### **I.5.3. Troisième intention**

Les opioïdes forts comme la morphine ou l'oxycodone sont recommandés en troisième intention. L'efficacité des opioïdes forts dans le traitement des douleurs neuropathiques reste modérée (Cooper et al., 2017). Leur usage est limité par leurs nombreux effets indésirables à l'origine d'arrêts prématurés du traitement. En effet, l'utilisation d'opioïdes peut être la cause de modifications immunologiques, d'hypogonadisme, de nausées, de constipation et peuvent également entraîner une forte dépendance physique au traitement. De plus, les mécanismes physiopathologiques des douleurs neuropathiques sont nombreux et varient selon leur origine, ainsi les traitements recommandés ne sont pas forcément adaptés à toutes les douleurs neuropathiques.

### **I.5.4. Prises en charges des neuropathies chimio-induites**

Les douleurs neuropathiques associées aux NPIC sont spécifiques à la physiopathologie de chaque agent anticancéreux neurotoxiques et nécessite une prise en charge particulière qui actuellement limitée dans le choix des molécules disponibles efficaces sur le marché. Étant donné l'absence d'agents préventifs efficaces, les cliniciens doivent soigneusement évaluer les bénéfices des agents anticancéreux neurotoxiques par rapport aux risques de développer une neuropathie irréversible à long terme, en particulier chez les patients atteints de neuropathie sous-jacente et présentant des affections qui prédisposent à la neuropathie.

De manière générale, les patients atteints de NPIC légère peuvent continuer à recevoir des doses complètes d'anticancéreux. Cependant, si les symptômes s'aggravent, le risque de neurotoxicité potentiellement invalidante doit être mis en balance avec le bénéfice de la poursuite du traitement. Pour les patients qui développent une NPIC plus sévère, les cliniciens doivent évaluer et discuter avec les patients de la pertinence de la réduction de la dose, de l'arrêt ou de l'utilisation de schémas de traitement intermittents.

Les recommandations mises à jour en 2020 de l'ASCO (American society of clinical oncology) préconisent l'utilisation de la duloxétine pour les patients atteints de NPIC (Loprinzi et al., 2020). Malgré ces recommandations, le bénéfice de son utilisation reste modeste et bien inférieur à ce qui est souhaitable.

Au vu du manque d'options thérapeutiques efficaces dans la prise en charge des douleurs induites par les NPIC, facteur limitant à un bon suivi du traitement anticancéreux chez un nombre croissant de patients, il devient urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prévention des NPIC.

## **I.6. Nouvelles cibles thérapeutiques pour un traitement préventif**

Pour prévenir l'apparition des troubles sensitifs (y compris la douleur) associés aux NPIC, il faudrait limiter la dégénérescence et/ou favoriser la régénération des neurones sensitifs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux modulateurs du système Rénine-Angiotensine (SRA) et aux antagonistes du récepteur à la cholécystokinine de type 2 (CCK2R).

### **I.6.1. Le système Rénine-Angiotensine**

#### ***I.6.1.1. Généralités***

Le SRA joue un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle. En particulier par l'action de l'angiotensine II, un peptide formé suite à une cascade de réactions enzymatiques à partir de l'angiotensinogène.

L'angiotensinogène est une glycoprotéine de 15 acides aminés précurseur inactif de l'angiotensine I (Ang I). L'Ang I est un décapeptide non vasoactif issu du clivage des dix derniers acides aminés de l'angiotensinogène par la rénine. L'Ang I est à son tour clivé en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion I (ECA) à son extrémité carboxy-terminale. L'ECA est une métalloprotéase à zinc et fait partie de la classe des carboxypeptidases. L'ECA n'est pas spécifique du SRA et possède divers substrats peptidiques. Elle dégrade également la bradykinine et la substance P en métabolites inactifs (Carey and Padia, 2018). L'ECA existe sous 3 formes distinctes : une forme membranaire, une forme soluble circulante et une forme tissulaire. Au niveau tissulaire, elle est exprimée de façon non-constitutive.

L'Ang II est un octapeptide qui peut se lier à deux types de récepteurs, les récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT1R) et les récepteurs à l'angiotensine II de type 2 (AT2R) (Figure 15). Ces récepteurs sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à sept hélices transmembranaires, leur homologie structurelle est seulement de l'ordre de 34 % (de Gasparo et al., 2000).

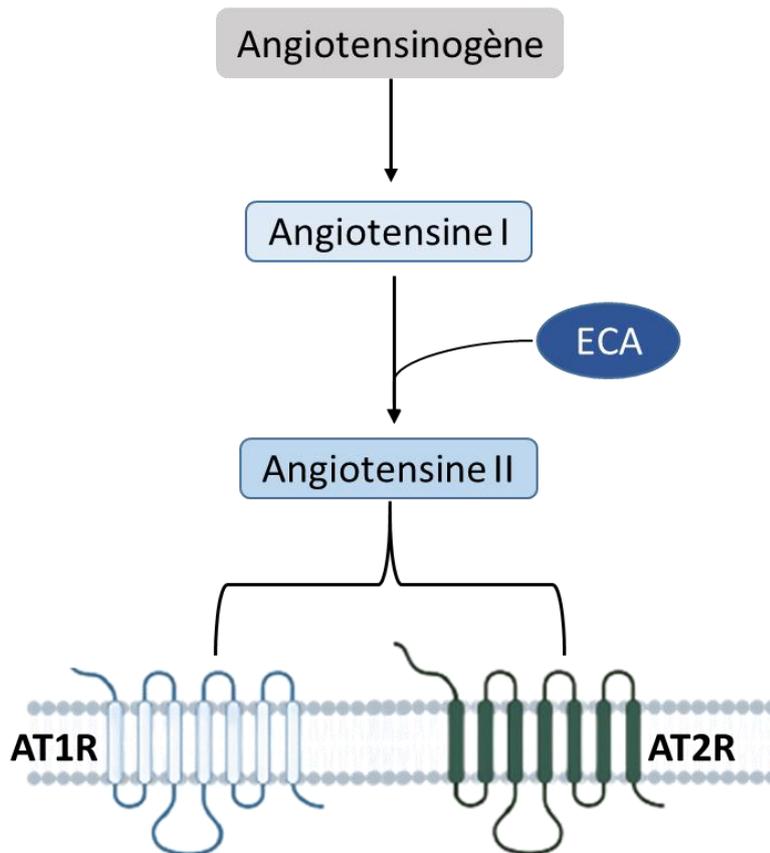


Figure 15. Schéma simplifié du SRA.

L'Ang II est le principal effecteur du SRA, néanmoins l'un de ces métabolites, l'angiotensine III (Ang III), montre des effets similaires. L'Ang III est produite par le clivage de la partie N-terminal de l'Ang II par l'aminopeptidase A. L'Ang III est rapidement dégradé en angiotensine IV (Ang IV) par l'aminopeptidase N ou B. L'Ang IV est un peptide actif et possède un récepteur spécifique de type 4 appelé AT4R.

Il existe également une voie alternative de dégradation de l'Ang II : l'axe ECA2/Ang (1-7)/récepteur Mas qui semble jouer un rôle important dans l'inflammation ou la fibrose de nombreux tissus (Simões e Silva et al., 2013). L'Ang II est clivée en Ang (1-7) par l'ECA-2. L'ECA-2 est également capable de cliver l'Ang I en Ang (1-9) qui sera dégradé par l'ECA pour donner de l'Ang (1-7). L'Ang (1-7) possède un récepteur spécifique appelé Mas, un récepteur transmembranaire couplé aux protéines Gq (Figure 16) (Becari et al., 2011). L'Ang (1-7) peut également se fixer aux récepteurs AT2R et MrgD (mas related gene D). Son précurseur l'Ang (1-9) peut lui aussi se lier aux AT2R.

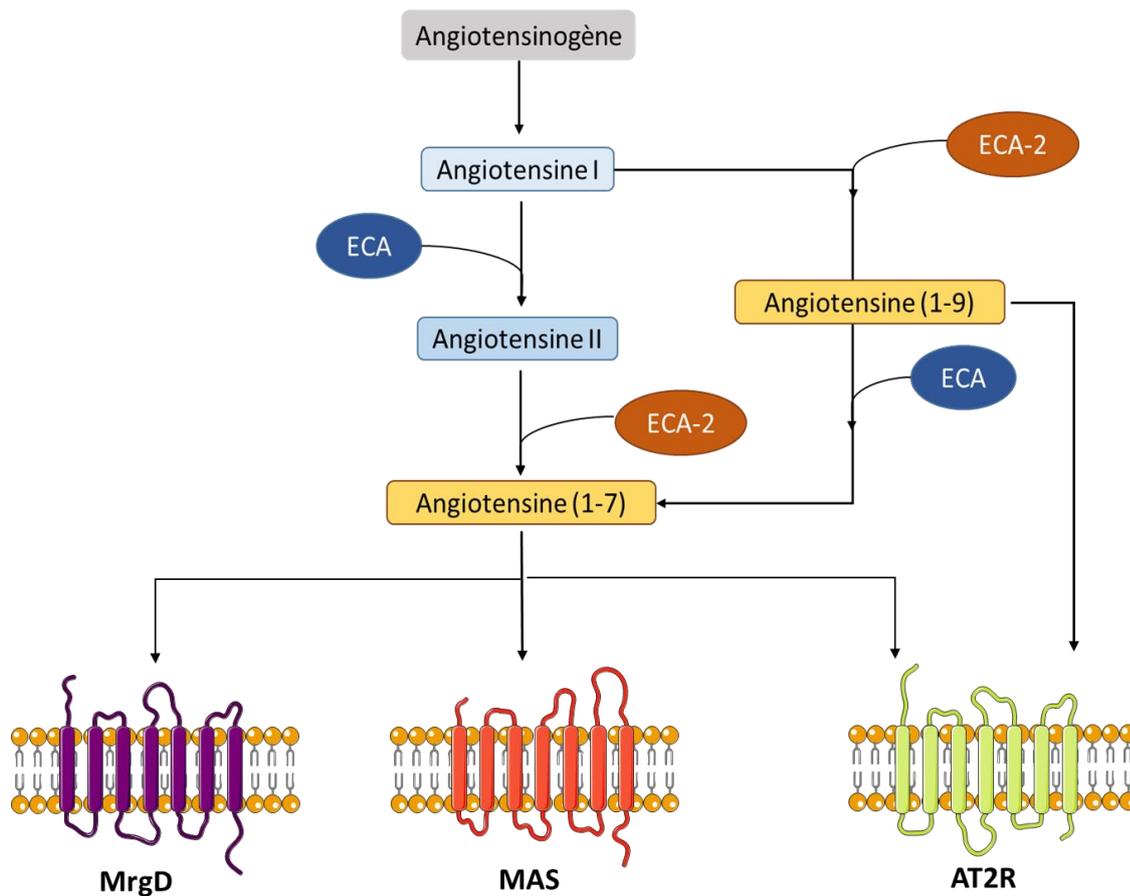


Figure 16. Schéma voie alternative SRA

Les éléments du SRA ne sont pas uniquement présents dans le système cardiovasculaire mais ils sont aussi exprimés dans le SNC et le SNP et participent à de nombreuses fonctions.

Un SRA tissulaire est exprimé au niveau du SNC (Lavoie et al., 2004; Stornetta et al., 1988), où il intervient dans un nombre important de ces fonctions en conditions physiologiques et pathologiques (Abiodun and Ola, 2020). Différents composants du SRA ont été identifiés dans le SNC. Tous les acteurs enzymatiques nécessaires à la synthèse des peptides dérivés de l'angiotensinogène y sont exprimés (Harding et al., 1988). L'angiotensinogène est produit dans les astrocytes et dans certaines populations spécifiques de neurones (Ciobica et al., 2009; Yang et al., 1999). La rénine est également retrouvée dans les neurones et les astrocytes, bien qu'elle soit présente en faible concentration dans le cerveau. Quant à l'ECA, elle est exprimée dans les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi qu'au niveau de la microglie dans

diverses régions du cerveau (Labandeira-Garcia et al., 2017). Les récepteurs AT1R et AT2R sont largement exprimés dans le SNC.

La mise en évidence de SRA tissulaire dans le SNP est plus récente. L'Ang II et ses deux principaux récepteurs (AT1R et AT2R) sont mis en évidence dans les GS de rat et d'Homme (Anand et al., 2013; Patil et al., 2010). L'angiotensinogène, la rénine ainsi que l'ECA sont présents dans les GS (Chakrabarty et al., 2013). AT1R a été mis en évidence dans les GS ainsi que dans le nerf sciatique de rat (Pavel et al., 2008; Tang et al., 2009). Par ailleurs, il existe des preuves substantielles du rôle de l'Ang II au niveau du système nerveux sensitif, et plus particulièrement dans la modulation de la douleur (Pelegri-da-Silva et al., 2005; Sakagawa et al., 2000). La présence des AT2R au sein des GS prête à controverse. En effet, dans une étude récente, Shepherd *et al.*, démontrent l'absence de AT2R dans les neurones sensitifs des GS par l'utilisation d'une lignée de souris exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur des AT2R : la GFP était indétectable dans les GS. De même, aucun ARNm de AT2R n'a été détecté sur des cultures de neurones sensitifs murins ou humains (Shepherd et al., 2018). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les AT2R a montré un marquage identique chez des souris sauvages et des souris AT2KO, signe d'un manque de spécificité de bon nombre d'anticorps anti-AT2R sur le marché (Hafko et al., 2013; Shepherd et al., 2018).

### ***1.6.1.2. SRA et douleur***

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ont montré des effets analgésiques dans la douleur neuropathique. L'utilisation du ramipril a notamment permis d'atténuer la douleur thermique et tactile induite par la constriction chronique du nerf sciatique (CCI) chez la souris (Kaur et al., 2015). L'administration de ramipril a également permis l'amélioration de la coordination motrice. Ces effets fonctionnels étaient associés à une réduction du stress oxydant chez les animaux CCI traités par le ramipril. Dans une autre étude, le fosinopril a prévenu l'allodynie tactile dans un modèle de neuropathie diabétique induite par la streptozotocine (STZ) (Araiza-Saldaña et al., 2015).

Chez l'Homme, le ramipril aurait un effet pro-algique dans un modèle de douleur. La douleur avait été évaluée chez des volontaires sains et normotendus par l'utilisation de capsules-couronne appliquées sur le bras et maintenues par un tensiomètre. La pression était appliquée à l'aide d'un tensiomètre. Le seuil de perception de la douleur

ainsi que la douleur maximale tolérée ont été abaissés significativement 4 heures après l'administration du ramipril, par rapport au groupe de patients contrôles (Kalra et al., 2008). Néanmoins chez l'Homme dans d'autre type de douleur, l'administration d'IEC peut induire une hyperalgésie (de Mos et al., 2009). Dans le contexte de patients atteints d'un syndrome douloureux régional complexe, la prise d'IEC augmente l'intensité de la douleur. Un lien est établi entre hypertension artérielle et diminution de la perception douloureuse (Ghione et al., 1988; Sheps et al., 1992). L'administration d'énalapril chez des patients hypertendus induit une augmentation significative de la perception douloureuse, mise en évidence par un test d'évaluation de la douleur dentaire. La diminution du seuil de sensibilité douloureuse peut s'expliquer par l'action antihypertensive de l'énalapril, mais aussi par son action centrale, qui a pour effet une diminution de la dégradation de la bradykinine et de la substance P, augmentant ainsi la perception douloureuse (Gradl et al., 2007).

Les antagonistes des AT1R (sartans) ont montré des effets analgésiques. Le telmisartan a diminué l'allodynie au froid, l'hyperalgésie thermique et mécanique, dans un modèle de CCI chez le rat. L'administration du telmisartan s'accompagnait d'une diminution des effets pro-inflammatoires du TNF- $\alpha$  (Jaggi and Singh, 2011). Le losartan, un autre antagoniste des AT1R, a permis d'atténuer la douleur dans un modèle de CCI chez le rat (Pavel et al., 2013). Une autre étude montre que l'administration intrathécale de losartan supprimait les comportements douloureux induits par une administration i.t d'Ang II (Nemoto et al., 2013). L'efficacité du losartan a aussi été évaluée dans un modèle de douleur neuropathique induite par le PTX. Des injections uniques ou répétées de losartan atténuaient et retardaient l'apparition de l'hyperalgésie mécanique induite par le PTX. L'effet bénéfique du losartan serait associé à une diminution de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  dans les GS (Kim et al., 2019). Le candésartan, un autre inhibiteur des AT1R, a montré un effet neuroprotecteur dans un modèle de neuropathie induite par la VCR au sein de notre unité de recherche. Les souris exposées à la VCR ont développé une allodynie mécanique significative associée à une dégénérescence des FNIE et des neurones sensitifs. Le candésartan administré en préventif chez les souris traitées par la VCR a permis la restauration complète de la sensibilité tactile et a prévenu l'atteinte des nerfs sensitifs (Bessaguet et al., 2018).

De nombreux antagonistes spécifiques des AT2R ont été développés : EMA200, EMA300, EMA400 et EMA401 (sélectivité de liaison >1000 fois pour l'AT2R par rapport à l'AT1R). Ces molécules ont montré des effets analgésiques dans des modèles de douleurs. Dans un modèle de douleur osseuse induite par injection intra-tibiale de cellules cancéreuses AT3B, l'injection d'EMA200 a permis de réduire l'allodynie et l'hyperalgésie thermique à la chaleur de façon dose-dépendante, en diminuant l'expression de AT2R dans les GS lombaires (Muralidharan et al., 2014). L'efficacité des inhibiteurs AT2R a été évaluée dans un modèle de rat CCI : tous les antagonistes ont présenté des effets analgésiques (Smith et al., 2013b). Enfin, l'EMA200 a montré un effet bénéfique sur les douleurs inflammatoires induites par l'adjuvant complet de Freund (ACF) : son administration a permis de rétablir la sensibilité thermique et de réduire l'hyperalgésie mécanique induites par l'ACF (Chakrabarty et al., 2013). Ce composé a également montré une analgésie dans un modèle murin de douleur neuropathique chronique (Shepherd et al., 2018). L'activation et l'infiltration locale de macrophages exprimant AT2R serait à l'origine de la douleur. L'action antalgique de l'EMA200 passerait par l'inhibition des AT2R exprimés par ces macrophages au cours d'une douleur aigue inflammatoire.

L'EMA401, antagoniste spécifique des AT2R, a fait l'objet de deux essais cliniques de phase 2 dans le traitement de la névralgie post-herpétique (essai EMPHENE, identifiant NCT03094195) et des douleurs associées à la neuropathie diabétique (essai EMPADINE, NCP03297294). Ces essais ont dû être interrompus du fait de données faisant état d'une hépatotoxicité à long terme lors d'essais précliniques chez le primate (Rice et al., 2021).

### ***1.6.1.3. SRA et neuroprotection/neurorégénération***

La neuroprotection est définie comme l'ensemble des stratégies thérapeutiques mises en place pour favoriser la protection et la survie neuronale, en ralentissant ou limitant les processus à l'origine d'un dysfonctionnement voire de la mort neuronale. La plupart des neuropathies périphériques dépendent de la longueur des axones et entraînent une dégénérescence axonale distale plutôt qu'une perte des corps cellulaires neuronaux. La neurorégénération, quant à elle, implique des réponses neuronales et non neuronales entraînant la restauration de la connectivité neuronale et la récupération fonctionnelle.

Le ramipril, un inhibiteur de l'ECA a montré des effets neuroprotecteurs principalement dans des modèles de neuropathie diabétique induite par la STZ chez le rat (Elias et al., 2008; Hakim et al., 1997), et cet effet bénéfique serait médié par l'action du ramipril sur le stress oxydant (Elias et al., 2008).

Les effets thérapeutiques potentiels du candésartan au niveau du SNP ont été mis en évidence dans des modèles de neuropathie diabétique. Au sein de notre laboratoire, il a été montré que le candésartan pouvait prévenir l'apparition de l'hypoalgésie mécanique et de la dysfonction neurovasculaire observées chez des souris chez lesquelles un diabète a été induit par l'injection de STZ (Danigo et al., 2015). Le candésartan a également montré une capacité à améliorer la conduction nerveuse motrice, la myélinisation des fibres dans un modèle de neuropathie diabétique induite par la STZ (Takata et al., 2012). Dans un modèle de diabète induit par le fructose chez le rat, le candésartan atténue l'hypoalgésie thermique des rats diabétiques et prévient la neurodégénérescence des fibres exprimant le CGRP dans l'artère mésentérique (Hashikawa-Hobara et al., 2012). L'administration de candésartan a permis de prévenir la diminution des FNIE ainsi que la dégénérescence des neurones des GS dans un modèle de NPIV, induisant une analgésie (Bessaguet et al., 2018).

D'autres modulateurs des AT2R ont également montré des effets de neuroprotection et de neurorégénération. Les effets neuroprotecteur et neurorégénérateur de modulateurs d'AT2R ont fait l'objet d'une revue publiée en 2021 dans le journal *Pharmaceuticals* (IF 2021 : 5.215) à laquelle j'ai participé. Le premier objectif de cette revue a été de décrire les connaissances actuelles sur le rôle des AT2R dans la neuroprotection et la neurorégénération au sein du SNP ; (1) en discutant des controverses autour de son expression au sein de SNP et notamment de sa distribution cellulaire, (2) en se concentrant sur la signalisation d'AT2R et son rôle dans la survie des neurones et la croissance neuritique. Enfin, les études précliniques concernant les effets neuroprotecteurs et neurorégénératifs de la stimulation d'AT2R sont abordés dans le contexte des neuropathies périphériques.

Review

# The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System?

Aurore Danigo <sup>1,\*</sup>, Amandine Rovini <sup>2,†</sup>, Flavien Bessaguet <sup>1</sup>, Hichem Bouchenaki <sup>1</sup>, Amandine Bernard <sup>1</sup>, Franck Sturtz <sup>1</sup>, Sylvie Bourthoumieu <sup>1</sup>, Alexis Desmoulière <sup>1</sup>, Laurent Magy <sup>1,3</sup> and Claire Demiot <sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 6309—Myelin Maintenance & Peripheral Neuropathy, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges MMNP, 87000 Limoges, France; flavien.bessaguet@etu.unilim.fr (F.B.); hichem.bouchenaki@unilim.fr (H.B.); amandine.bernard@unilim.fr (A.B.); franck.sturtz@unilim.fr (F.S.); sylvie.bourthoumieu@unilim.fr (S.B.); alexis.desmouliere@unilim.fr (A.D.); laurent.magy@unilim.fr (L.M.); claire.demiot@unilim.fr (C.D.)

<sup>2</sup> BioTis, INSERM U1026, University of Bordeaux, 33000 Bordeaux, France; amandine.rovini@u-bordeaux.fr

<sup>3</sup> Department of Neurology, Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France

\* Correspondence: aurore.danigo@unilim.fr; Tel.: +33-(0)6-75-47-27-48

† Authors contributed equally to this work.



**Citation:** Danigo, A.; Rovini, A.; Bessaguet, F.; Bouchenaki, H.; Bernard, A.; Sturtz, F.; Bourthoumieu, S.; Desmoulière, A.; Magy, L.; Demiot, C. The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System? *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 175. <https://doi.org/10.3390/ph14030175>

Academic Editor: Damian Holsinger

Received: 20 January 2021

Accepted: 18 February 2021

Published: 24 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Preclinical evidence, accumulated over the past decade, indicates that the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) stimulation exerts significant neuroprotective effects in various animal models of neuronal injury, notably in the central nervous system. While the atypical G protein-coupled receptor superfamily nature of AT2R and its related signaling are still under investigation, pharmacological studies have shown that stimulation of AT2R leads to neuritogenesis in vitro and in vivo. In this review, we focus on the potential neuroprotective and neuroregenerative roles of AT2R specifically in the peripheral nervous system (PNS). The first section describes the evidence for AT2R expression in the PNS and highlights current controversies concerning the cellular distribution of the receptor. The second section focuses on AT2R signaling implicated in neuronal survival and in neurite outgrowth. The following sections review the relatively few preclinical studies highlighting the putative neuroprotective and neuroregenerative effects of AT2R stimulation in the context of peripheral neuropathy.

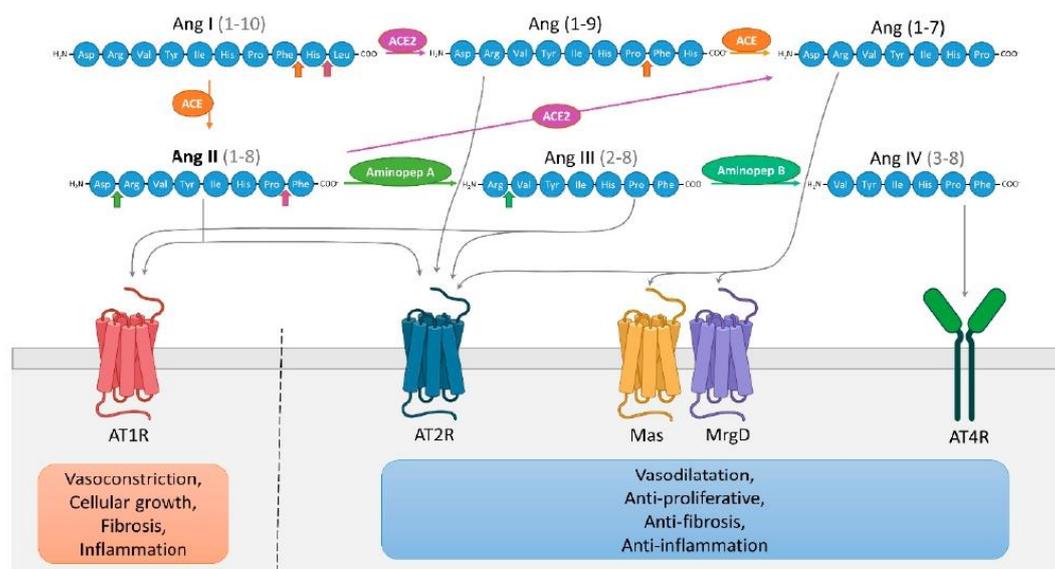
**Keywords:** angiotensin II type 2 receptor; peripheral nervous system; neuroregeneration; neuroprotection; pain

## 1. Introduction

There is a large unmet clinical need for novel therapeutic approaches to reduce disabilities (sensory impairment, motor deficit) and to improve overall quality of life in patients with peripheral neuropathies. The development of effective therapeutic solutions is hampered by the vast etiological spectrum of underlying causes and the persistent gaps in our understanding of the pathophysiological processes involved in peripheral neuropathy. However, accumulating evidence suggests a significant contribution of the renin-angiotensin system (RAS) in both neuroprotection and neuroregeneration.

The RAS is well-described and known to regulate arterial blood pressure and ionic homeostasis [1]. The sequential enzymatic cascade of RAS is initiated with renin, a catalytic enzyme produced by kidney and secreted into the systemic circulation, which cleaves liver-derived angiotensinogen (AGT) to produce the decapeptide angiotensin I (Ang I). Pulmonary angiotensin converting enzyme (ACE) converts Ang I into angiotensin II (Ang II), the main active component of the RAS. Ang II binds with high and similar affinity to its two principal receptors in humans, the Ang II type 1 receptor (AT1R) and the Ang II type 2 receptor (AT2R) [2]. Other angiotensinogen-derived peptides have been described and

are shown in Figure 1. The RAS was first described as an endocrine system. However, it is now considered to be a “ubiquitous” system that is expressed locally in many tissues exerting multiple autocrine/paracrine effects with implications in tissue physiology and homeostasis. The first demonstration of Ang II presence in tissues, in the arterial wall of sheep, dates back to 1980 [3]. Subsequent studies have quantified the synthesis of Ang II by the use of radiolabeled ligands in the heart, kidneys and adrenal glands [4–7]. Additionally, components of a local RAS have been detected in several tissues including skin, bone, adipose tissue and inflammatory cells [8–10]. The localization and effects of local RAS are described in further detail elsewhere [11].



**Figure 1.** Schematic representation of the renin-angiostensin system (RAS). Angiotensin (Ang) I is cleaved by angiotensin-converting enzyme (ACE) to Ang II which can be then cleaved to Ang III by aminopeptidase A, then further cleaved to Ang IV by aminopeptidase B. Ang I can also be cleaved by ACE2 to produce Ang (1–9) which can be cleaved into Ang (1–7) by ACE. Ang (1–7) can be directly generated from Ang II by ACE2. Ang (1–7) binds and activates the receptors Mas and Mas-related G protein-coupled receptor member D (MrgD), Ang IV binds to AT4R, Ang III activates AT1R and AT2R and Ang (1–9) directly activates AT2R. Functionally, it is possible to simplify the RAS into two distinctive pathways [12]. The first involves over-activation of AT1R by Ang II/Ang III, promoting cellular growth, vasoconstriction, fibrosis and inflammation. The second involves the interactions between AT2R and Ang II/Ang (1–9)/Ang III, but also Ang (1–7) and Mas/MrgD receptors, and Ang IV and AT4R, leading to vasodilatation and anti-proliferative, anti-fibrotic, anti-inflammatory effects.

AT1R and AT2R are both seven-transmembrane receptors displaying a similar affinity to Ang II although these two receptors differ in their amino acid sequence, tissue-specific expression and functional effects. The main role of AT2R is to inhibit actions mediated by AT1R by decreasing cell growth and proliferation while promoting cell differentiation, in addition to a vasodilatory action and a decrease in blood pressure [12]. As demonstrated in several studies, AT2R expression is temporally regulated. Ligand binding, *in situ* hybridization and autoradiography studies show that AT2R is widely expressed during fetal life, whereas its expression is maintained at low levels in all organs in adults, contrary to AT1R which is preferentially expressed in adults [13,14]. On the other hand, recent western blot and RT-PCR studies show that AT2R shows significantly higher expression in adult than in fetal and neonatal rodent tissues, with the exception of skin [15,16]. Such a discrepancy challenges the role of AT2R during development. Moreover, inverse expression profiles of AT1R and AT2R during development have been reported, with decreased

expression of AT1R and an increased expression of AT2R in the adult versus fetal stage, suggesting a crucial interacting role between the two receptors [16]. Moreover, AT1R/AT2R heterodimerization has previously been shown in non-neuronal cell types, illustrating the strong link between these two receptors [17]. AT2R expression is also dramatically increased in tissue under pathological conditions, for example during nerve crush injury or inflammation, suggesting a possible role of AT2R in tissue repair and more particularly in neuroregeneration [18–20].

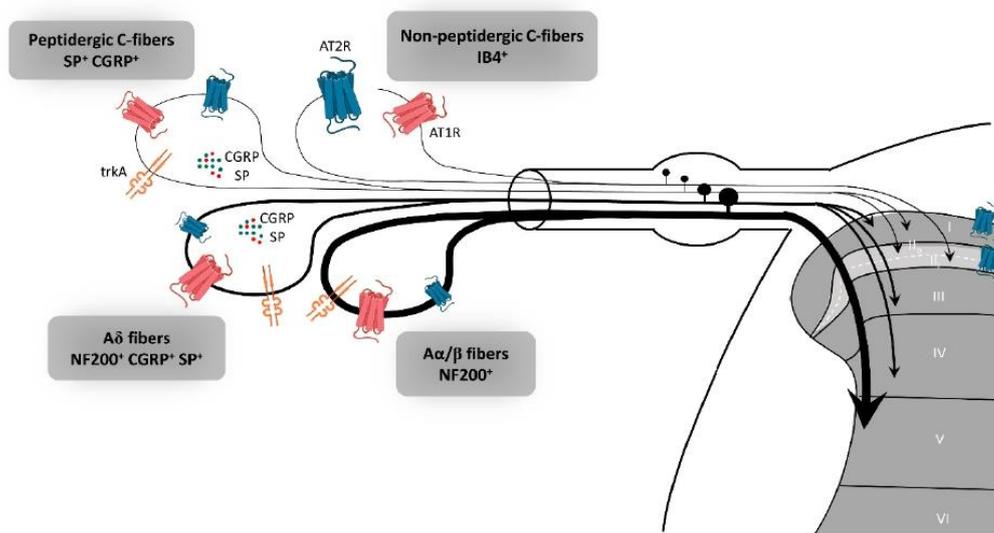
While numerous studies have focused on protective and regenerative properties of AT2R in the central nervous system [21–23], very few have considered a role for AT2R in the peripheral nervous system (PNS). Several reports have emphasized the role of peripheral AT2R in the modulation of pain [24–30]. However, the potential effects of Ang II/AT2R in neuroprotection/neuroregeneration in the PNS have been understudied and remains poorly understood. A few pharmacological studies, some from our team, highlight the beneficial effect of AT2R stimulation in a rodent model of traumatic- and drug-induced peripheral neuropathy [19,31–34]. Here, we aim to review the current knowledge on the role of AT2R and the therapeutic effect of respective agonists or antagonists in the treatment of various types of peripheral neuropathies. Basic information concerning the AT2R and its distribution within the PNS are introduced first.

## 2. Evidence for AT2R Expression in the Peripheral Nervous System

Over the past fifteen years, many studies have supported the concept of a local RAS and its potential role in the PNS, and particularly in the sensory nervous system [27,35–38]. Nevertheless, the distribution and expression level of AT2R in the PNS has been subject of controversy.

In rat dorsal root ganglion (DRG), AT2R expression, at the mRNA and protein levels, is tightly regulated throughout development to switch later to a restricted subpopulation of C-nociceptor neurons during adult life [39]. Recently, preferential expression of AT2R in non-peptidergic isolectin B4 (IB4<sup>+</sup>) C-nociceptor neurons was confirmed in adult rat DRG neurons [18]. The authors showed that AT2R is also expressed by some peptidergic small C- and medium A $\delta$ -neurons as well as by a few large A $\alpha$ - and A $\beta$ -neurons, and that almost all AT2R<sup>+</sup> DRG neurons co-expressed AT1R [18] (Figure 2). In humans, positive AT2R-immunolabelling was also shown in small-diameter DRG neurons and in nerve endings in the sub-epidermis and dermis, in urinary bladder, in vestibule and in the myenteric plexus [27,38,40]. This expression profile of AT2R in the PNS suggests its involvement in the development of sensory and nociceptive functions. However, immunohistochemistry (IHC)-based results must be viewed with caution due to the poor specificity of commercially-available AT2R antibodies [24,40]. One study has demonstrated the specificity of one commercial AT2R antibody, ab19134 (Abcam), using AT2R-expressing HEK-cells vs. non-transfected HEK-cells [41]. Nevertheless, recently, a research group reported no difference in AT2R signal intensity in DRG sections from wild type- and *agtr2* (the AT2R gene) KO-mice using these same AT2R antibodies [24].

At the mRNA level, AT2R is upregulated in pathological conditions in the PNS, as has been shown in other tissues such as infarcted heart and regenerating skeletal muscle [42,43]. In response to nerve axotomy and crush injury, AT2R mRNA levels are strongly increased in adult DRG and sciatic nerve fibers in rats [44]. A role for AT2R in Schwann cell (SC)-mediated healing actions has been evoked since the kinetics of AT2R mRNA expression is closely linked to the kinetics of SCs differentiation during nerve recovery. It is important to note that quantification of total AT2R mRNA from DRG encompasses different cell types (i.e., sensory neurons, satellite cells, immune cells, and SCs). SCs themselves have been shown to express AT1R and AT2R in vitro and in fresh samples of rat sciatic nerve, with a higher proportion of AT2R than AT1R [45].



**Figure 2.** Expression of AT2R in the sensory peripheral nervous system. According to the most recent immunohistochemistry study on the expression of AT2R in DRG and in the spinal cord of rat, AT2R would be expressed by almost all types of sensory neurons, though to different degrees [18]. Non-peptidergic C-nociceptors expressing IB4 are strongly stained for AT2R. Some small and medium DRG neurons co-expressed AT2R and trkA, a marker of nociceptive neurons (peptidergic C and A $\delta$  neurons). The few large neurons which express AT2R are stained for NF200 and trkA, markers of A $\alpha$ / $\beta$  nociceptive neurons. Most AT2R<sup>+</sup> neurons are also AT1R<sup>+</sup>. AT1R: angiotensin II type 1 receptor, AT2R: angiotensin II type 2 receptor, CGRP: calcitonin gene-related peptide, DRG: dorsal root ganglion, IB4: isolectin 4, NF200: neurofilament 200, SP: substance P, trkA: tropomyosin receptor kinase type A.

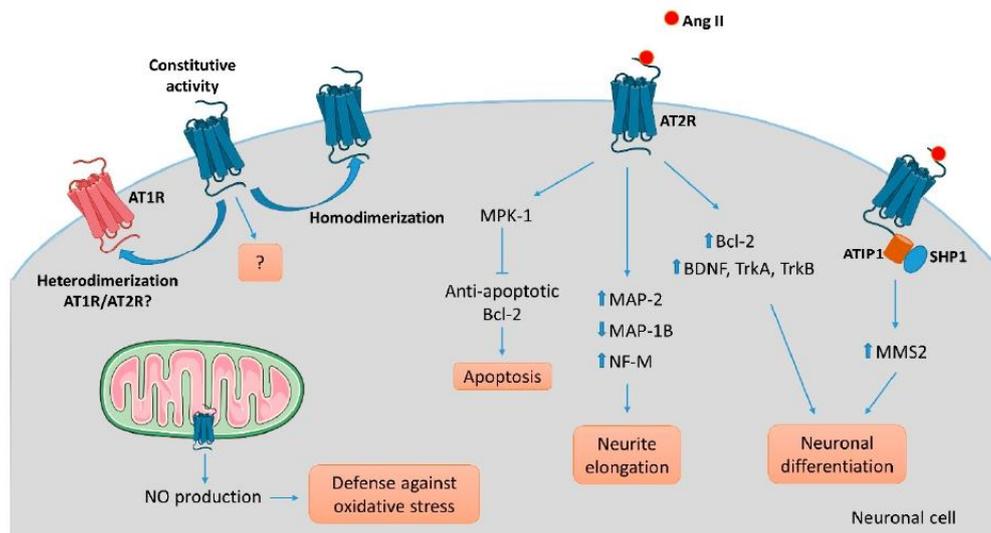
Recently, Shepherd et al. demonstrated that mouse and human DRG neurons do not express AT2R [24]. By combining different technical approaches to investigate the expression of AT2R, the authors pointed out the lack of AT2R expression in mouse DRG neurons, either at the protein- or mRNA-level. In line with this, Ang II did not induce either calcium influx and electrophysiological responses or intracellular signaling in cultured primary mouse DRG neuron. In addition, a lack of GFP signal was observed in DRG sections from AT2R-EGFP reporter mice, suggesting that *agtr2* was not expressed either in neurons or in non-neuronal cells of mouse DRG. However, they revealed that peripheral macrophages express a functional AT2R and these could be implicated in Ang II-induced peripheral mechanical pain sensitization [24]. One could envision a paracrine system between DRG neurons that synthesize Ang II and non-neuronal AT2R<sup>+</sup> cells such as SCs and/or immune cells that are recruited only during nerve injury [46]. In this respect, the CD3<sup>+</sup> T-cells which are involved in mechanical pain in response to chronic constriction injury (CCI) [41] might express AT2R. This cell-cell dialogue, mediated by AT2R in the PNS, could play a key role in neuroprotective and neuroregenerative processes.

With regard to the expression of AT2R by DRG neurons, it appears that species differences likely exist. Most studies conducted in rats have found AT2R to be expressed in DRG neurons while studies performed in mouse DRG neurons have given opposite results [24]. One explanation might be that two isoforms of AT2R exist in mice, as is the case for AT1R (AT1a and AT1b) in mice and rats, and as has already been suggested in the rat brain [47]. In this respect, AT2R-antibodies could detect another isoform of AT2R, which could be expressed in DRG neurons of AT2R KO-mice. It is also important to note that AT2R-deficient mice often only have part of the receptor affected, thus potentially allowing the expression of a truncated form of the protein, which is possibly detected by some antibodies [48,49]. Another hypothesis is that AT2R mRNA is synthesized in

DRG neurons under pathological conditions (lesion, crush, section) and transported along microtubules to nerve terminals where it is then translated by a local system [50]. This would provide a rationale for the discrepancies in results obtained from IHC on cultured DRG and DRG sections. Further studies are required to elucidate the questions concerning AT2R expression in the PNS and to understand their function.

### 3. AT2R Signaling

The AT2R gene was cloned in the early 90's and the receptor has been attributed numerous functions. However, its signaling pathway remains difficult to elucidate [51,52]. AT2R belongs to the G protein-coupled receptor superfamily (GPCR). However, aside from signaling through G-protein-dependent mechanisms, activation of this receptor by G protein-independent intracellular signaling in neurons makes it an "atypical" or "non-canonical" GPCR. The recently described crystal structure of human AT2R bound to either Ang II or an AT2R-selective ligand, allowed the receptor to be captured in an active-like conformation and provided structural insights into a moderate coupling to G proteins [53,54]. Continuing efforts investigating the conformational arrangement of this receptor are necessary to complete our understanding of AT2R activation and signaling and will aid in better design of targeted compounds [55]. In the following section, we will specifically review the role of AT2R signaling implicate in neuronal survival and neurite outgrowth and summarize the current findings in a schematic (Figure 3).



**Figure 3.** AT2R-mediated intracellular signaling pathways involved in neuronal cells. Several intracellular signaling pathways are associated with AT2R activation in neuronal cells leading to apoptosis via activation of the phosphatase MPK-1, neurite elongation via reorganization of the cytoskeleton, or neuronal differentiation in part via upregulation of growth-factors, depending on the cell type, the context, and the environment. To date, ATIP1 is identified as a partner of AT2R involved in intracellular signaling pathway and trafficking in neuronal cells. While the evidence of an ATIP1/AT2R complex comes from experiments on central nervous system neurons, we could hypothesize that a similar system exists in PNS neurons. AT2R signaling may antagonize AT1R-mediated signaling by a direct heterodimerization between the two. As well, homodimerization of AT2R might result in ligand-independent signaling.

To understand AT2R signal transduction, several cellular tools have been used. Among them, the rat pheochromocytoma PC12W cell line, of neuronal origin, has been particularly useful since these cells mostly express AT2R rather than AT1R. Several studies, focused on the effect of Ang II on PC12W cells, have demonstrated that AT2R mediates programmed

cell death through inactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibition of the anti-apoptotic Bcl-2 protein resulting eventually in induction of apoptosis [56,57]. This apoptotic function of AT2R was once hypothesized to be involved in developmental biology and pathophysiology. However, it was later demonstrated that AT2R stimulation by C21, a specific agonist [58], induced RNA expression of Bcl-2 and increased the level of neurotrophins (BDNF, TrkA and TrkB) in vitro in primary neurons and in vivo in a model of spinal cord injury [59]. In quiescent PC12W cells, AT2R stimulation by Ang II treatment leads to neurite formation [60]. In this case, the signaling involves an increase in polymerized  $\beta$ -tubulin, upregulation of microtubule-associated protein (MAP)-2 and down-regulation of MAP-1B levels. Similar observations were made in PC12W cells differentiated by nerve growth factor (NGF) and in undifferentiated NG108-15 cells (mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cell line) [60,61]. MAP-2 proteins are known to interact with microtubules, neurofilaments and actin, and contribute to the maintenance of the neuronal cytoskeleton. Similarly, MAP-1B regulates branching and neurite direction during DRG neuron regeneration [62]. A significant decrease in MAP-2 expression was observed in DRG following CCI to the sciatic nerve in rats, suggesting the involvement of MAP-2 in the early response to nerve injury [63]. Ang II treatment also diminishes the expression of neurofilament-M at the protein and mRNA levels in PC12W cells, and this effect is suppressed by preventive treatment with PD123177 (an AT2R antagonist) [64]. Thus, AT2R stimulation in vitro decreases proliferation and leads to neuronal differentiation and to anarchic neurite elongation via reorganization of cytoskeletal components. In undifferentiated NG108-15 and PC12W cells, both cell types expressing AT2R but not AT1R, Ang II-induced neuronal differentiation, and thus neurite elongation, is counteracted by AT1R stimulation in differentiated neuronal cells expressing AT1R [61]. Therefore, these data highlight the precise regulation existing between AT2R and AT1R during neuronal differentiation and neurite elongation. In NG108-15 cells, Ang II/AT2R interaction leads to neurite outgrowth through a sustained activation of p42/p44 MAPK and phosphorylation of trkA [65,66]. The link between AT2R and activation of p42/p44 MAPK leading to neurite outgrowth was further confirmed in cultured adult rat DRG neurons, another optimal in vitro model in which to investigate the effects of AT2R modulation on PNS neurons [67]. In this later study, neurons treated with Ang II presented denser and much longer neurites than controls, confirming results obtained in neuronal cell lines.

It has also been demonstrated that the morphological differentiation induced by Ang II/AT2R involves an increase in nitric oxide (NO) production in the NG108-05 cell line [68]. An increase of neuronal NO synthase (nNOS) was observed in cultures of rat DRG neurons under stress conditions [69]. The neuroprotective role of NO has already been described in vitro and in vivo in rat DRG neurons [69–71]. In vivo, inhibition of nNOS aggravates DRG neuron injuries, such as in a rat model of sciatic nerve transection, suggesting a neuroprotective role of NO [71]. A more detailed review of the role of NO in neuronal proliferation, survival and differentiation can be found elsewhere [72]. A functional mitochondrial angiotensin system has been reported in several cellular types, including neuronal cells [73]. AT2R was localized on the inner mitochondrial membrane by immunogold electron microscopy, and its stimulation increased NO production, thus decreasing mitochondrial respiration [74]. This phenomenon could represent a defense against oxidative stress, and a neuroprotective function of AT2R. However, the presence of AT2R in mitochondria from PNS neurons has not thus far been investigated.

In 2007, Li et al., showed, in neuronal cells, that AT2R interacts with ATIP1, the first member of the AT2-interacting protein (ATIP) family, to induce neuronal differentiation via upregulation of methane methylsulfonate-sensitive 2 (MMS2) [75]. ATIPs are a family of proteins encoded by alternative splicing of a single gene called *mtus1* (Microtubule associated tumor suppressor 1); ATIP1, ATIP3 and ATIP4 being the major isoforms. ATIP1 and ATIP3 are widely distributed whereas ATIP4 is restricted to the central nervous system [76]. The ATIPs are cytosolic proteins that constitutively interact with the C-terminal domain of AT2R and are involved in intracellular transport and signaling pathways of AT2R,

depending on the cell-type and on the isoform [77,78]. ATBP50, the murine ATIP1, was identified as a Golgi-associated protein involved in the transport of the AT2R to the cell membrane [78]. In neuronal cells, AT2R activation induces the ATIP1-Src homology phosphatase 1 (SHP1) complex, leading to transcriptional activation of the DNA repair enzyme MMS2, and then induction of neuronal differentiation [75].

While progress has been made in understanding AT2R signaling, this receptor remains an enigma. Other review articles have emphasized in great detail the limitations of AT2R signaling studies [12,79–81].

#### 4. Neuroprotection

Neuroprotection is defined as the ability for a therapy to prevent neuronal cell death by intervening in and inhibiting the pathogenic cascade that results in cell dysfunction and eventually in neuronal death. Most peripheral neuropathies are axon length dependent and result in distal axonal degeneration rather than loss of neuronal cell bodies. Thus, the ideal neuroprotective molecule should limit distal axonal degeneration, favor axon-glia interactions, and promote axonal regeneration and connection with the target cells. The antioxidant and anti-inflammatory axes are key mechanisms involved in neuroprotection.

In the central nervous system, blockade of AT1R protects against ischemic brain damage, notably by reversing oxidative stress and inflammation [82,83]. These neuroprotective effects during AT1R blocker treatment are associated with a relative increase of AT2R stimulation by Ang II [84]. Further studies evaluating direct AT2R stimulation by the agonists CGP42112 or C21 have confirmed anti-inflammatory and tissue repair effects of AT2R in rodent models of stroke using middle cerebral artery occlusion [85–87]. Protective effects of AT2R modulation in diverse neuronal populations in a wide range of brain injuries including ischemic strokes, ischemia/reperfusion injury, inflammation and others, have already been reviewed elsewhere [88,89].

A small number of *in vivo* preclinical studies have highlighted the putative neuroprotective effect of AT2R stimulation on peripheral neuropathies. In the first study, candesartan (an AT1R antagonist) treatment prevented functional sensory neuropathy in a rat model of type 2 diabetes of fructose-induced insulin resistance [32]. In this model, the peripheral neuropathy was characterized by hypoalgesia in response to a noxious thermal stimulus. These authors also showed that insulin resistance resulted in a decrease of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive nerves in mesenteric arteries and an increase of AT2R expression and dysfunction in DRG neurons. This significant increase of AT2R expression in the DRG of fructose drinking rats (FDR) reinforces the concept that AT2R plays an important role in nerves under pathological conditions. When candesartan was administered at the same time as fructose in FDR, sensory nerve disorders were improved, the density of CGRP<sup>+</sup> nerves was increased to match control levels and the high AT2R expression in DRG neurons was suppressed. Moreover, in FDR, AT1R blockade improved AT2R-mediated neurite outgrowth and restored Akt signaling [32]. Once again, these results reveal the strong functional interconnection that is present between AT1R and AT2R in peripheral nerves.

In our previous studies, we have shown several lines of evidence that direct or indirect stimulation of AT2R could prevent the development of sensory impairment in mouse models of toxin-induced neuropathies. First, in a mouse model of resiniferatoxin (RTX)-induced functional neuropathy, we showed that AT1R blockade by preventive administration of candesartan restored the RTX-induced thermal hypoalgesia and improved the depletion of substance P (SP) and CGRP in intraepidermal nerve fibers (IENFs) and in DRG neurons. This effect of candesartan was blocked by PD123319 (or EMA200), an AT2R blocker, and also in the AT2R KO mouse model. Therefore, we concluded that the neuroprotective effect of AT1R blockade was mediated by the promotion of AT2R activation by Ang II and the increase in tissue Ang II level [31]. Secondly, in a mouse model of vincristine (VCR)-induced tactile allodynia, administration of candesartan and C21 accelerated the recovery of normal tactile sensitivity. This beneficial effect of candesartan and C21 was

abolished by PD123319. Both drugs also prevented VCR-induced non-peptidergic IENF loss [19]. We also showed that direct AT2R stimulation by C21 prevented myelinated fiber loss and the enlargement of myelinated axonal diameter induced by VCR in our mouse model [19].

Interestingly, all of the above studies which highlight the neuroprotective effect of AT2R in the PNS were performed using rodent models of “toxin”-induced neuropathy, rather than traumatic models.

## 5. Neuroregeneration

In contrast to the central nervous system, injured axons in the PNS maintain regenerative capacities. Neuroregeneration involves neuronal and non-neuronal responses resulting in restoration of neuronal connectivity and functional recovery. Injured peripheral axons have to regrow over long distances to reestablish synaptic connections with their targets in the periphery. Failure of axonal regrowth contributes to muscle atrophy or to loss of function of end-organs. In order to combat these effects and improve functional outcomes following PNS injury, the goal of an ideal treatment would be to accelerate axonal regeneration.

### 5.1. *In Vitro*

The neuroregenerative properties of AT2R stimulation were first highlighted in the PC12W neuronal cell line, which is responsive to NGF treatment. Data in PC12W cells showed that AT2R stimulation by Ang II enhances neurite elongation and promotes NGF-induced neuronal differentiation. AT2R stimulation inhibits growth factor-induced proliferation and enhances NGF-mediated growth arrest. All of the effects of Ang II in PC12W and NG108-15 cells were suppressed by pretreatment with PD123319 [90,91]. The same neuroregenerative effect of Ang II was observed in primary cultures of neonatal rat DRG neurons. This Ang II effect is inhibited but not by losartan (an AT1R blocker) [20]. Using the same experimental paradigm, others have recently shown that the neuritogenesis properties of Ang II are counteracted by AT2R (PD123312)- as well as by AT1R (azilsartan)- antagonism [18]. Moreover, addition of Ang II in the culture medium induced neurite outgrowth in small to medium sized neurons positive for peripherin and this neuritogenesis was inhibited by PD123319 [37]. Hashikawa-Hobara and Hashikawa (2016) showed that AT2R-stimulation by CGP42112, a selective agonist of AT2R, induced neurite outgrowth in a primary culture of adult mouse DRG cells [92]. This result was also previously reported using rat and human DRG cell cultures treated with C21 or Ang II [27,67]. This positive effect of AT2R stimulation on neurite length and neurite density, shown with Gap43 staining (an axonal regeneration marker), was reduced after EMA401 (an AT2R antagonist) treatment [67].

### 5.2. *In Vivo*

To explore the neuroregenerative effects of drugs on the PNS, nerve transection and crush injury models in rodents have been widely used as the most representative models of traumatic peripheral neuropathy allowing the identification of key repair mechanisms. Local administration of Ang II in a rat model of sciatic nerve crush showed enhanced neuroregenerative mechanisms by accelerating recovery of sensorimotor function and by enhancing axonal regeneration and myelination [34]. All of these Ang II-mediated regenerating effects were blocked by PD123319. The authors concluded that this AT2R-dependent neuroregenerative effect could be due to the stimulation of AT2R in SCs with subsequent nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, which is essential for myelin formation. In a rat model of inflammatory pain, one study has reported that hind paw injection of complete Freund's adjuvant (CFA) induced cutaneous hyper-innervation associated with mechanical and thermal hypersensitivity at 3 days post-CFA injection. Simultaneous infusion of an AT2R blocker (PD123319) with CFA abolished dermal and epidermal hyper-innervation and reduced associated-hypersensitivity [93,94]. These results highlight the involvement

of AT2R activation in inflammation-induced cutaneous hyper-innervation. The authors also demonstrated that a local RAS is expressed by the inflammatory cells, which have been recruited at the CFA injection site. Further investigations were performed on tissue from patients with provoked vulvodynia (PVD) [38]. PVD is characterized as a localized provoked pain in the vulvar vestibule, attributed to an increase of nociceptors in the vestibular endoderm and elevated numbers of inflammatory cells [95–97]. Tender tissue from PVD patient shows hyper-innervation and an increased number of T-cells, B-cells and macrophages compared with non-tender areas. The authors demonstrated that all of the necessary RAS components to synthesize Ang II are present in tender tissue and provided by inflammatory cell migration and/or proliferation. They also showed that neurite outgrowth is induced by tender tissue-conditioned medium in primary cultures of neonatal rat DRG neurons, and that this effect is prevented by adding Ang II antibody or PD123319 [38]. Recently, Benitez et al. 2020 showed that pharmacological inhibition of AT1R has greater impact on CGRP<sup>+</sup> axonal endings whereas inhibition of AT2R has more effect on IB4<sup>+</sup> nociceptors under physiological conditions [18]. They reported that AT2R but also AT1R are involved in neuritogenesis of these nociceptors. These data confirm, *in vivo*, both the neuroregenerative properties of AT2R stimulation in the PNS and the interplay of AT1R and AT2R.

## 6. Concluding Remarks

Recent data have provided evidence that AT2R plays an important role in the protection and regeneration of the sensory nervous system. The complex and enigmatic nature of AT2R, as coined by Sadybekov and Katritch, and its related signaling, leaves many unanswered questions about its function [55]. Intracellular events generated by what is considered as an atypical GPCR are numerous and tissue-type dependent. A better understanding of AT2R ligand-independent activity and signaling cascades is critical and would enable us to define the physiological and functional contributions of this receptor.

Despite controversies about the expression of AT2R in the PNS, mainly due to the poorly characterized antibodies that are commercially available, pharmacological studies have shown that stimulation of AT2R leads to neuritogenesis *in vitro* and *in vivo* (Table 1), supporting the rationale that the peripheral AT2R may be an effective therapeutic target. In this instance, development of AT2R agonists could be beneficial in the case of traumatic or toxic peripheral neuropathies involving sensory axon loss. On the other hand, AT2R agonists may be deleterious in the case of inflammatory disease involving hyper-innervation. Thus, in vestibulodynia, treatment with PD123319 (an AT2R blocker) appears to be effective in reducing AT2R-dependent hyper-innervation and associated pain.

However, the relevance of AT2R targeting remains to be fully established since the latest clinical trials with EMA401 performed by Novartis have been terminated prematurely due to safety issues [28]. A similar contradiction applies to our understanding of AT2R involvement in modulation of pain [98]. While some studies have reported an analgesic effect following AT2R blockade, others have shown that AT2R stimulation prevents neuropathic pain [98]. Improved knowledge of the RAS and particularly of AT2Rs in the PNS provide possible new approaches, novel methods and promising targets to address unmet medical needs among patients with peripheral neuropathy.

Table 1. Neuroprotective and neuroregenerative effect of AT2R stimulation in the peripheral nervous system.

Model	Species	Effect of Neuropathy	Treatment	Administration	Effect of Treatment	Antagonism	AT2R Expression	Ref.
Topical phenol treatment	Wistar rat (6 week-old)	Decrease of CGRP nerve fibers in mesenteric arteries	Losartan + Ang II	Osmotic pump	Increase of CGRP nerve fibers	Effect suppressed by PD123319	DRG neuron (WB)	[33]
RTX-induced sensory neuropathy	Male Swiss mouse (25–30 g)	Depletion of CGRP and SP in IENFs and in DRG neurons	Candesartan	I.P.	Improvement of the neuropeptide depletion	Effect counteracted by PD123319 and in AT2R-KO mice	/	[31]
Vincristine-induced neuropathy	Male Swiss mouse (25–30 g)	Nonpeptidergic IENFs loss, loss of myelinated fibers and enlargement of axonal diameter in sciatic nerve	Candesartan and C21	I.P.	Prevention of IENF loss by candesartan and C21. Prevention of myelinated nerve fiber impairment by C21	Effects counteracted by PD123319	/	[19]
Sciatic nerve crush	Male Sprague-Dawley rats (200–250 g)	Axonal degeneration and demyelination	Ang II	Osmotic pump	Enhancement of axonal regeneration and myelination	Effect lost with PD123319	SCs	[34]
Hind paw inflammation (CFA injection)	Female Sprague-Dawley rats (190–200 g)	Increase of PGP9.5 <sup>+</sup> nerve fibers in dermis and epidermis. Increase of CGRP <sup>+</sup> nerve fibers in dermis	PD123319	Osmotic pump	Decrease of CFA-induced hyper-innervation in dermis and epidermis.	/	/	[93]
Rat DRG cells	Adult female Wistar rat	/	Ang II	/	Ang II increased neurite length and density	Effects counteracted by EMA401	DRG neurons (ICC, IHC)	[67]
Avulsed Human cervical DRG cells	From surgical nerve repair procedure	/	EMA401	/	Mean neurite density was reduced by EMA401	/	DRG cells	[67]
Adult mouse DRG cells	Male C57BL6j mice (25–30 g)	/	NGF + PD123319 or AT2R siRNA	/	AT2R inhibition is associated with decrease of NGF-induced neurite outgrowth	/	DRG cells	[92]

Ang II: angiotensin II, CFA: complete Freund's adjuvant, CGRP: calcitonin gene-related peptide, DRG: dorsal root ganglia, IENF: intraepidermal nerve fiber, ICC: immunocytochemistry, IHC: immunohistochemistry, I.P.: intra-peritoneal, NGF: nerve growth factor, PGP9.5: protein gene product 9.5, RTX: resiniferatoxin, SCs: Schwann cells, SP: substance P, WB: western blot.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, A.D. (Aurore Danigo), A.R.; writing—review and editing, A.D. (Aurore Danigo), A.R., F.B., H.B., A.B., A.D. (Alexis Desmoulière), C.D.; visualization, F.S., L.M., S.B.; supervision, C.D., A.D. (Alexis Desmoulière), L.M.; project administration, C.D., A.D. (Aurore Danigo); funding acquisition, C.D., A.D. (Aurore Danigo), F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from CHU de Limoges [APREL (Appel à projets équipes émergentes/équipes labellisées) « 2018 »], sponsored by ARS Nouvelle Aquitaine and from the association “La Ligue Contre le Cancer 87”.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** Claire Demiot is part of the French neuropsychopharmacology consortium of SFPT (“Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique”).

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- Rettig, R.; Healy, D.P.; Printz, M.P. Cardiovascular Effects of Microinjections of Angiotensin II into the Nucleus Tractus Solitarii. *Brain Res.* **1986**, *364*, 233–240. [[CrossRef](#)]
- Bosnyak, S.; Jones, E.S.; Christopoulos, A.; Aguilar, M.I.; Thomas, W.G.; Widdop, R.E. Relative Affinity of Angiotensin Peptides and Novel Ligands at AT1 and AT2 Receptors. *Clin. Sci. (Lond. Engl. 1979)* **2011**, *121*, 297–303. [[CrossRef](#)]
- Fei, D.T.; Coghlan, J.P.; Fernley, R.T.; Scoggins, B.A.; Tregear, G.W. Peripheral Production of Angiotensin II and III in Sheep. *Circ Res* **1980**, *46*, 1135–1137. [[PubMed](#)]
- Karlsson, C.; Lindell, K.; Ottosson, M.; Carlsson, B.R.; Carlsson, L.M.S. Human Adipose Tissue Expresses Angiotensinogen and Enzymes Required for Its Conversion to Angiotensin II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 3925–3929. [[CrossRef](#)]
- van Kats, J.P.; Danser, A.H.; van Meegen, J.R.; Sassen, L.M.; Verdouw, P.D.; Schalekamp, M.A. Angiotensin Production by the Heart: A Quantitative Study in Pigs with the Use of Radiolabeled Angiotensin Infusions. *Circulation* **1998**, *98*, 73–81. [[CrossRef](#)]
- van Kats, J.P.; van Meegen, J.R.; Verdouw, P.D.; Duncker, D.J.; Schalekamp, M.A.; Danser, A.H. Subcellular Localization of Angiotensin II in Kidney and Adrenal. *J. Hypertens.* **2001**, *19*, 583–589. [[CrossRef](#)]
- van Thiel, B.S.; Góes Martini, A.; Te Riet, L.; Severs, D.; Uijl, E.; Garrelts, I.M.; Leijten, F.P.; van der Pluijm, I.; Essers, J.; Qadri, F.; et al. Brain Renin–Angiotensin System. *Hypertension* **2017**, *69*, 1136–1144. [[CrossRef](#)]
- Jurewicz, M.; McDermott, D.H.; Sechler, J.M.; Tinkam, K.; Takakura, A.; Carpenter, C.B.; Milford, E.; Abdi, R. Human T and Natural Killer Cells Possess a Functional Renin–Angiotensin System: Further Mechanisms of Angiotensin II-Induced Inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 1093–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steckelings, U.M.; Wollschläger, T.; Peters, J.; Henz, B.M.; Hermes, B.; Artuc, M. Human Skin: Source of and Target Organ for Angiotensin II. *Exp. Dermatol.* **2004**, *13*, 148–154. [[CrossRef](#)]
- Nehme, A.; Zouein, F.A.; Zayeri, Z.D.; Zibara, K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *JCDD* **2019**, *6*, 14. [[CrossRef](#)]
- Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of Local Renin–Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 747–803. [[CrossRef](#)]
- Nouet, S.; Nahmias, C. Signal Transduction from the Angiotensin II AT2 Receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *11*, 1–6. [[CrossRef](#)]
- Grady, E.F.; Sechi, L.A.; Griffin, C.A.; Schambelan, M.; Kalinyak, J.E. Expression of AT2 Receptors in the Developing Rat Fetus. *J. Clin. Investig.* **1991**, *88*, 921–933. [[CrossRef](#)]
- Lenkei, Z.; Palkovits, M.; Corvol, P.; Llorens-Cortès, C. Expression of Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor MRNAs in the Adult Rat Brain: A Functional Neuroanatomical Review. *Front. Neuroendocrinol.* **1997**, *18*, 383–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gao, J.; Chao, J.; Parbhu, K.-J.K.; Yu, L.; Xiao, L.; Gao, F.; Gao, L. Ontogeny of Angiotensin Type 2 and Type 1 Receptor Expression in Mice. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2012**, *13*, 341–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yu, L.; Shao, C.; Gao, L. Developmental Expression Patterns for Angiotensin Receptors in Mouse Skin and Brain. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* **2014**, *15*, 139–149. [[CrossRef](#)]
- AbdAlla, S.; Lother, H.; Abdel-tawab, A.M.; Quitterer, U. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39721–39726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Benitez, S.G.; Seltzer, A.M.; Messina, D.N.; Foscolo, M.R.; Patterson, S.I.; Acosta, C.G. Cutaneous Inflammation Differentially Regulates the Expression and Function of Angiotensin-II Types 1 and 2 Receptors in Rat Primary Sensory Neurons. *J. Neurochem.* **2020**, *152*, 675–696. [[CrossRef](#)]

19. Bessaguet, F.; Danigo, A.; Bouchenaki, H.; Duchesne, M.; Magy, L.; Richard, L.; Sturtz, F.; Desmoulière, A.; Demiot, C. Neuroprotective Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation in Vincristine-Induced Mechanical Allodynia. *PAIN* **2018**, *159*, 2538–2546. [[CrossRef](#)]
20. Lucius, R.; Gallinat, S.; Rosenstiel, P.; Herdegen, T.; Sievers, J.; Unger, T. The Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptor Promotes Axonal Regeneration in the Optic Nerve of Adult Rats. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 661–670. [[CrossRef](#)]
21. Guimond, M.-O.; Gallo-Payet, N. How Does Angiotensin AT2 Receptor Activation Help Neuronal Differentiation and Improve Neuronal Pathological Situations? *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 164. [[CrossRef](#)]
22. Namsolleck, P.; Recarti, C.; Foulquier, S.; Steckelings, U.M.; Unger, T. AT(2) Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Curr. Hypertens. Rep.* **2014**, *16*, 416. [[CrossRef](#)]
23. Wilms, H.; Rosenstiel, P.; Unger, T.; Deuschl, G.; Lucius, R. Neuroprotection with Angiotensin Receptor Antagonists: A Review of the Evidence and Potential Mechanisms. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2005**, *5*, 245–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shepherd, A.J.; Copits, B.A.; Mickle, A.D.; Karlsson, P.; Kadunganattil, S.; Haroutounian, S.; Tadinada, S.M.; de Kloet, A.D.; Valtcheva, M.V.; McIlvried, L.A.; et al. Angiotensin II Triggers Peripheral Macrophage-to-Sensory Neuron Redox Crosstalk to Elicit Pain. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 7032–7057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shepherd, A.J.; Mickle, A.D.; Golden, J.P.; Mack, M.R.; Halabi, C.M.; de Kloet, A.D.; Samineni, V.K.; Kim, B.S.; Krause, E.G.; Gereau, R.W.; et al. Macrophage Angiotensin II Type 2 Receptor Triggers Neuropathic Pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E8057–E8066. [[CrossRef](#)]
26. Smith, A.K.; O'Hara, C.L.; Stucky, C.L. Mechanical Sensitization of Cutaneous Sensory Fibers in the Spared Nerve Injury Mouse Model. *Mol. Pain* **2013**, *9*, 1744–8069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Anand, U.; Yiangou, Y.; Sinisi, M.; Fox, M.; MacQuillan, A.; Quick, T.; Korchev, Y.E.; Bountra, C.; McCarthy, T.; Anand, P. Mechanisms Underlying Clinical Efficacy of Angiotensin II Type 2 Receptor (AT2R) Antagonist EMA401 in Neuropathic Pain: Clinical Tissue and in Vitro Studies. *Mol. Pain* **2015**, *11*, 38. [[CrossRef](#)]
28. Rice, A.S.C.; Dworkin, R.H.; McCarthy, T.D.; Anand, P.; Bountra, C.; McCloud, P.I.; Hill, J.; Cutter, G.; Kitson, G.; Desem, N.; et al. EMA401, an Orally Administered Highly Selective Angiotensin II Type 2 Receptor Antagonist, as a Novel Treatment for Postherpetic Neuralgia: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Clinical Trial. *Lancet* **2014**, *383*, 1637–1647. [[CrossRef](#)]
29. Marion, E.; Song, O.R.; Christophe, T.; Babonneau, J.; Fenistein, D.; Eyer, J.; Letournel, F.; Henrion, D.; Clere, N.; Paille, V.; et al. Mycobacterial Toxin Induces Analgesia in Buruli Ulcer by Targeting the Angiotensin Pathways. *Cell* **2014**, *157*, 1565–1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Song, O.-R.; Kim, H.-B.; Jouny, S.; Ricard, I.; Vandeputte, A.; Deboosere, N.; Marion, E.; Queval, C.J.; Lesport, P.; Bourinet, E.; et al. A Bacterial Toxin with Analgesic Properties: Hyperpolarization of DRG Neurons by Mycolactone. *Toxins* **2017**, *9*, 227. [[CrossRef](#)]
31. Bessaguet, F.; Danigo, A.; Magy, L.; Sturtz, F.; Desmoulière, A.; Demiot, C. Candesartan Prevents Resiniferatoxin-Induced Sensory Small-Fiber Neuropathy in Mice by Promoting Angiotensin II-Mediated AT2 Receptor Stimulation. *Neuropharmacology* **2017**, *126*, 142–150. [[CrossRef](#)]
32. Hashikawa-Hobara, N.; Hashikawa, N.; Inoue, Y.; Sanda, H.; Zamami, Y.; Takatori, S.; Kawasaki, H. Candesartan Cilexetil Improves Angiotensin II Type 2 Receptor-Mediated Neurite Outgrowth via the PI3K-Akt Pathway in Fructose-Induced Insulin-Resistant Rats. *Diabetes* **2012**, *61*, 925–932. [[CrossRef](#)]
33. Hobara, N.; Goda, M.; Yoshida, N.; Takatori, S.; Kitamura, Y.; Mio, M.; Kawasaki, H. Angiotensin II Type 2 Receptors Facilitate Reinnervation of Phenol-Lesioned Vascular Calcitonin Gene-Related Peptide-Containing Nerves in Rat Mesenteric Arteries. *Neuroscience* **2007**, *150*, 730–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Reinecke, K.; Lucius, R.; Reinecke, A.; Rickert, U.; Herdegen, T.; Unger, T. Angiotensin II Accelerates Functional Recovery in the Rat Sciatic Nerve in Vivo: Role of the AT2 Receptor and the Transcription Factor NF-KappaB. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2003**, *17*, 2094–2096. [[CrossRef](#)]
35. Pavel, J.; Tang, H.; Brimijoin, S.; Moughamian, A.; Nishioku, T.; Benicky, J.; Saavedra, J.M. Expression and Transport of Angiotensin II AT1 Receptors in Spinal Cord, Dorsal Root Ganglia and Sciatic Nerve of the Rat. *Brain Res.* **2008**, *1246*, 111–122. [[CrossRef](#)]
36. Patil, J.; Schwab, A.; Nussberger, J.; Schaffner, T.; Saavedra, J.M.; Imboden, H. Intra-neuronal Angiotensinergic System in Rat and Human Dorsal Root Ganglia. *Regul. Pept.* **2010**, *162*, 90–98. [[CrossRef](#)]
37. Chakrabarty, A.; Blacklock, A.; Svojanovsky, S.; Smith, P.G. Estrogen Elicits Dorsal Root Ganglion Axon Sprouting via a Renin-Angiotensin System. *Endocrinology* **2008**, *149*, 3452–3460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Liao, Z.; Chakrabarty, A.; Mu, Y.; Bhattacharjee, A.; Goestch, M.; Leclair, C.M.; Smith, P.G. A Local Inflammatory Renin-Angiotensin System Drives Sensory Axon Sprouting in Provoked Vestibulodynia. *J. Pain* **2017**, *18*, 511–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Benitez, S.; Seltzer, A.; Acosta, C. Nociceptor-like Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Express the Angiotensin-II AT2 Receptor throughout Development. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **2017**, *56*, 10–17. [[CrossRef](#)]
40. Hafko, R.; Villapol, S.; Nostramo, R.; Symes, A.; Sabban, E.L. Commercially Available Angiotensin II AT2 Receptor Antibodies Are Nonspecific. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 69234. [[CrossRef](#)]
41. Khan, N.; Muralidharan, A.; Smith, M.T. Attenuation of the Infiltration of Angiotensin II Expressing CD3+ T-Cells and the Modulation of Nerve Growth Factor in Lumbar Dorsal Root Ganglia—A Possible Mechanism Underpinning Analgesia Produced by EMA300, An Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptor Ant. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)]

42. Nio, Y.; Matsubara, H.; Murasawa, S.; Kanasaki, M.; Inada, M. Regulation of Gene Transcription of Angiotensin II Receptor Subtypes in Myocardial Infarction. *J. Clin. Investig.* **1995**, *95*, 46–54. [[CrossRef](#)]
43. Yoshida, T.; Huq, T.S.; Delafontaine, P. Angiotensin Type 2 Receptor Signaling in Satellite Cells Potentiates Skeletal Muscle Regeneration. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26239–26248. [[CrossRef](#)]
44. Gallinat, S.; Yu, M.; Dorst, A.; Unger, T.; Herdegen, T. Sciatic Nerve Transection Evokes Lasting Up-Regulation of Angiotensin AT2 and AT1 Receptor mRNA in Adult Rat Dorsal Root Ganglia and Sciatic Nerves. *Mol. Brain Res.* **1998**, *57*, 111–122. [[CrossRef](#)]
45. Bleuel, A.; de Gasparo, M.; Whitebread, S.; Püttner, I.; Monard, D. Regulation of Protease Nexin-1 Expression in Cultured Schwann Cells Is Mediated by Angiotensin II Receptors. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 750–761. [[CrossRef](#)]
46. Hu, P.; Bembrick, A.L.; Keay, K.A.; McLachlan, E.M. Immune Cell Involvement in Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord after Chronic Constriction or Transection of the Rat Sciatic Nerve. *Brain Behav. Immun.* **2007**, *21*, 599–616. [[CrossRef](#)]
47. Tsutsumi, K.; Saavedra, J.M. Heterogeneity of Angiotensin II AT2 Receptors in the Rat Brain. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 290–297.
48. Hein, L.; Barsh, G.S.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J.; Kobilka, B.K. Behavioural and Cardiovascular Effects of Disrupting the Angiotensin II Type-2 Receptor in Mice. *Nature* **1995**, *377*, 744–747. [[CrossRef](#)]
49. Ichiki, T.; Labosky, P.A.; Shiota, C.; Okuyama, S.; Imagawa, Y.; Fogo, A.; Niimura, F.; Ichikawa, I.; Hogan, B.L.; Inagami, T. Effects on Blood Pressure and Exploratory Behaviour of Mice Lacking Angiotensin II Type-2 Receptor. *Nature* **1995**, *377*, 748–750. [[CrossRef](#)]
50. Wong, H.H.W.; Lin, J.Q.; Ströhl, F.; Roque, C.G.; Cioni, J.M.; Cagnetta, R.; Turner-Bridger, B.; Laine, R.F.; Harris, W.A.; Kaminski, C.F.; et al. RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. *Neuron* **2017**, *95*, 852–868.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nakajima, M.; Mukoyama, M.; Pratt, R.E.; Horiuchi, M.; Dzau, V.J. Cloning of cDNA and Analysis of the Gene for Mouse Angiotensin II Type 2 Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *197*, 393–399. [[CrossRef](#)]
52. Mukoyama, M.; Nakajima, M.; Horiuchi, M.; Sasamura, H.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Expression Cloning of Type 2 Angiotensin II Receptor Reveals a Unique Class of Seven-Transmembrane Receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24539–24542. [[CrossRef](#)]
53. Asada, H.; Horita, S.; Hirata, K.; Shiroishi, M.; Shiimura, Y.; Iwanari, H.; Hamakubo, T.; Shimamura, T.; Nomura, N.; Kusano-Arai, O.; et al. Crystal Structure of the Human Angiotensin II Type 2 Receptor Bound to an Angiotensin II Analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 570–576. [[CrossRef](#)]
54. Asada, H.; Inoue, A.; Ngako Kadji, F.M.; Hirata, K.; Shiimura, Y.; Im, D.; Shimamura, T.; Nomura, N.; Iwanari, H.; Hamakubo, T.; et al. The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone. *Structure* **2020**, *28*, 418–425.e4. [[CrossRef](#)]
55. Sadybekov, A.; Katritch, V. Breaking the Enigma Code of Angiotensin II Type 2 Receptor Signaling. *Structure* **2020**, *28*, 390–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yamada, T.; Horiuchi, M.; Dzau, V.J. Angiotensin II Type 2 Receptor Mediates Programmed Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 156–160. [[CrossRef](#)]
57. Horiuchi, M.; Hayashida, W.; Kambe, T.; Yamada, T.; Dzau, V.J. Angiotensin Type 2 Receptor Dephosphorylates Bcl-2 by Activating Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19022–19026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Wan, Y.; Wallinder, C.; Plouffe, B.; Beaudry, H.; Mahalingam, A.K.; Wu, X.; Johansson, B.; Holm, M.; Botoros, M.; Karlén, A.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation, of the First Selective Nonpeptide AT2 Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5995–6008. [[CrossRef](#)]
59. Namsolleck, P.; Boato, F.; Schwengel, K.; Paulis, L.; Matho, K.S.; Geurts, N.; Thöne-Reineke, C.; Lucht, K.; Seidel, K.; Hallberg, A.; et al. AT2-Receptor Stimulation Enhances Axonal Plasticity after Spinal Cord Injury by Upregulating BDNF Expression. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *51*, 177–191. [[CrossRef](#)]
60. Stroth, U.; Meffert, S.; Gallinat, S.; Unger, T. Angiotensin II and NGF Differentially Influence Microtubule Proteins in PC12W Cells: Role of the AT2 Receptor. *Mol. Brain Res.* **1998**, *53*, 187–195. [[CrossRef](#)]
61. Laflamme, L.; de Gasparo, M.; Gallo, J.-M.; Payet, M.D.; Gallo-Payet, N. Angiotensin II Induction of Neurite Outgrowth by AT<sub>2</sub> Receptors in NG108-15 Cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 22729–22735. [[CrossRef](#)]
62. Bouquet, C.; Soares, S.; von Boxberg, Y.; Ravaille-Veron, M.; Propst, F.; Nothias, F. Microtubule-Associated Protein 1B Controls Directionality of Growth Cone Migration and Axonal Branching in Regeneration of Adult Dorsal Root Ganglia Neurons. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7204–7213. [[CrossRef](#)]
63. Cao, M.; Ji, F.; Liu, L.; Li, F. Expression Changes of Parvalbumin and Microtubule-Associated Protein 2 Induced by Chronic Constriction Injury in Rat Dorsal Root Ganglia. *Chin. Med. J.* **2011**, *124*, 2184–2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Gallinat, S.; Csikos, T.; Meffert, S.; Herdegen, T.; Stoll, M.; Unger, T. The Angiotensin AT2 Receptor Down-Regulates Neurofilament M in PC12W Cells. *Neurosci. Lett.* **1997**, *227*, 29–32. [[CrossRef](#)]
65. Gendron, L.; Laflamme, L.; Rivard, N.; Asselin, C.; Payet, M.D.; Gallo-Payet, N. Signals from the AT2 (Angiotensin Type 2) Receptor of Angiotensin II Inhibit P21ras and Activate MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) to Induce Morphological Neuronal Differentiation in NG108-15 Cells. *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 1615–1626. [[CrossRef](#)]
66. Plouffe, B.; Guimond, M.O.; Beaudry, H.; Gallo-Payet, N. Role of Tyrosine Kinase Receptors in Angiotensin II AT2 Receptor Signaling: Involvement in Neurite Outgrowth and in P42/P44mapk Activation in NG108-15 Cells. *Endocrinology* **2006**, *147*, 4646–4654. [[CrossRef](#)]

67. Anand, U.; Facer, P.; Yiangou, Y.; Sinisi, M.; Fox, M.; McCarthy, T.; Bountra, C.; Korchev, Y.E.; Anand, P. Angiotensin II Type 2 Receptor (AT2R) Localization and Antagonist-Mediated Inhibition of Capsaicin Responses and Neurite Outgrowth in Human and Rat Sensory Neurons. *Eur. J. Pain* **2013**, *17*, 1012–1026. [[CrossRef](#)]
68. Côté, F.; Laflamme, L.; Payet, M.D.; Gallo-Payet, N. Nitric Oxide, a New Second Messenger Involved in the Action of Angiotensin II on Neuronal Differentiation of NG108-15 Cells. *Endocr. Res.* **1998**, *24*, 403–407. [[CrossRef](#)]
69. Thippeswamy, T.; Morris, R. Nerve Growth Factor Inhibits the Expression of Nitric Oxide Synthase in Neurones in Dissociated Cultures of Rat Dorsal Root Ganglia. *Neurosci. Lett.* **1997**, *230*, 9–12. [[CrossRef](#)]
70. Gendron, L.; Côté, F.; Payet, M.D.; Gallo-Payet, N. Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Involved in Angiotensin II AT(2) Receptor Effects on Neurite Outgrowth in NG108-15 Cells. *Neuroendocrinology* **2002**, *75*, 70–81. [[CrossRef](#)]
71. Thippeswamy, T.; Jain, R.K.; Mumtaz, N.; Morris, R. Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase Results in Neurodegenerative Changes in the Axotomised Dorsal Root Ganglion Neurons: Evidence for a Neuroprotective Role of Nitric Oxide in Vivo. *Neurosci Res.* **2001**, *40*, 37–44. [[CrossRef](#)]
72. Contestabile, A.; Ciani, E. Role of Nitric Oxide in the Regulation of Neuronal Proliferation, Survival and Differentiation. *Neurochem. Int.* **2004**, *45*, 903–914. [[CrossRef](#)]
73. Abadir, P.M.; Foster, D.B.; Crow, M.; Cooke, C.A.; Rucker, J.J.; Jain, A.; Smith, B.J.; Burks, T.N.; Cohn, R.D.; Fedarko, N.S.; et al. Identification and Characterization of a Functional Mitochondrial Angiotensin System. *Cell Biol.* **2011**, *108*, 6. [[CrossRef](#)]
74. Valenzuela, R.; Costa-Besada, M.A.; Iglesias-Gonzalez, J.; Perez-Costas, E.; Villar-Cheda, B.; Garrido-Gil, P.; Melendez-Ferro, M.; Soto-Otero, R.; Lanciego, J.L.; Henrion, D.; et al. Mitochondrial Angiotensin Receptors in Dopaminergic Neurons. Role in Cell Protection and Aging-Related Vulnerability to Neurodegeneration. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, J.-M.; Mogi, M.; Tsukuda, K.; Tomochika, H.; Iwanami, J.; Min, L.-J.; Nahmias, C.; Iwai, M.; Horiuchi, M. Angiotensin II-Induced Neural Differentiation via Angiotensin II Type 2 (AT<sub>2</sub>) Receptor-MMS2 Cascade Involving Interaction between AT<sub>2</sub> Receptor-Interacting Protein and Src Homology 2 Domain-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase 1. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 499–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Di Benedetto, M.; Bièche, I.; Deshayes, F.; Vacher, S.; Nouet, S.; Collura, V.; Seitz, I.; Louis, S.; Pineau, P.; Amsellem-Ouazana, D.; et al. Structural Organization and Expression of Human MTUS1, a Candidate 8p22 Tumor Suppressor Gene Encoding a Family of Angiotensin II AT2 Receptor-Interacting Proteins, ATIP. *Gene* **2006**, *380*, 127–136. [[CrossRef](#)]
77. Nouet, S.; Amzallag, N.; Li, J.-M.; Louis, S.; Seitz, I.; Cui, T.-X.; Alleaume, A.-M.; Di Benedetto, M.; Boden, C.; Masson, M.; et al. Trans-Inactivation of Receptor Tyrosine Kinases by Novel Angiotensin II AT2 Receptor-Interacting Protein, ATIP. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28989–28997. [[CrossRef](#)]
78. Wruck, C.J.; Funke-Kaiser, H.; Pufe, T.; Kusserow, H.; Menk, M.; Schefe, J.H.; Kruse, M.L.; Stoll, M.; Unger, T. Regulation of Transport of the Angiotensin AT2 Receptor by a Novel Membrane-Associated Golgi Protein. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Forrester, S.J.; Booz, G.W.; Sigmund, C.D.; Coffman, T.M.; Kawai, T.; Rizzo, V.; Scalia, R.; Eguchi, S. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* **2018**, *98*, 1627–1738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Porrello, E.R.; Delbridge, L.M.D.; Thomas, W.G. The Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptor: An Enigmatic Seven Transmembrane Receptor. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2009**, *14*, 958–972. [[CrossRef](#)]
81. Sumners, C.; Fleegal, M.A.; Zhu, M. Angiotensin AT1 Receptor Signalling Pathways in Neurons. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 483–490. [[CrossRef](#)]
82. Fujita, T.; Hirooka, K.; Nakamura, T.; Itano, T.; Nishiyama, A.; Nagai, Y.; Shiraga, F. Neuroprotective Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1-R) Blocker via Modulating AT1-R Signaling and Decreased Extracellular Glutamate Levels. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 4099–4110. [[CrossRef](#)]
83. Lu, Q.; Zhu, Y.-Z.; Wong, P.T.-H. Neuroprotective Effects of Candesartan against Cerebral Ischemia in Spontaneously Hypertensive Rats. *Neuroreport* **2005**, *16*, 1963–1967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Iwai, M.; Liu, H.-W.; Chen, R.; Ide, A.; Okamoto, S.; Hata, R.; Sakanaka, M.; Shiuchi, T.; Horiuchi, M. Possible Inhibition of Focal Cerebral Ischemia by Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation. *Circulation* **2004**, *110*, 843–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ma, C.-Y.; Yin, L. Neuroprotective Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor during Cerebral Ischemia/Reperfusion. *Neural Regen Res.* **2016**, *11*, 1102–1107. [[CrossRef](#)]
86. Mateos, L.; Perez-Alvarez, M.J.; Wandosell, F. Angiotensin II Type-2 Receptor Stimulation Induces Neuronal VEGF Synthesis after Cerebral Ischemia. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1862*, 1297–1308. [[CrossRef](#)]
87. Schwengel, K.; Namsolleck, P.; Lucht, K.; Clausen, B.H.; Lambertsen, K.L.; Valero-esquitino, V.; Thöne-reineke, C.; Müller, S.; Widdop, R.E.; Denton, K.M.; et al. Angiotensin AT2-Receptor Stimulation Improves Survival and Neurological Outcome after Experimental Stroke in Mice. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 957–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. MataVELLI, L.C.; Siragy, H.M. AT2 Receptor Activities and Pathophysiological Implications. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2015**, *65*, 226–232. [[CrossRef](#)]
89. Sumners, C.; Horiuchi, M.; Widdop, R.E.; McCarthy, C.; Unger, T.; Steckelings, U.M. Protective Arms of the Renin-Angiotensin-System in Neurological Disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2013**, *40*, 580–588. [[CrossRef](#)]

90. Guimond, M.-O.; Wallinder, C.; Alterman, M.; Hallberg, A.; Gallo-Payet, N. Comparative Functional Properties of Two Structurally Similar Selective Nonpeptide Drug-like Ligands for the Angiotensin II Type-2 (AT<sub>2</sub>) Receptor. Effects on Neurite Outgrowth in NG108-15 Cells. *Eur J. Pharm.* **2013**, *699*, 160–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Meffert, S.; Stolf, M.; Steckelings, U.M.; Bottari, S.P.; Unger, T. The Angiotensin II AT<sub>2</sub> Receptor Inhibits Proliferation and Promotes Differentiation in PC12W Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1996**, *122*, 59–67. [[CrossRef](#)]
92. Hashikawa-Hobara, N.; Hashikawa, N. Angiotensin II AT<sub>2</sub>receptors Regulate NGF-Mediated Neurite Outgrowth via the NO-CGMP Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 970–975. [[CrossRef](#)]
93. Chakrabarty, A.; Liao, Z.; Smith, P.G. Angiotensin II Receptor Type 2 Activation Is Required for Cutaneous Sensory Hyperinnervation and Hypersensitivity in a Rat Hind Paw Model of Inflammatory Pain. *J. Pain* **2013**, *14*, 1053–1065. [[CrossRef](#)]
94. Chakrabarty, A.; Liao, Z.; Mu, Y.; Smith, P.G. Inflammatory Renin-Angiotensin System Disruption Attenuates Sensory Hyperinnervation and Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Provoked Vestibulodynia. *J. Pain* **2018**, *19*, 264–277. [[CrossRef](#)]
95. Bohm-Starke, N.; Hilliges, M.; Falconer, C.; Rylander, E. Increased Intraepithelial Innervation in Women with Vulvar Vestibulitis Syndrome. *GOI* **1998**, *46*, 256–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Bohm-Starke, N.; Hilliges, M.; Falconer, C.; Rylander, E. Neurochemical Characterization of the Vestibular Nerves in Women with Vulvar Vestibulitis Syndrome. *Gynecol. Obstet. Investig.* **1999**, *48*, 270–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Chadha, S.; Gianotten, W.L.; Drogendijk, A.C.; Weijmar Schultz, W.C.; Blindeman, L.A.; van der Meijden, W.I. Histopathologic Features of Vulvar Vestibulitis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **1998**, *17*, 7–11. [[CrossRef](#)]
98. Pulakat, L.; Sumners, C. Angiotensin Type 2 Receptors: Painful, or Not? *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 571994. [[CrossRef](#)]

## I.6.2. La cholécystokinine et CCK2R

### I.6.2.1. Généralités

La cholécystokinine (CCK) a été découverte pour la première fois en 1928 en tant qu'hormone du tractus gastro-intestinal (Ivy and Oldberg, 1928), puis identifiée en 1966 en tant que peptide de 33 acides aminés dans des extraits d'intestins de porc (Mutt and Jorpes, 1968). Par la suite, la CCK a été retrouvée dans le SNC, elle est considérée comme le neuropeptide le plus abondant du SNC (Hökfelt et al., 1985; Vanderhaeghen et al., 1975). Dans le tractus gastro-intestinal, la CCK est libérée par les cellules endocrines en réponse à l'ingestion de nourriture et régule la motilité intestinale, la contraction de la vésicule biliaire, la sécrétion d'enzymes pancréatiques, la vidange gastrique et la sécrétion d'acide chlorhydrique gastrique (Crawley and Corwin, 1994). Dans le système nerveux, la CCK est impliquée dans les comportements anxiogènes (Daugé and Léna, 1998), la satiété, la nociception, la thermorégulation, la mémoire et l'apprentissage (Daugé and Léna, 1998; Vasquez et al., 2014; Whissell et al., 2019).

Plusieurs formes moléculaires de la CCK ont été identifiées dans le cerveau, l'intestin et le sang chez l'Homme et chez les animaux de laboratoire. La CCK est produite à partir d'un seul gène, et les différents peptides associés sont le résultat de modifications post-traductionnelles (CCK-58, CCK-33, CCK22, CCK-12, CCK-8 et CCK-4) (Sekiguchi, 2016). Chez l'Homme, la CCK-58 et la CCK-8 sont les formes principales (Figure 17) (Wank, 1995).

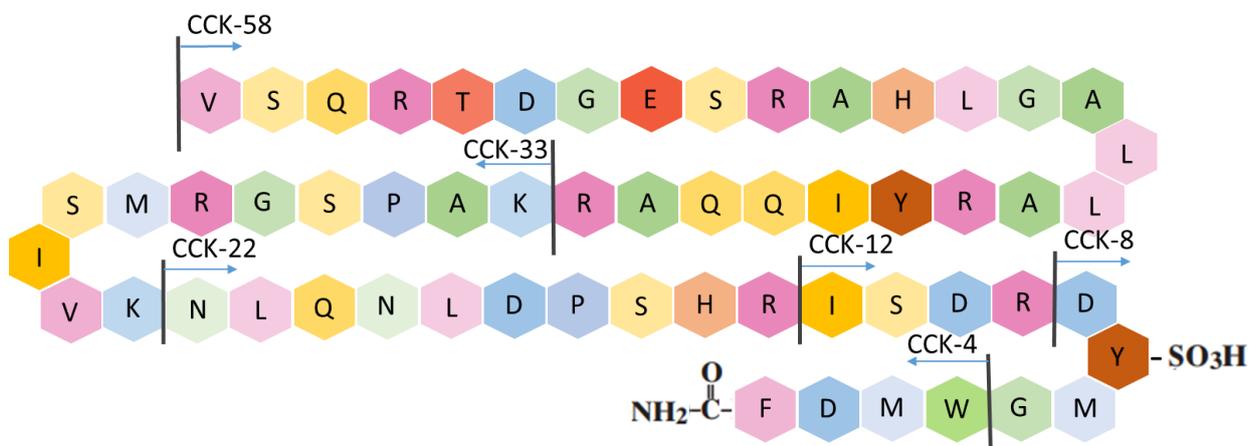


Figure 17. Structure en acides aminés des différentes formes de la cholécystokinine humaine

La CCK exerce ses fonctions physiologiques par l'activation de deux RCPG structurellement apparentés ; le récepteur de la CCK de type 1 (CCK1R) et le récepteur de la CCK de type 2 (CCK2R) (également appelés respectivement CCKAR et CCKBR, en raison de leur présence importante dans le tube digestif (Alimentary) et le cerveau (Brain)) (Dufresne et al., 2006). Le CCK2R est également le récepteur de la gastrine, une autre hormone polypeptidique structurellement apparentée produite dans le tractus gastrique (Kopin et al., 1992). En revanche, le CCK1R a une très faible capacité de liaison à la gastrine. Ces deux récepteurs sont hautement homologues avec environ 50 % de séquences identiques, en particulier dans les régions transmembranaires où ils présentent à 70 % d'homologie (Miller and Gao, 2008).

CCK1R se lie à la CCK-8 avec une affinité 500 à 1 000 fois supérieure à celle de la gastrine ou de la CCK-8 non sulfatée, et une affinité 10 000 fois supérieure à celle de la CCK-4. Ces récepteurs sont principalement localisés dans le tractus gastro-intestinal (pancréas, vésicule biliaire, muqueuse gastrique, sphincter pylorique, sphincter d'Oddi et sphincter œsophagien inférieur), où ils sont responsables de la régulation de divers processus digestifs (Noble et al., 1999; Wank, 1995, 1998). Ils sont également présents dans certaines zones du SNP (nerf vague) et du SNC (noyau tractus solitarius (NTS), noyau accumbens postérieur, noyau dorsomédial hypothalamique, corne dorsale de la moelle spinale et hypophyse antérieure) où ils agissent comme médiateurs des effets de la CCK sur la satiété (Ritter et al., 1999).

CCK2R lie avec une bonne affinité la CCK-8, la gastrine et la CCK-8 non sulfaté. L'affinité de CCK2R pour la CCK-4 est légèrement plus faible (environ 60 fois plus faible qu'avec la forme CCK-8) (Wank, 1995). CCK2R est principalement présent dans le SNC, où il serait responsable d'effets anxiogènes (Crawley and Corwin, 1994; Daugé and Léna, 1998; Griebel, 1999). Il serait également impliqué dans la nociception (Noble and Roques, 1999; Wiesenfeld-Hallin and Xu, 1996), et dans les processus de mémoire et d'apprentissage (Noble et al., 1999; Wank, 1995). Ce récepteur est également présent sur les cellules immunitaires telles que les monocytes (Sacerdote et al., 1991) et les lymphocytes T (Lignon et al., 1991), où sa fonction est inconnue. Pour mieux comprendre le rôle de CCK2R, de nombreux antagonistes ont été développés avec une affinité ligand/récepteur plus ou moins forte. Le proglumide est un des premiers antagonistes à avoir été développé. Il a été utilisé chez l'Homme dans le traitement des ulcères gastriques (Bergemann et al., 1981) et a depuis été

remplacé par des molécules plus efficaces. Le proglumide n'est pas un antagoniste spécifique du CCK2R, il est également capable de se lier au CCK1R avec une moindre affinité (Herranz, 2003). D'autres antagonistes ont ensuite été développés, notamment le Ly225910 (ou PD 140376) qui a une affinité 1750 fois plus forte pour CCK2R que pour CCK1R, ce qui fait de ce composé un antagoniste très spécifique pour CCK2R (Hill et al., 1993). Cependant il n'a jamais été administré chez l'Homme. Il est uniquement utilisé en recherche. Un autre antagoniste spécifique de CCK2R, le nétazépide (NTZ ,ou YF476) de chez TrioMedecines, est actuellement en essai clinique de phase 2 dans le traitement des tumeurs gastro-neuroendocrines, tumeurs surexprimant le CCK2R (Boyce et al., 2017). Il est bien toléré par les patients et à une bonne biodisponibilité (Boyce et al., 2015).

### ***1.6.2.2. CCK2R et douleur***

Au cours de ma thèse, nous avons réalisé un travail de revue bibliographique discutant du rôle de CCK2R dans le contrôle de la douleur. Ce travail a fait l'objet d'une revue dont je suis premier auteur, dans le journal *Pharmaceuticals* (IF 2021 : 5,215). Dans un premier temps, la revue précise la localisation cellulaire de CCK2R dans le système nerveux sensitif, et discute de son rôle dans la modulation de la douleur. La revue se focalise ensuite sur les modulateurs de ce récepteur ayant montré des effets antalgiques/neuroprotecteurs encourageants en précliniques. Enfin, pour conclure, nous soulignons la pertinence biologique et clinique du CCK2R en tant que cible prometteuse pour le développement de nouveaux traitements contre la douleur.



Review

# The Cholecystokinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management

Amandine Bernard <sup>1</sup>, Aurore Danigo <sup>1,\*</sup>, Sylvie Bourthoumieu <sup>1,2</sup>, Mohamad Mroué <sup>1</sup>, Alexis Desmoulière <sup>1</sup>, Franck Sturtz <sup>1,3</sup>, Amandine Rovini <sup>1</sup> and Claire Demiot <sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA6309—MMNP, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, 87025 Limoges, France; amandine.bernard@unilim.fr (A.B.); sylvie.bourthoumieu@unilim.fr (S.B.); mohamad.mroue@unilim.fr (M.M.); alexis.desmouliere@unilim.fr (A.D.); franck.sturtz@unilim.fr (F.S.); amandine.rovini@unilim.fr (A.R.); claire.demiot@unilim.fr (C.D.)

<sup>2</sup> Department of Cytogenetic, Medical Genetic and Reproduction Biology, University Hospital of Limoges, 87025 Limoges, France

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University Hospital of Limoges, 87025 Limoges, France

\* Correspondence: aurore.danigo@unilim.fr; Tel.: +33-(0)-675-472-748

**Abstract:** Over the past decades, accumulating evidence has demonstrated a pivotal role of cholecystokinin type 2 receptor (CCK2R) in pain modulation. The established role of CCK2R activation in directly facilitating nociception has led to the development of several CCK2R antagonists, which have been shown to successfully alleviate pain in several rodent models of pain. However, the outcomes of clinical trials are more modest since they have not demonstrated the expected biological effect obtained in animals. Such discordances of results between preclinical and clinical studies suggest reconsidering our knowledge about the molecular basis of the pharmacology and functioning of CCK2R. This review focuses on the cellular localization of CCK2R specifically in the sensory nervous system and discusses in further detail the molecular mechanisms and signal transduction pathways involved in controlling pain perception. We then provide a comprehensive overview of the most successful compounds targeting CCK2R and report recent advances in pharmacological strategies used to achieve CCK2R modulation. We purposely distinguish between CCK2R benefits obtained in preclinical models and outcomes in clinical trials with different pain etiologies. Lastly, we emphasize the biological and clinical relevance of CCK2R as a promising target for the development of new treatments for pain management.

**Keywords:** cholecystokinin type 2 receptor; pain management; antagonist; rodent model; clinical trial



check for updates

**Citation:** Bernard, A.; Danigo, A.; Bourthoumieu, S.; Mroué, M.; Desmoulière, A.; Sturtz, F.; Rovini, A.; Demiot, C. The Cholecystokinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1185. <https://doi.org/10.3390/ph14111185>

Academic Editor: Réjean Couture

Received: 2 November 2021

Accepted: 18 November 2021

Published: 19 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Chronic pain and its management remains a major health care issue and presents a therapeutic challenge, in large part because of its complex underlying pathophysiology. During the past decade, many studies have provided evidence of a pain modulating role for the G protein-coupled cholecystokinin type 2 receptor, CCK2R. Cholecystokinin (CCK) is a peptide that was discovered in the porcine gastrointestinal tract by Ivy and Oldberg in 1928 [1] and soon became part of the family of classical gut hormones, together with secretin and gastrin. As such, CCK is involved in exocrine [2] and endocrine [3,4] pancreatic secretion, gallbladder contraction and gut motility [5]. Two types of receptors mediate the action of CCK: cholecystokinin receptor type 1 CCK1R, formerly known as CCKAR, and CCK2R, known as CCKBR. CCK is a pre-pro-hormone synthesized by enteroendocrine intestinal cells, by I cells of the duodenum and jejunum, and by G cells of the stomach. Proteolytic cleavage of CCK generates a broad range of bio-active peptides among which are CCK-4, CCK-8 and CCK-8S (sulfated) (see review [6]). In 1975, the discovery of CCK-4 and CCK-8 peptides in the nervous system [7,8], prompted the characterization of CCK as a neuropeptide with pro-nociceptive and neurotransmitter properties. Pro-nociceptive

effects are mainly mediated by the activation of CCK2R. CCK-4, CCK-8 and their two receptors, CCK1R and CCK2R, which are expressed in areas of the brain associated with pain modulation and other processes such as memory, anxiety and thermoregulation. More recent studies have confirmed that the CCK system interacts with numerous neuropeptides involved in pain regulation (dopamine, glutamate, opioid, etc.) [9–11], and acts as a neuromodulator in sensation and pain tracts via CCK2R. The established role of CCK in directly facilitating nociception, has led to the development of several CCK2R antagonists which have been shown to successfully alleviate pain in rodent models [12,13]. Extensive research into non-peptide, small-molecule CCK2R antagonists has identified numerous promising lead compounds and clinical candidates, yet none has thus far made it into the clinic due to their unfavorable, ineffective and variable biological effects observed in clinical trials. This review summarizes the current knowledge supporting a role for CCK2R and its modulators for the treatment of pain. More specifically, we focus on the cellular localization of CCK2R in the sensory nervous system and discuss in further detail the molecular mechanisms and signal transduction pathways involved in controlling pain perception. We then provide a comprehensive overview of the most successful compounds targeting CCK2R and report recent advances in pharmacological strategies used to achieve CCK2R modulation. Lastly, the biological and clinical relevance of CCK2R as a promising target for the development of new treatments for pain management is emphasized.

## 2. CCK2R Structure and Functions

### 2.1. Gene Localization and Related Diseases

Human CCK2R was cloned for the first time in 1993 [14]. *Cck2r*, the gene coding for CCK2R, which is located on the terminal short arm of chromosomes 11 in humans (11p15.4), is 12 kbp in length and is composed of 5 exons. According to the Ensembl database, three transcripts have been identified in humans. CCK2R splice variants and mutations have been shown to be involved in cell proliferation and cancer pathogenesis [15]. Mutations, as well as overexpression of CCK2R, are associated with carcinogenesis via the modulation of processes including cell proliferation and cell adhesion.

### 2.2. Structural Features of the CCK2R

CCK1R and CCK2R belong to the family of G-protein-coupled receptors (GPCRs). The two genes share only 50% sequence homology, mostly in domains characteristic of GPCRs and in sequence signatures that are required for receptor activation, which might explain their differences in affinity for ligands [16]. Though there remain some controversies, CCK2R can be generally associated with Gq protein, and to a lesser extent with Gi, contrary to CCK1R which is associated with Gs protein [17]. The activated Gq pathway passes through phospholipase C beta (PLC $\beta$ ), which hydrolyzes phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) to inositol-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), leading to the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores into the cytoplasm, and to diacylglycerol (DAG), leading to the activation of protein kinase C (PKC). Ca<sup>2+</sup> is a major effector of neuronal function, involved in neurotransmitter release and membrane excitability. It has been shown that PKC can play a crucial role in the regulation of GPCRs [18]. GPCRs are comprised of seven  $\alpha$ -helical transmembrane domains, an extracellular N terminus with three extracellular loops, and an intracellular C terminus with three intracellular loops. GPCRs are a major class of proteins that are potentially involved in pain transmission and so, represent a preferred therapeutic target for novel analgesics [19]. For example, serotonin, apelin, dopamine, GABA<sub>B</sub>, opioid receptors and the recently clinically-implicated angiotensin II type 2 receptor (AT<sub>2</sub>R), all use signaling that passes through the GPCR family proteins and have roles in pain modulation [19,20].

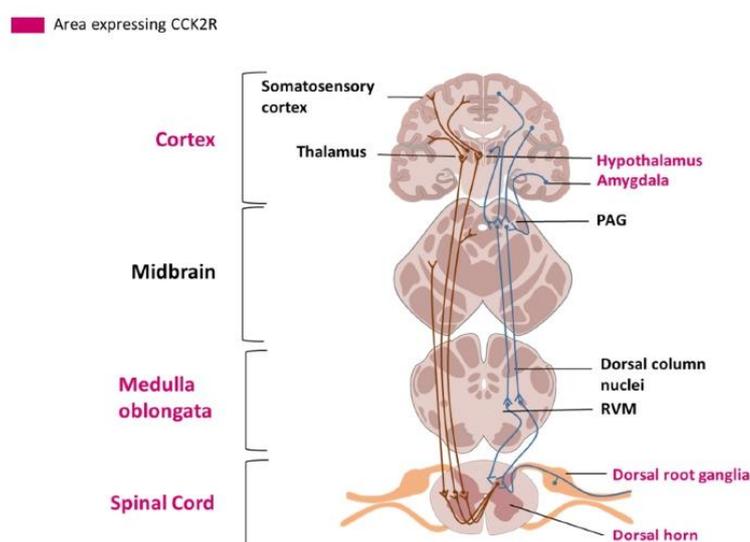
### 2.3. Cellular Localization and Tissue Distribution in the Nervous System

CCK2R is localized in the plasma membrane and can be internalized for desensitization, an essential mechanism for maintaining physiologically appropriate cellular responses

to extracellular stimuli. The internalization of the receptor can be decreased by removal of the C terminus, without affecting G protein coupling [21].

Only a few studies have investigated the expression of CCKRs in the human brain. Most of these explored the binding of radiolabeled ligands, which did not allow the discrimination between CCK1R and CCK2R [22,23]. However, a study using integrative data from several sources (transcriptomics, single-cell genomics, in situ hybridization and antibody-based protein profiling) has shown the localization and expression level of the receptors in human, pig and mouse brain [24]. This database detected CCK2R mRNA in most parts of the human brain, except the thalamus. Some of the structures that express CCK2R are directly implicated in the modulation of pain, such as the hypothalamus, the basal ganglia and the amygdala.

The hypothalamus has a role in modulating the affective dimension of pain and is part of the spinothalamic tract, the principal pain tract [25] (Figure 1). The basal ganglia (mainly including the putamen and the caudate nucleus, and the nucleus accumbens (NAc)) have been principally studied for their motor functions, but are also involved in different aspects of pain including the sensory-discriminative, affective and cognitive dimension of pain and the modulation of nociceptive stimulus intensity information [26]. The amygdala plays an important role in emotional responses and affective states, in disorders such as learned fear, anxiety and depression, and also in pain modulation [27].

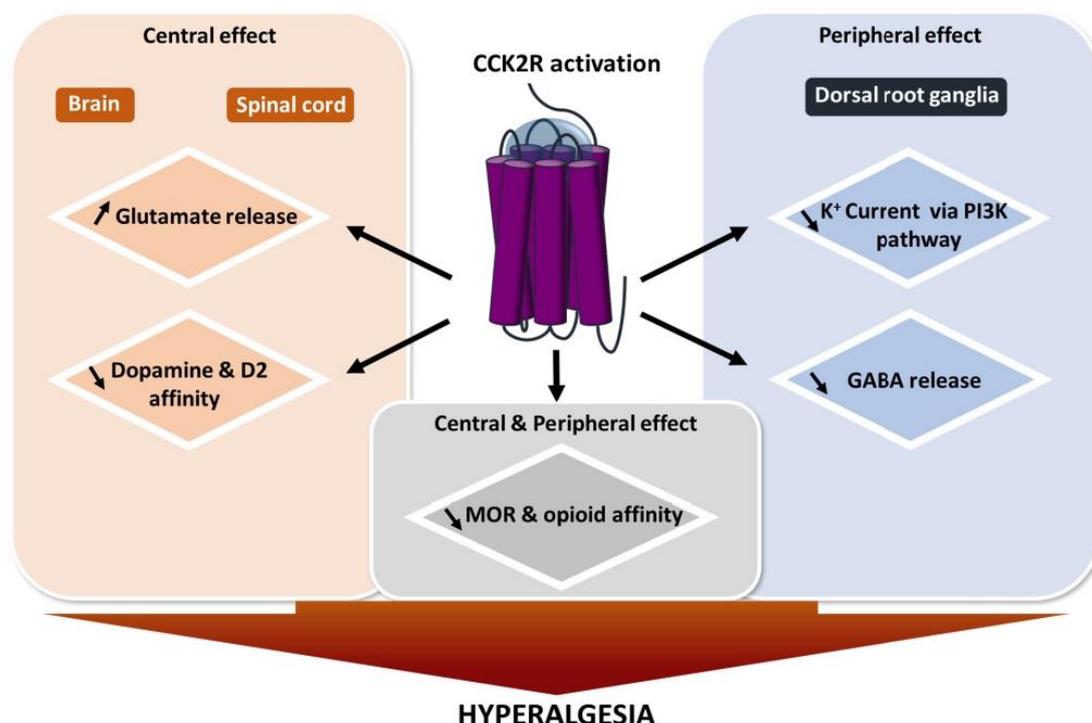


**Figure 1. Representation of the spinothalamic tract and descending pain modulation pathway.** Areas where CCK2R has been detected are labelled in pink. A: Ascending pain pathways. Nociceptors (C and A $\delta$  fibers) send pain information from peripheral tissues, their cell bodies are localized in the dorsal root ganglia (DRG). Fibers transmit nociceptive signals to a second order neuron in the dorsal horn of the spinal cord. The second order neuron then crosses over to the opposite side, where it forms the ascending spinothalamic tract. This tract takes signals to nuclei in the medulla oblongata and midbrain on the way up to the thalamus. The thalamus relays the information to the somatosensory and insular cortex, as well as cortical regions mediating different aspects of the pain experience such as affective responses in the cingulate cortex. B: Descending pain modulation pathways: Information from the environment and some motivational states can activate this top-down pathway. Several areas in the limbic forebrain including the anterior cingulate and insular cortex, nuclei in the amygdala and the hypothalamus, project to the midbrain periaqueductal grey (PAG), which then modulates ascending pain transmission from the afferent pain system indirectly through the rostral ventromedial medulla (RVM) in the brainstem.

Low level expression of CCK2R has been detected in the spinal cord [24]. Interestingly, the expression of CCK2R in the human peripheral nervous system has not been explored. In rats, CCK2R mRNA has been detected in dorsal root ganglia (DRGs) using *in situ* hybridization. Only 3% to 4% of all DRG neurons in physiological conditions expressed CCK2R mRNA [28]. Another study using [<sup>125</sup>I]-CCK-8S labelled with Bolton-Hunter reagent to localize its binding site in DRG, led to the same conclusion [29]. Moreover, in a model of unilateral peripheral transection of the sciatic nerve in the rat [28], *in situ* hybridization highlighted an increase in CCK2R mRNA in the L4 and L5 DRGs after axotomy. Localization of CCK2R in nociception-linked areas and upregulation of CCK2R mRNA after traumatic lesions underlined the interest of evaluating the roles of CCK2R in pain modulation.

### 3. Involvement of CCK2R in Pain Modulation

Pain is defined by The International Association for the Study of Pain (IASP) as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage”. Neuropathic pain is defined as pain caused by a lesion or a disease affecting the somatosensory nervous system. The development of neuropathic pain arises from multiple and complex pathophysiological mechanisms making its evaluation and management difficult. Hence, gaining knowledge about pain-underpinning mechanisms and their translation into symptoms might eventually allow a more appropriate therapeutic approach to treat each patient (Figure 2).



**Figure 2. Effect of CCK2R activation on pain modulation.** Summary of known CCK2R actions after activation. Most of its interactions induce a mechanism leading to hyperalgesia. GABA: gamma-aminobutyric acid; D2: dopamine receptor 2; MOR:  $\mu$  opioid receptor; PI3K pathway: Phosphoinositide 3-kinase pathway.

### 3.1. The Heterodimerization of CCK2R and the Opioid Receptor Reduces Opioid Efficacy

Since 1983, the role of CCK in hyperalgesia has been studied, in particular its interaction with opioid receptors [30]. Opioids are the most powerful analgesics currently used for the treatment of pain, yet repeated administration induces tolerance which significantly decreases their analgesic effect. Opioids bind to opioid receptors belonging to the GPCR family, namely  $\mu$ -opioid receptor (MOR),  $\delta$ -opioid receptor (DOR), and  $\kappa$ -opioid receptor (KOR). Those receptors are localized in primary sensory neurons, the spinal cord, brainstem, midbrain and cortex. Binding to the opioid receptor induces a decrease in neuronal activity and an inhibition in the release of pro-nociceptive neurotransmitters [31].

Many studies have shown that CCK-8, when delivered intrathecally, via intracerebral injection or systemically, reduces the effect of opioids [32,33]. CCK2R likely contributes to this anti-analgesic effect. In rats, the selective blockade of CCK2R using the antagonist L365,260 enhanced morphine analgesia and this effect is 40 times more potent than that obtained with the CCK1R antagonist, L365,031 [34]. More recently, a study has demonstrated direct heterodimerization of MOR/CCK2R consecutively to CCK-8 binding. The authors identified the third transmembrane domain of MOR as being required for the interaction with CCK2R. This interaction is the basis of the inhibition of MOR signal transduction and the antagonism of morphine analgesia [11]. Such data strengthen a rationale for disrupting the MOR/CCK2R interaction in order to enhance opioid analgesia.

### 3.2. CCK/CCK2R Facilitates Glutamate Release

It is well-established that CCK is highly expressed in the hippocampus [35]. Studies have shown that glutamate and CCK-8 are co-localized in the cortico-striatal pathway [36]. A study using whole-cell recordings from rat hippocampal slices, showed that CCK binding to CCK2R substantially increased releasable glutamate vesicles in the hippocampus [37].

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the brain, and considering its pivotal role in pain sensation and transmission, modulation of the glutamate receptor activity represents a promising potential target for pain management. As an example, the use of NMDA or AMPA glutamate receptor antagonists favorably reduce thermal and mechanical pain thresholds in both a model of inflammation and also in normal rats [9,38]. Thus, by facilitating the release of glutamate, CCK/CCK2R interaction promotes hyperexcitability in the hippocampus and likely an increase in nociceptive pain. Therefore, inhibition of the CCK2R could have an analgesic effect other than that mediated by opioid receptors.

### 3.3. CCK/CCK2R Increases Dopamine

A study using an *in vitro* filter wipe-off technique, revealed a modulatory role of CCK-8 on dopamine release in the rat NAc [39]. Specifically, activation of CCK2R by CCK-8 reduced the affinity of the D2-like receptor in the brain. This observation was confirmed by microdialysis of CCK-8 in rat NAc, showing an increase in dopamine release.

Dopamine has a central role in pain modulation [40], and the disruption of dopamine homeostasis in the central nervous system could contribute to pain chronicity. Dopamine actions are mediated by two families of receptors: the D1-like family receptors and the D2-like family receptors, which, respectively, activate and inhibit the release of dopamine. Stimulation of the D2-like receptors has an analgesic capacity. This effect has been shown for both inflammatory pain and in thermal nociception [41,42]. Moreover, the use of D2 antagonists has demonstrated a pro-nociceptive effect [41].

As outlined above, CCK2R activation mediates the release of dopamine, an excitatory neuromodulator, while CCK2R decreases the affinity of dopamine for its receptor D2. This mechanism could lead to pro-nociceptive effects via hyperexcitability.

### 3.4. CCK/CCK2R Decreases GABA Release

Pre-incubation of rat DRG neurons with CCK-8S prior to application of gamma-aminobutyric acid (GABA) resulted in attenuation of GABA-induced depolarization [43].

This effect was reversed by Ly225,910, a CCK2R antagonist. The CCK-8S-induced inhibition of GABA-evoked membrane potential can also be suppressed with a PLC inhibitor. The authors hypothesized that binding of CCK-8S to CCK2R would activate PKC, which would then phosphorylate the GABAA receptor inhibiting its function in DRG neurons. By this mechanism, the pre-synaptic inhibitory role of GABA would be disinhibited leading to induction of nociception activity in the spinal cord [43].

GABA also has a significant role in pain modulation, which is suggested by the anatomical distribution of GABA receptors (GABAA and GABAB) and evidence of the action of GABA agonists on the nociceptive response. GABA receptors are present in the spinal cord and brain areas that are associated with mediating and perceiving pain [44–47]. Moreover, GABA receptors have been localized on primary afferent A- $\delta$  and C fibers, which conduct mechanical and thermal nociceptive information.

### 3.5. CCK/CCK2R Decreases $K^+$ Channel Currents

Inhibition of the transient type-A  $K^+$  current by CCK-8/CCK2R activation has been recently shown in small-sized DRG neuron extracts from mice [48]. DRG neurons express a variety of A-type  $K^+$  channels that regulate membrane excitability. In DRG neurons, a decrease in A-type  $K^+$  current induces an increase in neuronal excitability and is, thus, associated with chronic pain [49]. The underlying mechanism of CCK2R-mediated modulation of A-type  $K^+$  currents involves the PI3K/SRC/JNK pathway. This signaling cascade results in the phosphorylation and, thus, the inhibition of A-type  $K^+$  channels [48]. In the same study, the authors showed that intraplantar administration of CCK8 affected nociception in mice, characterized by mechanical and heat hypersensitivity, and that this effect was mediated by CCK2R and modulation of A-type currents.

## 4. Development of Pharmacological Modulators

The search for and development of selective CCK2R agonists or antagonists has been a major challenge since the 1990s with potential applications spanning various medical areas. The sites and mechanisms of binding for endogenous and non-peptide ligands of CCK2R have been studied in detail, which has provided the knowledge for understanding the molecular basis of these interactions [50]. A description of ligand-binding sites in the CCK2R, defined by experimental and computational methods, has been reported elsewhere [51]. Here, we summarize the most potent and selective antagonists and, additionally, the endogenous agonists of CCK2R (Table 1).

**Table 1.** Main CCK2R Agonists and Antagonists.

	Agonists		Target	Antagonists		
	Affinity	Ref		Synthetic	Affinity	Ref
CCK-4 (endogenous)	Ki = 0.11 $\mu$ M	[52]	CCK2R	CI-988 (PD-134 308)	Ki = 0.5 nM	[53]
				L365,260 (benzodiazepine analogue)	Ki = 7 nM	[54]
CCK-8 (endogenous)	Ki = 0.3 nM	[14]		Ly225,910	Ki = 0.2 nM	[55]
Pentagastrin (synthetic)	Ki = 0.0029 $\mu$ M	[52]		Netazepide (YF476)	Ki = 0.19 nM	[56]
				YM-022	Ki = 68 pM	[52]
CCK-8S (endogenous)	CCK1R Ki = 1.41 nM	[57]		CCK1R & CCK2R	Proglumide	CCK1R: IC50 = 6 $\mu$ M
	CCK2R Ki = 0.34 nM		CCK2R: IC50 = 11 $\mu$ M			

This table summarizes the endogenous CCK2R agonists and their affinity, and provides a non-exhaustive list of the most potent and selective CCK2R antagonists. Ki: dissociation constant; IC50: the half minimal inhibitory concentration.

### 5. Pharmacological Modulation of CCK2R in Preclinical Models of Pain

Numerous rodent models of pain have been developed and characterized in recent years. Each model is representative of one of three types of pain: neuropathic, inflammatory or nociceptive. Different mechanisms are involved according to the cause of pain. Neuropathic pain is caused by a lesion or disease of the somatosensory system, including peripheral fibers (A $\beta$ , A $\delta$  and C fibers) and central neurons. Neuropathic pain can be central or peripheral, and results from trauma (spinal cord injury, stroke, post herpetic neuralgia) or toxic injury (diabetes, chemotherapy). Inflammatory pain is caused by the release of chemicals that sensitize nerve terminals at the site of inflammation (for example, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease). Nociceptive pain results from normal noxious stimuli, without alteration of nerve fibers or endogenous chemical events (Table 2).

**Table 2.** Preclinical studies highlighting the role of CCK2R in pain.

Model Type	Species	Injury	Treatment	Effect of CCK2R Modulation	Refs
<b>Central nervous system</b>					
Traumatic model	Male Sprague–Dawley Rats	Hemisection at T13 on left side	CI-988 (CCK2R antagonist) (i.t.) and systemic injection	CI-988 reduced allodynia	[13]
	129S4 CCK2R <sup>-/-</sup> mice	Chronic constriction injury	No treatment	In midbrain and medulla, CCK2R <sup>-/-</sup> mice showed reduced expression of MAPK pathway and cytokine production, compared to WT mice	[59]
<b>Peripheral nervous system</b>					
Traumatic model	129svC57BL6 CCK2R <sup>-/-</sup> mice		Naxolone (opioid receptor antagonist) injection (i.p.)	CCK2R <sup>-/-</sup> mice showed reduced sensitivity without treatment, naxolone injection increased mechanical allodynia, compared to WT Mice	[60]
			L365,260 (i.p.)	High dose of L365,260 decreased the sensitivity of WT mice	[60]
		Ligation of the sciatic nerve		CCK2R <sup>-/-</sup> mice did not display hyperalgesia, and exhibited less inflammation in sciatic nerve	[60]
	Rats	Unilateral peripheral transection of sciatic nerve		CCK2R was overexpressed in ipsilateral side of axotomy	[28]
	129svC57BL6 CCK2R <sup>-/-</sup> mice	Chronic constriction injury		CCK2R <sup>-/-</sup> mice had less microglial infiltration in nerve compared to WT	[60]
Burn model	C57BL6 mice	mild burn injury	Proglumide (30 mg/kg, i.p.), meloxicam (5 mg/kg, i.p.), gabapentin (100 mg/kg, i.p.), oxycodone (10 mg/kg, i.p.)	Proglumide decreased mechanical allodynia alone or with co-administration of oxycodone at low dose (1mg/kg, i.p.) and alleviated thermal allodynia	[61]

Table 2. Cont.

Model Type	Species	Injury	Treatment	Effect of CCK2R Modulation	Refs
Diabetic neuropathy model	ICR mice	Diabetic mice (injection of streptozotocin)	CI-988 (i.t.)	CI-988 increased latency of tail response in diabetic mice	[12]
			CCK-8 (i.t.)	CCK-8 injection decreased latency of tail response in WT mice, reversed by pretreatment with CI-998	[12]

i.p.: intraperitoneal; i.t.: intrathecal.

### 5.1. Model of Traumatic Injury at the Central Nervous System Level

The role of CCK/CCK2R in central neuropathic pain was investigated in a rat model of spinal cord injury (SCI) [13]. Following injury, animals developed mechanical allodynia, which was reduced by systemic or intrathecal administration of the CCK2R antagonist, CI-988 (see Table 1). Moreover, CCK mRNA expression was increased on the ipsilateral side at the spinal segments caudal to the SCI. These results suggest that the upregulation of spinal CCK may contribute to the development or maintenance of central neuropathic pain after SCI, via CCK2R activation [13]. Therefore, compounds similar to CI-988 may be useful for central pain management caused by traumatic injury.

### 5.2. Model of Traumatic Injury at the Peripheral Nervous System Level

Traumatic injuries to the peripheral nerves can be attributed to a combination of mechanisms ranging from simple traction or stretch to ischemia, burns and electrical injuries. In general, traumatic peripheral nerve injuries impede the recovery of functions, return to work and quality of life.

Following chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, wild type (WT) mice displayed chronic neuropathic pain symptoms from the second postoperative day to the end of the tests (44 days), whereas CCK2R<sup>-/-</sup> mice did not display chronic hyperalgesia [60]. This study suggests the involvement of CCK2R in the establishment of mechanisms leading to neuropathic pain following traumatic nerve injury.

### 5.3. Model of Burn Pain

In a model of hind paw burn injury in mice, the involvement of CCK2R in pain [61] was also supported. Burn-induced pain is caused by damage to peripheral nerve endings (neuropathic pain) and inflammatory processes (inflammatory pain). The burn injury model was described from both transcriptomic and pharmacological perspectives. The transcriptomic analysis of DRG neurons showed that the *Cck2r* gene was upregulated after induction of the burn injury. Several behavioral tests were performed to assess the impact of the burn (motor assessment, paw thickness, gait analysis, Hargreaves test, electronic von Frey test), the efficacy of opioid (meloxicam, amitriptyline, gabapentin and oxycodone) and the effect of the CCK inhibitor proglumide on pain. Opioid drugs, injected intraperitoneally (i.p.) once daily during the experiment, partially reversed mechanical allodynia but had no effect on thermal allodynia and gait abnormalities induced by burn injury. Proglumide (30 mg/kg/day, i.p.), significantly alleviated mechanical allodynia alone or in combination with oxycodone at low dose (1 mg/kg, i.p.). Oxycodone alone at 1 mg/kg did not produce any analgesia. Co-administration of proglumide with low-dose oxycodone appeared to improve paw withdrawal force but was not statistically significant; however, it did alleviate thermal allodynia. CCK2R antagonists may be useful clinically as adjuvants to decrease opioid requirements and improve analgesic management.

In this study, the only CCK2R antagonist tested was proglumide, which is not a specific antagonist of CCK2R. It may have a direct interaction with  $\delta$  opioid receptors, which can mask a potential effect of CCK2R blockade.

#### 5.4. Model of Diabetic Neuropathy

Diabetic neuropathy most often affects nerves in the legs and feet. Depending on the affected nerves, painful diabetic neuropathy symptoms can range from burning, sharp or aching pain and numbness in the legs and feet, to problems of the digestive system, urinary tract, blood vessels and heart.

The role of spinal CCK2R in thermal allodynia and hyperalgesia was investigated in a mouse model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy [12]. Diabetic mice displayed thermal hyperalgesia and allodynia characterized by a reduced time response to the tail flick in response to a heat test. In diabetic mice, blockade of the spinal CCK2R by intrathecal (i.t.) CI-988 injection showed a significant increase in tail response latency compared with untreated diabetic mice. Moreover, CCK2R activation by CCK-8 i.t. injection in non-diabetic mice reduced the latency of the tail response, and this effect was reversed by CI-988 pretreatment. As observed with CCK-8, the injection of a protein kinase C (PKC) activator reduced tail response latency and was also reversed by CI-988. This observation suggested that the activation of CCK2R could be involved in thermal hypersensitivity observed in diabetic neuropathy, via activation of the PKC pathway. Blockade of spinal CCK2R could, therefore, be a therapeutic strategy to alleviate some pain associated with diabetes [12].

### 6. Clinical Relevance of CCK2R Pharmacological Targeting

#### 6.1. Placebo

The placebo effect describes the beneficial psycho-physiological result observed after the administration of a substance or the performance of a therapeutic act, regardless of the expected intrinsic efficacy of the treatment. The placebo effect seems to be mediated by activation of  $\mu$ -opioid receptors [62].

The interaction already highlighted between CCK2R and opioid receptors demonstrates the role of CCK2R in the placebo response [63]. The use of pentagastrin, as a CCK2R agonist, disrupted the placebo effect in human subjects. In a double-blind study 40 volunteers were divided into 4 groups: natural history (control) group, hidden pentagastrin group, placebo group and placebo+ pentagastrin group [63]. In the three treatment groups, morphine was injected intravenously 15 min before inducing pain with a tourniquet on three non-consecutive days. On day 4, morphine was replaced by a placebo (saline solution) and/or pentagastrin. In the group receiving placebo only, similar pain was observed compared to the response with morphine, whereas in the groups receiving pentagastrin, the pain was at the level of control (without morphine). These results showed that opioid-induced placebo responses were abolished by the administration of pentagastrin. There would appear to be a balance between opioid receptors and CCK2R.

#### 6.2. Postoperative Pain

Postoperative pain is defined as acute pain experienced by the patient after a surgical procedure. Good management of postoperative pain is important in reducing complications and facilitating rehabilitation. Postoperative pain relief is mainly based on opioids, and so is associated with side effects such as constipation, respiratory distress and the development of tolerance to administered opioids.

In 1988, a clinical trial assessed the interactions between morphine and proglumide in 80 patients [64]. All patients suffered from moderate to severe postoperative pain following abdominal or gynecological surgery. They were divided into four groups that all received morphine on demand at 3 mg via the i.v. route: alone; with 0.05 mg proglumide (i.v.); with 0.5 mg proglumide; with proglumide at 50 mg. Morphine consumption, pain scores and side effects were evaluated 8 h after the first administration of morphine. At the end of this clinical trial, there was no difference between the groups either for drug consumption, pain scores or side effects. It was therefore concluded that proglumide does not potentiate morphine analgesia in a clinical postoperative setting and does not modify side effects [64].

The use of proglumide has also been evaluated in 60 patients with dental postoperative pain [65]. Proglumide administered at 0.05 mg (i.v.) in combination with morphine at 4 mg

(i.v.) achieved a significantly greater analgesic effect than morphine at 4 mg or 8 mg alone, with no evidence of increased side effects. Proglumide alone had no effect even at higher doses (0.5 and 5 mg) [65].

These two studies, evaluating the efficacy of proglumide in postoperative pain, gave contradictory results, which could be explained by the use of different pain scales. Indeed, visual analogue scales (VAS) are more sensitive than category scale measurements [66]. Moreover, it would appear that the potentiation of morphine analgesia by proglumide, follows a biphasic dose-response, with low doses being more effective than high.

### 6.3. Cancer Pain

Cancer pain may have multiple forms. Pain can be directly caused by the tumor itself, as it grows into or destroys adjacent tissue. As a tumor grows, it can press on nerves, resulting in neuropathic pain. The tumor can also release chemicals that can cause inflammatory pain, and cancer treatments, including surgery, radiation and chemotherapy, can also cause pain.

Proglumide has been tested in cancer pain in humans [67]. A double-blind crossover study was carried out on 43 patients suffering from metastatic cancer pain. Patients received in one arm, a full analgesic dose of morphine plus placebo i.v., and in the other arm, half the analgesic dose plus 50 mg of proglumide. Pain was analyzed using 8 VAS and 3 Tursky verbal rating scales (TVS). Analgesia was similar in the two arms, suggesting that proglumide potentiated the effect of morphine [67].

### 6.4. Neuropathic Pain

The analgesic effect of the CCK receptor antagonist L365,260 on chronic human neuropathic pain that is unresponsive to current treatment, has been studied in a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study [68]. Forty adult subjects taking morphine for neuropathic pain were enrolled in this assay. Each subject received three treatments in varying order, separated by a washout period of between 5 and 14 days. Treatments consisted of a dose of morphine with placebo, 30 mg of L365,260 taken orally or 120 mg of L365,260, each treatment administered for 2 weeks. In contrast to preclinical studies, L365,260 failed to show an antalgic effect [68].

## 7. Conclusions/Critical Perspectives

Many compounds acting on CCK2R have shown promising results in preclinical models of pain. However, most of these compounds did not produce the desired effects in clinical trials. The discordance of results between preclinical and clinical studies may be explained in part by the differences in expression and distribution of CCK2R between rodents and humans. Indeed, despite a gene sequence homology of 90–97% across species [2], the location of CCK2R in the nervous system is not the same. According to Sjöstedt et al., the pig would be a better model for the study of the human brain [24], particularly as CCK2R distribution in the human brain is closer to that in the pig than the mouse. However, it should be noted that CCK2R is expressed in the thalamus in both mice and pigs, but is absent in humans [24]. The thalamus is an important structure mediating pain transmission, so this may contribute to interspecies variation in the efficacy of CCK2R antagonists. Moreover, inconsistency between assessment tools used in rodent models and clinical endpoints in human studies may also be a technical contributor to differences observed between species. In fact, most studies to evaluate drug efficacy in rodent models use very restricted nociceptive endpoints (allodynia, hyperalgesia) measured by behavioral tests, whereas neuropathic pain symptoms are wider and more complex, including paresthesia or dysesthesia, than these endpoints can detect. In addition, primary endpoints in clinical trials vary, adding another degree of complexity to the translation of preclinical data into clinical efficacy. Finally, the effective dose of CCK2R antagonists seems to be restricted and, regardless of whether dosing is assessed in clinical or preclinical studies, effective doses are

often at the lower end [12,65]. Thus, the relationship between ligand and receptors does not seem to be linear.

Data are scarce concerning the exact localization of CCK2R in the nervous system, especially in the peripheral nervous system, thus limiting our understanding of CCK2R's mechanism of action. In rodents, some information on CCK2R expression in DRG indicates a very low expression in neurons [28]. However, DRG are not only composed of neurons but also satellite glial cells, which are crucial for proper functioning of the sensory nervous system [69], immune cells and endothelial cells. Satellite glial cells could be involved in pain processes and also in immunity. In addition, studies have identified the expression of CCK2R on different immune cell types, such as macrophages and T lymphocytes [70,71]. Further studies are needed to accurately define the localization of CCK2R, particularly in the sensory nervous system to help elucidate its role and that of the various cell populations in pain modulation.

The lack of positive results of CCK2R clinical studies on pain management, may be due to the poor bioavailability and efficacy of administered agents [72]. Some of the antagonists discovered early on are in fact partial agonists (L365,260) or inverse agonists, which calls for a reconsideration of the use of these compounds and the need for extensive characterization of newer compounds [73]. The lack of a precise 3D structure of CCK2R and limited knowledge of the essential structural features of its non-peptide ligand-binding site(s) hamper the development of CCK2R antagonists [73]. Most CCK2R antagonists have been studied in anxiety, fear and memory [10,74,75].

The value of CCK2R antagonist-based therapies lies in the complex and multiple signaling activated by the CCK2R. As mentioned above, CCK2R can interact with several other GPCRs and, thus, modulate the interaction with their ligands, shifting the discharge of neurotransmitters or ion transport. These varied interactions greatly complicate understanding of the mechanism of action of CCK2R that seems to differ depending on which part of the nervous system is involved.

Despite gaps in our understanding of the role of CCK2R in pain modulation, an increasing number of transcriptomic analyses underway in pain models, are highlighting the upregulation of CCK2R in several models including abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome [76], a model of lipopolysaccharide-induced lung inflammation [77] and a model of deletion of the NMDA receptor inducing hypersensitivity [78]. This upregulation demonstrated a central role of CCK2R in pain development.

To conclude, there is accumulating evidence that CCK2R plays a crucial role in the modulation of pain and that its blockade is a valid therapeutic strategy in the management of pain. Further preclinical investigations with more specific antagonists, appropriate dosing and models are needed to understand the mechanism(s) of action of CCK2R. Several promising new CCK2R antagonists have already been administered in human clinical trials with good safety profiles. Thus, these compounds represent new opportunities in analgesia pharmacology.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, A.B., A.D. (Aurore Danigo) and A.R.; writing—review and editing, A.B., A.D. (Aurore Danigo), A.R., S.B., M.M., A.D. (Alexis Desmoulière) and C.D.; visualization, F.S.; supervision, A.R. and C.D.; project administration, C.D. and A.D. (Aurore Danigo); funding acquisition, C.D., A.D. (Aurore Danigo) and F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** Claire Demiot is part of the French neuropsychopharmacology consortium of SFPT (“Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique”).

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- Ivy, A.C.; Oldberg, E. A Hormone Mechanism for Gall-Bladder Contraction and Evacuation. *Am. J. Physiol. Leg. Content* **1928**, *86*, 599–613. [CrossRef]
- Wank, S.A. Cholecystokinin Receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1995**, *269*, G628–G646. [CrossRef] [PubMed]
- Karlsson, S.; Åhrén, B. CCKA Receptor Antagonism Inhibits Mechanisms Underlying CCK-8-Stimulated Insulin Release in Isolated Rat Islets. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *202*, 253–257. [CrossRef]
- Rossetti, L.; Shulman, G.I.; Zawlich, W.S. Physiological Role of Cholecystokinin in Meal-Induced Insulin Secretion in Conscious Rats. Studies with L 364718, a Specific Inhibitor of CCK-Receptor Binding. *Diabetes* **1987**, *36*, 1212–1215. [CrossRef] [PubMed]
- Grider, J.R. Role of Cholecystokinin in the Regulation of Gastrointestinal Motility. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 1334S–1339S. [CrossRef]
- Dufresne, M.; Seva, C.; Fourmy, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 805–847. [CrossRef]
- McRoberts, J.W. Cholecystokinin and Pain. *Anesth. Prog.* **1986**, *33*, 87–90.
- Vanderhaeghen, J.J.; Signeau, J.C.; Gepts, W. New Peptide in the Vertebrate CNS Reacting with Antigastrin Antibodies. *Nature* **1975**, *257*, 604–605. [CrossRef]
- Jackson, D.L.; Graff, C.B.; Richardson, J.D.; Hargreaves, K.M. Glutamate Participates in the Peripheral Modulation of Thermal Hyperalgesia in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *284*, 321–325. [CrossRef]
- Léna, I.; Dhôtel, H.; Garbay, C.; Daugé, V. Involvement of D 2 Dopamine Receptors in the Opposing Effects of Two CCK-B Agonists in a Spatial Recognition Memory Task: Role of the Anterior Nucleus Accumbens. *Psychopharmacology* **2001**, *153*, 170–179. [CrossRef] [PubMed]
- Yang, Y.; Li, Q.; He, Q.-H.; Han, J.; Su, L.; Wan, Y. Heteromerization of  $\mu$ -Opioid Receptor and Cholecystokinin B Receptor through the Third Transmembrane Domain of the  $\mu$ -Opioid Receptor Contributes to the Anti-Opioid Effects of Cholecystokinin Octapeptide. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 64. [CrossRef]
- Kamei, J.; Zushida, K. The Role of Spinal Cholecystokinin B Receptors in Thermal Allodynia and Hyperalgesia in Diabetic Mice. *Brain Res.* **2001**, *892*, 370–375. [CrossRef]
- Kim, J.; Kim, J.H.; Kim, Y.; Cho, H.; Hong, S.K.; Yoon, Y.W. Role of Spinal Cholecystokinin in Neuropathic Pain after Spinal Cord Hemisection in Rats. *Neurosci. Lett.* **2009**, *462*, 303–307. [CrossRef] [PubMed]
- Noble, F.; Roques, B.P. CCK-B Receptor: Chemistry, Molecular Biology, Biochemistry and Pharmacology. *Prog. Neurobiol.* **1999**, *58*, 349–379. [CrossRef]
- Willard, M.D.; Lajiness, M.E.; Wulur, I.H.; Feng, B.; Swearingen, M.L.; Uhlik, M.T.; Kinzler, K.W.; Velculescu, V.E.; Sjöblom, T.; Markowitz, S.D.; et al. Somatic Mutations in CCK2R Alter Receptor Activity That Promote Oncogenic Phenotypes. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 739–749. [CrossRef]
- Miller, L.J.; Gao, F. Structural Basis of Cholecystokinin Receptor Binding and Regulation. *Pharm. Ther.* **2008**, *119*, 83–95. [CrossRef] [PubMed]
- Piiper, A.; Stryjek-Kaminska, D.; Klengel, R.; Zeuzem, S. CCK, Carbachol, and Bombesin Activate Distinct PLC-Beta Isoenzymes via Gq/11 in Rat Pancreatic Acinar Membranes. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, G135–G140. [CrossRef]
- Zhang, J.-G.; Cong, B.; Li, Q.-X.; Chen, H.-Y.; Qin, J.; Fu, L.-H. Cholecystokinin Octapeptide Regulates Lipopolysaccharide-Activated B Cells Co-Stimulatory Molecule Expression and Cytokines Production In Vitro. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2011**, *33*, 157–163. [CrossRef]
- Stone, L.S.; Molliver, D.C. In Search of Analgesia: Emerging Poles of GPCRs in Pain. *Mol. Interv.* **2009**, *9*, 234–251. [CrossRef]
- Danigo, A.; Rovini, A.; Bessaguet, F.; Bouchenaki, H.; Bernard, A.; Sturtz, F.; Bourthoumieu, S.; Desmoulière, A.; Magy, L.; Demiot, C. The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System? *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 175. [CrossRef]
- Pohl, M.; Silvente-Poirot, S.; Pisegna, J.R.; Tarasova, N.I.; Wank, S.A. Ligand-Induced Internalization of Cholecystokinin Receptors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18179–18184. [CrossRef] [PubMed]
- Dietl, M.M.; Probst, A.; Palacios, J.M. On the Distribution of Cholecystokinin Receptor Binding Sites in the Human Brain: An Autoradiographic Study. *Synapse* **1987**, *1*, 169–183. [CrossRef] [PubMed]
- Gaudreau, P.; St-Pierre, S.; Pert, C.B.; Quirion, R. Cholecystokinin Receptors in Mammalian Brain: A Comparative Characterization and Visualization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, *448*, 198–219. [CrossRef] [PubMed]
- Sjöstedt, E.; Zhong, W.; Fagerberg, L.; Karlsson, M.; Mitsios, N.; Adori, C.; Oksvold, P.; Edfors, F.; Limiszewska, A.; Hikmet, F.; et al. An Atlas of the Protein-Coding Genes in the Human, Pig, and Mouse Brain. *Science* **2020**, *367*, eaay5947. [CrossRef]
- Dafny, N.; Dong, W.Q.; Prieto-Gomez, C.; Reyes-Vazquez, C.; Stanford, J.; Qiao, J.T. Lateral Hypothalamus: Site Involved in Pain Modulation. *Neuroscience* **1996**, *70*, 449–460. [CrossRef]
- Chudler, E.H.; Dong, W.K. The Role of the Basal Ganglia in Nociception and Pain. *Pain* **1995**, *60*, 3–38. [CrossRef]
- Neugebauer, V. 15. Amygdala Pain Mechanisms. *Handb Exp. Pharm.* **2015**, *227*, 261–284. [CrossRef]
- Zhang, X.; Dagerlind, A.; Elde, R.P.; Castel, M.N.; Broberger, C.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T. Marked Increase in Cholecystokinin B Receptor Messenger RNA Levels in Rat Dorsal Root Ganglia after Peripheral Axotomy. *Neuroscience* **1993**, *57*, 227–233. [CrossRef]

29. Ghilardi, J.R.; Allen, C.J.; Vigna, S.R.; McVey, D.C.; Mantyh, P.W. Trigeminal and Dorsal Root Ganglion Neurons Express CCK Receptor Binding Sites in the Rat, Rabbit, and Monkey: Possible Site of Opiate-CCK Analgesic Interactions. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4854–4866. [[CrossRef](#)]
30. Faris, P.; Komisaruk, B.; Watkins, L.; Mayer, D. Evidence for the Neuropeptide Cholecystokinin as an Antagonist of Opiate Analgesia. *Science* **1983**, *219*, 310–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Stein, C. Opioids, Sensory Systems and Chronic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 179–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Torres-López, J.E.; Juárez-Rojop, I.E.; Granados-Soto, V.; Diaz-Zagoya, J.C.; Flores-Murrieta, F.J.; Ortiz-López, J.U.S.; Cruz-Vera, J. Peripheral Participation of Cholecystokinin in the Morphine-Induced Peripheral Antinociceptive Effect in Non-Diabetic and Diabetic Rats. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 788–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, X.H.; Wang, X.J.; Han, J.S. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) antagonized analgesia mediated by mu and kappa opioid receptors. *Sheng Li Xue Bao* **1990**, *42*, 219–225.
34. Dourish, C.T.; O'Neill, M.F.; Coughlan, J.; Kitchener, S.J.; Hawley, D.; Iversen, S.D. The Selective CCK-B Receptor Antagonist L-365,260 Enhances Morphine Analgesia and Prevents Morphine Tolerance in the Rat. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *176*, 35–44. [[CrossRef](#)]
35. Gall, C.; Berry, L.M.; Hodgson, L.A. Cholecystokinin in the Mouse Hippocampus: Localization in the Mossy Fiber and Dentate Commissural Systems. *Exp. Brain Res.* **1986**, *62*, 431–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bradwejn, J.; Vasar, E. *Cholecystokinin and Anxiety: From Neuron to Behavior*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; ISBN 978-3-662-21705-4.
37. Deng, P.-Y.; Xiao, Z.; Jha, A.; Ramonet, D.; Matsui, T.; Leitges, M.; Shin, H.-S.; Porter, J.E.; Geiger, J.D.; Lei, S. Cholecystokinin Facilitates Glutamate Release by Increasing the Number of Readily Releasable Vesicles and Releasing Probability. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 5136–5148. [[CrossRef](#)]
38. Lawand, N.B.; Willis, W.D.; Westlund, K.N. Excitatory Amino Acid Receptor Involvement in Peripheral Nociceptive Transmission in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *324*, 169–177. [[CrossRef](#)]
39. Ferraro, L.; O'connor, W.T.; Li, X.-M.; Rimondini, R.; Beam, L.; Ungerstedt, U.; Fuxe, K.; Tanganelli, S. Evidence for a Differential Cholecystokinin-B and -A Receptor Regulation of Gaba Release in the Rat Nucleus Accumbens Mediated via Dopaminergic and Cholinergic Mechanisms. *Neuroscience* **1996**, *73*, 941–950. [[CrossRef](#)]
40. Taylor, B.K.; Joshi, C.; Uppal, H. Stimulation of Dopamine D2 Receptors in the Nucleus Accumbens Inhibits Inflammatory Pain. *Brain Res.* **2003**, *987*, 135–143. [[CrossRef](#)]
41. Gao, X.; Zhang, Y.; Wu, G. Effects of Dopaminergic Agents on Carrageenan Hyperalgesia after Intrathecal Administration to Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *418*, 73–77. [[CrossRef](#)]
42. Barasi, S.; Duggal, K.N. The Effect of Local and Systemic Application of Dopaminergic Agents on Tail Flick Latency in the Rat. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *117*, 287–294. [[CrossRef](#)]
43. Ma, K.-T.; Si, J.-Q.; Zhang, Z.-Q.; Zhao, L.; Fan, P.; Jin, J.-L.; Li, X.-Z.; Zhu, L. Modulatory Effect of CCK-8S on GABA-Induced Depolarization from Rat Dorsal Root Ganglion. *Brain Res.* **2006**, *1121*, 66–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Enna, S.J.; McCarron, K.E. The Role of GABA in the Mediation and Perception of Pain. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; Volume 54, pp. 1–27. ISBN 978-0-12-032957-1.
45. Désarmenien, M.; Feltz, P.; Occhipinti, G.; Santangelo, F.; Schlichter, R. Coexistence of GABAA and GABAB Receptors on A Delta and C Primary Afferents. *Br. J. Pharm.* **1984**, *81*, 327–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Paul, J.; Zeilhofer, H.U.; Fritschy, J.-M. Selective Distribution of GABA<sub>A</sub> Receptor Subtypes in Mouse Spinal Dorsal Horn Neurons and Primary Afferents. *J. Comp. Neurol.* **2012**, *520*, 3895–3911. [[CrossRef](#)]
47. Valev, A.Y.; Hackman, J.C.; Wood, P.M.; Davidoff, R.A. Pharmacologically Novel GABA Receptor in Human Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurophysiol.* **1996**, *76*, 3555–3558. [[CrossRef](#)]
48. Yu, S.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Chang, Z.; Wei, Y.; Sun, Y.; Jiang, D.; Jiang, X.; Tao, J. Cholecystokinin Type B Receptor-Mediated Inhibition of a-Type K<sup>+</sup> Channels Enhances Sensory Neuronal Excitability Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase and C-Src-Dependent Jnk Pathway. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zemel, B.M.; Ritter, D.M.; Covarrubias, M.; Muqem, T. A-Type KV Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons: Diversity, Function, and Dysfunction. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 253. [[CrossRef](#)]
50. Foucaud, M.; Archer-Lahlou, E.; Marco, E.; Tikhonova, I.G.; Maigret, B.; Escrieut, C.; Langer, I.; Fourmy, D. Insights into the Binding and Activation Sites of the Receptors for Cholecystokinin and Gastrin. *Regul. Pept.* **2008**, *145*, 17–23. [[CrossRef](#)]
51. Tikhonova, I.G.; Marco, E.; Lahlou-Archer, E.; Langer, I.; Foucaud, M.; Maigret, B. Daniel Fourmy Validated Ligand Binding Sites in CCK Receptors. Next Step: Computer-Aided Design of Novel CCK Ligands. *CTMC* **2007**, *7*, 1243–1247. [[CrossRef](#)]
52. Berna, M.J.; Tapia, J.A.; Sancho, V.; Jensen, R.T. Progress in Developing Cholecystokinin (CCK)/Gastrin Receptor Ligands Which Have Therapeutic Potential. *Curr. Opin. Pharm.* **2007**, *7*, 583–592. [[CrossRef](#)]
53. Horwell, D.C.; Hughes, J.; Hunter, J.C.; Pritchard, M.C.; Richardson, R.S.; Roberts, E.; Woodruff, G.N. Rationally Designed “Dipeptoid” Analogues of CCK. Alpha-Methyltryptophan Derivatives as Highly Selective and Orally Active Gastrin and CCK-B Antagonists with Potent Anxiolytic Properties. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 404–414. [[CrossRef](#)]
54. Lotti, V.J.; Chang, R.S. A New Potent and Selective Non-Peptide Gastrin Antagonist and Brain Cholecystokinin Receptor (CCK-B) Ligand: L-365,260. *Eur. J. Pharm.* **1989**, *162*, 273–280. [[CrossRef](#)]

55. Hill, D.; Horwell, D.C.; Hunter, J.C.; Kneen, C.O.; Pritchard, M.C.; Suman-Chauhan, N. Synthesis of a Potent and Selective Non-Peptide CCK-B/Gastrin Receptor Antagonist Tritiated Ligand. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 885–888. [\[CrossRef\]](#)
56. Takinami, Y.; Yuki, H.; Nishida, A.; Akuzawa, S.; Uchida, A.; Takemoto, Y.; Ohta, M.; Satoh, M.; Semple, G.; Miyata, K. YF476 Is a New Potent and Selective Gastrin/Cholecystokinin-B Receptor Antagonist In Vitro and In Vivo. *Aliment. Pharm. Ther.* **1997**, *11*, 113–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Reeve, J.R.; Liddle, R.A.; McVey, D.C.; Vigna, S.R.; Solomon, T.E.; Keire, D.A.; Rosenquist, G.; Shively, J.E.; Lee, T.D.; Chew, P.; et al. Identification of Nonsulfated Cholecystokinin-58 in Canine Intestinal Extracts and Its Biological Properties. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2004**, *287*, G326–G333. [\[CrossRef\]](#)
58. Herranz, R. Cholecystokinin Antagonists: Pharmacological and Therapeutic Potential. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 559–605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Köks, S.; Fernandes, C.; Kurrikoff, K.; Vasar, E.; Schalkwyk, L.C. Gene Expression Profiling Reveals Upregulation of Tlr4 Receptors in Cckb Receptor Deficient Mice. *Behav. Brain Res.* **2008**, *188*, 62–70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Kurrikoff, K.; Köks, S.; Matsui, T.; Bourin, M.; Arend, A.; Aunapuu, M.; Vasar, E. Deletion of the CCK2 Receptor Gene Reduces Mechanical Sensitivity and Abolishes the Development of Hyperalgesia in Mononeuropathic Mice. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *20*, 1577–1586. [\[CrossRef\]](#)
61. Yin, K.; Deuis, J.R.; Lewis, R.J.; Vetter, I. Transcriptomic and Behavioural Characterisation of a Mouse Model of Burn Pain Identify the Cholecystokinin 2 Receptor as an Analgesic Target. *Mol. Pain* **2016**, *12*. [\[CrossRef\]](#)
62. Zubietta, J.-K.; Bueller, J.A.; Jackson, L.R.; Scott, D.J.; Xu, Y.; Koepp, R.A.; Nichols, T.E.; Stohler, C.S. Placebo Effects Mediated by Endogenous Opioid Activity on  $\mu$ -Opioid Receptors. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 7754–7762. [\[CrossRef\]](#)
63. Benedetti, F.; Amanzio, M.; Thoen, W. Disruption of Opioid-Induced Placebo Responses by Activation of Cholecystokinin Type-2 Receptors. *Psychopharmacology* **2011**, *213*, 791–797. [\[CrossRef\]](#)
64. Lehmann, K.A.; Schlüsener, M.; Arabatsis, P. Failure of Proglumide, a Cholecystokinin Antagonist, to Potentiate Clinical Morphine Analgesia. A Randomized Double-Blind Postoperative Study Using Patient-Controlled Analgesia (PCA). *Anesth. Analg.* **1989**, *68*, 51–56.
65. Lavigne, G.J.; Hargreaves, K.M.; Schmidt, E.A.; Dionne, R.A. Proglumide Potentiates Morphine Analgesia for Acute Postsurgical Pain. *Clin. Pharm. Ther.* **1989**, *45*, 666–673. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Langley, G.B.; Sheppard, H. The Visual Analogue Scale: Its Use in Pain Measurement. *Rheumatol. Int.* **1985**, *5*, 145–148. [\[CrossRef\]](#)
67. Bernstein, Z.P.; Yucht, S.; Battista, E.; Lema, M.; Spaulding, M.B. Proglumide as a Morphine Adjunct in Cancer Pain Management. *J. Pain Symptom Manag.* **1998**, *15*, 314–320. [\[CrossRef\]](#)
68. McCleane, G.J. A Randomised, Double Blind, Placebo Controlled Crossover Study of the Cholecystokinin 2 Antagonist L-365,260 as an Adjunct to Strong Opioids in Chronic Human Neuropathic Pain. *Neurosci. Lett.* **2003**, *338*, 151–154. [\[CrossRef\]](#)
69. Hanani, M.; Spray, D.C. Emerging Importance of Satellite Glia in Nervous System Function and Dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2020**, *21*, 485–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Cuq, P.; Gross, A.; Terraza, A.; Fourmy, D.; Clerc, P.; Dornand, J.; Magous, R. MRNAs Encoding CCKB but Not CCKA Receptors Are Expressed in Human T Lymphocytes and Jurkat Lymphoblastoid Cells. *Life Sci.* **1997**, *61*, 543–555. [\[CrossRef\]](#)
71. Xu, S.-J.; Gao, W.-J.; Cong, B.; Yao, Y.-X.; Gu, Z.-Y. Effect of Lipopolysaccharide on Expression and Characterization of Cholecystokinin Receptors in Rat Pulmonary Interstitial Macrophages. *Acta Pharm. Sin.* **2004**, *25*, 1347–1353.
72. Boyce, M.; Lloyd, K.A.; Pritchard, D.M. Potential Clinical Indications for a CCK2 Receptor Antagonist. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *31*, 68–75. [\[CrossRef\]](#)
73. Novak, D.; Anderluh, M.; Kolenc Peitl, P. CCK2R Antagonists: From SAR to Clinical Trials. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1322–1336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Daugé, V.; Léna, I. CCK in Anxiety and Cognitive Processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1998**, *22*, 815–825. [\[CrossRef\]](#)
75. Vialou, V.; Bagot, R.C.; Cahill, M.E.; Ferguson, D.; Robison, A.J.; Dietz, D.M.; Fallon, B.; Mazei-Robison, M.; Ku, S.M.; Harrigan, E.; et al. Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety-Related Behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of  $\Delta$ FosB. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 3878–3887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Lin, Z.; Wang, Y.; Lin, S.; Liu, D.; Mo, G.; Zhang, H.; Dou, Y. Identification of Potential Biomarkers for Abdominal Pain in IBS Patients by Bioinformatics Approach. *BMC Gastroenterol.* **2021**, *21*, 48. [\[CrossRef\]](#)
77. Kaelberer, M.M.; Caceres, A.I.; Jordt, S.-E. Activation of a Nerve Injury Transcriptional Signature in Airway-Innervating Sensory Neurons after Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2020**, *318*, L953–L964. [\[CrossRef\]](#)
78. Brifault, C.; Romero, H.; Van-Enoo, A.; Pizzo, D.; Azmoon, P.; Kwon, H.; Nasamran, C.; Gonias, S.L.; Campana, W.M. Deletion of the Gene Encoding the NMDA Receptor GluN1 Subunit in Schwann Cells Causes Ultrastructural Changes in Remak Bundles and Hypersensitivity in Pain Processing. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 9121–9136. [\[CrossRef\]](#)

## **Partie II. Objectif**

## Partie II. Objectifs généraux

---

L'objectif de mon travail de thèse a été d'explorer en préclinique de nouvelles cibles pharmacologiques, dans des modèles murins de NPIC. Nos modèles ont l'avantage de développer des atteintes morphologiques en plus de symptômes douloureux, permettant de mettre en évidence le potentiel effet neuroprotecteur et/ou analgésique des molécules candidates.

Deux stratégies thérapeutiques différentes ont été développées, l'une utilisant des modulateurs du SRA dans un modèle de neuropathie induite par le PTX, l'autre ciblant CCK2R surexprimé au niveau des GS dans les modèles de neuropathie induite par la VCR et par le PTX.

### II.1. Objectif 1 : Evaluer l'effet du ramipril en préventif sur la survenue de la NPIP chez la souris

Le SRA est principalement connu et étudié pour son rôle de régulateur de la pression artérielle. Son expression et son rôle au niveau du système nerveux ont récemment été mis en évidence, et plus particulièrement, au niveau du SNP sensitif. La modulation du SRA modifie la perception douloureuse et la sensibilité non douloureuse chez l'animal et chez l'Homme (Bessaguet et al., 2016; Rohit et al., 2006). Plusieurs études mettent en avant les effets neuroprotecteurs de modulateurs du SRA dans des modèles animaux de neuropathies périphériques sensitives et motrices (Danigo et al., 2015; Kaur et al., 2015). L'effet bénéfique du candésartan, un antagoniste des récepteurs AT1 de l'Ang II, a été mis en évidence dans un modèle de NPIP, caractérisé au sein du laboratoire. Le traitement au candésartan a totalement prévenue la survenue de l'allodynie mécanique induite par la VCR, ainsi que les atteintes morphologiques associées, i.e. une perte en FNIE, en neurones sensitifs et un gonflement des fibres myélinisées (Bessaguet et al., 2018). De plus, l'effet neuroprotecteur et analgésique du candésartan impliquait la stimulation d'AT2R. De la même façon, l'utilisation de façon préventive du ramipril dans un modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine, un anticancéreux alkylant dérivant du platine, a permis d'améliorer la sensibilité tactile et la nociception au froid altérées par la chimiothérapie. Le modèle développé ici était représentatif de la neurotoxicité aiguë de l'OXP, i.e. une allodynie au froid et mécanique transitoire, sans neurodégénérescence (Bouchenaki et al., 2021). Mon travail s'inscrit donc à la suite

de ces travaux, à savoir identifier l'effet neuroprotecteur du ramipril dans un modèle murin de neuropathie induite par le PTX.

Pour ce faire, un modèle de NPIP a été développé et caractérisé à l'aide de tests comportementaux et d'analyses morphologique (immuno-histologie et microscopie électronique). Une fois le modèle caractérisé, le ramipril a été administré de façon préventive afin d'évaluer ses effets sur le développement de la NPIP (**cf.III.1.3.1. Protocole 1**). Un modulateur pharmacologique des AT2R (PD123319) a également été administré afin d'évaluer l'implication d'AT2R dans les effets du ramipril. Des expérimentations sur des lignées de souris AT2KO ont également permis de valider les résultats pharmacologiques obtenus.

## **II.2. Objectif 2 : Evaluer l'effet d'antagonistes de CCK2R en préventif sur la survenue de la NPIV et de la NPIP chez la souris**

CCK2R est exprimé dans le système gastro-intestinal et le SNC. Il est exprimé dans des zones du cerveau impliquées dans la modulation de la douleur et dans d'autres processus tels que la mémoire, l'anxiété et la thermorégulation. Il est également connu pour interagir avec de nombreux neuropeptides impliqués dans la régulation de la douleur (dopamine, glutamate, opioïde, etc.) (Jackson et al., 1995; Léna et al., 2001; Yang et al., 2018). De plus, plusieurs analyses transcriptomiques réalisées dans des modèles de douleurs neuropathiques associées à des lésions nerveuses ont mis en évidence la surexpression de CCK2R dans les GS (Yamamoto and Nozaki-Taguchi, 1995; Yin et al., 2016; Zhang et al., 1993). Le blocage de CCK2R est également analgésique dans plusieurs modèles de douleur, induit par brûlure (Yin et al., 2016) et dans un modèle de neuropathie diabétique (Kamei and Zushida, 2001) entre autres. En vue de ces informations, le blocage de CCK2R pourrait être une stratégie efficace pour prévenir le développement de la douleur neuropathique chimio-induite et en particulier dans le modèle murin de NPIV (Bessaguet et al., 2018) et de NPIP (**cf.II.1. Objectif 1**).

Pour ce faire, le modèle NPIV précédemment caractérisé au sein de notre laboratoire de recherche a été utilisé. Dans un premier temps, un antagoniste non spécifique des CCK2R, le proglumide ainsi qu'un antagoniste spécifique des CCK2R, le Ly225910, ont été administrés en préventif afin d'évaluer leurs effets sur le développement de la

NPIV (**cf. III.1.3.2. Protocole 2**). Des études *in vitro* sur des lignées cancéreuses sensibles à la VCR ont également été réalisées, afin de vérifier si les deux molécules candidates n'altéraient pas l'effet cytotoxique de la VCR.

Un second protocole, utilisant un autre antagoniste spécifique des CCK2R, le NTZ, a fait l'objet du même type d'étude sur le modèle NPIV (**cf. III.1.3.3. Protocole 3**) et sur le modèle NPIP (**cf. III.1.3.4. Protocole 4**). Contrairement au Ly225910, le NTZ est administrable chez l'Homme et est actuellement en essai clinique de phase 2 chez l'Homme dans le traitement de tumeurs gastriques neuroendocrines (Boyce et al., 2017). Nous avons pu l'obtenir suite à un contrat de collaboration avec le laboratoire TrioMedecines Ltd (Londres, UK) de type MTA (Material Transfert Agreement).

## **Partie III. Travail expérimental**

## Partie III. Travail expérimental

---

### III.1. Protocoles expérimentaux

#### III.1.1. Animaux

Toutes les expérimentations ont été réalisées au sein de l'animalerie agréée BISCEM modèles animaux (agrément n°8708503), et conformément à la réglementation en vigueur définie par le Ministère de l'Agriculture, la Direction des Services Vétérinaires et le Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale (autorisation n° **#27947-2020111216498126 v2**, n° **#11280-2017091510483336 v3** et n°**#28013-202011713586769 v2**). Des souris Swiss mâles et femelles de 20-25 g provenant des centres d'élevage Janvier ont été utilisées pour mener les expérimentations. Celles-ci ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* et une période d'acclimatation de 7 jours a été respectée entre la réception des animaux et le début des expériences. Des souris C57bl6 déficientes pour AT2 (AT2KO), mâles et femelles, âgées de 5 à 6 semaines ont également été utilisées pour les expériences concernant mon premier objectif de thèse, à savoir la modulation du SRA par le ramipril dans le modèle NPIP (cf. III.1.3.1. Protocole 1).

#### III.1.2. Traitements et molécules neurotoxiques

##### III.1.2.1. Les molécules neurotoxiques

La VCR (Sulfate de Vincristine, Hospira) a été diluée dans une solution physiologique à la concentration de 0,1 mg/ml. Les injections de VCR ont été réalisées par voie i.p. quotidiennement de J0 (1<sup>er</sup> jour d'injection de VCR) à J7 (total de 8 injections) à la dose de 100 µg/kg (Kiguchi et al., 2008a; Saika et al., 2009)

Le PTX (Paclitaxel, Hospira) a été dilué dans une solution physiologique à la concentration de 0,1 mg/ml. Les injections de PTX ont été réalisées par voie i.p. tous les 2 jours pendant 4 jours (J0, J2, J4, J6) à la dose de 2 mg/kg.

##### III.1.2.2. Modulateur du système SRA

Le ramipril (R0404, Sigma) a été solubilisé dans du DMSO puis dilué dans une solution physiologique pour obtenir une solution à 0,3 mg/ml. Le traitement a été administré tous les jours en i.p. de J-1 à J20, à la dose de 3 mg/kg (Figure 18).

Le PD123319 (Sigma) a été dilué dans une solution physiologique à la concentration de 0,2 mg/ml. Le traitement a été administré tous les jours en i.p. de J-1 à J20 à la dose de 2 mg/kg (Figure 18).

### ***III.1.2.3. Antagonistes du récepteur à la cholécystokinine de type 2***

Le proglumide (proglumide sodium salt, Sigma) a été solubilisé dans du DMSO puis dilué dans du PBS pour obtenir une solution à 3 mg/ml. Le traitement a été injecté par voie i.p. quotidiennement de J-1 (1 jour avant la 1<sup>ère</sup> administration de VCR : J0) à J7 (9 injections) à la dose de 30 mg/kg (Yin et al., 2016) (Figure 19).

Le Ly225910 (Abcam) a été solubilisé dans du DMSO puis dilué dans une solution physiologique afin d'obtenir une concentration finale en solution de 0,1 mg/ml. Le traitement a été injecté par voie i.p. quotidiennement de J-1 à J7 (9 injections) à la dose de 1,0 mg/kg (Ballaz et al., 2007) (Figure 11).

Le nétazépide (Trio Medicines Ltd) a été solubilisé dans du DMSO (10 %) puis dilué dans du PEG 300 (50 %) et dans une solution physiologique à la concentration de 0,4 mg/ml. Le traitement a été administré par gavage quotidiennement de J-1 à J7 pour le protocole VCR (Figure 20) et de J-1 à J15 pour le protocole PTX, aux doses de 2 mg/kg et 5 mg/kg (Figure 21).

## **III.1.3. Chronologie des protocoles**

### ***III.1.3.1. Protocole 1. Effets du ramipril dans la prévention de la NPIP chez la souris***

La neuropathie périphérique a été induite par quatre injections i.p de PTX, tous les 2 jours pendant 4 jours. Un volume équivalent de solution saline a été administré aux souris contrôles (Ctrl) en i.p. Les traitements, ramipril (3 mg/kg/j, i.p, Sigma) et/ou PD123319 (2 mg/kg/j, i.p, Sigma) ont été administrés un jour avant la première injection de PTX, et les 20 jours suivant de manière quotidienne. Les souris véhicules ont reçu du DMSO 1 % en i.p suivant la même chronologie (Figure 18).

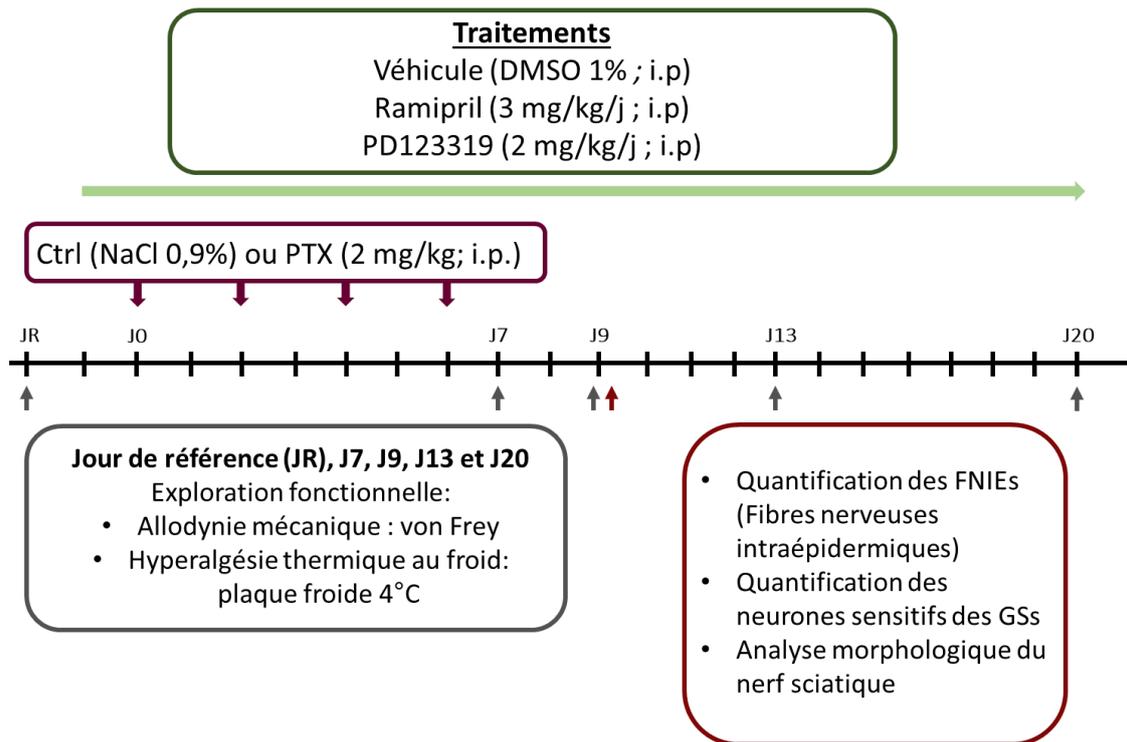


Figure 18 : Chronogramme du protocole 1. Effets du ramipril sur la prévention des neuropathies périphériques induites par le PTX.

Ctrl : Contrôle, DMSO : Diméthylsulfoxyde, FNIE : Fibres nerveuses intraépidermiques, GS : Ganglions spinaux, i.p. : Intrapéritonéale, PTX : Paclitaxel

Les tests fonctionnels ont été réalisés à différents temps. JR qui correspond au jour de référence pour évaluer la sensibilité de chaque animal avant traitement, J0 qui correspond à la première injection de PTX puis à J7, J9, J13 et J20 après la première injection de PTX. L'immunohistochimie et les analyses morphologiques ont été réalisées sur des tissus prélevés trois jours après la dernière injection de PTX (J9).

### **III.1.3.2. Protocole 2. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la vincristine**

La neuropathie périphérique a été induite par une injection quotidienne en i.p pendant 8 jours de VCR. Les souris témoins ont reçu un volume équivalent de solution saline suivant le même mode et la même chronologie d'injection. Le proglumide (30 mg/kg/j, i.p., Sigma) ou le Ly225910 (1 mg/kg/j, i.p., Abcam) ont été administrés un jour avant la première administration de VCR, puis chaque jour pendant les 8 jours suivants. Les souris véhicules ont reçu des injections d'un volume équivalent de véhicule (DMSO à 2 %) (Figure 19).

Les tests fonctionnels ont été réalisés aux jours 1, 3, 5 et 7 dans tous les groupes. L'immunohistochimie et les analyses morphologiques ont été réalisées sur des tissus prélevés à J7.

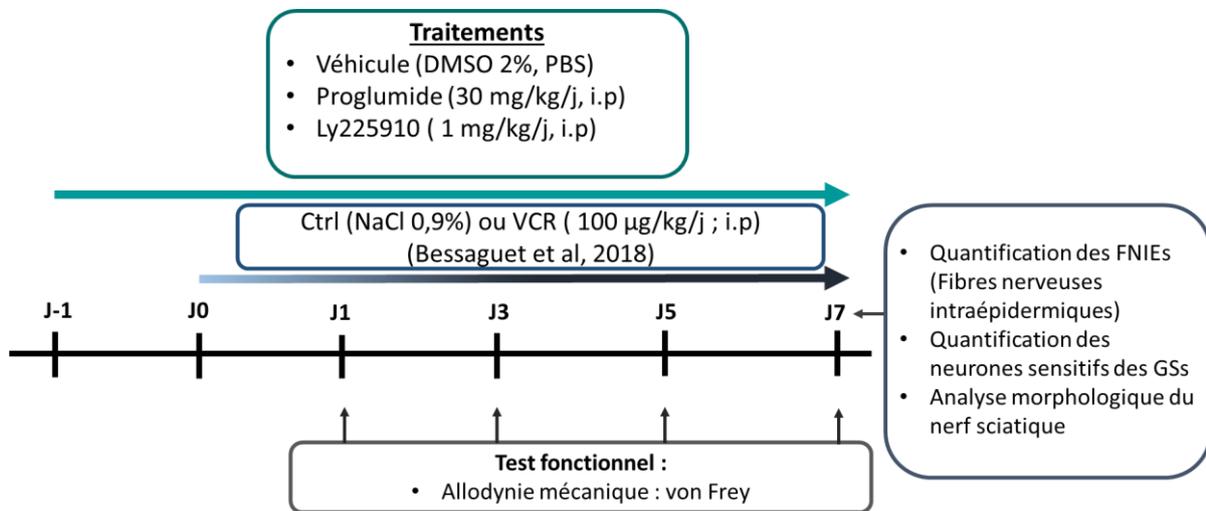


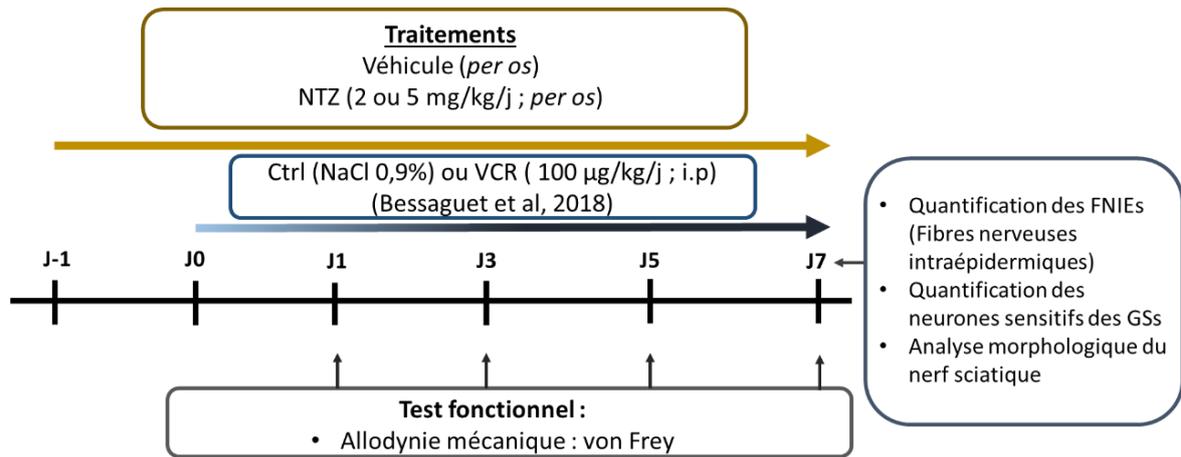
Figure 19. Chronogramme du protocole 2 : Effet du blocage CCK2R par le proglumide et le Ly225910 sur la neuropathie périphérique induite par la VCR.

CCK2R : Récepteur à la cholécystokinine de type 2, Ctrl : Contrôle, FNIE : Fibres nerveuses intraépidermiques, GS : Ganglions spinaux, i.p : Intrapéritonéale

### III.1.3.3. Protocole 3. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par la vincristine.

La neuropathie périphérique a été induite par une injection quotidienne en i.p pendant 8 jours de VCR. Les souris témoins ont reçu un volume équivalent de solution saline suivant le même mode et la même chronologie d'injection. Le NTZ à 2 mg/kg/j ou à 5 mg/kg/j a été administré *per os* un jour avant la première administration de VCR, puis chaque jour suivant pendant 8 jours. Les souris véhicules ont reçu des injections d'un volume équivalent de véhicule (10 % DMSO, 50 % PEG, 40 % NaCl 0.9 %) (Figure 20).

Les tests fonctionnels ont été réalisés aux jours 1, 3, 5 et 7 dans tous les groupes. L'immunohistochimie et les analyses morphologiques ont été réalisées sur des tissus prélevés à J7.



Véhicule : 10 % DMSO, 50 % PEG 300, 40% NaCl 0,9%

Figure 20. Chronogramme du protocole 3. Effet du Nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par la VCR.

CCK2R : Récepteur à la cholécystokinine de type 2, Ctrl : Contrôle, FNIE : Fibres nerveuses intraépidermiques, GS : Ganglions spinaux, i.p : Intrapéritonéale, NTZ : nétazépide, VCR : Vincristine

#### **III.1.3.4. Protocole 4. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par le paclitaxel.**

La neuropathie périphérique a été induite par quatre injections i.p de PTX, tous les 2 jours pendant 4 jours. Un volume équivalent de solution saline a été administré aux souris contrôles (Ctrl) en i.p Le NTZ à 2 mg/kg/j ou à 5 mg/kg/j ont été administré *per os* un jour avant la première administration de VCR, puis chaque jour suivant pendant 8 jours. Les souris véhicules ont reçu des injections d'un volume équivalent de véhicule (10 % DMSO, 50 % PEG, 40 % NaCl 0.9 %) (Figure 21).

Les tests fonctionnels ont été réalisés à différents temps. JR correspond au jour de référence pour évaluer la sensibilité de chaque animal avant traitement, J0 correspond à la première injection de PTX puis à J7, J9, et J13 après la première injection de PTX. L'immunohistochimie et les analyses morphologiques ont été réalisées sur des tissus prélevés neuf jours après la dernière injection de PTX (J15).

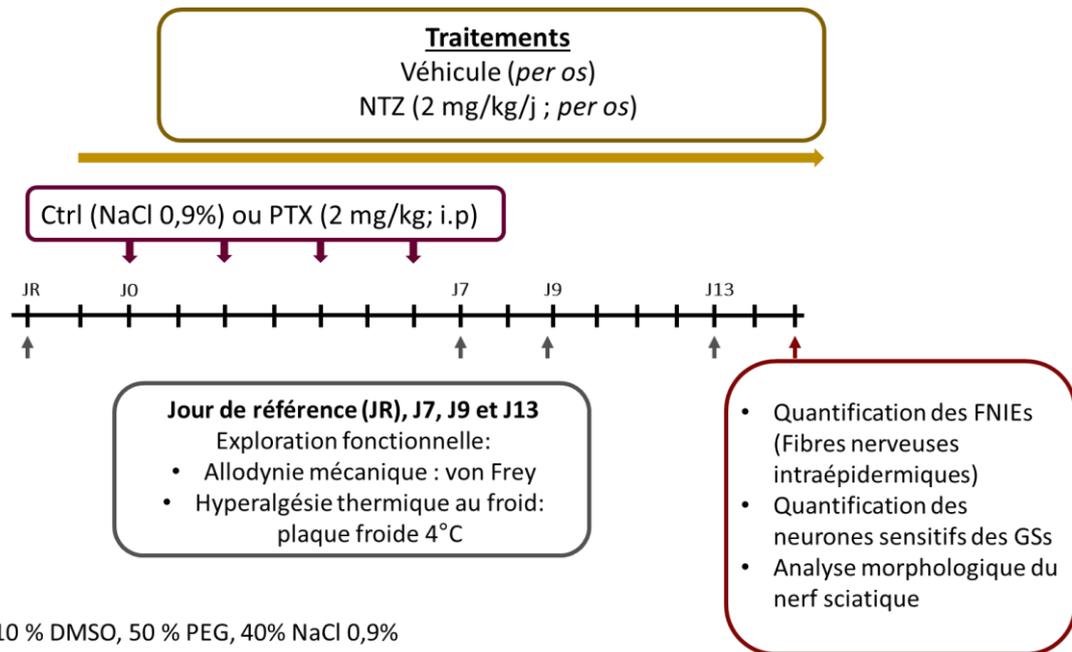


Figure 21. Chronogramme du protocole 4. Effet du nétazépide sur la neuropathie périphérique induite par le PTX.

CCK2R : Récepteur à la cholécystokinine de type 2, Ctrl : Contrôle, FNIE : Fibres nerveuses intraépidermiques, GS : Ganglions spinaux, i.p : Intrapéritonéale, NTZ : nétazépide, PTX : Paclitaxel

### III.1.4. Test Comportementaux

#### III.1.4.1. Test du von Frey

Le test du von Frey permet d'évaluer le seuil de sensibilité tactile, en utilisant des mono-filaments en nylon (Bioseb). Ces mono-filaments permettent d'appliquer des pressions plus ou moins fortes sur les mécanorécepteurs de la peau. Ces pressions sont définies pour chaque filament de diamètre et de force croissante. Ce test représente le test de référence, chez les rongeurs, pour évaluer les altérations du seuil de sensibilité tactile (diminution, augmentation), et notamment pour évaluer l'allodynie mécanique. Le seuil de sensibilité sera évalué par le retrait de la patte de l'animal, ce qui correspond à un réflexe d'échappement au stimulus nociceptif.

Avant le début des expérimentations, les animaux sont préalablement acclimatés dans la salle d'expérimentation pendant 30 minutes. Une session de tests représente 3 essais successifs espacés de 5 min. La moyenne de ces 3 essais est alors calculée et donne le seuil de sensibilité tactile de l'animal. La pression mécanique induite par les différents filaments va de 0,008 à 2 g.

Pour ce test, les souris sont placées dans des cages posées sur une grille. Cette grille est confortable pour l'animal et permet de visualiser facilement leurs pattes. Après une

période d'acclimatation sur la grille, le filament de taille intermédiaire (0,4 g) est appliqué sur la patte arrière gauche. Si l'animal ne répond pas, un filament de force plus élevée est alors testé jusqu'à l'obtention d'un comportement de retrait. En revanche, si l'animal répond à ce stimulus, le filament de force plus faible est testé jusqu'à la disparition du mouvement de retrait, le dernier filament pour lequel l'animal a réagi est alors pris en compte. Cette méthode permet de diminuer le nombre de stimulations et de limiter les phénomènes d'habituation.

#### **III.1.4.2. Plaque chaude**

Le test de la plaque chauffante permet de mesurer l'intégrité des fibres nociceptives thermiques A $\delta$  et C. Les animaux étaient préalablement acclimatés dans la salle d'expérimentation pendant 15 minutes avant le début des expérimentations. Les souris ont été placées sur la plaque chauffante (Bioseb) réglée sur une température de 52°C. Une boîte en plexiglas délimite le contour de la plaque afin d'empêcher l'animal de s'échapper. Les animaux présentant des comportements de retrait (léchage, tremblement, saut...) étaient rapidement retirés de la plaque et la latence d'apparition était enregistrée en seconde. Dans le cas où les animaux ne montraient pas de tels comportements, ces derniers étaient retirés de la plaque au bout de 30 secondes (cut-off) afin de limiter tout dommage tissulaire. Une session de test consistait en 3 essais successifs espacés de 5 minutes chacun. La moyenne des 3 essais était calculée et correspondait à la latence de l'animal pour cette même session.

#### **III.1.5. Analyse histologique**

##### **III.1.5.1. Prélèvements**

Les souris sont profondément anesthésiées à l'aide d'isoflurane puis mises à mort par dislocation cervicale. Le prélèvement des GS nécessite la dissection de la colonne vertébrale. Les ganglions de niveaux L4-L5 ont été rapidement prélevés. La peau des pattes arrière a été prélevée à l'aide d'un punch à biopsie, de 3 mm de diamètre. Les GS et la peau des pattes sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (PFA 4 %, Sigma) pendant 12 h à 4°C puis rincés 3 fois au PBS, et finalement placés dans une solution de sucrose 30 % toute la nuit à 4°C (cryoprotection). Les nerfs sciatiques sont également prélevés, 1 nerf sciatique par souris a également été fixé en PFA 4%, les autres nerfs ont été fixés dans du glutaraldéhyde 2,5 % (Gluta 2,5 %, Sigma) pendant 24 h à 4°C.

### ***III.1.5.2. Etude de l'innervation cutanée par immunofluorescence***

Après l'étape de fixation et de cryoprotection, les biopsies de peau ont été incluses dans un milieu d'enrobage de manière à obtenir des coupes transversales de peau. Ce milieu d'enrobage est ensuite congelé en utilisant de l'isopentane refroidi à l'azote liquide, puis conservé à -80%. Des coupes de 20 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et placées sur des lames Superfrost®. Ces coupes ont servi au comptage des FNIE, grâce à un marquage au PGP9.5.

Pour réaliser l'immunomarquage, les coupes ont d'abord été saturées avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, Bovine Serum Albumine, Sigma) à 10 %. Cette étape est nécessaire pour saturer les sites antigéniques et ainsi limiter une fixation de l'anticorps de manière aspécifique afin de réduire le bruit de fond. L'anticorps primaire est ensuite dilué dans la solution de saturation additionnée de triton X-100 à 0,3 % (TX-100, Sigma), puis déposé sur les coupes pour une nuit d'incubation à température ambiante. Les membranes sont perméabilisées grâce à l'action du TX-100, permettant à l'anticorps de pénétrer plus facilement dans le tissu. Après l'incubation de l'anticorps primaire, une série de 3 lavages de 5 min chacun (sans agitation) est réalisée avec du PBS. L'anticorps secondaire est dilué dans une solution à 1 % BSA puis à son tour incubé pendant 2 h à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage pour la fluorescence. Les coupes de peau ont été observées avec un microscope à fluorescence Eclipse 50i (Nikon Instruments). Les FNIE immunopositives ont été comptées au grossissement 400x selon les règles de comptage établies par (Lauria et al., 2005). La longueur de la jonction dermo-épidermique a été déterminée à l'aide du logiciel NIS-Element BR2.30 (Nikon, Japon), au grossissement 40x, et est définie comme la longueur de l'épiderme (en mm). La densité a été exprimée en nombre de fibres/mm.

### ***III.1.5.3. Etude des neurones des GS et des nerfs sciatiques par immunofluorescence***

Les GS et les nerfs sciatiques ont été inclus dans un milieu d'enrobage, après les étapes de fixation et de cryoprotection. Les GS et les nerfs sciatiques inclus ont été congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide puis conservés à -80°C. Des coupes de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat, puis déposées sur des lames Superfrost®. Des immunomarquages ont été réalisés sur les GS pour le

comptage des neurones totaux (PGP9.5), et sur les GS et nerf sciatiques pour localiser le type cellulaire exprimant le récepteur CCK2R (co-marquage CCK2R/S100 ou CCK2R/MBP). Les anticorps utilisés et leur dilution sont décrits dans les tableaux 4 et 5 suivants :

Tableau 4. Anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence

Ac Primaire	Espèce	Dilution	Fournisseur
Anti-PGP9.5	Lapin	1/50	Abcam
Anti-CCK2R	Chèvre	1/200	Abcam
Anti-S100	Lapin	1/500	Dako
Anti-MBP	mouse	1/500	biolegend

Tableau 5. Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence

Ac Secondaire	Espèce	Dilution	Fluorochrome	Fournisseur
Anti-IG de lapin	Ane	1/50	Cy3(rouge)	Jackson Immunoresearch
Anti-IG de chèvre	Ane	1/1000	AF594(rouge)	Life Technologies
Anti-IG de lapin	Ane	1/1000	AF488(vert)	Jackson Immunoresearch
Anti-IG de mouse	Ane	1/1000	AF488(vert)	Life Technologies

Une saturation des sites antigéniques a été réalisée par une incubation de 30 min dans une solution de BSA à 10 % (marquage comptage neurones totaux) ou à 2 % de BSA et 2 % de sérum d'âne dans du PBS. Les anticorps primaires (PGP9.5 ou CCK2R/PGP9.5), dilués dans la solution de saturation, ont été disposés sur les coupes de tissus durant une nuit à 4°C. Après 3 rinçages au PBS, les coupes étaient montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage spécifique pour la fluorescence.

Pour le comptage des neurones totaux positifs pour PGP9.5, au moins 3 coupes par GS ont été photographiées au grossissement 200x avec un microscope à fluorescence Eclipse 50i (Nikon Instruments). Sur chaque photographie, les neurones totaux positifs pour PGP9.5 ont été comptés. L'aire de la zone occupée par les neurones a été délimitée puis calculée à l'aide du logiciel NIS-Element BR2.30 (Nikon, Japon). La densité en neurones totaux a été exprimée en nombre de neurones PGP9.5(+)/mm<sup>2</sup>.

Pour la localisation des récepteurs CCK2R, les GS et les nerfs sciatiques ont été photographiés au grossissement 200x avec un microscope à fluorescence Eclipse 50i (Nikon Instruments). Sur chaque photo, la colocalisation des 2 marqueurs a été recherchée, afin d'identifier le ou les types cellulaires exprimant CCK2R.

#### ***III.1.5.4. Etude de la morphologie des fibres nerveuses du nerf sciatique par microscopie électronique***

Six nerfs sciatiques par groupe ont été étudiés. Après fixation au Gluta 2,5 %, les nerfs sciatiques ont été rincés 3 fois au Tampon Sorensen (TS) puis fixés à nouveau dans une solution d'acide osmique à 2 % dilué dans du TS durant 30 min à température ambiante. Après 2 rinçages au TS, les prélèvements ont été déshydratés dans une suite de bains de différents degrés d'alcool, avant d'être inclus dans une résine d'Epon 812 (Euromedex). Des coupes semi-fines de 1 µm d'épaisseur colorées au bleu de toluidine ont été examinées au microscope optique afin de délimiter les zones d'intérêt pour les coupes ultra-fines (9 à 10 nm). Ces dernières ont été colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb puis examinées au microscope électronique (Jeol 1011). Trois photographies au grossissement 3000x et 75000x ont été effectuées. Le grossissement 75000x a été réalisé pour une analyse précise de la morphologie des fibres amyéliniques et myélinisées. Quant au grossissement 3000x, il a été utilisé afin de réaliser différents comptages. Sur les trois photos de chaque animal, le nombre total de fibres myélinisées a été rapporté à l'aire considérée. La densité en fibres myélinisées totale a été exprimée en nombre de fibres myélinisées/mm<sup>2</sup>. Une analyse de l'aire de l'axone des fibres myélinisées a été réalisée pour 10 fibres prises au hasard sur chaque photo.

#### **III.1.6. Etude de l'expression génique**

##### ***III.1.6.1. Prélèvement et extraction ARN***

Après anesthésie par inhalation d'isoflurane, les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Six GS ont été prélevés sur chaque souris. Les ganglions ont été conservés dans du RNAlater® (Qiagen) pour stabiliser les ARNs, puis broyés (5500 g, 2x40 secondes, Precellys). Le lysat cellulaire ainsi obtenu a été utilisé pour extraire l'ARN à l'aide du kit ARNeasy Mini (Qiagen). La quantité d'ARN a été dosée au Nanodrop™ (ThermoFisher Scientific). Le contrôle de la qualité et la quantité des ARNs a été effectué à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent). La qualité des ARNs est évaluée grâce au RIN (RNA integrity number), qui est le rapport ARNr 28S/18S. Ce rapport doit idéalement être égal ou supérieur à 7.

### III.1.6.2. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique a été effectuée à l'aide de la puce SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 (Agilent). Pour chaque échantillon, 600 ng d'ADNc marqué à la Cyanine 3 ont été déposés sur la puce. L'hybridation de l'ADNc sur les oligonucléotides de la puce a été réalisée dans un four d'hybridation pendant 17 h à 65°C. Après plusieurs lavages post-hybridation, les intensités de fluorescence au niveau de chaque puce ont été mesurées à l'aide du scanner le SureScan Dx MicroArray (Agilent).

Les données brutes ainsi obtenues, ont été analysées à l'aide du logiciel Genespring® (Agilent). Les rapports d'expression ou Fold Change (FC) et la valeur p ont été obtenus après normalisation des données et une comparaison des échantillons VCR par rapport aux échantillons Ctrl à l'aide d'un test t de Student. Seuls les gènes ayant un FC supérieur à 1,5 et une valeur p inférieure à 0,01 ont été analysés. La base de donnée DAVID, (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery <https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), a été utilisée pour analyser les données.

### III.1.6.3. Validation par RT-PCRq

Les résultats de la puce à expression ont été validés par transcription inverse (ou rétro transcription, RT) et PCR quantitative (PCRq). Dans un premier temps, les ARNm ont été transcrits en ADNc grâce au kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), puis une PCR en temps réel a été réalisée suivant le protocole RotorGene SYBRgreen PCRq (Qiagen). Le niveau d'expression relative a été calculé par la technique des  $\Delta C_t$  en normalisant par rapport aux gènes de référence *Gusb* et *Hprt*. Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 6.

Tableau 6. Liste des amorces utilisées en PCRq

Genes (size)	Amorces(5'-3')	N°d'accension
<b>Mouse <i>Cck2r</i></b>	Design by Qiagen (QuantiTect Primer assay)	NM_007627
<b>Mouse <i>hprt</i> (185 bp)</b>	F: TGATCAGTCAACGGGGGACAT R: AGGTCCTTTTCACCAGCAAGC	NM_013556.2
<b>Mouse <i>gusb</i> (199 bp)</b>	F: CAACGAGTCACTTCGGCACC R: GGCGTTGCTCACAAAGGTCA	NM_010368.2

## III.2. Effet du ramipril dans la prévention des neuropathies induites par le paclitaxel

### Article publié

“Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy”

Bouchenaki, H.\*; **Bernard, A.\***; Bessaguet, F.; Frachet, S.; Richard, L.; Sturtz, F.; Magy, L.; Bourthoumieu, S.; Demiot, C.; Danigo, A. \* Les deux auteurs ont contribué à parts égales à ce travail.

*Pharmaceutics* 2022, 14, 848

### III.2.1. Objectifs

L'effet neuroprotecteur du ramipril a précédemment été démontré dans des modèles de CCI chez le rat, de diabète induit par la streptozotocine et de syndrome douloureux aigu induit par l'OXP chez la souris (Bouchenaki et al., 2021; Elias et al., 2008; Kaur et al., 2015). A notre connaissance, l'effet d'un traitement préventif par ramipril sur la survenue de la NPIP n'a pas été exploré à ce jour. De plus, nous avons démontré que l'effet neuroprotecteur du candésartan, un inhibiteur d'AT1R, sur la neuropathie périphérique induite par la VCR était médié par le récepteur AT2 et que l'activation directe d'AT2R par un agoniste spécifique, le C21, était également neuroprotecteur (Bessaguet et al., 2018). Le rôle protecteur de l'AT2R dans les systèmes nerveux central et périphérique est bien connu et AT2R est l'un des deux principaux récepteurs du SRA, exprimé, entre autre, dans le système nerveux sensitif (Danigo et al., 2021) . Ainsi, après avoir caractérisé le modèle de NPIP, l'effet du ramipril sur la survenue de la NPIP, ainsi que l'implication d'AT2R dans cet effet, ont été explorés.

### III.2.2. Résultats principaux

Le protocole d'injection du PTX choisi chez la souris Swiss induit une allodynie tactile, sans altération de la coordination motrice ou de la sensibilité thermique. Cette allodynie tactile est accompagnée d'une diminution de la densité en fibres myélinisées et non myélinisées dans le nerf sciatique, d'une perte de densité des FNIE dans l'épiderme et d'une diminution de la densité neuronale dans les GS. Nous avons obtenu un modèle de NPIP avec une neurodégénérescence.

L'utilisation du ramipril a totalement prévenu le développement de l'allodynie tactile induite par le PTX et limité l'intensité des altérations morphologiques induite par le PTX. Néanmoins, cet effet analgésique du ramipril contre l'allodynie tactile était perdu lorsqu'il

était administré chez des souris AT2R déficientes ou en combinaison avec un antagoniste d'AT2R, le PD123319. Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que l'effet bénéfique du ramipril sur l'allodynie tactile induite par le PTX pourrait être médié par la stimulation indirecte d'AT2R.

## **Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse MODEL of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy**

**Hichem Bouchenaki <sup>1,†</sup> , Amandine Bernard <sup>1,†</sup> , Flavien Bessaguet <sup>2</sup> , Simon Frachet <sup>1,3</sup> , Laurence Richard <sup>1,3</sup> , Franck Sturtz <sup>1,4</sup> , Laurent Magy <sup>1,3</sup> , Sylvie Bourthoumieu <sup>1,5</sup> , Claire Demiot <sup>1</sup> , and Aurore Danigo <sup>1</sup>**

**1** UR 20218-NeurIT, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, 87025 Limoges, France;

**2** INSERM 1083 CNRS UMR 6015 Mitovasc Laboratory, CarMe Team, University of Angers,

49045 Angers, France; flavien.bessaguet@univ-angers.fr

**3** Department of Neurology, Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France

**4** Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France

**5** Department of Cytogenetic, Medical Genetic and Reproduction Biology, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France

**†** These authors contributed equally to this work.

## Article

# Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse MODEL of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy

Hichem Bouchenaki <sup>1,†</sup>, Amandine Bernard <sup>1,†</sup>, Flavien Bessaguet <sup>2</sup>, Simon Frachet <sup>1,3</sup>, Laurence Richard <sup>1,3</sup>, Franck Sturtz <sup>1,4</sup>, Laurent Magy <sup>1,3</sup>, Sylvie Bourthoumieu <sup>1,5</sup>, Claire Demiot <sup>1,\*</sup> and Aurore Danigo <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> UR 20218-NeurIT, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, 87025 Limoges, France; hichem.bouchenaki@gmail.com (H.B.); amandine.bernard@unilim.fr (A.B.); simon.frachet@unilim.fr (S.F.); laurence.richard@unilim.fr (L.R.); franck.sturtz@unilim.fr (F.S.); laurent.magy@unilim.fr (L.M.); sylvie.bourthoumieu@unilim.fr (S.B.); aurore.danigo@unilim.fr (A.D.)
- <sup>2</sup> INSERM 1083 CNRS UMR 6015 Mitovasc Laboratory, CarMe Team, University of Angers, 49045 Angers, France; flavien.bessaguet@univ-angers.fr
- <sup>3</sup> Department of Neurology, Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France
- <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France
- <sup>5</sup> Department of Cytogenetic, Medical Genetic and Reproduction Biology, University Hospital of Limoges, 87000 Limoges, France
- \* Correspondence: claire.demiot@unilim.fr; Tel.: +33-5554-35915
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Bouchenaki, H.; Bernard, A.; Bessaguet, F.; Frachet, S.; Richard, L.; Sturtz, F.; Magy, L.; Bourthoumieu, S.; Demiot, C.; Danigo, A. Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse MODEL of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 848. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040848>

Academic Editor: Elena V. Batrakova

Received: 28 February 2022

Accepted: 11 April 2022

Published: 12 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Paclitaxel (PTX)-induced peripheral neuropathy (PIP) induces numerous symptoms affecting patient quality of life, leading to decreased doses or even to cessation of anticancer therapy. Previous studies have reported that a widely used drug, ramipril, improves neuroprotection in several rodent models of peripheral neuropathy. The protective role of the angiotensin II type 2 receptor (AT2) in the central and peripheral nervous systems is well-established. Here, we evaluate the effects of ramipril in the prevention of PIP and the involvement of AT2 in this effect. Paclitaxel was administered in wild type or AT2-deficient mice on alternate days for 8 days, at a cumulative dose of 8 mg/kg (2 mg/kg per injection). Ramipril, PD123319 (an AT2 antagonist), or a combination of both were administered one day before PTX administration, and daily for the next twenty days. PTX-administered mice developed mechanical allodynia and showed a loss of sensory nerve fibers. Ramipril prevented the functional and morphological alterations in PTX mice. The preventive effect of ramipril against tactile allodynia was completely absent in AT2-deficient mice and was counteracted by PD123319 administration in wild type mice. Our work highlights the potential of ramipril as a novel preventive treatment for PIP, and points to the involvement of AT2 in the neuroprotective role of ramipril in PIP.

**Keywords:** paclitaxel-induced peripheral neuropathy; angiotensin converting enzyme inhibitor; Ramipril; neuropathic pain; mouse model

## 1. Introduction

The occurrence of peripheral neuropathy with residual neuropathic pain is a major dose-limiting adverse effect of many commonly used chemotherapeutic agents and greatly affects patient quality of life. The only currently recognized prophylactic measure for chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is monitoring for pre-existing neuropathies and then the early detection of clinical symptoms of neuropathy in subjects undergoing neurotoxic chemotherapy treatment. The diagnosis of CIPN may justify either dose reduction or discontinuation, with an impact on cancer control and survival. Moreover, CIPN-associated persistent pain is related to the onset of several comorbidities including anxiety, depression, and insomnia, which have severe health consequences [1]. Thus, the prevention of CIPN and its improvement by an appropriate therapeutic approach

is a key priority to avoid compromising anticancer treatments through dose reduction or cessation, as well as to improve patient quality of life. Paclitaxel (PTX) is the first member of the taxane family, one of the main neurotoxic classes of anticancer drugs. Paclitaxel is used to treat several types of cancer, including breast cancer, lung cancer and ovarian cancer. Among the taxane family, PTX shows the highest incidence of peripheral neuropathy [2], and induces the most severe CIPN symptoms [3]. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PIPNe) is responsible for predominantly painful sensory symptoms, including paresthesia or dysesthesia, mainly tactile allodynia, and shows a length-dependent pattern.

Considerable preclinical data has shown that RAS inhibitors, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and angiotensin receptor blockers (ARB), exert a neuroprotective effect in various murine models of peripheral neuropathy [4,5], such as traumatic [6–8], diabetic [9–11] and toxin-induced neuropathies [12]. A beneficial effect of ramipril, an ACEi, was demonstrated in animal models of chronic constriction injury, streptozotocin-induced diabetes, and oxaliplatin-induced acute pain syndrome [6,11,13]. Recently, Kim et al. reported that preventive or curative treatment with losartan, an ARB, delayed the onset of mechanical allodynia induced by PTX in rats [14]. We have previously demonstrated that the neuroprotective effect of candesartan, another ARB, in vincristine-induced peripheral neuropathy was mediated by the angiotensin II type 2 receptor (AT2) [15]. The AT2 receptor is one of the two main G-protein-coupled receptor subtypes of the RAS, along with AT1, and is expressed in numerous cells and tissues, notably in the sensory nervous system [16]. The protective role of AT2 in the central and peripheral nervous systems is well known [4]. To our knowledge, the effect of preventive treatment with ramipril on PIPNe has not been explored to date. In this study, we aimed to investigate the effect of ramipril in a mouse model of PIPNe and the potential role of AT2 in this effect.

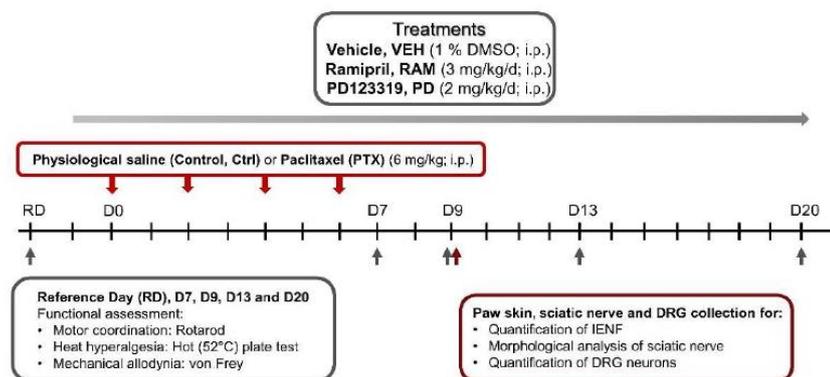
## 2. Materials and Methods

This study conformed with the guidelines for the ethical care of experimental animals of the European Community (2010/63/EU) and was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (number 11280#2017091510483336). Experiments are reported in compliance with the ARRIVE guidelines [17]. All effort was made to limit suffering and minimize the number of animals used in the following experiments.

### 2.1. Treatments

Paclitaxel-induced peripheral neuropathy was induced by four intraperitoneal (i.p.) injections of PTX (1 injection every other day) (8 mg/kg/2 days; Hospira, France). An equivalent volume of PTX diluent was administered to control mice (physiological saline solution, i.p.).

Treatments with ramipril (3 mg/kg/day, i.p.; Sigma, Lezennes, France) and/or PD123319 (2 mg/kg/day, i.p.; Sigma, Lezennes, France) began one day ahead of the first PTX administration and were sustained daily for the next 20 days (Figure 1). This regimen has already been shown to have a neuroprotective effect in rodent models of traumatic peripheral neuropathy and oxaliplatin-induced acute pain syndrome [6,13]. Ramipril was diluted in a final solution of 1% dimethyl sulfoxide (1% DMSO) in physiological saline (0.9% NaCl). Vehicle mice received injections of an equivalent volume of 1% DMSO used for ramipril injections.



**Figure 1.** Study design. D: day, DMSO: dimethylsulfoxide, DRG: dorsal root ganglion, IENF: intraepidermal nerve fibers, i.p.: intraperitoneal.

## 2.2. Animals

Male and female Swiss mice (6–7 weeks old, 25–30 g) from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were housed in plastic cages and maintained on a 12-h light/dark cycle with food and water available ad libitum (BISCEM-animal care and facility center).

Mice were randomized into four groups: vehicle (VEH), ramipril (RAM), PD123319 (PD) and ramipril combined with PD123319 (RAM+PD). Mice from each group were then randomly assigned to two subgroups: control (Ctrl) or paclitaxel (PTX), forming a total of eight groups of mice:

Ctrl-VEH  
Ctrl-RAM  
Ctrl-PD  
Ctrl-RAM+PD  
PTX-VEH  
PTX-RAM  
PTX-PD  
PTX-RAM+PD

Mice were assigned to each group by using an online randomization tool (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm> accessed on 25 February 2019). All behavioral tests were assessed by the same investigator, blinded to the treatment (VEH, RAM, or PD) and the condition (PTX or Ctrl).

Functional tests were performed on the reference day (RD) to evaluate the baseline for each animal, on day 0 (D0) corresponding to the first PTX injection, then on D7, D9, D13 and D20 following the first PTX injection. Immunohistochemistry and morphological analyses were assessed on tissues removed three days following the final PTX injection, corresponding to the highest sensory impairment (Figure 1).

To further elucidate the neuroprotective role of AT2, the same protocol was also performed using 5–6-week-old male and female C57BL6 AT2-deficient (AT2KO) mice. The AT2KO mice were randomly assigned to four groups: AT2KO-Ctrl-VEH, AT2KO-PTX-VEH, AT2KO-Ctrl-RAM and AT2KO-PTX-RAM.

## 2.3. Behavioral Tests

### 2.3.1. Motor Coordination

The rotarod test (Bioseb, Vitrolles, France) was performed to assess motor coordination. Mice were trained to walk against the motion of a rotating rod at a speed of 4 rpm three days prior to the start of the experiment (RD). On test days, mice were placed on the rotarod and subjected to a gradual 1 rpm/second acceleration for 30 s, following which the speed was maintained constant. The holding time (in seconds) was recorded. The cut-off time

was established at 60 s. The mean holding time was calculated after each test session, which consisted of three trials separated by 5 min.

### 2.3.2. Heat Hyperalgesia

The hot-plate test (Bioseb, Vitrolles, France) was used to evaluate thermal nociception [6]. Mice were placed on a 52 °C hotplate. The latency (s) time before the first withdrawal criterion including shaking, licking, or jumping was recorded. The cut-off was set at 30 s to avoid potential tissue damage. Mean latency was expressed as the threshold of an individual animal to thermal stimulation. Each test session consisted of three recordings separated by 5 min.

### 2.3.3. Tactile Allodynia

Von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) were used to test tactile allodynia [9]. Mice were kept in a plastic cage with a wire mesh floor given accessibility to their paws to be examined. To avoid visual stimulation, the plastic cage was covered with an opaque cup. The mid-plantar left hind paw was examined. A modified version of the simplified up-down approach was used to determine the mechanical threshold [8]. A test round started with filament #6 (0.40 g) and progressed to higher or lower filaments values depending on the animal's response. For each experimental condition, each animal went through three test rounds for each paw. The mechanical threshold was expressed as a percentage compared to the baseline measurement (%).

### 2.4. Immunohistochemistry of Footpad Skin and Dorsal Root Ganglia Neurons

To assess sensory innervation, animals ( $n = 6$ ) were sedated by isoflurane then sacrificed by cervical dislocation. The footpads were then removed using punch biopsy (diameter 3 mm), fixed overnight in 4% paraformaldehyde solution (4% PFA), then cryoprotected (in 30% sucrose) and frozen at  $-20$  °C. Sections of 20  $\mu\text{m}$  were cut on a cryostat and incubated overnight at room temperature with the primary antibody to protein gene product 9.5 (PGP9.5, 1:50, Abcam, Paris, France). Sections were then incubated with a donkey anti-rabbit AF594-conjugated secondary antibody (diluted 1:500; Life Technologies, Saint-Aubin, France) for 2 h at room temperature. Epidermal nerve fibers were counted by blinded observers at 400 $\times$  magnification (Eclipse 50i, Nikon Instruments, Nantes, France), according to established guidelines for human nerve counts [18]. Three slides per mouse were counted.

Four lumbar (L4 and L5) dorsal root ganglia (DRG) per mouse were collected to assess the DRG neuron density by counting neuron cellular bodies visualized by PGP9.5. Each DRG section (8  $\mu\text{m}$ ) was systematically photographed at 200 $\times$  under a fluorescence microscope (Eclipse 50i; Nikon Instruments, Nantes, France). Immunoreactive DRG neurons were counted by blinded observers and the area containing neurons measured using NIS-Elements BR2.30 software (Nikon, Tokyo, Japan). The density of neurons positive for PGP9.5 is expressed as neurons/ $\text{mm}^2$ . Three sections per DRG were counted.

### 2.5. Morphological Analysis of Sciatic Nerves

To assess the morphology and the quantification of myelinated and unmyelinated nerve fibers, sciatic nerves were dissected, fixed in 2.5% glutaraldehyde diluted in Sorensen buffer, then dehydrated, and embedded in Epon 812 resin (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Semi-thin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed by electron microscopy (JEM1400 Flash, Jeol, Peabody, MA, USA). A sufficient number of images to cover the entire section of the sciatic nerve was captured per animal ( $n = 3/\text{group}$ ) at 3000 $\times$  magnification and the number of myelinated fibers per  $\text{mm}^2$  counted to calculate the density.

## 2.6. Data Analysis

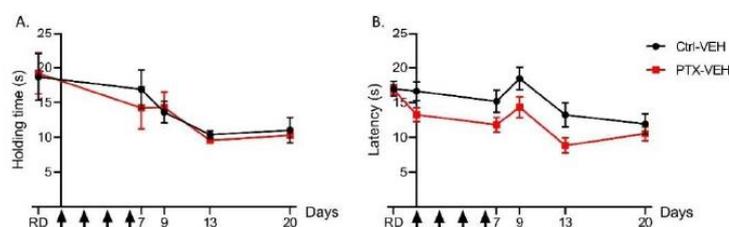
Data were analyzed using GraphPad Prism 8 software and expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). When statistical significance was identified by mixed-effects model statistical methods, individual comparisons were subsequently tested using Tukey's multiple comparison tests for longitudinal follow-up of functional tests. For morphological analyses, a nonparametric Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparisons test were used to evaluate differences among multiple groups. Significance levels was represented as follows: \*  $p$ -value  $< 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3. Results

### 3.1. Characterization of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy

#### 3.1.1. Paclitaxel Does Not Affect Motor Coordination and Heat Nociception

Motor coordination was evaluated using the rotarod test in the Ctrl-VEH and the PTX-VEH mice (Figure 2A). No significant difference in motor coordination between the PTX-VEH and the Ctrl-VEH mice was found at all test days.



**Figure 2.** Motor coordination and heat nociception were not affected by PTX in wild type mice. (A) Motor coordination was evaluated by the rotarod test. The holding time reflects the capacity of mice to coordinate their movements in order to stay on the rod during acceleration (from 4 rpm to 40 rpm, 30 s). (B) Thermal nociception was evaluated by the hot plate test at 52 °C.  $n = 8$  to 10. Black arrows indicate days on which PTX was administered. Ctrl: control, PTX: paclitaxel, RD: reference day, VEH: vehicle.

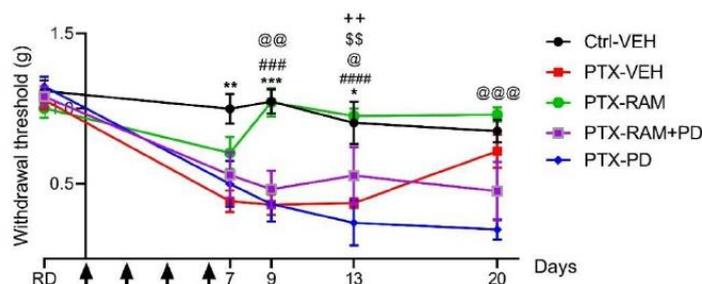
Heat nociception was evaluated in the PTX-VEH and the Ctrl-VEH mice using the hot plate test at 52 °C (Figure 2B). Though the data was suggestive of a light PTX-induced heat hyperalgesia, no significant difference in hot-plate withdrawal latencies was found between the PTX-VEH and the Ctrl-VEH mice.

#### 3.1.2. Paclitaxel Induces Tactile Allodynia

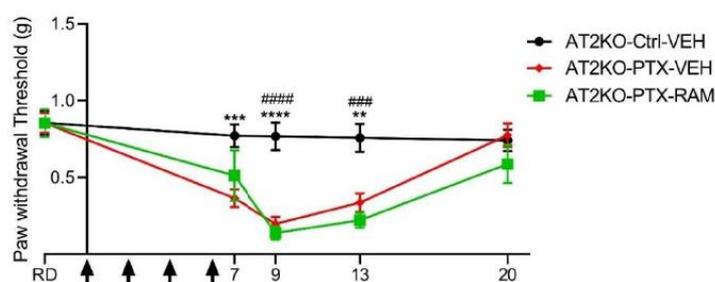
No difference in mechanical sensitivity was observed between any groups on the reference day. The PTX induced a significant tactile allodynia in wild type mice, manifested by lower mechanical thresholds from D7 to D13 (D7:  $p = 0.0018$ , D9:  $p = 0.0001$ , D13:  $p = 0.0378$ , PTX-VEH vs. Ctrl-VEH). The mechanical threshold returned to baseline 14 days after the last PTX injection (D20:  $p = 0.8471$ , PTX-VEH vs. Ctrl-VEH) (Figure 3).

Tactile sensitivity was also evaluated in C57BL6 AT2KO mice (Figure 4). We observed that the baseline tactile sensitivity of the C57BL6 AT2KO mice was lower than in the Swiss wild type mice. Strain-dependent differences in sensitivity have already been observed in mice [19], thus this discrepancy could be due to the different genetic backgrounds of wild type and AT2-deficient mice, being Swiss and C57BL6 strains, respectively.

However, PTX also induced a significant tactile allodynia in the AT2KO mice from D7 to D13, as was found in the wild type mice (D7:  $p = 0.0007$ , D9:  $p < 0.0001$ , D13:  $p = 0.0028$ , AT2KO-PTX-VEH vs. AT2KO-Ctrl-VEH). Similarly, the mechanical threshold returned to baseline 14 days after the last PTX injection in AT2-KO mice (D20:  $p = 0.9469$ , AT2KO-PTX-VEH vs. AT2KO-Ctrl-VEH) (Figure 4).



**Figure 3.** Ramipril prevents tactile allodynia induced by paclitaxel, this effect being counteracted by AT2 blockade, in wild type mice. Tactile sensitivity was evaluated by the von Frey filament test.  $n = 8$  to 10. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  Ctrl-VEH vs. PTX-VEH. ###  $p < 0.001$ , ####  $p < 0.0001$  PTX-VEH vs. PTX-RAM. @  $p < 0.05$ , @@  $p < 0.01$ , @@@  $p < 0.001$  Ctrl-VEH vs. PTX-PD, \$\$  $p < 0.01$  Ctrl-VEH vs. PTX-RAM+PD. ++  $p < 0.01$  PTX-RAM vs. PTX-RAM+PD. Black arrows indicate days on which PTX was administered. AT2: angiotensin II type 2 receptor, Ctrl: control, PD: PD123319 (AT2 antagonist), PTX: paclitaxel, RAM: ramipril, RD: reference day, VEH: vehicle.

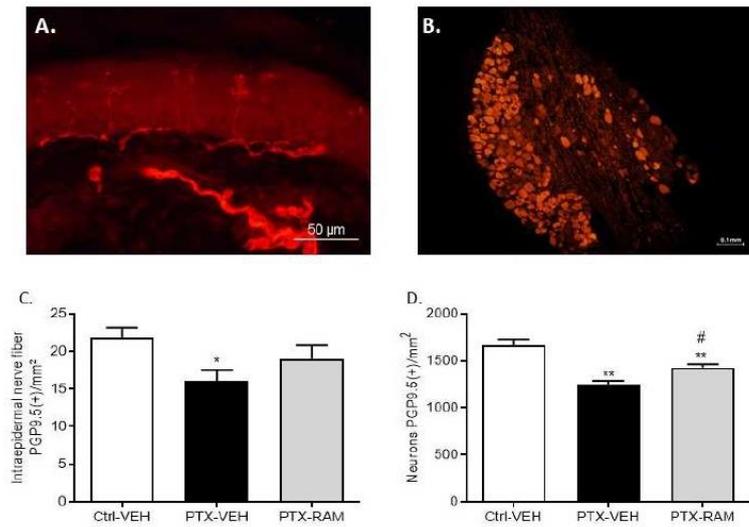


**Figure 4.** Ramipril did not show a neuroprotective effect in AT2-deficient (AT2KO) mice. Tactile sensitivity was evaluated by the von Frey filament test.  $n = 8$  to 10. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  AT2KO-Ctrl-VEH vs. AT2KO-PTX-VEH. ###  $p < 0.001$ , ####  $p < 0.0001$  AT2KO-PTX-VEH vs. AT2KO-PTX-RAM. Black arrows indicate days on which PTX was administered. Ctrl: control, PD: PD123319, PTX: paclitaxel, RAM: ramipril, RD: reference day, VEH: vehicle.

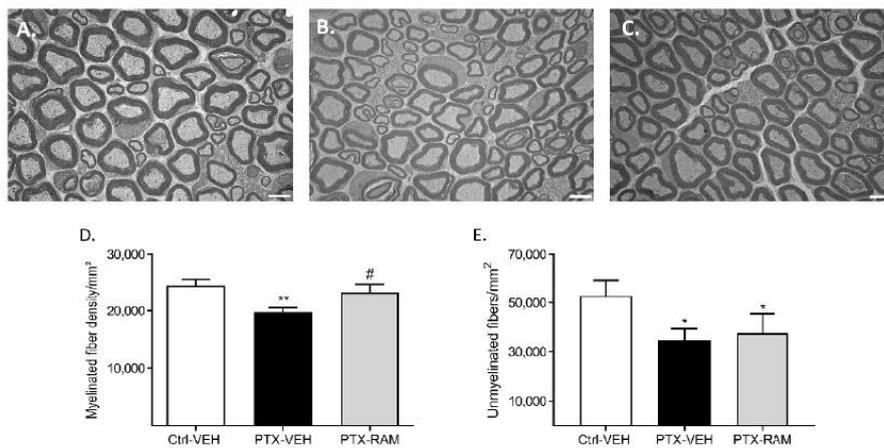
### 3.1.3. Paclitaxel Induces a Decrease in Sensory Neuron Terminals in the Epidermis, and a Decrease of Myelinated and Unmyelinated Nerve Fiber Densities in the Sciatic Nerve

Paw skin and DRG sections were stained with PGP9.5, a pan-neuronal marker, for evaluating densities of IENF and of DRG neurons, respectively (Figure 5A,B). A significant difference in IENF density, corresponding to sensory nerve endings, was found between the Ctrl-VEH and the PTX-VEH groups ( $p = 0.0210$ ) (Figure 5C). Similarly, the density of DRG neurons, corresponding to the cell body of sensory neurons, was significantly reduced by PTX administration ( $p = 0.0002$ , PTX-VEH vs. Ctrl-VEH) (Figure 5D).

Sciatic nerves were removed and processed for electron microscopy. Transverse sections were used to quantify densities of myelinated and unmyelinated fibers (Figure 6). Paclitaxel led to a significant decrease in myelinated nerve fiber density in the sciatic nerve ( $p = 0.0016$ , PTX-VEH vs. Ctrl-VEH) (Figure 6D). The density of unmyelinated nerve fibers was also significantly lower in the PTX-VEH group compared to the Ctrl-VEH group ( $p = 0.0106$ ) (Figure 6E).



**Figure 5.** Ramipril alleviates sensory neuron loss induced by PTX administration in DRG of wild type mice. Immunohistochemistry for PGP9.5 was performed on paw skin (A) and DRG sections (B). Intraepidermal nerve fiber density was assessed. Three sections of paw skin were examined per mouse.  $n = 6$  mice (C). Quantification of DRG neuron density was evaluated. Three DRG sections and three DRG per mice were counted.  $n = 6$  per group (D). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , vs. Ctrl-VEH. #  $p < 0.05$ , PTX-VEH vs. PTX-RAM. Ctrl: control, PTX: paclitaxel, RAM: ramipril, VEH: vehicle.



**Figure 6.** Ramipril alleviates PTX-induced loss of myelinated fibers in the sciatic nerve of wild type mice. (A–C) are representative images of sciatic nerve sections visualized by electron microscopy from the Ctrl-VEH, PTX-VEH and the PTX-RAM groups, respectively. (D) Quantification of myelinated fiber density. (E) Quantification of unmyelinated fiber density.  $n = 6$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , vs. Ctrl-VEH. #  $p < 0.05$ , PTX-VEH vs. PTX-RAM. Ctrl: control, PTX: paclitaxel, RAM: ramipril, VEH: vehicle.

### 3.2. Effect of Ramipril and Involvement of AT2 on PIPN

#### 3.2.1. Ramipril Accelerates Recovery of Normal Mechanical Sensitivity in Wild Type Mice and this Effect Was Counteracted by Blockade of AT2

Treatment with ramipril, PD123319 or with a combination of both did not affect the mechanical sensitivity in Ctrl mice (data not shown). Mice receiving PTX and ramipril did not develop mechanical allodynia. The sensitivity of the PTX-RAM mice was similar to the Ctrl-VEH mice and significantly lower than the PTX-VEH mice from D9 to D13 (D9:  $p = 0.0002$ , D13:  $p < 0.0001$ , PTX-VEH vs. PTX-RAM) (Figure 3). The beneficial effect of ramipril on PTX-induced mechanical allodynia was lost when combined with PD123319. Treatment of PTX-administered mice with a combination of ramipril and PD123319 did not prevent the onset of mechanical allodynia induced by PTX (D13:  $p = 0.0062$ , Ctrl-VEH vs. PTX-RAM+PD,  $p = 0.0054$ , PTX-RAM vs. PTX-RAM+PD). Mice in the PTX-RAM+PD group developed mechanical allodynia, which was similar to mice in the PTX-VEH group (D7:  $p = 0.7230$ , D9:  $p = 0.8819$ , D13:  $p = 0.7753$ , D20:  $p = 0.6468$ ). The blockade of AT2 by PD123319 did not influence the onset of PTX-induced mechanical allodynia (D9:  $p = 0.0019$ , D13:  $p = 0.0382$ , Ctrl-VEH vs. PTX-PD). Moreover, mechanical allodynia induced by PTX appeared to be maintained by PD123319 (D20:  $p = 0.0127$ , PTX-VEH vs. PTX-PD). In fact, the mechanical sensitivity of mice from the PTX-RAM+PD and PTX-PD groups did not return to baseline at D20 as was seen in the PTX-VEH group (D20:  $p = 0.0001$ , Ctrl-VEH vs. PTX-PD).

#### 3.2.2. Ramipril Accelerates Recovery of Normal Mechanical Sensitivity in Wild Type but Not in AT2KO Mice

Evaluation of mechanical sensitivity was also performed in AT2-deficient mice to confirm its involvement in the preventive effect of ramipril on the onset of PTX-induced mechanical allodynia (Figure 4). The AT2-deficient mice treated with PTX in combination with Ramipril developed a significant mechanical allodynia from D9 to D13, similar to that observed in AT2-deficient mice treated only with PTX (D9:  $p < 0.0001$ , D13:  $p = 0.0002$ , AT2KO-Ctrl-VEH vs. AT2KO-PTX-RAM). Thus, the preventive effect of ramipril was completely lost in AT2-deficient mice.

#### 3.2.3. Ramipril Ameliorates Morphological Alterations Induced by PTX

Ramipril did not affect IENF and DRG neuron densities in the control groups (data not shown). The decrease in IENF density caused by PTX was ameliorated by ramipril. Indeed, though no significant difference was observed between the PTX-VEH and the PTX-RAM groups ( $p = 0.1201$ ), it should be noted that there was also no longer a difference between the Ctrl-VEH and the PTX-RAM groups in IENF density ( $p = 0.1838$ ) (Figure 5A). Ramipril did not completely prevent but did significantly improve the decrease in DRG neuron density induced by PTX ( $p = 0.004$ , Ctrl-VEH vs. PTX-RAM;  $p = 0.0159$ , PTX-VEH vs. PTX-RAM) (Figure 5B).

Ramipril had no effect on the morphology of myelinated or unmyelinated nerve fibers in the sciatic nerves of the control groups (data not shown). No notable changes in unmyelinated fiber morphology were observed in the PTX-VEH mice compared to the Ctrl-VEH mice. Ramipril significantly prevented the decrease of myelinated fiber density that is induced by PTX ( $p = 0.022$ , PTX-RAM vs. PTX-VEH) (Figure 6A). In contrast, ramipril treatment had no effect on the loss of unmyelinated fibers induced by PTX ( $p = 0.0472$ , Ctrl-VEH vs. PTX-RAM;  $p = 0.4415$ , PTX-VEH vs. PTX-RAM) (Figure 6B).

## 4. Discussion

The main findings of this study are that: (1) the mouse model of PIPN which was used was characterized by mechanical allodynia, associated with a decrease in the IENF density, and degeneration of the DRG neurons and myelinated nerve fibers in the sciatic nerve, (2) ramipril prevented the onset of PTX-induced mechanical allodynia, and partially

ameliorated the alterations in morphology, and (3) the neuroprotective effect of ramipril on PTX-induced allodynia was mediated by AT<sub>2</sub>.

The experiments conducted on PTX- and VEH-treated mice showed that administration of PTX did not alter motor coordination, as assessed by the rotarod test. This suggests that PTX does not affect the peripheral nerves involved in motor function, i.e., large A $\alpha$ -type myelinated fibers. This observation is consistent with the fact that large myelinated sensory nerve fibers have also been reported to be the most susceptible to PIPN in human [20]. Previous reports have highlighted alterations of thermal sensitivity in PIPN rodent models including cold allodynia [21,22], heat hyperalgesia [23] and heat hypoalgesia [24–26]. In our experimental conditions, we did not notice any alterations in heat nociception induced by PTX administration. Differences in doses, formulations and injection schedule of chemotherapy drugs, and the use of different mouse strains as well as the varying endpoints measured by behavioral tests, can lead to considerable differences in outcomes between two similar models [19,27]. In this regard, and to improve translational research in the case of CIPN, we previously discussed the urgent need to standardize the methods used to evaluate pain in animal models [28]. Lastly, PTX administration did lead to the onset of mechanical allodynia as evidenced by results of the von Frey test.

In the various murine models of PIPN that have been previously developed, mechanical hypersensitivities are the most common observed and predominant functional alterations [19,21,22,24,29,30]. Accumulation of PTX in DRG neurons has been demonstrated in several rodent models of PIPN, causing a distal-to-proximal degeneration of peripheral sensory nerve fibers, preferentially in myelinated nerve fibers, but also, and to a lesser extent, causing degeneration of the central branches of DRG neurons [31,32]. Mechanical allodynia is a complex process involving many players in the central and peripheral nervous systems. Paclitaxel-induced mechanical allodynia may be mediated by components of the PNS, and more particularly by an alteration in myelinated A $\beta$  fibers (mechano-nociceptors) and unmyelinated C fibers (polymodal nociceptors), both of which have been shown to be involved in the development of mechanical allodynia in previous studies [33,34]. Additionally, central injuries at the spinal cord level may be involved [35]. In fact, as is the case with oxaliplatin, patients receiving PTX commonly develop painful symptoms a few hours after the first PTX administration, without overt evidence of nerve degeneration, and these early defects have been designated PTX-induced acute pain syndrome [36,37]. In our study, morphological analyses showed that PTX treatment led to a decrease in IENF density, a loss of sensory DRG neurons, and loss of myelinated and unmyelinated nerve fibers in the sciatic nerves, corresponding to the length-dependent sensory axonopathy observed in patients experiencing PIPN [38,39]. Thus, the Swiss mouse model used in our study, characterized by sensory deficit and nerve degeneration reproduced the clinical features of chronic PIPN.

Daily administration of ramipril prevented the development of PTX-induced mechanical allodynia and morphological changes in nerves. Blockade of the renin-angiotensin system with ACE inhibitors has already been shown to have analgesic effects in humans and in several models of neuropathic pain [5,40] induced by chronic constriction injury [6,8], insulin resistance [41], or streptozotocin-diabetes [9]. However, our results are in opposition to those of a previous study which reported that enalapril, an ACE inhibitor, potentiated mechanical allodynia in a mouse model of PTX-induced pain syndrome [42]. In this study, very low doses of PTX (0.001 to 0.004 mg/kg, i.p.) were administered leading to the onset of mechanical allodynia without overt evidence of neurodegeneration. We could suggest that ACE inhibitors may be proalgetic in the first hours following a single administration, and then become neuroprotective and analgesics in the long run, in the case of neuropathic pain associated with structural changes to nerves. Moreover, the authors demonstrated that potentiation of allodynia by enalapril was mediated by B1 and B2 kinin receptors [42]. Another study showed that treatment with ramipril inhibited tactile and cold allodynia, and reduced the expression of the pro-nociceptive kinin B1 receptor in a rat model of sensory neuropathy induced by glucose-feeding [41]. In this latter model, as well as in ours, the

beneficial effect of ramipril could be associated with its anti-inflammatory and antioxidant effects, independently of the kinin system. Indeed, both processes, inflammation and oxidative stress, participate in the development of PIPN [43]. Ramipril has previously been shown to have beneficial effects in a model of neuropathic pain induced by CCI, and these effects were associated with anti-inflammatory and antioxidant actions, following a decrease in Ang II levels [6]. Therefore, it cannot be excluded that anti-inflammatory and antioxidant effects of ramipril were attributable to its role in RAS modulation. However, further investigations are now needed to explore the involvement of the kinin system in the effects of ramipril, under the same experimental conditions as were used here.

We have previously shown that direct or indirect stimulation of AT2 prevents mechanical allodynia induced by VCR [15]. Moreover, the neuroprotective role of AT2 in the central and peripheral nervous system has also been the subject of numerous studies and has been reviewed elsewhere [4,44]. In view of this, we tested the hypothesis that the protective effect of ramipril in PTX-induced neuropathy is mediated by AT2. Blockade of AT2 by PD123319 was found to counteract the beneficial effect of ramipril. PD123319 is an AT2 antagonist, 10,000-fold more selective for AT2 than for AT1, however, PD123319 is also a putative ligand for Mas-related receptor (Mrgd) [45]. The use of AT2KO mice showed a complete loss of the preventive effect of ramipril on PTX-induced mechanical allodynia, and so confirm the involvement of AT2 in the ramipril effect. Thus, using both pharmacological and gene deficiency approaches, our results strongly suggest that the beneficial effect of ramipril on PTX-induced mechanical allodynia was mediated by stimulation of AT2. One hypothesis is that the blockade of ACE by ramipril could favor the ACE2 pathway which cleaves Ang I to produce Ang (1–9), and which interacts with AT2. The Ang (1–9)/AT2 axis has mostly been investigated for its cardioprotective role, which has been previously reviewed elsewhere [46]. In addition, the anti-inflammatory effects of AT2 stimulation have been documented in many tissues and may in our case participate in the antiallodynic and neuroprotective effects of ramipril [47]. Stimulation of AT2 also reduces reactive oxygen superoxide (ROS) production in M1 activated macrophages which are classically defined as proinflammatory [48]. There is evidence that PTX treatment causes macrophage accumulation in the DRG and sciatic nerves in rodents, thus contributing to the accumulation of ROS and development of CIPN [49,50].

Several studies have reported an analgesic effect following AT2 blockade [51–53]. Moreover, one study has reported that blockade of AT2 by PD123319 (at a single dose of 20 mg/kg) prevented mechanical and cold allodynia in a mouse model of PTX-induced acute pain syndrome [54]. In our experimental conditions, i.e., in a mouse model of chronic PIPN, the blockade of AT2 maintained mechanical allodynia as sensitivity of the mice treated with PD123319 did not return to baseline as was the case in untreated PTX mice. This discrepancy could be explained by the difference of doses and schedule of administration. Indeed, AT2 agonism has already showed neuroprotective/neuroregenerative effects in other models [4]. In this way, the blockade of AT2 by daily administration of PD123319 on a long period (20 days) could inhibit some neuroregenerative processes and thus affect the recovery of normal tactile sensitivity.

To conclude, we have shown that ramipril administration alleviates functional and morphological alterations induced by PTX in our mouse model of sensory neuropathy. Moreover, we propose an alternative and novel mechanism for ramipril-mediated neuroprotection that is mediated by AT2 activation. We suggest that stimulation of AT2 represents a possible therapeutic strategy in the case of long-term effects associated with CIPN. As ramipril is a relatively inexpensive, safe and well-tolerated drug [55,56], our results encourage future clinical evaluation of the preventive therapeutic potential of ramipril in patients exposed to PTX-induced sensory neuropathy.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.B., C.D. and A.D.; formal analysis, H.B., A.B., F.B. and A.D.; funding acquisition, C.D. and A.D.; investigation, H.B., A.B., F.B. and L.R.; methodology, H.B., A.B., F.B., C.D. and A.D.; project administration, C.D.; resources, A.D.; supervision, F.S. and C.D.; validation, C.D. and A.D.; visualization, S.B. and A.D.; writing—original draft, H.B. and A.D.;

writing—review and editing, H.B., A.B., F.B., S.F., L.R., L.M., S.B., C.D. and A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by a grant from “Ligue Contre le Cancer 87-AAP2019”. A.D. was sponsored by a grant from AAP Région Nouvelle Aquitaine. This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the guidelines for the ethical care of experimental animals of the European Community (2010/63/EU) and was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (number 11280#2017091510483336).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank Camille Mourgaud (University of Clermont-Ferrand, France), Morgane Chase and Widad El Alaoui (University of Limoges, France) for technical support. The authors also thank Angélique Nizou for logistic support. C.D. is a member of the French Neuropsychopharmacology Consortium of the SFPT (“Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique”).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kerckhove, N.; Collin, A.; Condé, S.; Chaletex, C.; Pezet, D.; Balayssac, D. Long-term effects, pathophysiological mechanisms, and risk factors of chemotherapy-induced peripheral neuropathies: A comprehensive literature review. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Scripture, C.D.; Figg, W.D.; Sparreboom, A. Peripheral neuropathy induced by paclitaxel: Recent insights and future perspectives. *Curr. Neuropharmacol.* **2006**, *4*, 165–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zajączkowska, R.; Kocot-Kępska, M.; Leppert, W.; Wrzosek, A.; Mika, J.; Wordliczek, J. Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Danigo, A.; Rovini, A.; Bessaguet, F.; Bouchenaki, H.; Bernard, A.; Sturtz, F.; Bourthoumieu, S.; Desmoulière, A.; Magy, L.; Demiot, C. The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System? *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 175. [[CrossRef](#)]
5. Bessaguet, F.; Magy, L.; Desmoulière, A.; Demiot, C. The Therapeutic Potential of Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS) in Chronic Pain: From Preclinical Studies to Clinical Trials. *Expert Rev. Neurother.* **2016**, *16*, 331–339. [[CrossRef](#)]
6. Kaur, P.; Muthuraman, A.; Kaur, J. Ameliorative potential of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ramipril) on chronic constriction injury of sciatic nerve induced neuropathic pain in mice. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* **2015**, *16*, 103–112. [[CrossRef](#)]
7. Yuksel, T.N.; Halici, Z.; Demir, R.; Cakir, M.; Calikoglu, C.; Ozdemir, G.; Unal, D. Investigation of the effect of telmisartan on experimentally induced peripheral nerve injury in rats. *Int. J. Neurosci.* **2015**, *125*, 464–473. [[CrossRef](#)]
8. Hegazy, N.; Rezaq, S.; Fahmy, A. Renin-angiotensin system blockade modulates both the peripheral and central components of neuropathic pain in rats: Role of calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* **2020**, *127*, 451–460. [[CrossRef](#)]
9. Davidson, E.P.; Coppey, L.J.; Holmes, A.; Yorek, M.A. Effect of inhibition of angiotensin converting enzyme and/or neutral endopeptidase on vascular and neural complications in high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *677*, 180–187. [[CrossRef](#)]
10. Hashikawa-Hobara, N.; Hashikawa, N.; Inoue, Y.; Sanda, H.; Zamami, Y.; Takatori, S.; Kawasaki, H. Candesartan cilexetil improves angiotensin II type 2 receptor-mediated neurite outgrowth via the PI3K-Akt pathway in fructose-induced insulin-resistant rats. *Diabetes* **2012**, *61*, 925–932. [[CrossRef](#)]
11. Alkudhayri, S.; Sajini, R.; Alharbi, B.; Qabbani, J.; Al-Hindi, Y.; Fairaq, A.; Yousef, A. Investigating the beneficial effect of aliskiren in attenuating neuropathic pain in diabetic Sprague-Dawley rats. *Endocrinol. Diabetes Metab.* **2021**, *4*, e00209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bessaguet, F.; Danigo, A.; Magy, L.; Sturtz, F.; Desmoulière, A.; Demiot, C. Candesartan prevents resiniferatoxin-induced sensory small-fiber neuropathy in mice by promoting angiotensin II-mediated AT2 receptor stimulation. *Neuropharmacology* **2017**, *126*, 142–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bouchenaki, H.; Danigo, A.; Bernard, A.; Bessaguet, F.; Richard, L.; Sturtz, F.; Balayssac, D.; Magy, L.; Demiot, C. Ramipril Alleviates Oxaliplatin-Induced Acute Pain Syndrome in Mice. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 712442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, E.; Hwang, S.-H.; Kim, H.-K.; Abdi, S.; Kim, H.K. Losartan, an Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, Alleviates Mechanical Hyperalgesia in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain by Inhibiting Inflammatory Cytokines in the Dorsal Root Ganglia. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 7408–7419. [[CrossRef](#)]

15. Bessaguet, F.; Danigo, A.; Bouchenaki, H.; Duchesne, M.; Magy, L.; Richard, L.; Sturtz, F.; Desmoulière, A.; Demiot, C. Neuroprotective effect of angiotensin II type 2 receptor stimulation in vincristine-induced mechanical allodynia. *Pain* **2018**, *159*, 2538–2546. [[CrossRef](#)]
16. Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 747–803. [[CrossRef](#)]
17. Du Sert, N.P.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; Emerson, M.; et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. Boutron I, editor. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000411.
18. Lauria, G.; Cornblath, D.R.; Johansson, O.; McArthur, J.C.; Mellgren, S.I.; Nolano, M.; Rosenberg, N.; Sommer, C. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* **2005**, *12*, 747–758. [[CrossRef](#)]
19. Smith, S.B.; Cramer, S.E.; Mogil, J.S. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: Responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2593–2604. [[CrossRef](#)]
20. De Iuliis, F.; Taglieri, L.; Salerno, G.; Lanza, R.; Scarpa, S. Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, *96*, 34–45. [[CrossRef](#)]
21. Flatters, S.J.L.; Bennett, G.J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* **2004**, *109*, 150–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Polomano, R.C.; Mannes, A.J.; Clark, U.S.; Bennett, G.J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* **2001**, *94*, 293–304. [[CrossRef](#)]
23. Ruiz-Medina, J.; Baulies, A.; Bura, S.A.; Valverde, O. Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response. *Eur. J. Pain* **2013**, *17*, 75–85. [[CrossRef](#)]
24. Authier, N.; Fialip, J.; Eschalier, A.; Coudoré, F. Assessment of allodynia and hyperalgesia after cisplatin administration to rats. *Neurosci. Lett.* **2000**, *291*, 73–76. [[CrossRef](#)]
25. Cavaletti, G.; Cavalletti, E.; Montaguti, P.; Oggioni, N.; De Negri, O.; Tredici, G. Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology* **1997**, *18*, 137–145.
26. Apfel, S.C.; Lipton, R.B.; Arezzo, J.C.; Kessler, J.A. Nerve growth factor prevents toxic neuropathy in mice. *Ann. Neurol.* **1991**, *29*, 87–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Klein, I.; Wiesen, M.H.J.; Albert, V.; Bobylev, I.; Joshi, A.R.; Müller, C.; Lehmann, H.C. Impact of drug formulations on kinetics and toxicity in a preclinical model of paclitaxel-induced neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2021**, *26*, 216–226. [[CrossRef](#)]
28. Bouchenaki, H.; Danigo, A.; Sturtz, F.; Hajj, R.; Magy, L.; Demiot, C. An overview of ongoing clinical trials assessing pharmacological therapeutic strategies to manage chemotherapy-induced peripheral neuropathy, based on preclinical studies in rodent models. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2021**, *35*, 506–523. [[CrossRef](#)]
29. Dina, O.A.; Chen, X.; Reichling, D.; Levine, J.D. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* **2001**, *108*, 507–515. [[CrossRef](#)]
30. Gauchan, P.; Andoh, T.; Ikeda, K.; Fujita, M.; Sasaki, A.; Kato, A.; Kurashiki, Y. Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: Different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 732–734. [[CrossRef](#)]
31. Cavaletti, G.; Cavalletti, E.; Oggioni, N.; Sottani, C.; Minoia, C.; D'Incalci, M.; Zucchetti, M.; Marmiroli, P.; Tredici, G. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. *Neurotoxicology* **2000**, *21*, 389–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tasnim, A.; Rammelkamp, Z.; Slusher, A.B.; Wozniak, K.; Slusher, B.S.; Farah, M.H. Paclitaxel causes degeneration of both central and peripheral axon branches of dorsal root ganglia in mice. *BMC Neurosci.* **2016**, *17*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Liljencrantz, J.; Björnsdotter, M.; Bergstrand, S.; Ceko, M.; Seminowicz, D.A.; Cole, J.; Bushnell, M.C.; Olausson, H. Altered C-tactile processing in human dynamic tactile allodynia. *Pain* **2013**, *154*, 227–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Xu, Z.Z.; Kim, Y.H.; Bang, S.; Zhang, Y.; Berta, T.; Wang, F.; Oh, S.B.; Ji, R.R. Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1326–1331. [[CrossRef](#)]
35. Hughes, D.I.; Todd, A.J. Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. *Neurotherapeutics* **2020**, *17*, 874–885. [[CrossRef](#)]
36. Pachman, D.R.; Qin, R.; Seisler, D.; Smith, E.M.L.; Kaggal, S.; Novotny, P.; Ruddy, K.J.; Lafky, J.M.; Ta, L.E.; Beutler, A.S.; et al. Comparison of oxaliplatin and paclitaxel-induced neuropathy (Alliance A151505). *Support Care Cancer* **2016**, *24*, 5059–5068. [[CrossRef](#)]
37. Loprinzi, C.L.; Reeves, B.N.; Dakhil, S.R.; Sloan, J.A.; Wolf, S.L.; Burger, K.N.; Kamal, A.; Le-Lindqwister, N.A.; Soori, G.S.; Jaslowski, A.J.; et al. Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: Prospective cohort study NCCTG N08C1. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1472–1478. [[CrossRef](#)]
38. Klein, I.; Lehmann, H.C. Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics* **2021**, *9*, 229. [[CrossRef](#)]
39. Siau, C.; Xiao, W.; Bennett, G.J. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: Loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp. Neurol.* **2006**, *201*, 507–514. [[CrossRef](#)]
40. Muthuraman, A.; Kaur, P. Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Current Drug Target for the Management of Neuropathic Pain. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 178–195. [[CrossRef](#)]

41. Ismael, M.A.; Talbot, S.; Carbonneau, C.L.; Beauséjour, C.M.; Couture, R. Blockade of sensory abnormalities and kinin B1 receptor expression by N-Acetyl-L-Cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *589*, 66–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brusco, I.; Silva, C.R.; Trevisan, G.; de Campos Velho Gewehr, C.; Rigo, F.K.; La Rocca Tamiozzo, L.; Rossato, M.F.; Tonello, R.; Dalmolin, G.D.; de Almeida Cabrini, D.; et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 7824–7837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wu, Z.; Wang, S.; Wu, I.; Mata, M.; Fink, D.J. Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor- $\alpha$  in neuropathic pain caused by paclitaxel. *Eur. J. Pain* **2015**, *19*, 889–898. [[CrossRef](#)]
44. Sumners, C.; Flegel, M.A.; Zhu, M. Angiotensin AT1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lautner, R.Q.; Villela, D.C.; Fraga-Silva, R.A.; Silva, N.; Verano-Braga, T.; Costa-Fraga, F.; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Sousa, F.; Alzamora, A.; et al. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circ Res.* **2013**, *112*, 1104–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kittana, N. Angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin 1-7/1-9 system: Novel promising targets for heart failure treatment. *Fundam Clin. Pharmacol.* **2018**, *32*, 14–25. [[CrossRef](#)]
47. Ranjbar, R.; Shafiee, M.; Hesari, A.; Ferns, G.A.; Ghasemi, F.; Avan, A. The potential therapeutic use of renin–angiotensin system inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 2277–2295. [[CrossRef](#)]
48. Isaksson, R.; Casselbrant, A.; Elebring, E.; Hallberg, M.; Larhed, M.; Fändriks, L. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor reduces nitric oxide production in lipopolysaccharide treated mouse macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *868*, 172855. [[CrossRef](#)]
49. Duggett, N.A.; Griffiths, L.; McKenna, O.E.; de Santis, V.; Yongsanguanchai, N.; Mokori, E.B.; Flatters, S.J. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience* **2016**, *333*, 13–26. [[CrossRef](#)]
50. Sekiguchi, F.; Domoto, R.; Nakashima, K.; Yamasoba, D.; Yamanishi, H.; Tsubota, M.; Wake, H.; Nishibori, M.; Kawabata, A. Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk. *Neuropharmacology* **2018**, *141*, 201–213. [[CrossRef](#)]
51. Smith, M.T.; Anand, P.; Rice, A.S.C. Selective small molecule angiotensin II type 2 receptor antagonists for neuropathic pain: Preclinical and clinical studies. *Pain* **2016**, *157*, S33–S41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Shepherd, A.J.; Mohapatra, D.P. Attenuation of Unevoked Mechanical and Cold Pain Hypersensitivities Associated With Experimental Neuropathy in Mice by Angiotensin II Type-2 Receptor Antagonism. *Anesth. Analg.* **2019**, *128*, e84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Anand, U.; Facer, P.; Yangou, Y.; Sinisi, M.; Fox, M.; McCarthy, T.; Bountra, C.; Korchev, Y.; Anand, P. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) localization and antagonist-mediated inhibition of capsaicin responses and neurite outgrowth in human and rat sensory neurons. *Eur. J. Pain* **2013**, *17*, 1012–1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zanata, G.C.; Pinto, L.G.; da Silva, N.R.; Lopes, A.H.; de Oliveira, F.F.; Schivo, I.R.; Cunha, F.Q.; McNaughton, P.; Cunha, T.M.; Silva, R.L. Blockade of Bradykinin Receptors or Angiotensin II Type 2 Receptor Prevents Paclitaxel-Associated Acute Pain Syndrome in Mice. *Eur. J. Pain* **2020**, *23*, 1660. [[CrossRef](#)]
55. Uchida, M.; Kawazoe, H.; Takatori, S.; Namba, H.; Uozumi, R.; Tanaka, A.; Kawasaki, H.; Araki, H. Preventive Effects of Renin-angiotensin System Inhibitors on Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy: A Retrospective Observational Study. *Clin. Ther.* **2018**, *40*, 1214–1222.e1. [[CrossRef](#)]
56. Roldan, C.J.; Song, J.; Engle, M.P.; Dougherty, P.M. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers Modulate the Function of Myelinated Fibers after Chemotherapy: A Quantitative Sensory Testing Study. *Pain Physician* **2017**, *20*, 281–292. [[CrossRef](#)]

## **III.3. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la VCR et le PTX**

### **III.3.1. Effet du blocage du CCK2R dans la prévention des neuropathies induites par la vincristine**

**Article en cours de soumission dans le journal *Pain***

“Blockade of cholecystokinin type 2 receptor prevents the onset of vincristine-induced neuropathy in mice”

Amandine Bernard<sup>a</sup>, Aurore Danigo<sup>a</sup>, Mohamad Mroué<sup>a</sup>, Amandine Rovini<sup>a</sup>, Laurent Magy, Laurence Richard<sup>a,b</sup>, Alexis Desmoulière<sup>a</sup>, Franck Sturtz<sup>a</sup>, Claire Demiot<sup>a</sup> and Sylvie Bourthoumieu<sup>a,c</sup>.

#### **III.3.1.1. Objectifs**

Une analyse transcriptomique réalisée sur les GS de souris ayant développées une NPIV (Bessagnet et al., 2018), a permis de mettre en évidence la surexpression de plusieurs gènes, notamment du gène *cck2r*, codant pour le récepteur de type 2 à la cholécystokinine (CCK2R). Particulièrement présent dans le système gastro-intestinal et dans le système nerveux central, ce récepteur est impliqué dans la satiété, l'anxiété et la douleur (Greenough et al., 1998; Yang et al., 2018). Un modèle de douleurs induites par brûlure a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de *Cck2r* dans les GS de façon similaire à notre modèle de NPIV. Le proglumide, un antagoniste des récepteurs CCK (de type 1 et 2), a permis d'inverser l'allodynie mécanique induite par la brûlure (Yin et al., 2016). Le proglumide fait actuellement l'objet d'un essai clinique (Phase I) dans le cadre de la prise en charge de la stéatose hépatique non-alcoolique (clinicaltrial.gov, NCT04152473). Outre le proglumide, plusieurs autres antagonistes de CCK2R ont vu le jour. Parmi eux, le Ly225910, un antagoniste spécifique de CCK2R, utilisé uniquement en recherche.

Cibler CCK2R pourrait être une stratégie efficace pour prévenir l'apparition de douleurs neuropathiques induites par la VCR et améliorer ainsi la qualité de vie du patient et ses chances de survie face au cancer. L'objectif était ici d'évaluer l'effet neuroprotecteur du proglumide et du Ly225910 dans notre modèle murin de NPIV.

#### **III.3.1.2. Résultats principaux**

L'analyse transcriptomique réalisée sur les GS de souris exposées à la VCR pendant 7 jours nous a permis de mettre en évidence la dérégulation de l'expression de gènes

en lien avec la régénération et la projection axonale, et de gènes en lien avec la réponse immune suggérant des mécanismes neuropathique et inflammatoire dans le développement de la NPIV. L'injection de la VCR a donc induit une surexpression génique de *Cck2r* dans notre modèle. En nous intéressant à l'expression protéique de ce récepteur, nous avons observé un immunomarquage positif de CCK2R seulement dans les GS des souris VCR. L'utilisation de co-marquages dans le nerf sciatique a permis de préciser la localisation de CCK2R au niveau des CS.

Le blocage de CCK2R par le proglumide et le Ly225910 a prévenu le développement de l'allodynie tactile induite par la VCR, et prévient également la totalité des altérations morphologiques induites par la VCR. Ces molécules protègent contre la dégénérescence des FNIE, des neurones dans les GS mais également de la perte et du gonflement des fibres myélinisées dans le nerf sciatique. Le proglumide ou le Ly225910 en association avec la VCR n'ont pas affecté l'activité anticancéreuse de la VCR dans les lignées cellulaires humaines de lymphomes.

# **Blockade of cholecystinin type 2 receptors prevents the onset of vincristine-induced neuropathy in mice**

**Amandine BERNARD<sup>a</sup>, Aurore DANIGO<sup>a</sup>, Mohamad MROUE<sup>a</sup>, Amandine ROVINI<sup>a</sup>, Laurence RICHARD<sup>a,b</sup>, Alexis DESMOULIERE<sup>a</sup>, Franck STURTZ<sup>a</sup>, Claire DEMIOT<sup>a</sup> and Sylvie BOURTHOUMIEU<sup>a,c</sup>.**

<sup>a</sup> NeurIT Neuropathies et Innovations Thérapeutiques UR 20218, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, 87025 Limoges, France.

<sup>b</sup> Department of Neurology, Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital of Limoges, 87042 Limoges, France.

<sup>c</sup> Department of cytogenetics, Medical Genetic and Reproduction Biology, University Hospital of Limoges, Limoges, France.

**Corresponding author:** Claire Demiot, PharmD, PhD

2 rue du Dr Marcland 87025 LIMOGES CEDEX, France

claire.demiot@unilim.fr

Tel : +33555435915

## **Abbreviations**

BBB: blood brain barrier

BSA: bovine serum albumin

CCK2R (or CCKBR): cholecystokinin type 2 receptor

CIPN: chemotherapy-induced peripheral neuropathy

DRG: dorsal root ganglion

GABA: Gamma aminobutyric acid

GPCR: G-protein coupled receptor

IENFs: intraepidermal nerve fibers

MOR: Mu opioid receptor

NRS: normal rabbit serum

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

PGP9.5: protein gene product 9.5

PNS: peripheral nervous system

VCR: vincristine

VEH: vehicle

VIPN: vincristine-induced peripheral neuropathy

## **Abstract.**

Vincristine (VCR) belongs to the family of vinca alkaloids and is one of the most common and effective chemotherapeutic drugs for treating a broad range of cancers. VCR is the most neurotoxic agent of its drug class and is responsible for the onset of the VCR-induced peripheral neuropathy (VIPN). The pathophysiological mechanisms involved remain unclear, significantly hampering the development of effective therapeutic strategies that could prevent the onset of VIPN. To explore the mechanisms underlying VIPN, we performed microarray gene expression profiling on dorsal root ganglia in a mouse model of VIPN. This transcriptomic analysis highlighted 229 genes that were significantly differentially expressed. Among these, *Cck2r*, a gene coding for the cholecystokinin type 2 receptor (CCK2R), was upregulated (FC = 8.75,  $p = 0.000921$ ). CCK2R is a G-protein-coupled receptor well known for its roles in satiety and anxiety, but also strongly linked to pain processing. We therefore explored the effect of CCK2R blockade using two pharmacological tools (proglumide and Ly225910) on the onset of VIPN and maintenance of VCR efficacy as an anticancer agent on human cancer cell lines. Blockade of CCK2R, by proglumide or Ly225910, significantly reduced mechanical allodynia and prevented sensory nerve fiber damage induced by VCR. Proglumide or Ly225910 in combination with VCR did not affect the anticancer activity of VCR in human cancer cell lines. Targeting CCK2R could therefore be an effective strategy to prevent the onset of VCR-induced neuropathic pain and thus improve patient quality of life, and improve cancer survival.

**Keywords:** Chemotherapy-induced peripheral neuropathy, vincristine, allodynia, proglumide, Ly225910, CCK2R

## 1. Introduction

Vincristine (VCR) belongs to the family of vinca alkaloids and is one of the most common and effective chemotherapeutic drugs for the treatment of a broad range of cancers. VCR is also the most neurotoxic agent of its class and is responsible for the onset of VCR-induced peripheral neuropathy (VIPN) [2]. Similar to other anticancer agents, VCR shows limited passage across the blood-brain barrier (BBB) [31], but does accumulate in the dorsal root ganglia (DRG) and peripheral nerves, which has been suggested to cause peripheral neurotoxicity [26,57]. VIPN is a sensory length-dependent axonopathy, accompanied by neuropathic pain such as paresthesia and allodynia [3]. Currently, the onset of VIPN-associated pain necessitates the discontinuation of treatment, significantly influencing the survival of cancer patients and negatively affecting their quality of life. VIPN affects between 30 and 40 % of patients and therefore represents a significant public health issue [70]. Currently there is no standardized measure for CIPN, and current methods (i.e scales and neurophysiological assessment) have their own limitations. Furthermore, there are no approved treatments to prevent CIPN, and limited therapeutic options are available to monitor and manage CIPN once it develops. The only presently accepted preventive measures to limit the onset of VIPN are screening for pre-existing neuropathies and the early detection of clinical signs of neuropathy in subjects receiving neurotoxic chemotherapy [59]. No preventive therapies have thus far shown significant clinical efficacy [20], leaving the search for biomarkers and new targets involved in CIPN an active and open research field. For the last two decades, research has explored the underlying mechanisms of VCR-induced neuropathic pain in rodent models. However, the exact pathophysiological mechanisms remain unclear, significantly hampering the development of effective therapeutic strategies that could either prevent or alleviate the symptoms of VIPN.

Recent reports have strongly linked CCK2R to nociceptive processing [6]. CCK2R is a G-protein-coupled receptor (GPCRs) well known for its roles in satiety and anxiety [25,74].

CCK2R is expressed in the gastrointestinal system as well as in areas of the brain involved in pain modulation and other processes such as memory, anxiety and thermoregulation. Several studies have confirmed that the CCK2R acts as a neuromodulator in sensation and pain tracts through interaction with dopamine, glutamate and other neuropeptides involved in pain regulation [30,44,73]. Upregulation of CCK2R in rodent DRG has been found in a model of burn-induced pain using transcriptomic analysis [75], as well as in other models of neuropathic pain associated with nerve injury [72,79]. In this study we thus sought to elucidate the contribution of CCK2R to vincristine-induced pain and to examine if inhibition of CCK2R may be a potentially effective strategy to prevent the development of VCR-induced neuropathic pain.

## **2. Materials and methods**

This study conformed to the European Community guidelines for the ethical care of experimental animals and was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (APAFiS # 27947-2020111216498126 v2). Animal experiments are reported in compliance with ARRIVE guidelines [53]. All effort was made to limit suffering and the number of animals used in the following experiments.

### **2.1. Animals**

Male and female Swiss mice (6-7 weeks old) from Janvier labs (France) were housed in groups of 4 to 5 per cage, and maintained on a 12h light/dark cycle with food and water available *ad libitum* (BISCEm-animal care and facility center). Shredded paper nesting material was supplied for environmental enrichment.

Mice were assigned to 4 groups: untreated, vehicle (VEH), proglumide (PRGL) and Ly225910 (Ly). Mice in each group were then assigned to either control (Ctrl) or vincristine (VCR) subgroups, forming a total of 8 groups:

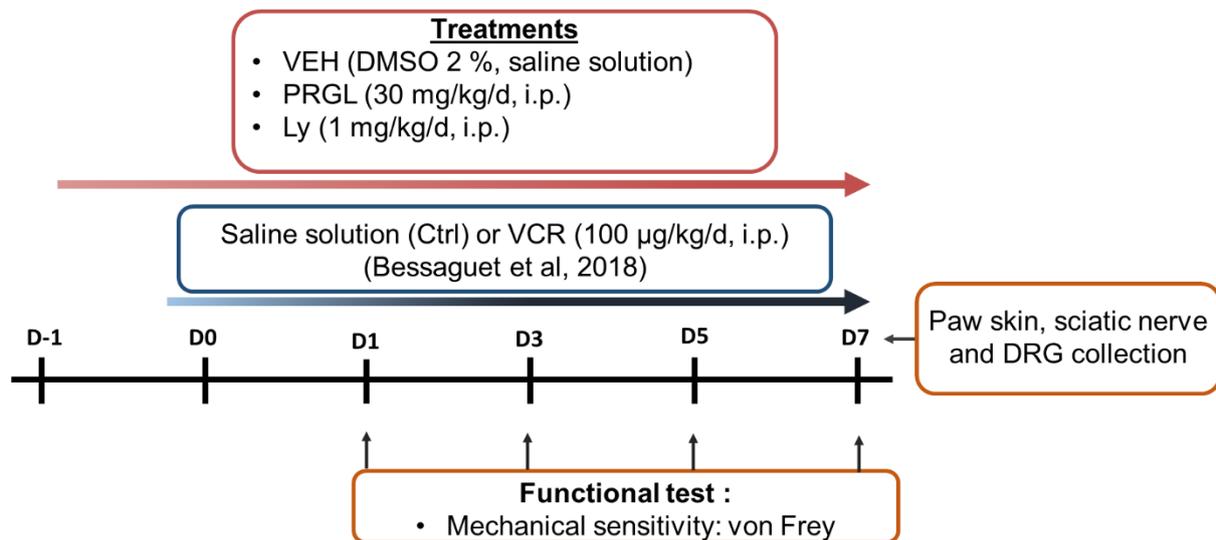
- Ctrl-untreated = Ctrl
- VCR-untreated = VCR
- Ctrl-VEH
- Ctrl-PRGL
- Ctrl-Ly
- VCR-VEH
- VCR-PRGL
- VCR-Ly

Mice were assigned to each group using an online randomization tool (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>). Ctrl and VCR mice were used for assessment of *Cck2r* expression (molecular analysis) and CCK2R localization (IHC analysis) in the sensory nervous system at D7. Sciatic nerve, dorsal root ganglia and paw skin were removed at the end of experiment for subsequent immunohistochemistry and morphological analysis.

## 2.2. Treatments

Peripheral neuropathy was induced by a daily injection over 8 days of VCR (100 µg/kg/day, intraperitoneally [i.p.]; Hospira, Meudon, France) [8], or an equivalent volume of the vehicle (saline solution, i.p.) administered in control mice (Figure. 1).

Treatments started one day prior to the first VCR administration, and were administered each day for 8 days. Proglumide, (30 mg/kg/day, i.p., Sigma) and Ly225910 (1 mg/kg/day, i.p., Abcam) were diluted in a final solution of 2 % dimethyl sulfoxide in physiological saline (2 % DMSO). Vehicle-treated mice received injections of an equivalent volume of 2 % DMSO. The Proglumide dose used has previously been shown to have a neuroprotective effect in rodent models of spinal cord injury [75]. The dose of Ly225910 was chosen based on a study showing beneficial effects of Ly225910 in a stress model [4].



**Figure 1.** Schematic representation of the study design. CCK2R: Cholecystinin type 2 receptor; Ctrl: control, DMSO: dimethyl sulfoxide, DRG: dorsal root ganglion, i.p., intraperitoneal, Ly: LY225910, PRGL: proglumide, VEH: vehicle, VCR: vincristine.

### 2.3. Molecular analysis

#### 2.3.1. mRNA extraction

Animals from untreated Ctrl and VCR groups were sacrificed by cervical dislocation, after isoflurane anesthesia (n = 4 per group and per time). The spinal cord was dissected and ten DRG per mice were removed. DRG were crushed and mRNA was extracted using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). Analysis of the quality and quantity of mRNA was performed by Bioanalyzer 2100 (Agilent). Only samples with an RNA integrity number (RIN) up to 7 were used.

#### 2.3.2. Transcriptomic analysis

Transcriptomic analysis was performed using an expression chip: SurePrint G3 Mouse Expression v2 (Agilent). Samples were processed following the manufacturer's instructions. After 17 h of hybridization at 65°C, the chip was washed several times and then placed in the SureScan DX MicroArray (Agilent). Analysis of the chip data was carried out using Genespring. Fold Change (FC) and p-values were obtained after data normalization and T-test

analysis comparing Ctrl-VEH and Ctrl-VCR groups. Limits were applied to  $FC \geq 1.5$  and  $p\text{-value} \leq 0.01$ . Gene ontology (GO) analysis was conducted using the online tool Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). An enrichment score  $> 0.5$  was set as the cut-off value.

### 2.3.3. RT-qPCR

mRNA was transcribed to cDNA using QuantiTect reverse Transcription kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, cDNA was subjected to real-time PCR using Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). The variation of expression for each gene (primer sequences, Table 1) was calculated using the  $\Delta C_t$  method, with the house-keeping gene *Hprt* as an internal control.

**Table 1.** Primer sequences used for real time PCR

Genes (size)	Primers (5'-3')	Accession No.
Mouse <i>cck2r</i> (122 bp)	Designed by Qiagen (QuantiTect Primer assay)	NM_007627
Mouse <i>hprt</i> (185 bp)	F: TGATCAGTCAACGGGGGACAT R: AGGTCCTTTTCACCAGCAAGC	NM_013556.2

## 2.4. Behavioral test

Functional tests were performed on days 1, 3, 5 and 7 in all groups. Animals were acclimatized to the testing room for at least 1 h prior to behavioral testing on each day. The behavioral test was assessed by the same researcher, blinded to the treatment (PRGL, Ly or VEH) and the conditions (VCR or Ctrl).

Tactile sensitivity was assessed using von Frey filaments (Bioseb, France) [12]. Mice were placed for acclimation, in a plastic cage with a wire mesh floor which allowed access to their

paws, for 30 min. The plastic cage was covered with an opaque cover to avoid visual stimulation. The area tested was the mid-plantar left hind paw. The mechanical threshold was tested using a modification of the simplified up-down method [11]. Each test round started with filament #6 (0.40 grams) and progressed to higher or lower filament values depending on the animal's response. Each animal went through three test rounds for each paw for each experimental condition.

## **2.5. Immunohistochemistry and morphological analysis**

### 2.5.1. Localization of CCK2R in the sensory nervous system

#### *2.5.1.1. Immunofluorescence for CCK2R in DRG*

Animals were anesthetized with isoflurane then sacrificed by cervical dislocation at D7. Four lumbar (L4-L5) DRG per mouse (n = 6 per groups) were collected, post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA), cryoprotected (30 % sucrose) and then frozen at -80°C. Sections were cut at 8 µm and incubated overnight with antibodies against CCK2R (Goat polyclonal, 1:200, Abcam) and S100 (rabbit polyclonal, 1:500, Dako), or MBP (mouse monoclonal antibody, 1:500, BioLegend). Sections were then incubated with the appropriate secondary antibodies. Each DRG section was then systematically photographed at 200x using a fluorescence microscope.

### 2.5.2. Quantification of IENF and DRG neuron densities

To assess footpad skin innervation, animals (n = 6 per group) were sacrificed at D7 by cervical dislocation following isoflurane anesthesia. Footpads were then removed using a 3mm punch biopsy, fixed overnight in 4 % PFA, cryoprotected (30 % sucrose) and frozen at -20°C. Sections were cut on a cryostat at 20 µm and were incubated overnight with a primary antibody directed against Protein gene product 9.5 (PGP9.5, rabbit monoclonal, 1:50; Abcam). Sections were then incubated with a secondary antibody conjugate to Cy3 (1:500; Jackson Immunoresearch,

Suffolk, UK). Epidermal nerve fibers were counted blindly at 400× magnification (Eclipse 50i, Nikon Instruments), according to established guidelines for human studies [19]. The length of the dermo-epidermal junction was determined using NIS-Elements BR 2.30 software (Nikon) and was defined as the epidermal length. Epidermal nerve density was defined as the number of epidermal nerves divided by the epidermal length. To assess the density of DRG neurons, four lumbar (L4-L5) DRG per mice were collected, and processed as described above except that 8 µm sections were sampled. Each DRG section was photographed at 200× using fluorescence microscopy in a systematic fashion. Immunoreactive DRG neurons were counted and only the area containing neurons was measured using NIS-Elements BR 2.30 software (Nikon). The density of PGP 9.5(+) neurons was expressed as neurons/mm<sup>2</sup>.

### 2.5.3. Sciatic nerve ultrastructural analysis

To assess the morphology and to quantify myelinated nerve fibers, sciatic nerves were dissected and placed in 2.5 % glutaraldehyde solution diluted in Sorensen buffer, dehydrated, and embedded in Epon 812 resin (Euromedex, France). Semi-thin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed by electron microscopy (JEM-1400 Flash, Jeol, USA). Six photographs per animal (n = 6 per group), covering the entire section of sciatic nerve, were taken at 3000x magnification, and the number of myelinated fibers per mm<sup>2</sup> was counted to calculate the density.

## 2.6. Evaluation of cancer cell viability

SU-DHL-4 (ATCC® CRL-2957™) cells were seeded in 96-well plates at  $2 \times 10^4$  cells/well, and U-2932 (DSMZ® ACC633) at  $1.10^4$  cells/well. After incubation for 24 h, cells were treated with Ly225910 alone at doses ranging from 0.001 to 10 nM, or in combination with VCR at the half maximal inhibitory concentration ([IC50]) for 24 h. Twenty µL of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) solution at  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  were added to the 100 µL of medium in each

well then incubated with the cells for 3 h. After incubation, the medium was removed by centrifugation at 600 rpm for 10 min and 150  $\mu$ L of DMSO were added to each well to solubilize the formazan crystals. Absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (Lab Systems, MultiskanEX). Cell viability was expressed as the percentage of MTT reduction, assigning a 100 % value to the absorbance value of untreated cells. All experiments were performed three times results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

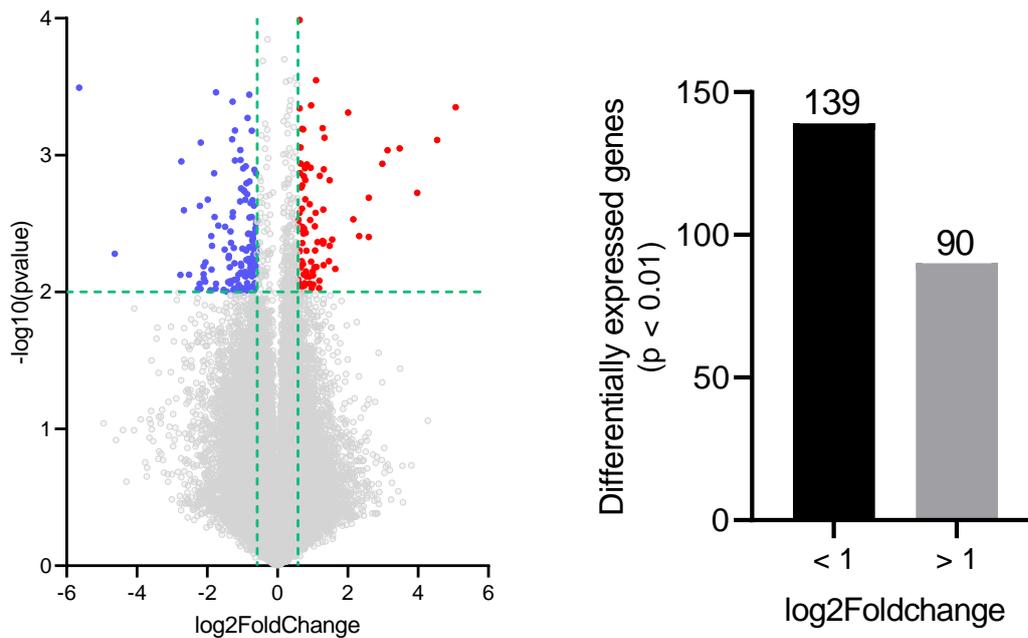
## **2.7. Data analysis**

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. A one-way analysis of variance was used to evaluate differences among multiple groups with Gaussian distributions, and P values determined using Tukey's multiple comparisons test. A nonparametric Kruskal–Wallis test and a Dunn multiple comparisons test were used for data that did not show Gaussian distribution. Differences were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. Transcriptomic changes induced by VCR exposure in mouse DRG**

Investigation of microarray gene expression was performed at D7 of VCR exposure in order to define gene expression changes during induction of VIPN. The previously described mouse model of VIPN used mimics features observed in humans, i.e. mechanical allodynia of the lower limbs without any motor impairment associated with sensory nerve degeneration [9]. 229 genes were found to be significantly differentially expressed in VCR compared to Ctrl mice ( $p < 0.01$ ,  $|FC| > 1.5$ ); 90 genes were upregulated and 139 were downregulated (Figure 2).



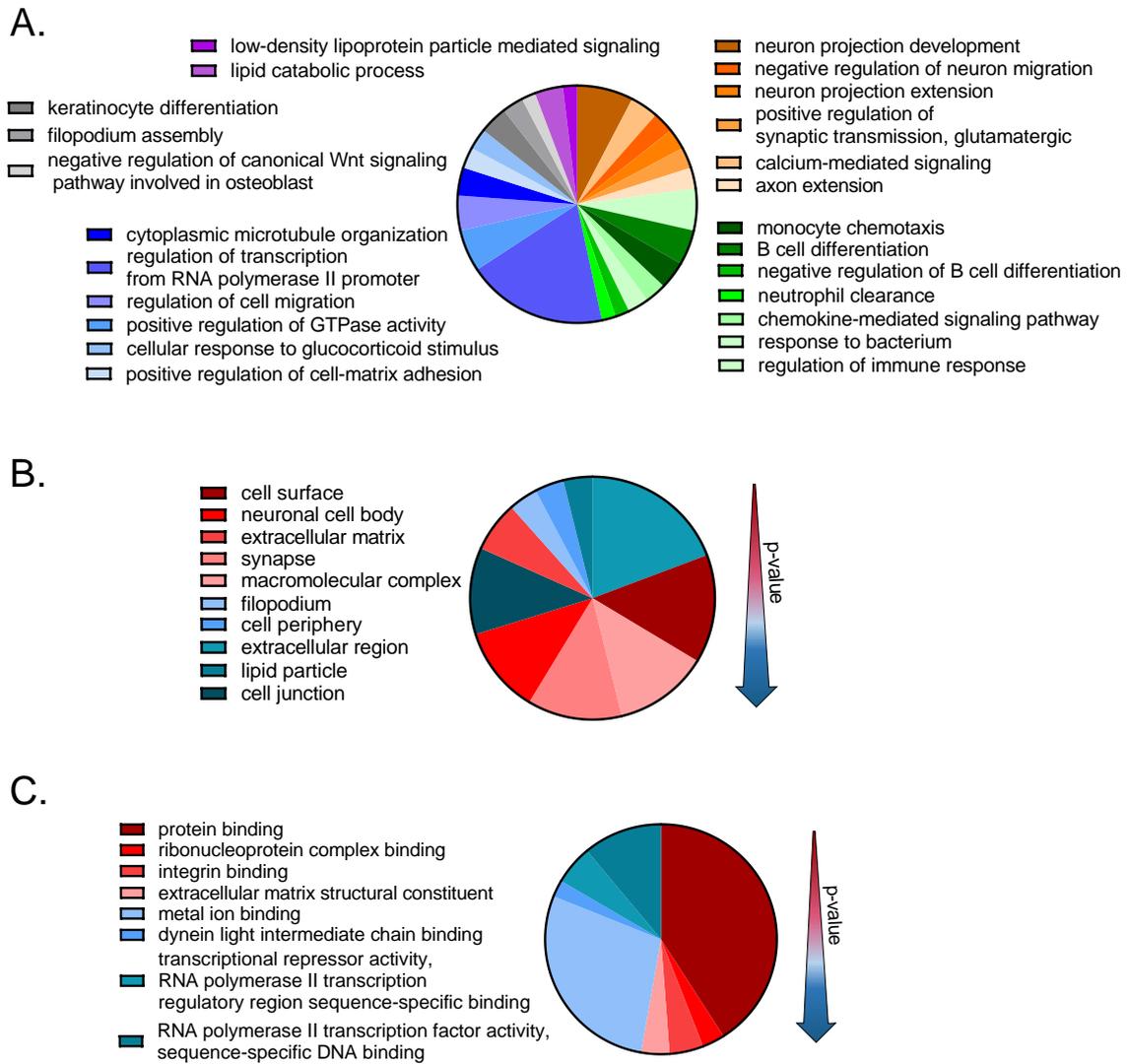
**Figure 2.** Analysis of differentially expressed genes (DEGs) in mouse dorsal root ganglia exposed to vincristine. (A) Volcano plot of all dysregulated genes ( $p < 0.01$ ,  $|FC| > 1.5$ ). The most highly upregulated or downregulated genes are represented in red and blue respectively. (B) Vincristine administration induced the upregulation of 90 genes and the downregulation of 139 genes in DRG.

Among the highly upregulated genes were *Ucn*, *Atf3*, *Cck2r*, *Sprr1a*, *Ecell* and *Dync1h1*, which have all been associated with altered pain perception, neuropathic pain, and nerve injury in previous studies (Table 2). Highly downregulated genes included *Ms4a1*, *Sema5a* and *Bcl11a*, which have also been shown to be involved in nerve injury processes (Table 3).

The GO-enrichment analysis was performed to elucidate biological processes (BP), cellular components (CC) and molecular functions (MF) associated with the 229 DEG transcripts in DRG following VCR exposure. This global analysis showed a predominant effect of VCR treatment on genes associated with inflammatory and immune responses, and the neuronal system (Figure 3).

**Table 2.** List of highly upregulated genes ( $p < 0.01$ ,  $|FC| > 1.5$ ) in dorsal root ganglia of mice exposed to VCR.

Gene symbol	Description	p-value	Up FC	
<i>Ucn</i>	Urocortin (Ucn), transcript variant 1	4.42E-04	33.59	Oxidative stress, neuroprotective in Parkinson's disease [1] repair
<i>Sprr1A</i>	Small proline-rich protein 1A	7.75E-04	23.35	Promotes axonal outgrowth [10]
<i>Dync1h1</i>	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	0.0018	15.76	The main motor protein responsible for retrograde axonal transport in neurons [27]
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	0.0020	6.06	Survival and the regeneration of axons following axotomy [56]
<i>Ecel1</i>	Endothelin converting enzyme-like 1	0.0039	6.05	Nerve development, nerve regeneration [39]
<i>Mill2</i>	MHC I like leukocyte 2, transcript variant 1	0.0029	4.45	Expressed by Schwann cells, involved in antigen presentation [49]
<i>Lingo1</i>	Leucin rich repeated and ig domain containing 1	0.0033	2.08	Negatively regulates myelination by oligodendrocytes [50]
<i>Stmn4</i>	Stathmin-like 4	0.0093	1.95	Marker for polyneuropathy in primary Sjögren's syndrome [22]
<i>Snap25</i>	Synaptosomal-associated protein 25	0.0086	1.70	Cell exocytosis during synaptic transmission. Cleaved by Botulinum toxin, implicated in neuropathic pain [69]
<i>Mmp16</i>	Matrix metalloproteinase 16	0.0014	1.68	Regulates neuronal responsiveness to myelin [23]
<i>Ptprd</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	0.0098	1.64	Increased in DRG, neuropathic pain in CCI rat and mice [15,62]
<i>Nwd1</i>	NACHT and WD repeat domain containing 1	0.0043	1.62	Facilitates synaptogenesis in spinal cord and then neuropathic pain [71]
<i>Sumo2</i>	Small ubiquitin-like modifier 2	0.0017	1.60	Overexpressed after nerve injury, role in regeneration [78],
<i>Camsap2</i>	Calmodulin regulated spectrin-associated protein family, member 2	0.0065	1.58	Control of dendritic microtubule organization [17]
<i>Flt3</i>	FMS-like tyrosine kinase 3	0.0032	1.51	Alleviates pain if downregulated [54]



**Figure 3.** GO-enrichment analysis results obtained using DAVID database. (A) Biological processes. The darker color refers to lower p-value. (B) Cellular component. (C) Molecular function.

The GO enrichment analysis (BP) focusing on upregulated genes highlighted 5 upregulated genes associated with “neuron projection development” (*Camsap2*, *Lingo1*, *Nrxn1*, *Stmn4* and *Ucn*), 3 downregulated genes associated with “negative regulation of neuron migration” (*Srgap2*, *Gsk3* and *Tnn*) and two genes associated with “positive regulation of synaptic transmission, GABAergic” (*Cck2r*, *Nrxn1*) (Figure 3A). Cellular components (GO-term) of the “neuronal cell body” were significantly upregulated (*C4b*, *Dync1h1*, *Nrxn*, *Kcnj14*, *Snap25* and *Ucn*) (Figure 3B). The most significant GO-molecular functions associated with upregulated

genes were “integrin binding”, “ribonucleoprotein complex binding”, and “extracellular matrix structural constituent” (Figure 3C, Table 2).

Significantly downregulated genes (Table 3) were associated with the following GO biological processes; “monocyte chemotaxis”, “positive regulation of GTPase activity” and “regulation of cell migration” (Figure 3A). The GO Cellular Components associated with downregulated genes were “cell surface”, “macromolecular complex” and “nucleus” (Figure 3B). The most significant GO-Molecular Functions associated with downregulated genes were “integrin binding”, “ribonucleoprotein complex binding”, and “extracellular matrix structural constituent” (Figure 3C).

**Table 3.** List of highly downregulated genes ( $p < 0.01$ ,  $|FC| > 1.5$ ) in DRG of mice exposed to VCR.

Gene symbol	Description	p-value	down FC	
<i>Ms4a1</i>	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	0.00135248	24.72407	B-lymphocyte antigen (CD20)
<i>Cyp2e1</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	0.0079	4.28	Regulates response to oxidative stress [45]
<i>Sema5a</i>	Semaphorin 5A	0.0097	3.75	Schwann cell injury response [14], axon guidance molecule in the nervous system [28]
<i>Gabrg3</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 3	0.0066	2.55	Synaptogenesis, nociception [67]
<i>Cp</i>	Ceruloplasmin	0.0098	1.86	Provide iron to axonal mitochondria [51]
<i>Bcl11a</i>	B-Cell Lymphoma/Leukemia 11A	6.63E-04	1.66	Negative regulation of dendrite extension [41]
<i>Dmd</i>	dystrophin, muscular dystrophy	0.0053	1.61	Synaptic transmission [40]
<i>Prox1</i>	Prospero Homeobox 1	0.0087	4.63	Induces new lymphatic vessel formation and promotes nerve reconstruction [48]

### 3.2. CCK2R mRNA is overexpressed in DRG of VCR-administered mice

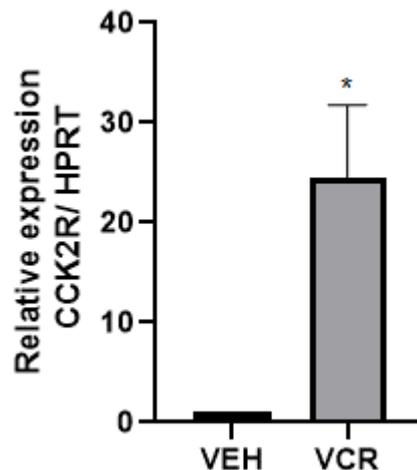
VCR exposure led to an upregulation of the expression of the *Cck2r* gene in mouse DRG (FC = + 8.75, p = 0.0009 VCR-VEH vs Ctrl-VEH). Given the established implication of the entire cholecystokinin system, namely cholecystokinin and its two receptors, CCK1R and CCK2R, in pain modulation, we included the *Cck* and *Cck1r* genes in our search however their expression did not show a significant change following VCR exposure (Table 4).

**Table 4.** Expression of genes related to CCK2R during VIPN induction.

Gene	VCR	
	FC	p-value
<i>Cck2r</i>	<b>8.75</b>	<b>9.21E-4****</b>
<i>Cck1r</i>	1.2	0.15
<i>Cck</i>	10.6	0.78

Cut off: p-value < 0.05, FC ≥ |1.5|. CCK2R: cholecystokinin type 2 receptor, FC: fold change, VIPN: vincristine-induced peripheral neuropathy

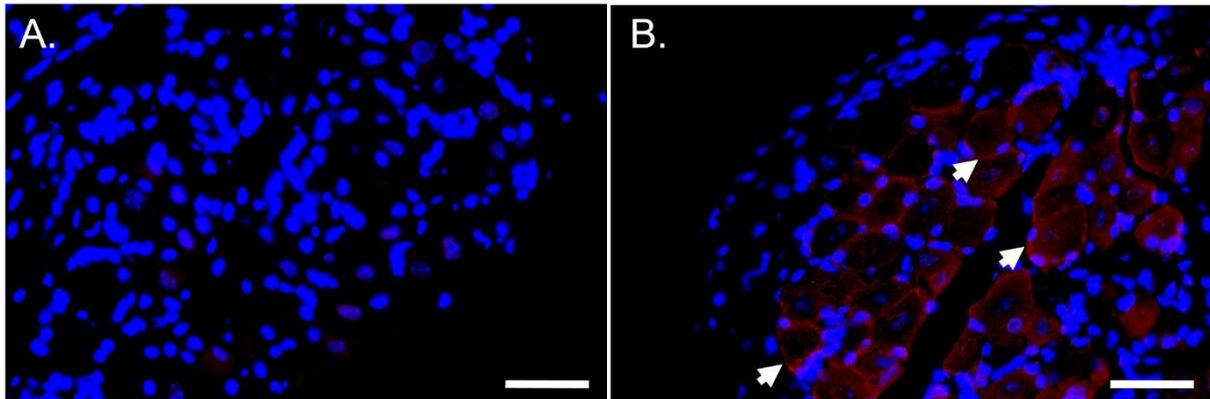
CCK2R overexpression was further confirmed by RT-qPCR (Figure 4).



**Figure 4.** Relative expression of CCK2R assessed by RT-qPCR. qPCR relative expression was calculated using the  $\Delta C_t$  method and normalized to HPRT gene expression. \* p<0.05 Ctrl vs. VCR (n = 3 per group).

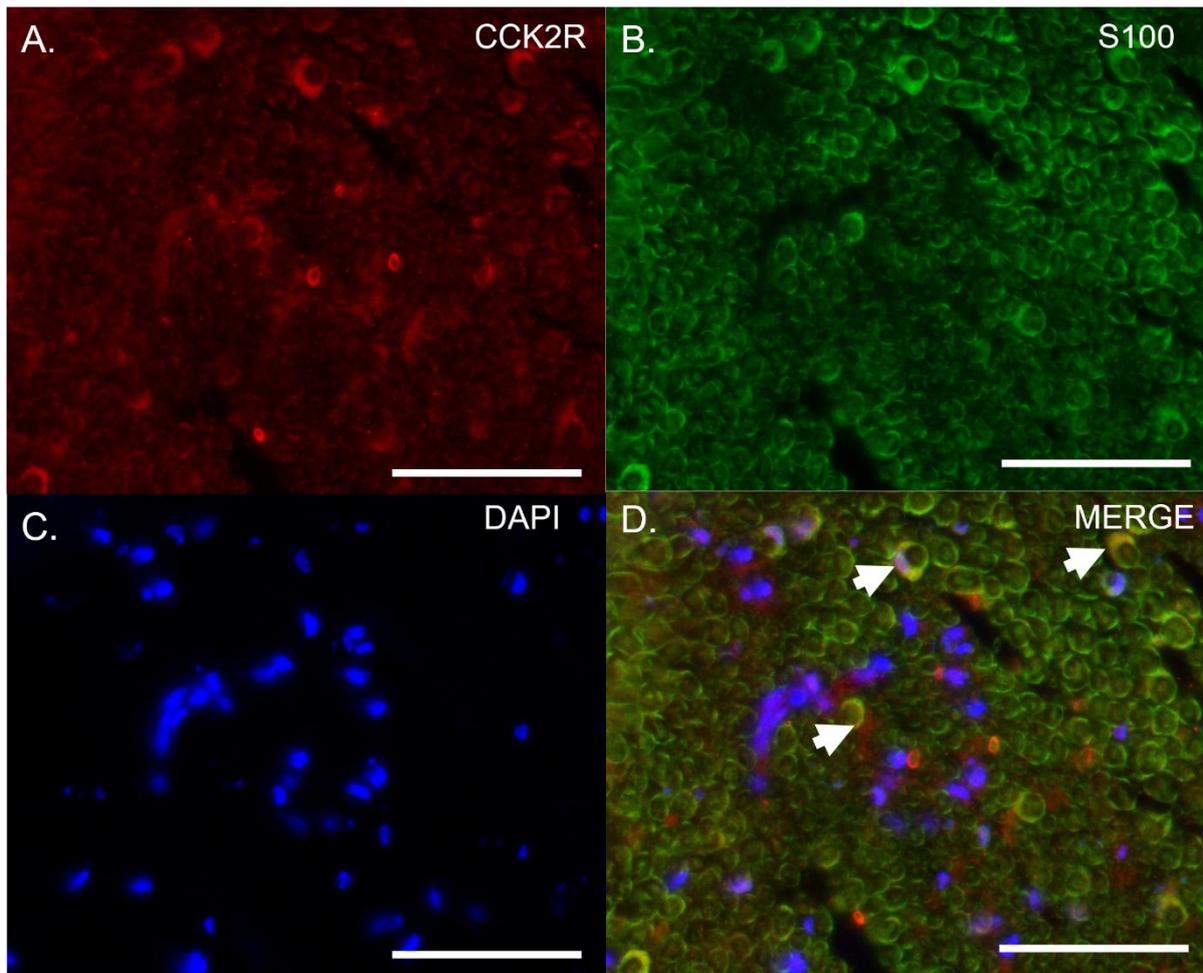
### 3.3. Location of CCK2R protein in mouse DRG and sciatic nerve

To define the contribution of CCK2R to VCR pain modulation, we first assessed the location of its distribution in the peripheral nervous system. The specificity of CCK2R antibody was first tested on mouse stomach, where it is highly expressed in parietal and enterochromaffin-like cells (ECL) (supplementary data). Interestingly, CCK2R staining could only be detected in DRG of VCR-VEH mice (Figure 5) in the vicinity of neurons.

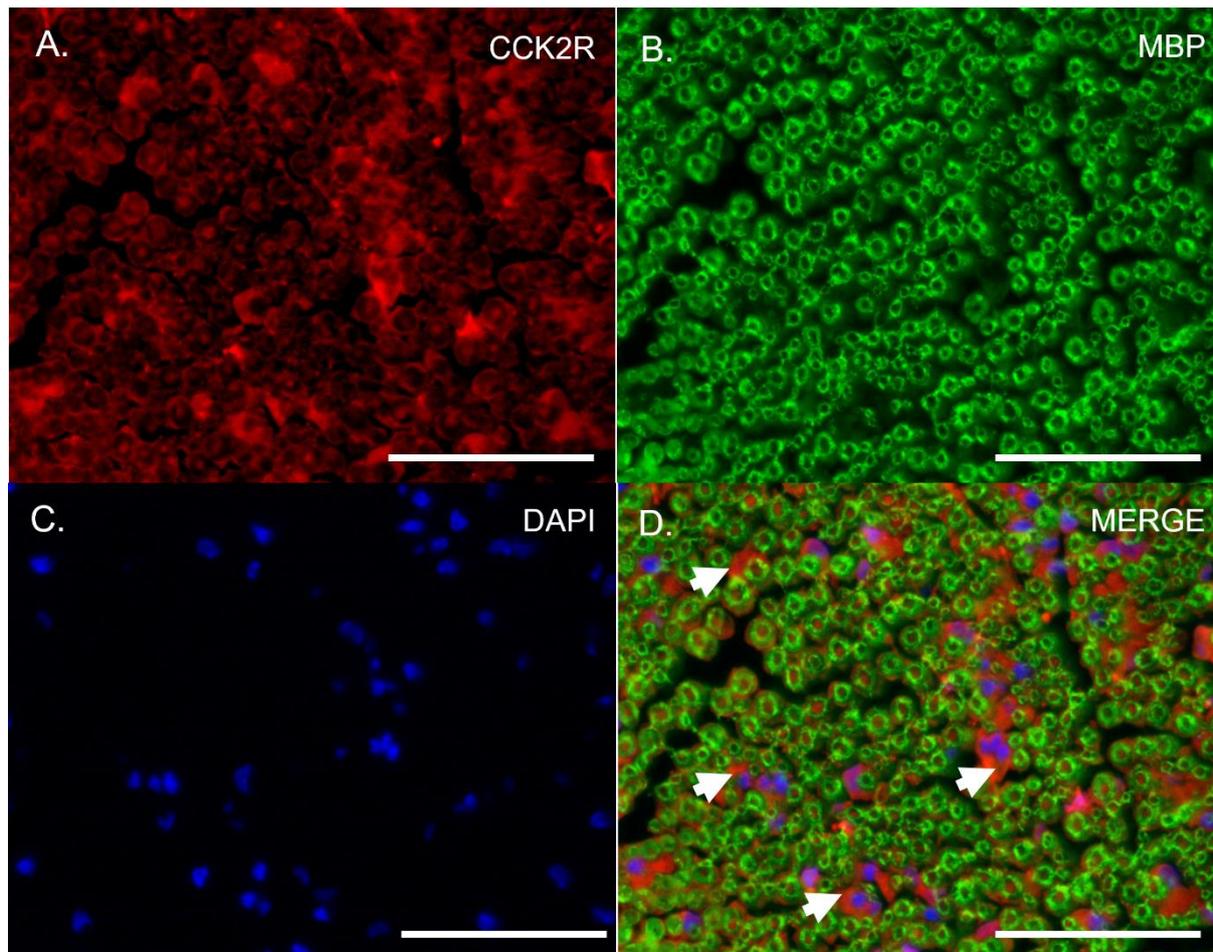


**Figure 5.** Expression of CCK2R protein in DRG of VCR mice assessed by immunochemistry. Immunostaining of CCK2R on DRG from VEH mice (A.) and VCR mice (B.). Scale bar = 0.05 mm.

To gain insights into the precise location of CCK2R expression we performed co-staining on sciatic nerve sections with S100, a cytoplasmic marker of adult Schwann cells (Figure 6), or with MBP, a myelin sheath marker (Figure 7). Co-localization of CCK2R and S100 was observed (Figure 6), whereas no dual-labelling was observed with MBP (Figure 7), suggesting that CCK2R may be expressed more specifically in the cytoplasm of Schwann cells.



**Figure 6.** Dual-labelling of CCK2R and S100 in sciatic nerves of VCR-administered mouse. Dual-labelling was carried out on sciatic nerves of VCR-VEH mice with antibodies directed against CCK2R (red), and S100 (green), a marker of Schwann cell cytoplasm. Co-labelling is indicated on the merged image by white arrows. CCK2R: cholecystokinin type 2 receptor, S100: S100  $\beta$  protein, Scale bar = 0.05 mm.



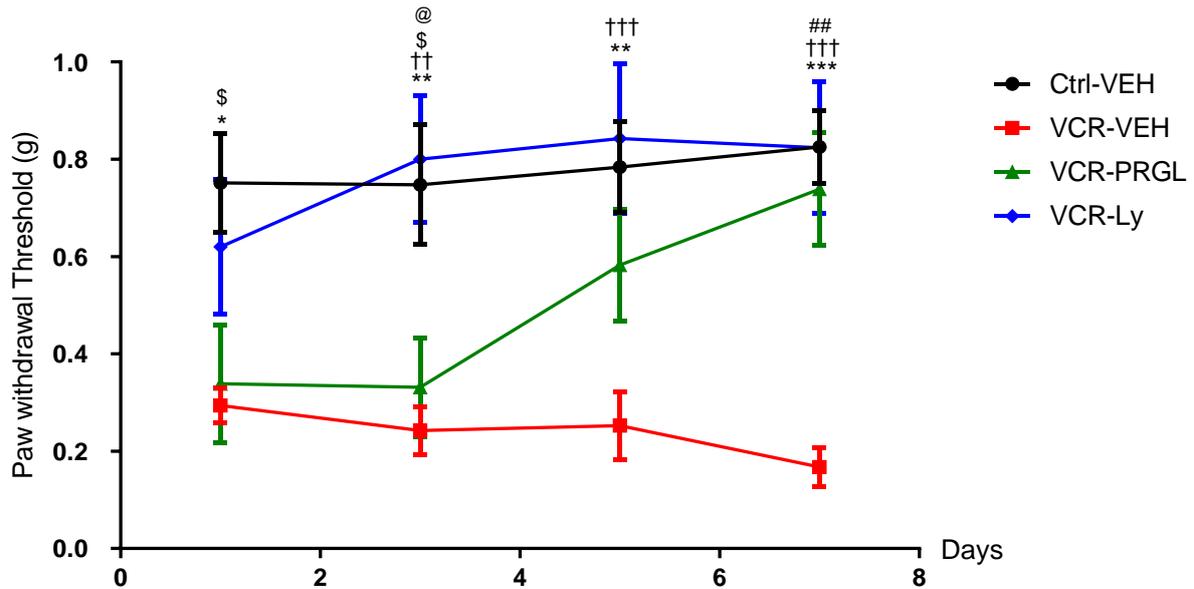
**Figure 7.** Dual-labelling CCK2R and MBP in sciatic nerves of VCR-administered mice. Dual-labelling was carried out on Sciatic nerve sections of VCR-VEH mice with antibodies directed against CCK2R (red), and MBP (green), a marker of myelin sheath. On the merged image, CCK2R labelling was observed around MBP labelling (white arrow). CCK2R: Cholecystokinin type 2 receptor, MBP: Myelin basic protein. Scale bar = 0.05 mm.

### 3.4. CCK2R signaling contributes to VCR-induced allodynia

We next looked to define the relevance of CCK2R in vincristine-induced mechanical allodynia observed in our mouse model, by using two complementary pharmacological tools. Proglumide, a non-selective antagonist of CCK1R and CCK2R, has already been used clinically for its analgesic properties in the 1980's [5,7,42] and is currently in a clinical trial (Phase I) for the management of nonalcoholic fatty liver disease (clinicaltrial.gov, NCT04152473). Ly225910 is a specific CCK2R antagonist, thus far used only in research [29].

As described previously [8], mice in the VCR-VEH group developed a significant mechanical allodynia from D1 to D7 compared with mice in the Ctrl-VEH group (D1:  $p = 0.0146$ ; D3:  $p=0.0055$ ; D5:  $p = 0.0031$ ; D7:  $p = 0.0001$ ). Proglumide, Ly225910 or vehicle (0.1 % DMSO) had no significant effect on mechanical responses in the Ctrl groups at D1, D3, D5 or D7 (data not shown). VCR-administered mice treated with proglumide developed mechanical allodynia at D1, similar to that observed in the VCR-VEH mice, however a significant difference was found between VCR-PRGL and Ctrl-VEH mice only at D1 and D3 (D1  $p = 0.0339$ , D3  $p = 0.0317$ ) (Figure 8). PRGL accelerated the recovery of normal mechanical sensitivity in VCR-administered mice from D5 to D7, with complete restoration at D7 showed by a significant difference in mechanical threshold between VCR-PRGL and VCR-VEH groups ( $p = 0.0012$ ) (Figure 8).

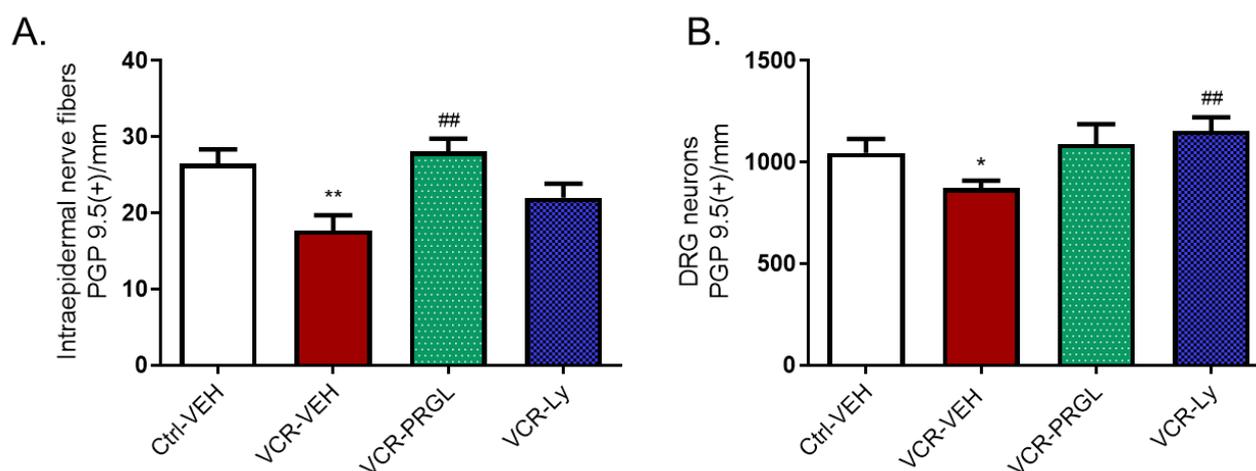
Although the trend was suggestive of a protective effect of Ly225910 on VCR-induced mechanical allodynia at D1, no significant difference in mechanical threshold was observed between VCR-VEH and VCR-Ly mice ( $p = 0.1349$ ). However, Ly225910 treatment restored normal mechanical sensitivity, similar to that of Ctrl-VEH mice and significantly lower than that of VCR-VEH mice, from D3 to D7 (D3:  $p = 0.0017$ , D5:  $p = 0.0008$ , D7:  $p = 0.0002$  VCR-VEH vs VCR-Ly) (Figure 8).



**Figure 8.** Effects of Ly225910 on mechanical allodynia induced by vincristine in mice. Mechanical sensitivity was evaluated using the von Frey filament test at D1 D3, D5 and D7.  $n = 8$  mice per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , VCR-VEH vs Ctrl-VEH. ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$ , VCR-VEH vs VCR-Ly, \$  $p < 0.05$  Ctrl-VEH vs VCR-PRGL, ##  $p < 0.01$  VCR-VEH vs VCR-PRGL, @  $p < 0.05$  VCR-LY vs VCR-PRGL. Ctrl: control, Ly: Ly225910, VEH: vehicle, VCR: vincristine.

### 3.5. CCK2R blockade alleviates the decrease in IENF and DRG neuron densities induced by VCR

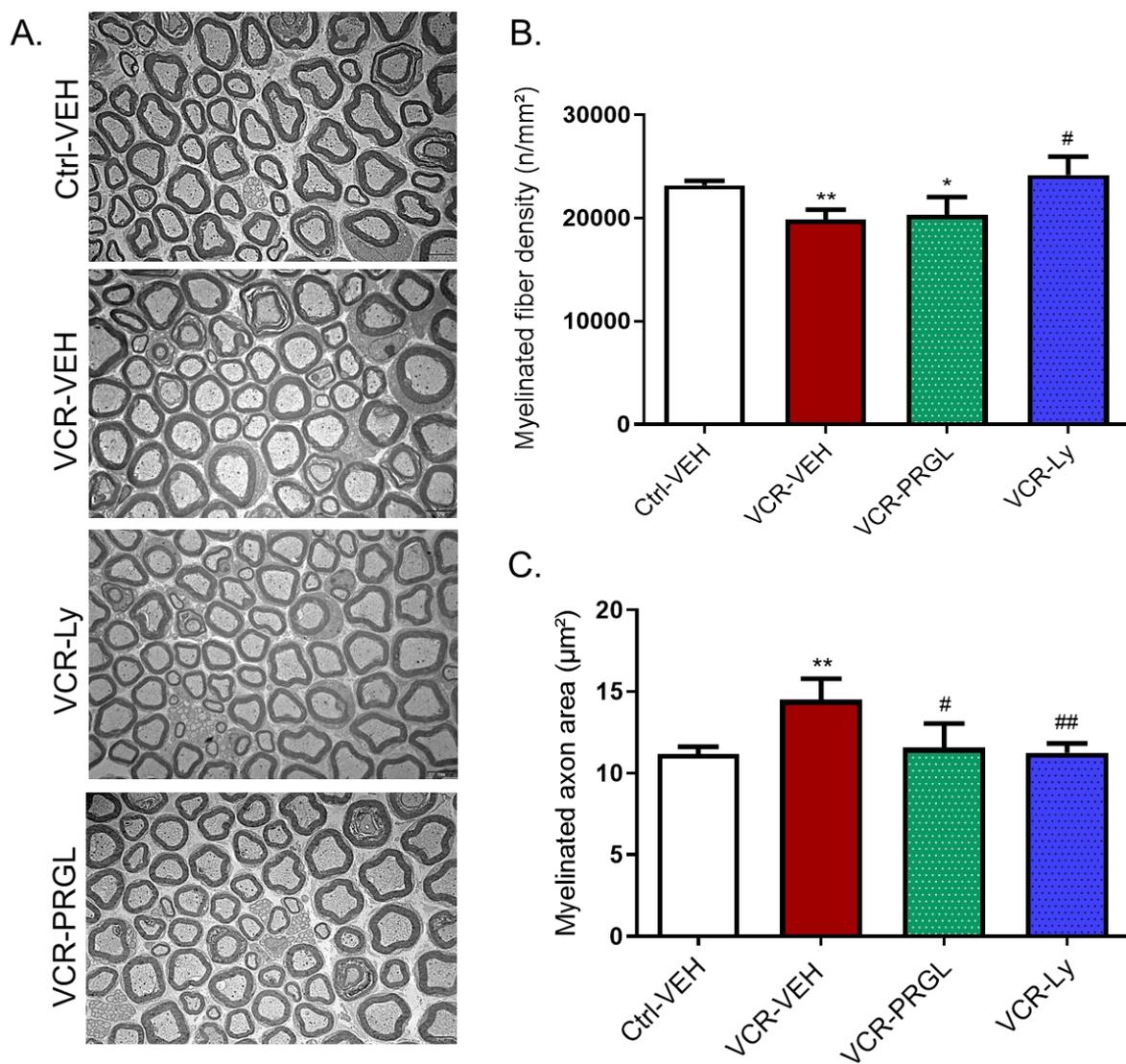
The IENF density was lower in VCR-VEH mice than in Ctrl-VEH mice ( $p = 0.0043$ ). Proglumide and Ly225910 had no effect on IENF and DRG neuron densities in the Ctrl groups (data not shown). However, there was no significant difference in IENF density between Ctrl-VEH mice and VCR-VEH mice treated with PRGL or Ly225910 (Figure 9A). Similarly, the density of DRG neurons was significantly reduced by VCR administration ( $p = 0.0325$  Ctrl-VEH vs VCR-VEH). Treatment with proglumide and Ly225910 prevented the VCR-induced loss of DRG neurons ( $p = 0.0076$ , VCR-Ly vs VCR-VEH) (Figure 9B).



**Figure 9.** Effect of proglumide and Ly225910 on the loss of sensory nerve endings and neurons induced by vincristine in mice. Immunohistochemistry for PGP9.5 was performed on paw skin sections and DRG. (A) Intraepidermal nerve fiber density was assessed. Three sections of paw skin were examined per mouse.  $n = 6$  mice. (B) DRG neuron density was quantified. Three DRG sections and three DRG per mice were counted.  $n = 6$  per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Ctrl-VEH. ## $p < 0.05$  vs VCR-VEH. PGP9.5: protein gene product 9.5. Ctrl: control, Ly: Ly225910, VEH: vehicle, VCR: vincristine, PRGL: proglumide.

### 3.6. Effect of CCK2R blockade on alterations induced by VCR on myelinated nerve fiber density and morphology in sciatic nerves

Proglumide and Ly225910 did not affect the morphology of myelinated or unmyelinated nerve fibers in the sciatic nerves of Ctrl groups, nevertheless there were no notable changes in unmyelinated fiber morphology (Figure 10A) in VCR-VEH mice relative to Ctrl-VEH mice. Quantitative analysis of electron microscopy images showed that VCR treatment significantly decreased myelinated fiber density ( $p = 0.0076$ , Figure 10A and B). This decrease was associated with an increase in myelinated axon area ( $p < 0.01$ , Figure 10A and C). Proglumide and Ly225910 prevented the decrease in myelinated fiber density ( $p = 0.0325$ , Figure 10A) and the increase in myelinated axon area induced by VCR ( $p = 0.0043$ , Figure 10B), such that there was no significant difference between the myelinated axon areas of mice in the Ctrl-VEH, the VCR-Ly and VCR-PRGL groups (Figure 10A and C).

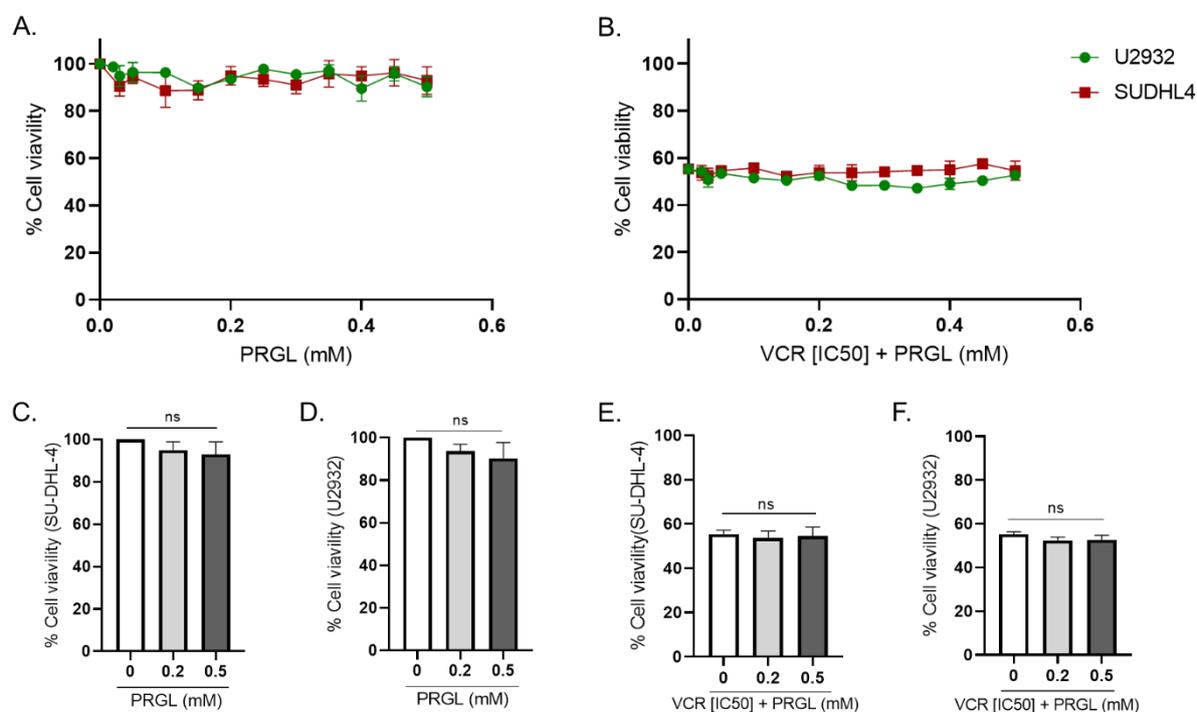


**Figure 10.** Quantitative analysis of sciatic nerves by electron microscopy. (A) Visualization of myelinated fibers in the sciatic nerve. (B) Quantification of myelinated fiber density. (C) Measure of myelinated axon area in the nerve. n=6 per group; \*\*p < 0.01 vs Ctrl-VEH \*\*. #p < 0.05; ##p < 0.01; vs VCR-VEH. Ctrl: control, Ly: Ly225910, VEH: vehicle, VCR: vincristine.

### 3.7. Pharmacological modulation of CCK2R did not alter the anticancer activity of VCR on human lymphoma cell lines

The influence of proglumide and Ly225910 on the anticancer activity of VCR was evaluated using two human diffuse large B-cell lymphoma cells line (SU-DH-L4 and U932) in agreement with VCR use in the clinic for these cancers. Firstly, cell lines were exposed to VCR (from 0 to 2 nM) to assess its cytotoxic efficacy and to determine the [IC50] (1.065 nM for SU-DHL-4 and 0.959 nM for U-2932).

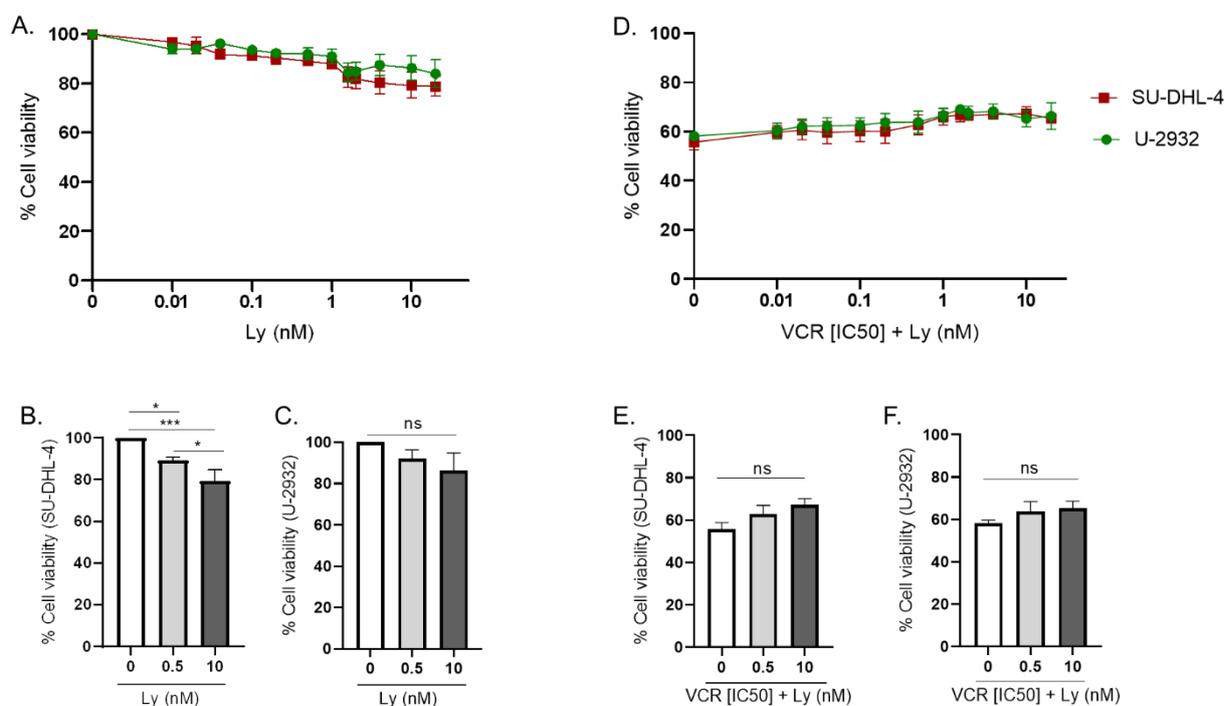
Proglumide alone had no effect on cell viability of both cell lines (Figure 11A, B, and C). In cells treated with VCR at [IC50], combination with proglumide did not significantly affect the anticancer activity of VCR in both cell lines (Figure. 11D, E and F).



**Figure 11.** Effect of the combination of proglumide and VCR on cell viability of human lymphoma cell lines. Cell viability was evaluated using MTT assay at 24 h on two lymphoma cell lines, SU-DHL-4 and U-2932. Cell viability was evaluated with proglumide alone (0.02-0.5 mM), and with VCR at IC50. IC50: half maximal inhibitory concentration, PRGL: proglumide, VCR: vincristine.

Ly225910 alone slightly reduced viability of both cell lines (Figure. 12A, B, and C). In the SU-DHL-4 cell line, Ly225910 alone led to a significant decrease in cell viability of 10.81 % at 0.5 nM ( $p = 0.0136$ , Ly [0.5 nM] vs Ly [0 nM]) and of 20.67 % at 10 nM ( $p = 0.0005$ , Ly [10 nM] vs Ly [0 nM]) (Figure.11 A, B). In the U932 cell line, Ly225910 treatment reduced cell viability by 8 % at 0.5 nM ( $p = 0.4985$ , vs Ly [0 nM]) and by 14 % at 10 nM, and this effect was not statistically significant (Figure. 12A, B and C).

In cells treated with VCR at [IC50], Ly225910 did not significantly affect the anticancer activity of VCR in both cell lines (Figure 12D, E and F) suggesting that CCK2R blockade does not interfere with VCR efficacy.



**Figure 12.** Effect of the combination of Ly225910 and VCR on cell viability of human lymphoma cell lines. Cell viability was evaluated by MTT assay at 24 h on two lymphoma cell lines, SU-DHL-4 and U2932. Cell viability was evaluated with Ly225910 alone (0.001-10 nM), and with VCR at IC50. IC50: half maximal inhibitory concentration, Ly: Ly225910, VCR: vincristine.

#### 4. Discussion

The main findings of this study were that (1) CCK2R is overexpressed, at both the mRNA and protein level, in mouse DRG following VCR exposure, (2) blockade of CCK2R by proglumide or Ly225910 is an effective strategy to reduce mechanical allodynia and prevent sensory nerve fiber damage induced by VCR and, (3) proglumide or Ly225910 in combination with VCR did not adversely affect the anticancer activity of VCR in human cancer cell lines. Moreover, our IHC study showed that CCK2R appeared to be mainly expressed by glial cells such as Schwann cells and satellite glial cells in the peripheral nervous system.

Our understanding of CIPN is complicated by its multifactorial underlying components, including the chemotherapy agent used and the heterogeneity of neuropathic symptoms. Transcriptomic analysis has great potential as an approach to identify potential gene regulatory processes and molecular details that could contribute to neuropathic pain in patients. Here, we aimed to investigate the potential changes in pathways following VCR exposure. Numerous genes involved in nerve regeneration, axonal projection or synaptogenesis were found to be upregulated in mouse DRG in response to VCR, whereas some genes associated with negative regulation of neuron migration were downregulated. The GO-enrichment analysis highlighted that the immune response-associated genes were significantly differentially-expressed in DRG following VCR exposure. These results are in line with those of Starobova *et al.*, 2020, who reported that the regulatory genes associated with the immune system, but not those associated with the neuronal system, were affected by VCR treatment (40 µg/kg), suggesting involvement of a neuroinflammatory mechanism [60]. These authors also reported that two genes that are implicated in axonal regeneration, *Atf3* and *Sprr1a*, were highly upregulated following VCR exposure. These two genes are expressed only after a peripheral nerve injury and were also upregulated in our model [10,56]. Under our experimental conditions, treatment with VCR at a cumulative dose of 800 µg/kg affected the expression of genes associated with the immune response and the neuronal system, suggesting a combination of neuroinflammatory and neuropathic mechanisms being involved as a result of VCR neurotoxicity [63].

This preliminary screening by transcriptomic analysis also confirmed our interest in CCK2R as a potential therapeutic target for preventing VIPN. Indeed, the overexpression of *Cck2r* is noteworthy for several reasons. Firstly, CCK2R is a G-protein-coupled receptor, a major class of proteins that represent a preferred therapeutic target for novel analgesics [6,61]. Secondly, several studies have demonstrated the involvement of CCK2R in the modulation of nociception, notably by central mechanisms [6,37,55]. And finally, several CCK2R antagonists have been

developed and some of these have been shown to successfully alleviate pain in other rodent models [34,38].

CCK2R is preferentially expressed in the gastrointestinal tract and in the central nervous system and is well known for its role in satiety, anxiety and pain [25,73]. Under physiological conditions, CCK2R is expressed at a very low level in the peripheral nervous system, but this expression may be dramatically increased in pathological states [37,75,79]. Our IHC results showed that CCK2R is expressed at a very low level in DRG under physiological conditions but is overexpressed in the case of VCR exposure. In addition, overexpression of CCK2R in DRG has been reported in a rat model of diabetes, suggesting its possible involvement in healing mechanisms after toxic nerve injury [33]. Moreover, CCK2R seems to be preferentially expressed in glial cells, such as satellite glial cells and Schwann cells, cell types well-known for their role in maintenance and repair of peripheral nerves. Thus, the localization and regulation of CCK2R support its possible involvement in neuroprotection/neuroregeneration processes.

Subsequently, based on our transcriptomic/IHC results and literature, we took a pharmacological to block CCK2R in the mouse model of VCR-induced neuropathy. Daily administration of proglumide did not prevent the onset of mechanical allodynia induced by VCR but did accelerate the recovery of normal mechanical sensitivity in VCR-administered mice. Recently, it has been shown that proglumide reduced mechanical allodynia in a rat model of burn-induced pain [75]. Analgesic effects of proglumide have already been described in other preclinical and human pain models, such as post-operative pain, burn-induced pain and neuropathic pain. In these reports, proglumide was administered alone or in combination with morphine or other opioids. Even though some studies showed negative effects [24,35,43], co-administration of proglumide with opioids generally potentiated its anti-nociceptive effect and prevented morphine tolerance [5,7,42,47,66]. The interaction of CCK/morphine systems takes

place at the supraspinal, spinal and also the peripheral level, as has been highlighted in a diabetic rat model [65]. Under our experimental conditions, proglumide alone showed analgesic properties on VCR-induced mechanical pain, as has been previously shown in a burn-induced pain model cited above [75].

Proglumide is a nonselective antagonist of CCK1R and CCK2R. CCK2R is the most highly expressed receptor in the mouse nervous system [58] and was also overexpressed in the DRG of VCR-exposed mice. Thus, in order to evaluate the specific effect of CCK2R blockade, mice exposed to VCR were treated with Ly225910. Pretreatment with Ly225910 totally prevented the onset of VCR associated-mechanical allodynia. Several studies have already demonstrated that blockade of CCK2R was beneficial for pain treatment [6,37,55]. A study in CCK2R-deficient mice suggested that mechanical sensitivity as well as the development of neuropathic pain are regulated by antagonistic interactions between CCK receptors and opioid receptors. Indeed, CCK2R is able to dimerize with the opioid receptor MOR [73]. Once activated, CCK2R forms heterodimers with MOR, preventing the binding of opioids to their receptor, thus blocking their analgesic effect. In addition, CCK2R can inhibit transient type-A K<sup>+</sup> channels [76]. In DRG neurons, activation of CCK2R by its ligand, CCK-8, induced a decrease in type-A K<sup>+</sup> currents, and involved the PI3K/SRC/JNK pathway. Voltage-dependent potassium channels (K<sub>v</sub>) play a major role in the excitability of primary sensory neurons by promoting the repolarization step during the generation of action potentials. The decrease in type A K<sup>+</sup> current increases neuronal excitability [68], and in this way leads to hypersensitivity and thermal hyperalgesia [16,18,19,64]. A reduction in K<sub>v</sub> activity is associated with an increase in the frequency and duration of action potentials resulting in membrane hyperexcitability [77]. Therefore, specific blockade of CCK2R could inhibit this reduction in K<sup>+</sup> current, DRG neuron hyperexcitability and thus reduce pain.

Functional results in this study were reinforced by histological analysis. Both proglumide and Ly225910 were able to block all neuronal damage caused by VCR neurotoxicity. The loss of IENF, the decrease in myelinated fiber density, and the swelling in myelinated fibers were all inhibited by both proglumide and Ly225910. Therefore, under our experimental conditions, the inhibition of the CCK system by proglumide and the specific blockade of CCK2R by Ly225910 showed analgesic properties, in agreement with observations made in other neuropathic pain models. The neuroprotective effects obtained in our model have not been previously described to our knowledge. Several hypotheses could explain this neuroprotective/neuroregenerative effect. Activation of microglia and astrocytes in the spinal cord during VCR exposure has been suggested to lead to cytokine release, thus maintaining neuropathic pain by inflammatory mechanisms [32,36]. Blockade of the CCK system may be anti-inflammatory, preventing neuroinflammation and consequently hyperexcitability of the sensory nervous system induced by VCR exposure. This anti-inflammatory effect of CCK blockade has already been shown in a model of chronic pancreatitis treated with proglumide [52]. CCK2R is a G-coupled protein predominantly coupled with the Gq protein. Activation of Gq results in a massive  $Ca^{++}$  efflux from intracellular calcium endoplasmic reticulum stores, leading to increased neuron excitability. Overall activation of CCK2R, and thus rapid and repeated mobilization of intracellular  $Ca^{++}$ , contributes to excitotoxic conditions and neuronal degeneration [21]. Blockade of CCK2R, that is upregulated in DRG by VCR, may protect against this excitotoxicity.

In addition to analgesic and neuroprotective properties, the use of proglumide and Ly225910 did not seem to alter the anticancer activity of VCR. Indeed, *in vitro* experiments were performed on human lymphoma cell lines treated with VCR showed that simultaneous administration of proglumide or Ly225910 with VCR did not reduce the cytotoxicity of VCR.

Further studies on VCR-treated animals bearing cancers are now required to confirm these effects are reproduced in vivo.

In addition to proglumide, and staying with the idea of drug repurposing, several more selective CCK2R antagonists have recently emerged and may be good candidates to prevent VIPN. Among these, netazepide (Trio Medicine Ltd.) or YF476, is well tolerated in humans [13], and has been the subject of several clinical trials, notably in the management of gastric neuroendocrine tumors (clinicaltrials.gov NCT01339169) [46]. In conclusion, targeting CCK2R may represent an effective strategy for preventing the onset of VCR-induced neuropathic pain, thus improving both patient quality of life and rates of cancer survival.

## 5. Acknowledgements

This study was supported by research funding from the Cancéropôle Grand-Sud-Ouest “Projet Emergent 2020”. Dr. Claire Demiot is a member of the French Neurosychopharmacology Consortium of the SFPT (“Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique”).

## 6. References

- [1] Abuirmeileh A, Lever R, Kingsbury AE, Lees AJ, Locke IC, Knight RA, Chowdrey HS, Biggs CS, Whitton PS. The corticotrophin-releasing factor-like peptide urocortin reverses key deficits in two rodent models of Parkinson’s disease. *Eur J Neurosci* 2007;26:417–423.
- [2] Argyriou AA, Bruna J, Marmioli P, Cavaletti G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Critical reviews in oncology/hematology* 2012;82. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.04.012.
- [3] Authier N, Balayssac D, Marchand F, Ling B, Zangarelli A, Descoeur J, Coudore F, Bourinet E, Eschalier A. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2009;6. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.003.
- [4] Ballaz SJ, Akil H, Watson SJ. The CCK-system mediates adaptation to novelty-induced stress in the rat: A pharmacological evidence. *Neuroscience Letters* 2007;428:27–32.

- [5] Benedetti F, Amanzio M, Thoen W. Disruption of opioid-induced placebo responses by activation of cholecystinin type-2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;213:791–797.
- [6] Bernard A, Danigo A, Bourthoumieu S, Mroué M, Desmoulière A, Sturtz F, Rovini A, Demiot C. The Cholecystinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14:1185.
- [7] Bernstein ZP, Yucht S, Battista E, Lema M, Spaulding MB. Proglumide as a Morphine Adjunct in Cancer Pain Management. *Journal of Pain and Symptom Management* 1998;15:314–320.
- [8] Bessaguet F, Danigo A, Bouchenaki H, Duchesne M, Magy L, Richard L, Sturtz F, Desmoulière A, Demiot C. Neuroprotective effect of angiotensin II type 2 receptor stimulation in vincristine-induced mechanical allodynia. *Pain* 2018;159:2538–2546.
- [9] Bessaguet F, Danigo A, Bouchenaki H, Duchesne M, Magy L, Richard L, Sturtz F, Desmoulière A, Demiot C. Neuroprotective effect of angiotensin II type 2 receptor stimulation in vincristine-induced mechanical allodynia. *Pain* 2018;159:2538–2546.
- [10] Bonilla IE, Tanabe K, Strittmatter SM. Small Proline-Rich Repeat Protein 1A Is Expressed by Axotomized Neurons and Promotes Axonal Outgrowth. *J Neurosci* 2002;22:1303–1315.
- [11] Bonin RP, Bories C, De Koninck Y. A Simplified Up-Down Method (SUDO) for Measuring Mechanical Nociception in Rodents Using von Frey Filaments. *Mol Pain* 2014;10:1744-8069-10–26.
- [12] Bouchenaki H, Danigo A, Bernard A, Bessaguet F, Richard L, Sturtz F, Balayssac D, Magy L, Demiot C. Ramipril Alleviates Oxaliplatin-Induced Acute Pain Syndrome in Mice. *Front Pharmacol* 2021;12:712442.
- [13] Boyce M, Downen S, Turnbull G, van den Berg F, Zhao C-M, Chen D, Black J. Effect of netazepide, a gastrin/CCK2 receptor antagonist, on gastric acid secretion and rabeprazole-induced hypergastrinaemia in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79:744–755.
- [14] Brosius Lutz A, Lucas TA, Carson GA, Caneda C, Zhou L, Barres BA, Buckwalter MS, Sloan SA. An RNA-sequencing transcriptome of the rodent Schwann cell response to peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 2022;19:105.
- [15] Cao S, Yuan J, Zhang D, Wen S, Wang J, Li Y, Deng W. Transcriptome Changes In Dorsal Spinal Cord Of Rats With Neuropathic Pain. *J Pain Res* 2019;12:3013–3023.
- [16] Cao X-H, Byun H-S, Chen S-R, Cai Y-Q, Pan H-L. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 2010;114:1460–1475.
- [17] Cao Y, Lipka J, Stucchi R, Burute M, Pan X, Portegies S, Tas R, Willems J, Will L, MacGillavry H, Altelaar M, Kapitein LC, Harterink M, Hoogenraad CC. Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 and Kinesin-14 Motor KIFC3 Control Dendritic Microtubule Organization. *Current Biology* 2020;30:899-908.e6.

- [18] Chi XX, Nicol GD. Manipulation of the potassium channel Kv1.1 and its effect on neuronal excitability in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 2007;98:2683–2692.
- [19] Chien L-Y, Cheng J-K, Chu D, Cheng C-F, Tsaur M-L. Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci* 2007;27:9855–9865.
- [20] Colvin LA. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): where are we now? *Pain* 2019;160:S1–S10.
- [21] Dong X, Wang Y, Qin Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:379–387.
- [22] Duda S, Witte T, Stangel M, Adams J, Schmidt RE, Baerlecken NT. Autoantibodies binding to stathmin-4: new marker for polyneuropathy in primary Sjögren's syndrome. *Immunol Res* 2017;65:1099–1102.
- [23] Ferraro GB, Morrison CJ, Overall CM, Strittmatter SM, Fournier AE. Membrane-type matrix metalloproteinase-3 regulates neuronal responsiveness to myelin through Nogo-66 receptor 1 cleavage. *J Biol Chem* 2011;286:31418–31424.
- [24] Friedrich AE, Gebhart GF. Effects of spinal cholecystinin receptor antagonists on morphine antinociception in a model of visceral pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:538–544.
- [25] Greenough A, Cole G, Lewis J, Lockton A, Blundell J. Untangling the effects of hunger, anxiety, and nausea on energy intake during intravenous cholecystinin octapeptide (CCK-8) infusion. *Physiol Behav* 1998;65:303–310.
- [26] Guo L, Hamre J III, Eldridge S, Behrsing HP, Cutuli FM, Mussio J, Davis M. Editor's Highlight: Multiparametric Image Analysis of Rat Dorsal Root Ganglion Cultures to Evaluate Peripheral Neuropathy-Inducing Chemotherapeutics. *Toxicological Sciences* 2017;156:275–288.
- [27] Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EMC. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003;300:808–812.
- [28] Hilario JD, Rodino-Klapac LR, Wang C, Beattie CE. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. *Dev Biol* 2009;326:190–200.
- [29] Hill D, Horwell DC, Hunter JC, Kneen CO, Pritchard MC, Suman-Chauhan N. Synthesis of a potent and selective non-peptide CCK-B/gastrin receptor antagonist tritiated ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1993;3:885–888.
- [30] Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 1995;284:321–325.

- [31] Jackson DV, Castle MC, Poplack DG, Bender RA. Pharmacokinetics of vincristine in the cerebrospinal fluid of subhuman primates. *Cancer Res* 1980;40:722–724.
- [32] Ji X-T, Qian N-S, Zhang T, Li J-M, Li X-K, Wang P, Zhao D-S, Huang G, Zhang L, Fei Z, Jia D, Niu L. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *PLoS One* 2013;8:e60733.
- [33] Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Díaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Torres-López JE. Involvement of cholecystokinin in peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response. *Pain* 2006;122:118–125.
- [34] Kamei J, Zushida K. The role of spinal cholecystokinin B receptors in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Research* 2001;892:370–375.
- [35] Kellstein DE, Mayer DJ. Chronic administration of cholecystokinin antagonists reverses the enhancement of spinal morphine analgesia induced by acute pretreatment. *Brain Res* 1990;516:263–270.
- [36] Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S. Involvement of inflammatory mediators in neuropathic pain caused by vincristine. *Int Rev Neurobiol* 2009;85:179–190.
- [37] Kim J, Kim JH, Kim Y, Cho H, Hong SK, Yoon YW. Role of spinal cholecystokinin in neuropathic pain after spinal cord hemisection in rats. *Neuroscience Letters* 2009;462:303–307.
- [38] Kim J, Kim JH, Kim Y, Cho H, Hong SK, Yoon YW. Role of spinal cholecystokinin in neuropathic pain after spinal cord hemisection in rats. *Neuroscience Letters* 2009;462:303–307.
- [39] Kiryu-Seo S, Nagata K, Saido TC, Kiyama H. New Insights of a Neuronal Peptidase DINE/ECEL1: Nerve Development, Nerve Regeneration and Neurogenic Pathogenesis. *Neurochem Res* 2019;44:1279–1288.
- [40] Kreko-Pierce T, Pugh JR. Altered Synaptic Transmission and Excitability of Cerebellar Nuclear Neurons in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2022;16. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.926518>. Accessed 4 Aug 2022.
- [41] Kuo T-Y, Hong C-J, Hsueh Y-P. Bcl11A/CTIP1 regulates expression of DCC and MAP1b in control of axon branching and dendrite outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2009;42:195–207.
- [42] Lavigne GJ, Hargreaves KM, Schmidt EA, Dionne RA. Proglumide potentiates morphine analgesia for acute postsurgical pain. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:666–673.
- [43] Lehmann KA, Schlüsener M, Arabatsis P. Failure of proglumide, a cholecystokinin antagonist, to potentiate clinical morphine analgesia. A randomized double-blind postoperative study using patient-controlled analgesia (PCA). *Anesth Analg* 1989;68:51–56.

- [44] Léna I, Dhôtel H, Garbay C, Daugé V. Involvement of D 2 dopamine receptors in the opposing effects of two CCK-B agonists in a spatial recognition memory task: role of the anterior nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 2001;153:170–179.
- [45] Leung T, Rajendran R, Singh S, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) regulates the response to oxidative stress and migration of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2013;15:R107.
- [46] Lloyd KA, Parsons BN, Burkitt MD, Moore AR, Papoutsopoulou S, Boyce M, Duckworth CA, Exarchou K, Howes N, Rainbow L, Fang Y, Oxvig C, Dodd S, Varro A, Hall N, Pritchard DM. Netazepide Inhibits Expression of Pappalysin 2 in Type 1 Gastric Neuroendocrine Tumors. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;10:113–132.
- [47] McCleane GJ. The cholecystokinin antagonist proglumide enhances the analgesic efficacy of morphine in humans with chronic benign pain. *Anesth Analg* 1998;87:1117–1120.
- [48] Meng F-W, Jing X-N, Song G-H, Jie L-L, Shen F-F. Prox1 induces new lymphatic vessel formation and promotes nerve reconstruction in a mouse model of sciatic nerve crush injury. *Journal of Anatomy* 2020;237:933–940.
- [49] Meyer zu Hörste G, Heidenreich H, Mausberg AK, Lehmann HC, ten Asbroek ALMA, Saavedra JT, Baas F, Hartung H-P, Wiendl H, Kieseier BC. Mouse Schwann cells activate MHC class I and II restricted T-cell responses, but require external peptide processing for MHC class II presentation. *Neurobiol Dis* 2010;37:483–490.
- [50] Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 2005;8:745–751.
- [51] Mietto BS, Jhelum P, Schulz K, David S. Schwann Cells Provide Iron to Axonal Mitochondria and Its Role in Nerve Regeneration. *J Neurosci* 2021;41:7300–7313.
- [52] Nadella S, Ciofoaia V, Cao H, Kallakury B, Tucker RD, Smith JP. Cholecystokinin Receptor Antagonist Therapy Decreases Inflammation and Fibrosis in Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2020;65:1376–1384.
- [53] Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 2020;18:e3000411.
- [54] Rivat C, Sar C, Mechaly I, Leyris J-P, Diouloufet L, Sonrier C, Philipson Y, Lucas O, Mallié S, Jouvenel A, Tassou A, Haton H, Venteo S, Pin J-P, Trinquet E, Charrier-Savournin F, Mezghrani A, Joly W, Mion J, Schmitt M, Pattyn A, Marmigère F, Sokoloff P, Carroll P, Rognan D, Valmier J. Inhibition of neuronal FLT3 receptor tyrosine kinase alleviates peripheral neuropathic pain in mice. *Nat Commun* 2018;9:1042.

- [55] Roca-Lapirot O, Fossat P, Ma S, Egron K, Trigilio G, López-González M-J, Covita J, Bouali-Benazzouz R, Favereaux A, Gundlach AL, Landry M. Acquisition of analgesic properties by the cholecystokinin (CCK)/CCK2 receptor system within the amygdala in a persistent inflammatory pain condition: *PAIN* 2019;160:345–357.
- [56] Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ. ATF3 Increases the Intrinsic Growth State of DRG Neurons to Enhance Peripheral Nerve Regeneration. *Journal of Neuroscience* 2007;27:7911–7920.
- [57] Silva A, Wang Q, Wang M, Ravula SK, Glass JD. Evidence for direct axonal toxicity in vincristine neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:211–216.
- [58] Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, Oksvold P, Edfors F, Limiszewska A, Hikmet F, Huang J, Du Y, Lin L, Dong Z, Yang L, Liu X, Jiang H, Xu X, Wang J, Yang H, Bolund L, Mardinoglu A, Zhang C, von Feilitzen K, Lindskog C, Pontén F, Luo Y, Hökfelt T, Uhlén M, Mulder J. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* 2020;367:eaay5947.
- [59] Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Current Review. *Ann Neurol* 2017;81:772–781.
- [60] Starobova H, Mueller A, Deuis JR, Carter DA, Vetter I. Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice. *The Journal of Pain* 2020;21:182–194.
- [61] Stone LS, Molliver DC. In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Mol Interv* 2009;9:234–251.
- [62] Sun C, Wu G, Zhang Z, Cao R, Cui S. Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D Regulates Neuropathic Pain After Nerve Injury via the STING-IFN-I Pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2022;15. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.859166>. Accessed 5 Aug 2022.
- [63] Sun W, Yang S, Wu S, Ba X, Xiong D, Xiao L, Hao Y. Transcriptome analysis reveals dysregulation of inflammatory and neuronal function in dorsal root ganglion of paclitaxel-induced peripheral neuropathy rats. *Mol Pain* 2022:17448069221106168.
- [64] Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* 2011;7:5.
- [65] Torres-López JE, Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Diaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Ortíz-López JUS, Cruz-Vera J. Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology* 2007;52:788–795.
- [66] Tortorici V, Nogueira L, Salas R, Vanegas H. Involvement of local cholecystokinin in the tolerance induced by morphine microinjections into the periaqueductal gray of rats. *Pain* 2003;102:9–16.

- [67] Ugarte SD, Homanics GE, Firestone LL, Hammond DL. Sensory thresholds and the antinociceptive effects of GABA receptor agonists in mice lacking the  $\beta 3$  subunit of the GABAA receptor. *Neuroscience* 1999;95:795–806.
- [68] Vydyanathan A, Wu Z-Z, Chen S-R, Pan H-L. A-type voltage-gated K<sup>+</sup> currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not isolectin B4-negative primary sensory neurons. *J Neurophysiol* 2005;93:3401–3409.
- [69] Wang J, Xu W, Kong Y, Huang J, Ding Z, Deng M, Guo Q, Zou W. SNAP-25 Contributes to Neuropathic Pain by Regulation of VGLuT2 Expression in Rats. *Neuroscience* 2019;423:86–97.
- [70] Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008;13:27–46.
- [71] Wu Y, Fu Q, Huang X, Luo Y, Wan S, Peng M, Su S, Xu X, Li Y, Li X, Sun D, Ke C. NWD1 facilitates synaptic transmission and contributes to neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2022;205:108919.
- [72] Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. Role of cholecystokinin-B receptor in the maintenance of thermal hyperalgesia induced by unilateral constriction injury to the sciatic nerve in the rat. *Neuroscience Letters* 1995;202:89–92.
- [73] Yang Y, Li Q, He Q-H, Han J, Su L, Wan Y. Heteromerization of  $\mu$ -opioid receptor and cholecystokinin B receptor through the third transmembrane domain of the  $\mu$ -opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystokinin octapeptide. *Experimental & Molecular Medicine* 2018;50:64.
- [74] Yang Y, Li Q, He Q-H, Han J-S, Su L, Wan Y. Heteromerization of  $\mu$ -opioid receptor and cholecystokinin B receptor through the third transmembrane domain of the  $\mu$ -opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystokinin octapeptide. *Exp Mol Med* 2018;50:64.
- [75] Yin K, Deuis JR, Lewis RJ, Vetter I. Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystokinin 2 receptor as an analgesic target. *Mol Pain* 2016;12.
- [76] Yu S, Zhang Y, Zhao X, Chang Z, Wei Y, Sun Y, Jiang D, Jiang X, Tao J. Cholecystokinin Type B Receptor-Mediated Inhibition of  $\alpha$ -Type K<sup>+</sup> Channels Enhances Sensory Neuronal Excitability Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase and C-Src-Dependent Jnk Pathway. *Cell Commun Signal* 2019;17. doi:10.1186/s12964-019-0385-8.
- [77] Zemel BM, Ritter DM, Covarrubias M, Muqem T. A-Type KV Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons: Diversity, Function, and Dysfunction. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018;11. Available: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00253>. Accessed 31 May 2022.
- [78] Zhang D-Y, Yu K, Yang Z, Liu X-Z, Ma X-F, Li Y-X. Variation in expression of small ubiquitin-like modifiers in injured sciatic nerve of mice. *Neural Regen Res* 2019;14:1455–1461.

- [79] Zhang X, Dagerlind A, Elde RP, Castel MN, Broberger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T. Marked increase in cholecystokinin B receptor messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neuroscience* 1993;57:227–233.

## III.4. Effet du NTZ dans la prévention des neuropathies périphériques induites par la VCR et le PTX

### III.4.1. Introduction

Récemment, nous avons mis en évidence une surexpression génique de *Cck2r* dans notre modèle de neuropathie périphérique. L'utilisation d'antagoniste de CCK2R, le proglumide (antagoniste non-spécifique de CCK2R) et le Ly225910 (antagoniste spécifique du CCK2R) a permis de prévenir le développement de la NPV. Le blocage de ce récepteur a également montré des effets neuroprotecteurs sur ce modèle empêchant la perte en FNIE dans la peau, en fibres myélinisées dans les nerfs sciatiques et en neurones dans les GS.

Outre le proglumide et Ly225910, plusieurs autres antagonistes de CCK2R ont vu le jour. Parmi eux, le NTZ (Trio Medecine Ltd.) ou YF476, a fait l'objet de plusieurs essais cliniques, notamment dans la prise en charge des tumeurs gastriques neuroendocrines (clinicaltrial.gov NCT01339169) (Moore et al., 2013) et est bien toléré chez l'Homme (Boyce et al., 2012). Cette molécule a l'avantage d'être plus spécifique vis-à-vis des CCK2R que le proglumide et d'être administrable chez l'Homme contrairement au Ly225910 (antagoniste CCK2R) utilisé seulement en recherche. De plus, son effet anticancéreux potentiel pourrait être un atout majeur pour la prise en charge des NPIC.

La VCR et le PTX étant deux poisons du fuseau mitotique, nous avons décidé avec le soutien de TrioMedecines Ltd (Angleterre, Dr Boyce), d'évaluer l'effet analgésique et neuroprotecteur du NTZ dans notre modèle de NPV et dans notre modèle de NPIC, dans lequel nous avons préalablement évalué la surexpression de *Cck2r* dans les GS.

Dans ce contexte, nous pensons que le blocage de CCK2R pourrait être une stratégie efficace pour prévenir le développement de la douleur neuropathique induite par la VCR et le PTX, et ainsi améliorer la qualité de vie du patient et ses chances de survie face au cancer. Nous avons vérifié la surexpression de *Cck2r* dans les GS de souris exposées au PTX. Nos modèles murins de NPV et de NPIC, développent des allodynies tactiles sans modification des performances motrices associées à une dégénérescence des nerfs sensitifs (Bessaguet et al., 2018; Bouchenaki et al., 2022). Après avoir confirmé la surexpression de *Cck2r*, nous avons évalué l'effet du NTZ dans nos deux modèles d'un point de vue fonctionnel et morphologique. En plus de ces

études *in vivo*, nous avons évalué les effets du NTZ en association avec le PTX sur la viabilité de deux lignées humaines de cancer du sein et du poumon.

### III.4.2. Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée en suivant les protocoles présentés dans la partie **Protocoles expérimentaux** (modèle NPIV, cf. III.1.3.3. **Protocole 3**; modèle NPIP cf. III.1.3.4. **Protocole 4**). Comme détaillé précédemment :

- la NPIV a été induite par une injection quotidienne de VCR pendant 7 jours (groupe VCR-VEH), le NTZ a été administré en gavage, 1 jour avant la première injection de VCR, à 2 mg/kg (VCR-NTZ 2 mg/kg) ou 5 mg/kg (VCR-NTZ 5 mg/kg).
- La NPIP a été induite par un total de quatre injections de PTX réalisées tous les 2 jours (groupe PTX-VEH), le NTZ a été administré en gavage, 1 jour avant la première injection de PTX, à 2 mg/kg (PTX-NTZ 2 mg/kg)

### III.4.3. Résultats

#### III.4.3.1. L'ARNm de *CCK2R* est surexprimé dans les GS des souris exposées au PTX

L'analyse quantitative de l'expression de *Cck2r* dans les GS prélevés au jour de la dernière (J6) injection de PTX a montré que l'expression de *Cck2r* était significativement plus élevée dans le groupe PTX par rapport au groupe Ctrl à J6 ( $p = 0,0143$ ) (Figure 22).

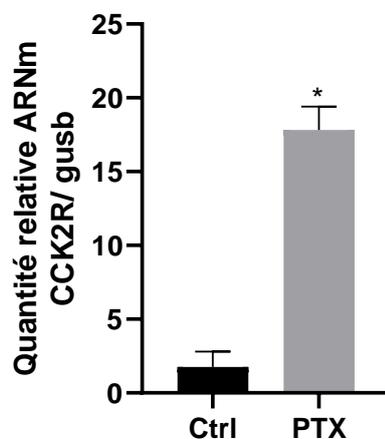


Figure 22. Expression relative en ARNm de *Cck2r* après la dernière injection de PTX à J6. L'expression relative de *Cck2r* par RT-PCRq a été calculé selon la méthode des  $\Delta\text{Ct}$  et normalisée en fonction de l'expression de *Gusb*.  $n = 4$ .

### III.4.3.2. Le NTZ à 2 et 5 mg/kg prévient l'allodynie mécanique induite par la VCR et le PTX

Au jour de référence (JR), aucune différence n'est observée entre les différents groupes. Le NTZ et son véhicule (50 % PEG 300, 40 % solution saline, 10 % DMSO) n'affecte pas la sensibilité tactile des groupes Ctrl aux différents temps (données non présentées).

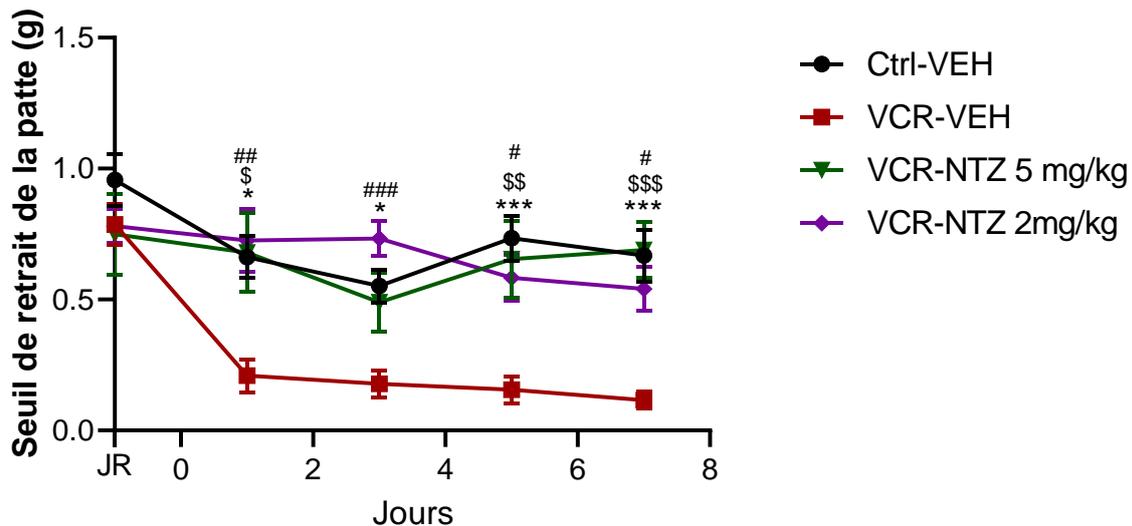


Figure 23. Effets du NTZ sur l'allodynie mécanique induit par la VCR chez la souris.

La sensibilité tactile a été évaluée à l'aide des filaments de von Frey à J1, J3, J5 et J7. n = 10 par groupe, \* p<0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, VCR-VEH vs Ctrl-VEH. \$ p<0,05, \$\$ p < 0,01, \$\$\$ p < 0,001, VCR-VEH vs VCR-NTZ 5 mg/kg, # p<0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 VCR-VEH vs VCR-NTZ 2 mg/kg. Ctrl : control, NTZ : nétazépide, VEH : véhicule, VCR : vincristine.

Les souris du groupe VCR-VEH ont développé une allodynie tactile significative de J1 à J7 par rapport aux souris Ctrl-VEH (J1: p = 0,0171; J3: p=0,0279; J5: p = 0,0001; J7: p = 0,0003). Les souris ayant reçu du NTZ seul n'ont pas développé d'allodynie tactile. Le NTZ à 5 mg/kg a rétabli une sensibilité mécanique normale similaire à celle des souris Ctrl-VEH et significativement inférieure aux souris n'ayant pas reçu de NTZ de J1 à J7 (J1 : p = 0,0165, J5 : p = 0,0023, J7 : p = 0,0003 VCR-VEH vs VCR-NTZ 5 mg/kg). Des résultats similaires ont été obtenus avec une dose plus faible de 2 mg/kg (D1 : p = 0,0065, D3 : p = 0,0005, D5 : p = 0,0125, D7 : p = 0,0132 VCR-VEH vs VCR-NTZ 2 mg/kg) (Figure 23).

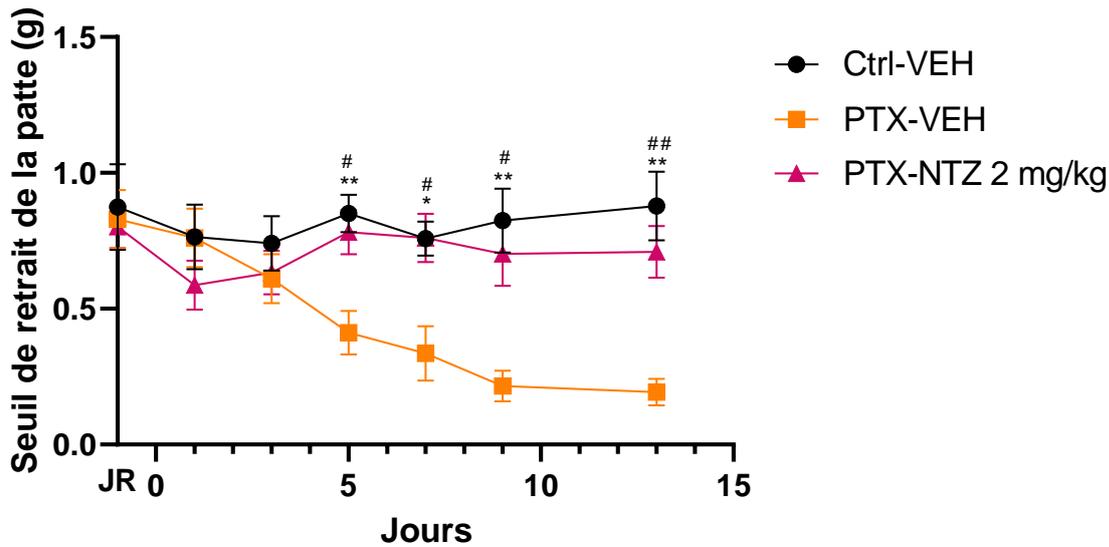


Figure 24. Effets du NTZ sur l'allodynie mécanique induit par le PTX chez la souris. La sensibilité tactile a été évaluée à l'aide des filaments de von Frey à J1, J3, J5, J7, J9 et J13.  $n = 8$  par groupe, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , PTX-VEH vs Ctrl-VEH. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , PTX-VEH vs PTX-NTZ 2 mg/kg. Ctrl : control, NTZ : nétazépide, PTX : paclitaxel, VEH : véhicule.

Les souris du groupe PTX-VEH ont développé une allodynie tactile significative de J5 à J13 par rapport au groupe Ctrl-VEH (J5 :  $p = 0,005$ , J7 :  $p = 0,0177$ , J9 :  $p = 0,004$ , J13 :  $p = 0,0078$ ). Les souris du groupe PTX-NTZ n'ont pas développé d'allodynie tactile, leur seuil de sensibilité était équivalent à celui du groupe Ctrl-VEH. Les souris n'ayant pas reçu de traitement au NTZ et exposées au PTX ont un seuil de sensibilité tactile significativement inférieur à celle ayant reçu ce même traitement (J5 :  $p = 0,0275$ , J7 :  $p = 0,0331$ , J9 :  $p = 0,0177$ , J13 :  $p = 0,0029$ ) (Figure 24).

#### III.4.3.3. Le NTZ restaure la densité en FNIE et la densité en neurones dans les GS

Le NTZ à 2 ou 5 mg/kg n'a eu aucun effet sur la densité des FNIE et des neurones des GS dans les groupes Ctrl (données non présentées).

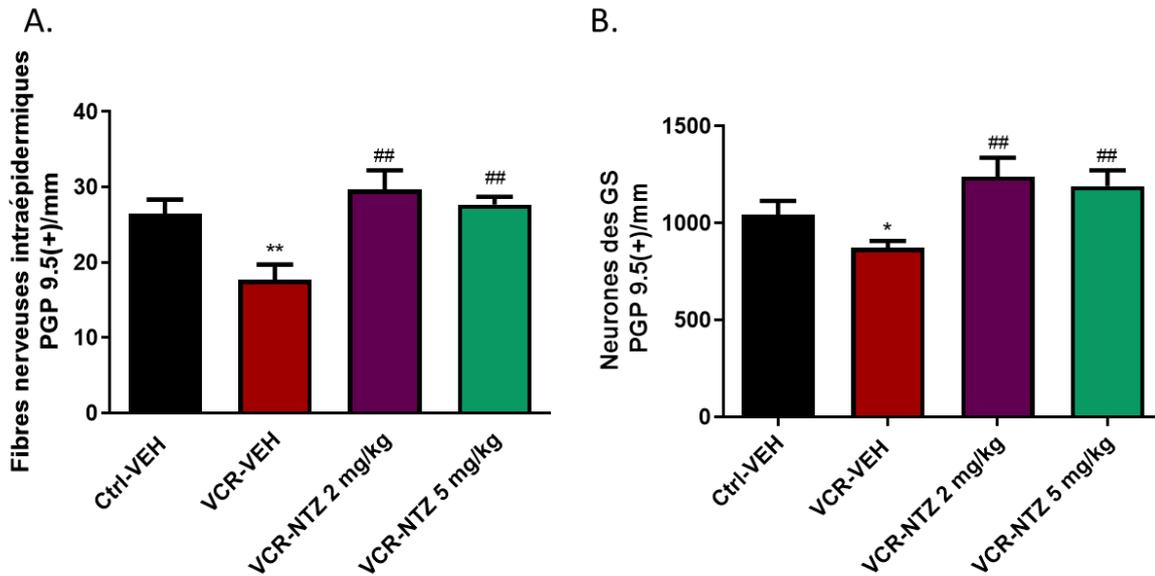


Figure 25. Effets du nétazépide sur la perte des terminaisons nerveuses sensibles et des neurones des GS induit par la VCR.

Une immunohistochimie pour la PGP9.5 a été réalisée sur des coupes de peau de patte et de GS: (A) Densité des FNIE, trois coupes de peau de patte ont été examinées par souris. n = 6 souris. (B) Densité des neurones des GS, trois coupes de GS par souris ont été comptées. n = 6 par groupe. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 vs Ctrl-VEH. ##p < 0,05 vs VCR-VEH. Ctrl : control, FNIE : fibre nerveuses intraépidermique, NTZ : nétazépide, PGP9.5 : protein gene product 9.5, VEH : véhicule, VCR : vincristine.

La densité des FNIE était plus faible chez les souris VCR-VEH que chez les souris Ctrl-VEH (p = 0,0043). Cependant, il n'y avait pas de différence significative de la densité des FNIE entre les souris Ctrl-VEH et les souris VCR traitées par NTZ à 2 ou 5 mg/kg (NTZ 5 mg/kg : p = 0,2944 ; NTZ 2 mg/kg : p = 0,2143) (Figure 25 A). De même, la densité des neurones des GS était significativement réduite par l'administration de VCR (p = 0,0325 Ctrl-VEH vs VCR-VEH, Figure 25 B). Le traitement par NTZ a empêché la perte de neurones des GS induite par la VCR (p = 0,0022, VCR-NTZ 5 mg/kg vs VCR-VEH, p = 0,0152, VCR-NTZ 2 mg/kg vs VCR-VEH) (Figure 25 B).

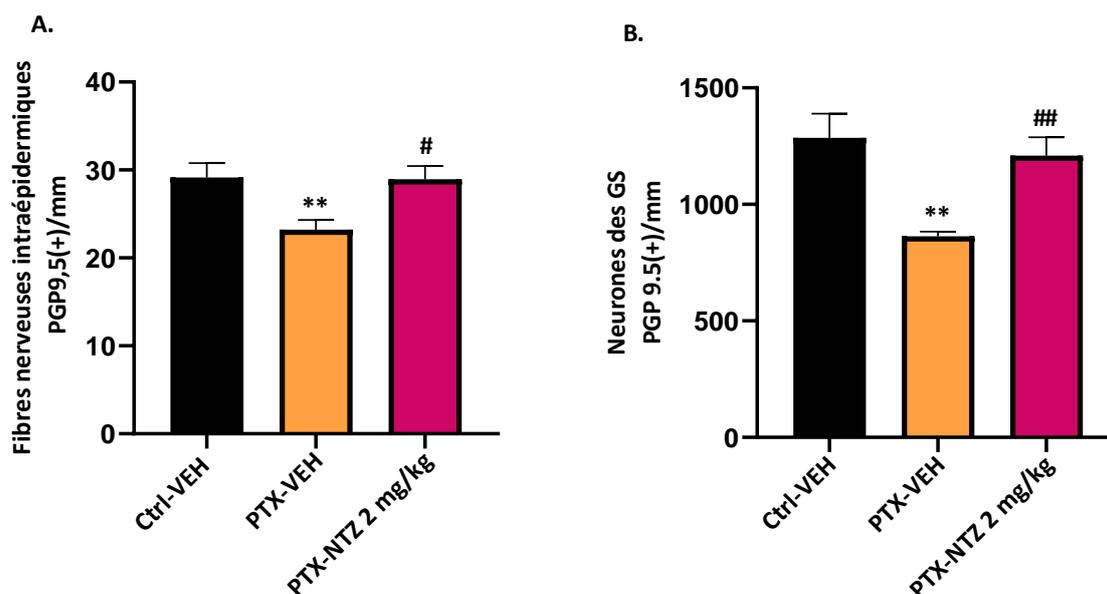


Figure 26. Effets du nétazéptide sur la perte des terminaisons nerveuses sensibles et des neurones des GS induit par le PTX.

Une immunohistochimie pour la PGP9.5 a été réalisée sur des coupes de peau de patte et de GS: (A) Densité des FNIE, trois coupes de peau de patte ont été examinées par souris. n = 6 souris. (B) Densité des neurones des GS, trois coupes de GS par souris ont été comptées. n = 6 par groupe. \*\*p < 0,01 vs Ctrl-VEH. #p < 0,05, ##p < 0,01 vs PTX-VEH. Ctrl: control, FNIE : fibre nerveuses intraépidermique, NTZ : nétazéptide, PGP9.5 : protein gene product 9.5, PTX : paclitaxel, VEH : véhicule.

Le PTX induit une perte de densité en FNIE de manière significative par rapport au groupe Ctrl-VEH (p = 0,0087). Par ailleurs, la densité des FNIE des souris PTX-NTZ était significativement supérieure à celle du groupe PTX-VEH (p = 0,0206). De plus, il n'existe pas de différence significative entre les groupes PTX-NTZ et Ctrl-VEH (p = 0,500) (Figure 26 A). Le PTX a également induit une diminution de la densité en neurones dans les GS par rapport au Ctrl-VEH (p = 0,0011). Le traitement par NTZ a empêché la perte de neurones des GS induite par le PTX de manière significative (p = 0,0011 ; PTX-VEH vs PTX-NTZ) (Figure 26 B).

#### **III.4.3.4. Effets du Nétazéptide sur la densité en fibres myélinisées et la morphologie du nerf sciatique.**

Le NTZ n'a pas affecté la morphologie des fibres nerveuses myélinisées ou non myélinisées dans les nerfs sciatiques des groupes témoins, et il n'y a eu aucun changement notable dans la morphologie des fibres non myélinisées chez les souris VCR-VEH par rapport aux souris Ctrl-VEH (données non montrées).

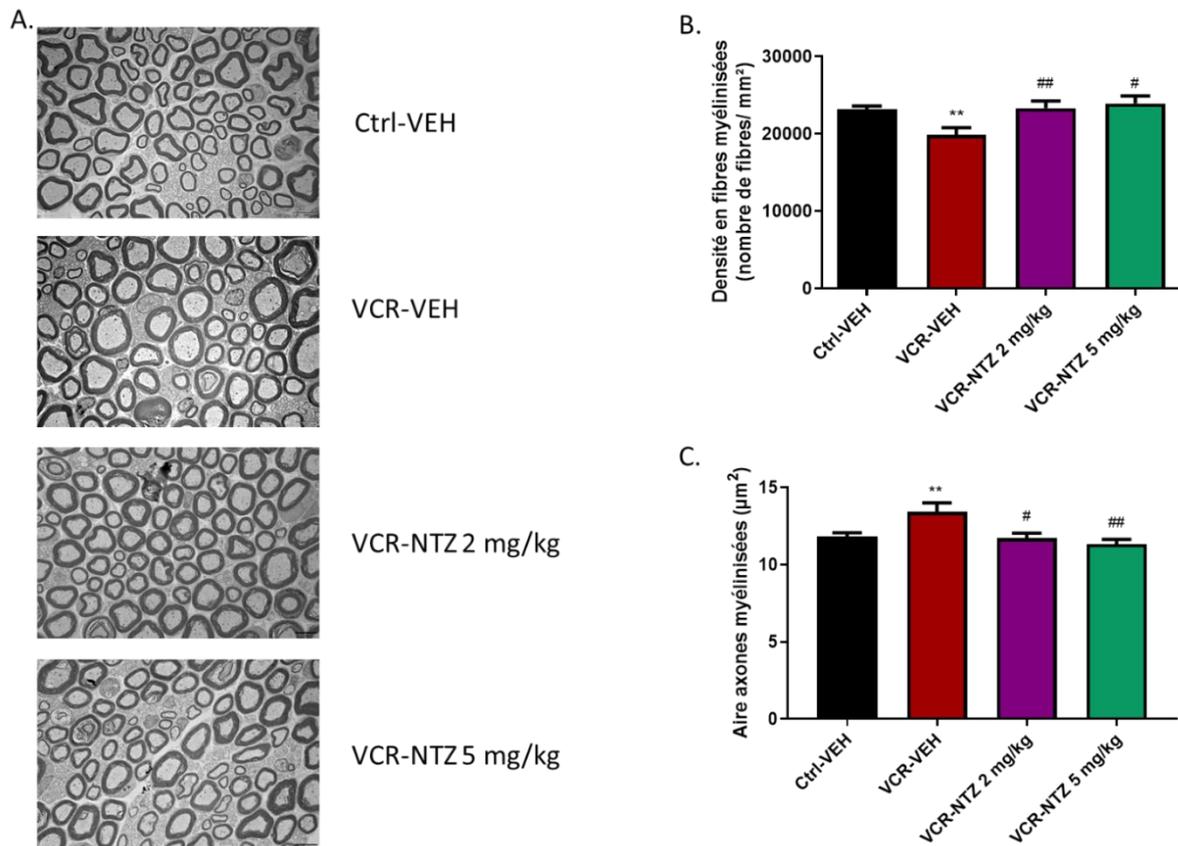


Figure 27. Analyse quantitative du nerf sciatique par microscopie électronique, modèle NPIV. (A) Visualisation des fibres myélinisées dans le nerf sciatique. (B) Quantification de la densité des fibres myélinisées. (C) Mesure de la surface des axones myélinisés dans le nerf. n= 6 par groupe \*\*p<0,01 vs Ctrl-VEH #p < 0,05, ##p<0,01 vs PTX-VEH. Ctrl : contrôle, NTZ : nétazépide, VCR : vincristine, VEH : véhicule.

L'analyse des images de microscopie électronique a montré que le traitement par la VCR diminuait significativement la densité des fibres myélinisées ( $p = 0,0076$ , Figure 27 A et B). Cette diminution était associée à une augmentation de la surface des axones myélinisés ( $p < 0,01$ , Figure 27 A et C). Le NTZ a empêché la diminution de la densité des fibres myélinisées à 2 mg/kg ( $p = 0,0206$ ) et 5 mg/kg ( $p = 0,0206$ , Figure 27 A) et l'augmentation de la surface des axones myélinisés induite par la VCR (2 mg/kg :  $p = 0,0313$ , 5 mg/kg :  $p = 0,0043$ , Figure 27 B), de sorte qu'il n'y avait pas de différence significative entre les surfaces des axones myélinisés des souris du groupe Ctrl-VEH et des groupes VCR-NTZ 2 mg/kg et VCR-NTZ 5 mg/kg (Figure 27 A et C).

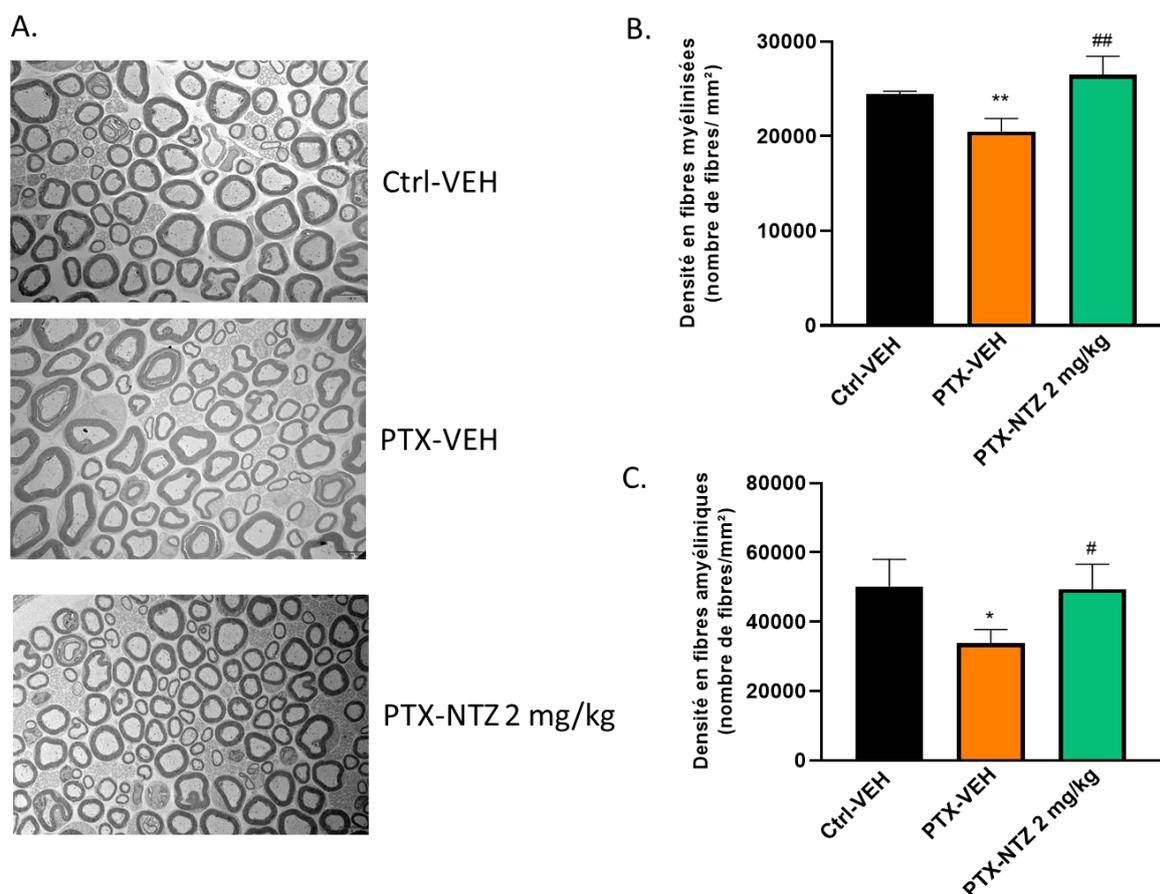


Figure 28. Analyse quantitative du nerf sciatique par microscopie électronique, modèle NPIIP.

(A) Visualisation des fibres myélinisées dans le nerf sciatique. (B) Quantification de la densité des fibres myélinisées. \*\* $p < 0,01$  vs Ctrl-VEH ## $p < 0,01$  vs PTX-VEH. Ctrl : contrôle, NTZ : nétazépide, VEH : véhicule, PTX : paclitaxel.

L'analyse quantitative des fibres myélinisées en microscopie électronique montre que le traitement par PTX diminue significativement la densité des fibres myélinisées ( $p = 0,0043$  Ctrl-VEH vs PTX-VEH). Cette diminution n'est pas observée dans le groupe PTX-NTZ, la densité en fibre myélinisées de ce groupe ne diffères pas de celle obtenue pour les souris Ctrl-VEH ( $p = 0,4206$ , Figure 28 A et B). L'administration du NTZ empêche la perte en fibres myélinisées observée dans le groupe PTX-NTZ de manière significative ( $p = 0,0087$ , PTX-VEH vs. PTX-NTZ). Le traitement au PTX induit également une perte significative en fibre amyélinique par rapport au Ctrl ( $p = 0,0367$  Ctrl-VEH vs PTX-VEH). Cette perte n'est pas observée dans le groupe PTX-NTZ, la densité en fibre amyélinique de ce groupe ne diffères pas de celle des souris Ctrl-VEH ( $p = 0,5000$ , Figure 28 C). Aucun changement notable n'est observé concernant la morphologie des fibres myélinisées ou non-myélinisées chez les souris PTX-NTZ par rapport aux souris Ctrl-VEH.

### III.4.3.5. Le NTZ ne modifie pas l'activité anticancéreuse du PTX sur des lignées cellulaires de cancers de poumon et de sein.

L'influence du blocage du CCK2R par le NTZ sur l'activité anticancéreuse du PTX a été évaluée sur deux lignées cancéreuses humaines A549 et MDA-MB-231.

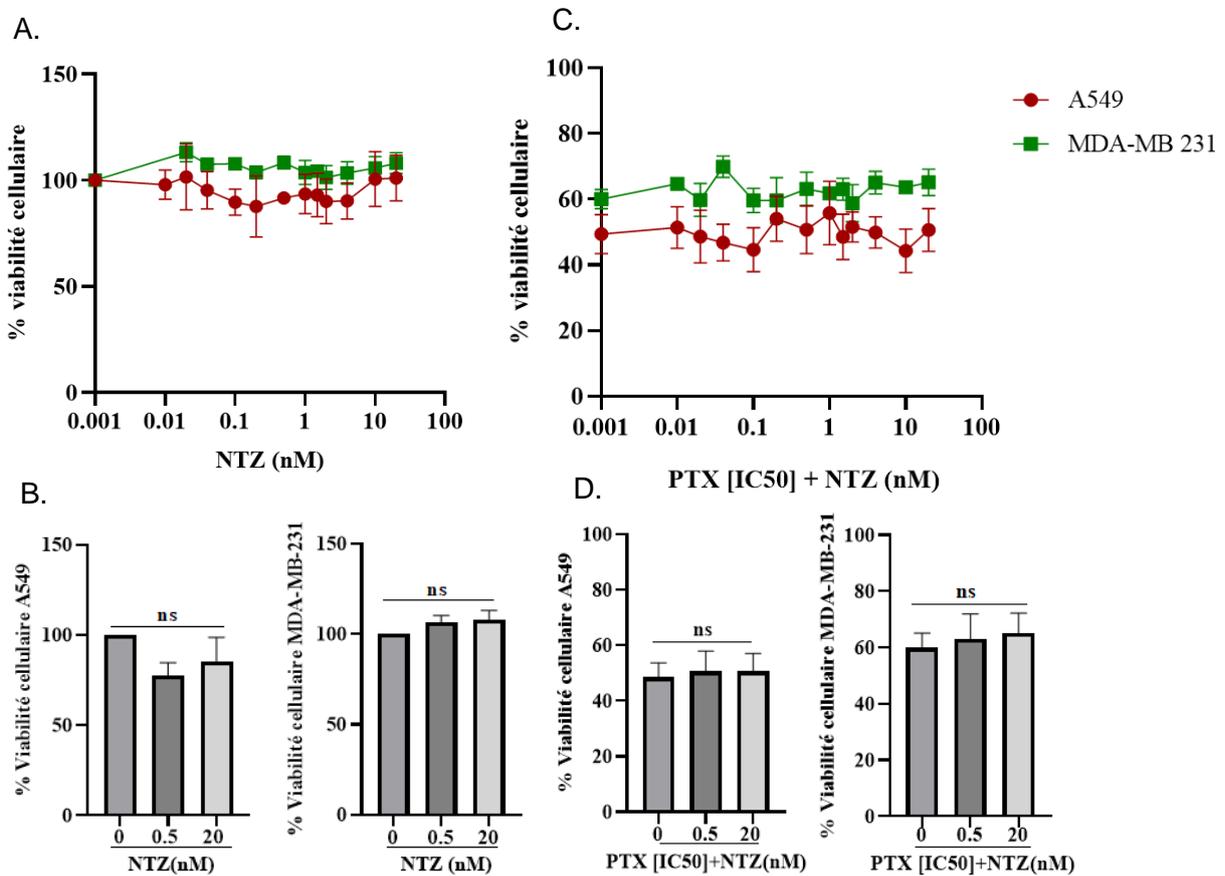


Figure 29. Effets du nétazépidine sur la cytotoxicité du PTX sur les lignées cancéreuses humaines A549 et MDA-MB-231.

La viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTT avec NTZ seul (0,001-20 nM), et/ou avec PTX à l'IC<sub>50</sub> = 2,5 μM. Effet du NTZ seul sur la viabilité cellulaire des lignées A549 et MDA-MB-231 (A et B) et sur l'activité cytotoxique du PTX (C et D). IC<sub>50</sub> = concentration inhibitrice semi-maximale, NTZ : nétazépidine, PTX : paclitaxel.

Le NTZ seul à différentes concentrations ne diminue pas de façon significative la viabilité des deux lignées cellulaires (Figure 29 A et B). Concernant les cellules traitées par du PTX à [IC<sub>50</sub>], le NTZ n'affecte pas de manière significative l'activité anticancéreuse du PTX dans les deux lignées cellulaires (Figure 29 C et D).

### III.4.4. Discussion

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants : 1) le NTZ prévient l'allodynie tactile dans nos deux modèles de NPIC, induite par la VCR et par le PTX. 2) le NTZ

est neuroprotecteur dans ces 2 modèles, il prévient la totalité des dommages induit par la VCR et le PTX. 3) Le NTZ n'affecte pas l'activité cytotoxique du PTX.

Les souris exposées à la VCR ont développé une allodynie mécanique de J1 à J7 après le début des injections de VCR, cette allodynie est également mise en évidence dans d'autres études (Gauchan et al., 2009a; Kiguchi et al., 2008b; Saika et al., 2009). La VCR ayant une faible capacité à traverser la BHE, nous supposons que l'allodynie induite par la VCR implique d'abord des composants périphériques. Plusieurs études ont démontré que l'atteinte des fibres A $\beta$  et des nocicepteurs C et A $\delta$  peuvent entraîner une allodynie mécanique (Liljencrantz et al., 2013; Sasaki et al., 2013; Smith et al., 2013a). Ces observations sont en accord avec nos résultats histologiques. Les analyses en microscopie électronique montrent que la VCR entraîne une diminution de la densité des fibres myélinisées et un élargissement des axones myélinisés dans le nerf sciatique, comme cela a déjà été montré (Boehmerle et al., 2014; Tanner et al., 1998; Topp et al., 2000). Par ailleurs, l'analyse immunohistologique de la peau démontre que l'administration de VCR réduit la densité des FNIE comme cela a déjà été montré chez le rat (Siau et al., 2006). Ainsi, ces résultats suggèrent que la VCR affecte principalement les fibres myélinisées A $\beta$  et A $\delta$  ce qui confirme les observations des tests fonctionnels.

Dans le modèle de NPIP, l'administration de PTX a entraîné également l'apparition d'une allodynie mécanique. Les hypersensibilités mécaniques sont les altérations fonctionnelles les plus communément observées (Authier et al., 2000; Dina et al., 2001; Flatters and Bennett, 2004; Polomano et al., 2001). L'accumulation de PTX dans les neurones du GS a été démontrée dans plusieurs modèles de rongeurs de NPIP, provoquant une dégénérescence distale à proximale des fibres nerveuses sensibles périphériques, préférentiellement dans les fibres nerveuses myélinisées, mais aussi, et dans une moindre mesure, provoquant la dégénérescence des branches centrales des neurones du GS (Cavaletti et al., 2000; Tasnim et al., 2016). Tout comme la VCR, le PTX ne passe pas ou très peu la BHE (Fellner et al., 2002). Les symptômes induits par le PTX semblent être d'origine périphérique, et seraient plus particulièrement associés à une altération des fibres A $\beta$  myélinisées et des fibres C non myélinisées. Les analyses morphologiques ont montré que le traitement au PTX entraînait une diminution de la densité des FNIE, une perte de neurones sensoriels des GS et une perte de fibres nerveuses myélinisées, ce qui correspond à l'axonopathie sensitive

dépendante de la longueur observée chez les patients souffrants de NPIP (Klein and Lehmann, 2021; Siau et al., 2006).

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une surexpression de CCK2R dans le modèle de NPIV, ici nous observons également une surexpression de ce récepteur dans le modèle PTX. Dans notre modèle de NPIV, nous avons mis en évidence un rôle neuroprotecteur et analgésique du blocage des CCK2R. D'autres études ont également rapporté cet effet analgésique, notamment sur un modèle de douleur induite par brûlure (Yin et al., 2016), et dans un modèle de neuropathie diabétique (Juárez-Rojop et al., 2006). CCK2R étant surexprimé dans nos deux modèles, nous avons décidé de tester un nouvel antagoniste de CCK2R, le NTZ. Cette molécule, comparativement au Ly225910 et au proglumide précédemment cités, a l'avantage d'être plus spécifique de CCK2R, et de faire actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2 dans le traitement des tumeurs gastriques neuroendocrines (Boyce et al., 2017). La première phase de cet essai clinique à valider que le NTZ était bien toléré chez l'Homme (Boyce et al., 2015).

L'administration préventive de NTZ chez la souris, a permis de prévenir l'apparition de l'allodynie mécanique induite par la VCR et par le PTX, et a également montré un effet neuroprotecteur dans ces deux modèles. Une dose à 2 mg/kg était suffisante pour permettre un effet préventif sur la survenue de la douleur induite par la VCR. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser uniquement cette dose sur le modèle PTX.

Les analyses morphologiques ont montré que les atteintes neurodégénératives induites par la VCR et le PTX étaient contré par le traitement. En plus des effets analgésiques, des effets neuroprotecteurs sont donc également observés. Aucune autre étude ne démontre d'effet neuroprotecteur induit par le blocage des CCK2R, le mécanisme derrière cette neuroprotection n'est pas connu. Nous supposons que ce mécanisme est similaire dans nos deux modèles. En effet, la VCR et le PTX sont deux poisons du fuseau mitotique, ayant une physiopathologie proche. Les souris exposées à la VCR ou au PTX ont développé des symptômes similaires, se caractérisant par une allodynie tactile, une perte en FNIE dans la peau, une perte de neurones dans les GS et également une perte en fibres myélinisées, et les deux modèles surexpriment CCK2R. De plus, la VCR et le PTX induisent tous deux de la neuroinflammation et également des altérations mitochondriales. En effet, la VCR et le PTX affectent le mouvement du calcium en agissant sur la membrane mitochondriale (Kidd et al., 1994;

Tari et al., 1986). Cette modification des flux calciques altère la fonction mitochondriale (Rossi et al., 2019), induisant une diminution de la production d'ATP, et une augmentation de la production de ROS (Singh et al., 2019). La présence de nombreuses mitochondries gonflées et vacuolisées a été observée dans le nerf sciatique chez le rat exposé à la VCR (Xu et al., 2016). Ce phénomène est également retrouvé après exposition au PTX (Flatters and Bennett, 2006). Il a été montré, qu'une sur-stimulation par la CCK-8 induisait des modifications mitochondriales dans les cellules acineuses pancréatiques, ce qui pouvait induire une pancréatite aiguë (González et al., 2003). En effet, l'interaction CCK-8/CCK2R stimulerait la production d'IP3, à l'origine de la libération des stocks intracellulaires de  $Ca^{2+}$ , élevant ainsi la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$ . Le même phénomène pourrait avoir lieu dans nos modèles, la surexpression de CCK2R pourrait induire une modification de l'homéostasie calcique, entraînant une modification de la fonction mitochondriale et la libération de ROS dans les neurones sensitifs. Le blocage de CCK2R pourrait limiter l'accumulation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et donc limiter les atteintes mitochondriales et la libération de ROS.

En plus de ces propriétés analgésiques et neuroprotectrices, l'utilisation du NTZ ne semble pas altérer l'activité anticancéreuse du PTX. En effet, des tests *in vitro* ont été réalisés sur des lignées cellulaires de cancer du sein et du poumon humain sensible au PTX. Ils ont montré que l'utilisation simultanée de NTZ et de PTX ne réduisait pas la cytotoxicité du PTX. Le même type de test reste à réaliser pour évaluer l'effet du NTZ sur la cytotoxicité de la VCR sur des lignées humaines de lymphomes.

En conclusion, nous avons montré que l'administration du NTZ empêche les altérations fonctionnelles et morphologiques induites par la VCR et le PTX dans nos modèles murins de neuropathies sensorielles. Nous suggérons que le blocage de CCK2R représente une stratégie thérapeutique possible dans le cas d'effets à long terme associés aux NPIC, bien que les mécanismes sous-jacents restent à déterminer. Le NTZ étant un médicament en essai clinique de phase 2 dans le traitement des tumeurs gastriques neuroendocrines et bien toléré (Boyce et al., 2015), nos résultats encouragent une future évaluation clinique du potentiel thérapeutique préventif du NTZ chez les patients exposés à une neuropathie sensitive induite par la VCR ou le PTX. Néanmoins des tests supplémentaires sur des souris porteuses d'une tumeur et

traitées par la VCR ou le PTX sont à envisager pour étudier l'effet de l'antagoniste du CCK2R sur l'efficacité de la cytotoxicité de la VCR *in vivo*.

## **Partie IV. Discussion générale**

## Partie IV. Discussion générale

---

L'objectif de mon travail de thèse a été d'explorer en préclinique de nouvelles stratégies thérapeutiques des NPIC. La prévention et le traitement des effets indésirables des chimiothérapies neurotoxiques constituent un enjeu majeur de santé public. En effet, l'utilisation de ces anticancéreux impacte fortement la qualité de vie des patients. L'apparition de symptômes douloureux oblige souvent à diminuer ou à changer de molécule anticancéreuse.

Les études menées dans nos modèles murins ont permis :

- de montrer que le ramipril est une molécule d'intérêt thérapeutique pour la prévention des douleurs neuropathiques induites par le PTX et est également neuroprotective dans ce modèle.
- de montrer que l'action bénéfique du ramipril passe par la stimulation indirecte d'AT2R.
- de mettre en évidence que le blocage de CCK2R est une stratégie intéressante pour le traitement des NPIC, notamment pour les neuropathies induites par la VCR. En effet, le blocage de ces récepteurs par différents antagonistes le proglumide et le Ly225910 ont montré des effets bénéfiques dans notre modèle de NPIC concernant la douleur et l'atteinte neuronale.
- de mettre en évidence que l'utilisation du NTZ (antagoniste CCK2R) est une stratégie intéressante pour le traitement des neuropathies induites par la VCR et PTX. En effet, le blocage de CCK2R par le NTZ a montré des effets bénéfiques dans nos 2 modèles murins concernant la douleur et l'atteinte neuronale.

Les effets secondaires liés à la neurotoxicité des agents de chimiothérapie anticancéreuses, sont en partie dus à leur mode d'action. La VCR et le PTX sont tous les deux des poisons du fuseau mitotique. La VCR inhibe la polymérisation des microtubules en se fixant à la tubuline. Le PTX inhibe la dépolymérisation des microtubules. Ces deux molécules ont, du fait de leur similarité d'action, certains mécanismes physiopathologiques en commun. Elles induisent toutes les deux des pertes en FNIE conduisant au développement de l'allodynie tactile (Gornstein and Schwarz, 2017; Siau and Bennett, 2006). Ces deux molécules ne passent pas ou très

peu la BHE, le système périphérique est donc principalement affecté. La VCR et le PTX vont notamment s'accumuler dans les nerfs périphériques. Le PTX aura également tendance à s'accumuler aux niveaux des GS (Cavaletti et al., 2000). A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement préventif à l'apparition des NPIC, à l'origine de douleurs neuropathiques.

Concernant le protocole d'injection du PTX, le choix a été fait par rapport à ce qui est retrouvé le plus souvent dans la littérature (Hopkins et al., 2016). Ce protocole consiste en 4 injections i.p. de PTX à 2 mg/kg/2jour, équivalent à une dose cumulative de 8 mg/kg. Ce protocole d'administration de PTX chez la souris Swiss mâle ou femelle induit une neuropathie sensitive associées à des atteintes nerveuses, notamment une perte en FNIE comme observé chez l'Homme. Cette neuropathie est caractérisée par une allodynie tactile apparaissant après la séquence d'injection du PTX qui persiste jusqu'à 20 jours après la première injection de PTX. En revanche avec notre modèle nous n'avons pas mis en évidence de modification significative de la sensibilité thermique. Chez l'Homme, la NPIP est également caractérisée par des modifications de la sensibilité thermique (allodynie au froid) (Balayssac et al., 2011). La dose utilisée n'est peut-être pas suffisante pour induire une modification de ce paramètre bien qu'une dose cumulée de 4 mg/kg a suffi à induire une allodynie au froid dans un modèle de souris C57/BL6 (Smith et al., 2004). En outre, la méthode d'investigation de la sensibilité thermique n'était peut-être pas adaptée dans notre étude, le test de la plaque chaude peut être considéré comme expérimentateur dépendant et les animaux ne sont pas libres de leur mouvement. Un test de gradient thermique ou de préférence de plaque pourrait permettre de mettre en évidence des modifications non visibles avec un simple test de plaque.

Dans notre modèle de NPIP, une diminution de la densité en FNIE est observée dans l'épiderme ainsi qu'une diminution du nombre de fibres myélinisées et amyéliniques dans le nerf sciatique et d'une diminution de la densité en neurones dans les GS. Ces observations sont en concordance avec ce qu'on peut retrouver en clinique. Une biopsie du nerf sural d'un patient ayant reçu une dose cumulée de taxol de 6603 mg a montré une perte sévère en fibres nerveuses myélinisées et non-myélinisées, une atrophie axonale compatible avec une ganglionopathie ou une dégénérescence longueur-dépendante (Sahenk, 1994).

Concernant le protocole d'injection de la VCR, la durée du traitement de 7 jours a été retenue conformément au protocole précédemment développé et publié au sein de notre laboratoire (Bessaguet et al., 2018). L'administration de VCR est faite quotidiennement à 100 µg/kg pendant 7 jours en i.p. induisant une neuropathie sensitive chez toutes les souris traitées. Chez l'Homme, environ 30 à 40 % des patients présentent des modifications de la sensibilité tactile de type allodynie et hyperalgésie suite à un traitement à la VCR (Windebank and Grisold, 2008). Ainsi, notre modèle concorde avec la symptomatologie clinique, avec l'apparition d'une allodynie dès J1 qui est maintenue au moins jusqu'à J7. Cette modification de la sensibilité tactile n'est pas accompagnée de perturbations de la nociception thermique ou d'altérations des performances motrices.

D'un point de vue morphologique, une diminution de la densité en FNIE dans l'épiderme ainsi qu'une diminution des fibres myélinisées dans le nerf sciatique sont observés. Le fait que les performances motrices soient conservées chez les souris VCR suggère que les fibres myélinisées atteintes par la VCR seraient plus particulièrement les fibres sensibles plutôt que les fibres motrices. Notre modèle animal reste donc un modèle pertinent puisqu'il est proche de la pathologie humaine.

Nos modèles ont été développés en utilisant une lignée de souris non-consanguines. Ce choix a été fait afin de pouvoir évaluer l'efficacité de nos traitements sur une population d'individus plus hétérogènes, et donc de coller au mieux à la diversité génétique retrouvée chez l'Homme. De même, l'utilisation de souris mâles et de femelles nous a également paru évident. De plus en plus d'études pharmacologiques utilisent à la fois des mâles et des femelles pour être plus représentatives des pratiques cliniques chez l'Homme, où les traitements sont administrés indépendamment du sexe. Cependant, il semblerait que les femmes soient plus sensibles aux douleurs chroniques (Mogil, 2012). Cette différence entre les sexes est également observée chez les rongeurs notamment chez la souris. En effet, une étude récente a mis en évidence une différence entre mâles et femelles dans les voies d'induction de la douleur causée par une lésion du nerf sciatique (Sorge et al., 2015). Si l'hypersensibilité tactile induit par la lésion semble être causée par l'activation de la microglie chez les mâles, ce n'est pas le cas chez les femelles. L'hypersensibilité serait dû dans un premier temps au recrutement de lymphocytes T. Cette différence pourrait notamment être dû au taux de testostérone plus importante chez les mâles. De plus,

il existe également une différence dans l'analgésie provoquée par la morphine, elle serait plus efficace chez les femmes bien que le délai avant son action thérapeutique soit plus élevé que chez les hommes (Niesters et al., 2010). Ce phénomène renforce le fait que le mécanisme de douleur peut être différent chez l'homme et la femme. Dans nos modèles, nous n'avons pas observé de différence significative quant au sexe des souris lors de l'induction des NPIC, ou de différence significative en réponse aux traitements.

Dans des travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire, il a été mis en évidence que la modulation du SRA prévenait la neuropathie induite par la VCR et également celle induite par l'OXP (Bessaguet et al., 2018; Bouchenaki et al., 2021). Nous avons donc émis l'hypothèse que les modulateurs du SRA seraient de bons candidats pour prévenir la neuropathie induite par le PTX. De façon intéressante, le ramipril a permis de prévenir le développement de l'allodynie mécanique induite par le PTX. L'utilisation de souris déficientes pour AT2R et l'utilisation d'un antagoniste AT2R, le PD123319, ont permis de mettre en évidence que cet effet préventif passe par la stimulation indirecte de ces récepteurs. De plus, la stimulation indirecte des AT2R a également montré un effet neuroprotecteur similaire à celui observé dans le modèle VCR (Bessaguet et al., 2018). L'utilisation du ramipril dans notre modèle, empêche l'ECA de cliver l'Ang I en Ang II, une voie alternative de dégradation de l'Ang I peut alors se mettre en place. L'Ang I est dégradé par l'ECA-2 en Ang (1-9), ce métabolite est capable de se fixer aux AT2R, les stimulant directement. Il a été démontré que la stimulation des récepteurs AT2 induit une diminution de l'excitabilité neuronale par l'activation de canaux potassiques (Gao et al., 2014). L'excitabilité neuronale des neurones dans les GS est impliquée dans le développement d'hypersensibilités mécaniques (Zhang and Dougherty, 2014). D'autre part, la NPIP a une composante inflammatoire forte (Zaks-Zilberman et al., 2001). Il a été démontré que l'administration de PTX augmente les niveaux de TNF- $\alpha$  dans les GS (Wu et al., 2015) ainsi que le niveau de ROS (Duggett et al., 2016). Le ramipril pourrait induire un effet anti-allodynique et neuroprotecteurs par son effet anti-inflammatoire. Cet effet anti-inflammatoire a été mis en évidence plus récemment dans un modèle de douleur neuropathique dans un modèle de CCI. Dans ce modèle, l'administration de ramipril était associée à des actions anti-inflammatoires et antioxydantes, liées à la baisse des niveaux d'Ang II (Kaur et al., 2015).

Au cours de ma thèse, une seconde cible a été mise en évidence pour le traitement des NPIC. En effet, une analyse transcriptomique sur le modèle VCR a révélé une surexpression de *Cck2r*. Préférentiellement exprimé dans le système gastro-intestinal, ce RCPG est également exprimé dans le système central, où il joue un rôle dans la satiété, l'anxiété et la douleur (Greenough et al., 1998; Yang et al., 2018). Au niveau du SNP, il est très peu exprimé en condition physiologique. Néanmoins, des études montrent qu'il est surexprimé en cas de lésions (Kim et al., 2009; Yin et al., 2016; Zhang et al., 1993). Dans un modèle de douleurs provoquées par brûlure chez le rat dans lequel *Cck2r* était surexprimé, il a été montré que l'utilisation d'un antagoniste de CCK2R, le proglumide permettait de réduire l'allodynie mécanique (Yin et al., 2016). Bien que le proglumide ne soit pas un antagoniste spécifique de CCK2R, il est efficace pour réduire la douleur dans ce modèle. Au vu de ces informations, nous avons choisi dans un premier temps d'évaluer l'utilisation du proglumide dans la prévention des NPIC. L'administration quotidienne de proglumide n'a pas empêché l'apparition de l'allodynie mécanique induite par la VCR mais a accéléré la récupération d'une sensibilité mécanique normale chez les souris ayant reçu de la VCR. Ces premiers résultats nous ont confortés dans l'idée que le blocage de CCK2R était bénéfique dans notre modèle. Nous nous sommes alors tournés vers un antagoniste plus spécifique le Ly225910. Le Ly225910 est un antagoniste spécifique de CCK2R, néanmoins il n'a pas été étudié dans la douleur et n'est pas administrable chez l'Homme contrairement au proglumide. Le prétraitement avec Ly225910 a totalement empêché l'apparition de l'allodynie mécanique associée à la VCR. Le décalage de l'action du proglumide sur l'allodynie mécanique pourrait être en partie dû à son manque de spécificité, à sa faible biodisponibilité ou au fait que ce composé soit activé par voie orale.

Les résultats fonctionnels ont été renforcés par les analyses histologiques, le proglumide et le Ly225910 ont pu restaurer tous les dommages causés par la neurotoxicité de la VCR de manière similaire. Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence une neuroprotection induite par le blocage de CCK2R.

Des études ont montré un effet bénéfique du blocage de CCK2R dans le traitement de la douleur (Bernard et al., 2021; Kim et al., 2009; Roca-Lapirot et al., 2019). Une étude sur des souris déficientes pour CCK2R suggère que les sensibilités mécaniques ainsi que le développement de la douleur neuropathique sont régulés par des interactions antagonistes entre les récepteurs CCK et les récepteurs opioïdes. En effet, le CCK2R

est capable de se dimériser avec le récepteur opioïde  $\mu$  (Yang et al., 2018). Une fois activé, CCK2R forme des hétérodimères avec les récepteurs opioïde  $\mu$ , empêchant la liaison des opioïdes à leur récepteur, bloquant ainsi leur effet analgésique.

D'autres hypothèses pourraient expliquer les effets neuroprotecteurs et analgésiques du blocage de CCK2R. Le blocage du système CCK pourrait exercer des propriétés anti-inflammatoires et prévenir la neuroinflammation et donc l'hyperexcitabilité du système nerveux sensitif induite par la VCR (Yu et al., 2019). En effet, l'activation de la microglie et des astrocytes dans la moelle spinale pendant l'exposition à la VCR conduit à la libération de cytokines, entretenant la douleur neuropathique par des mécanismes inflammatoires (Kiguchi et al., 2009). Cet effet anti-inflammatoire du blocage du système CCK a déjà été démontré dans un modèle de pancréatite chronique traité au proglumide (Nadella et al., 2020).

Une autre hypothèse implique la modification de l'homéostasie ionique. Dans les GS, l'activation de CCK2R par son ligand CCK-8 induit une diminution du courant  $K^+$  de type A, impliquant la voie PI3K/SRC/JNK. Les canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_v$ ) jouent un rôle majeur dans l'excitabilité des neurones sensoriels primaires en favorisant l'étape de repolarisation lors de la génération des potentiels d'action. La diminution du courant  $K^+$  de type A augmente l'excitabilité neuronale (Vydyanathan et al., 2005), et par la même occasion conduit à une hypersensibilité et une hyperalgésie thermique (Cao et al., 2010; Chien et al., 2007; Takeda et al., 2011). Une réduction de l'activité  $K_v$  est associée à une augmentation de la fréquence et de la durée des potentiels d'action, ce qui entraîne une hyperexcitabilité membranaire (Zemel et al., 2018). Ainsi, le blocage spécifique du CCK2R pourrait inhiber ce phénomène.

En plus des propriétés analgésiques et neuroprotectrices du Ly225910 et du proglumide, nous n'avons pas observé d'altération de l'activité cytotoxique de la VCR en présence de l'un ou l'autre de ces composés sur des lignées humaines de lymphomes. Néanmoins, des tests supplémentaires sur des animaux porteurs d'une tumeur et traités par la VCR serait une plus-value pour étudier l'effet des antagonistes du CCK2R sur l'efficacité antitumorale de la VCR *in vivo*.

Plusieurs autres antagonistes sélectifs du CCK2R ont été développés et apparaissent comme de bons candidats pour prévenir la NPIV. Parmi eux, le NTZ (Trio Medecine Ltd.) ou YF476 a retenu notre attention, il est bien toléré chez l'Homme (Boyce et al.,

2015), et a fait l'objet de plusieurs essais cliniques, notamment dans la prise en charge des tumeurs neuroendocrines gastriques (clinicaltrials.gov NCT01339169) (Boyce et al., 2017). Le NTZ a donc été également testé sur le modèle VCR mais également sur notre modèle PTX. Comme attendu nous avons observé les mêmes effets que le Ly225910 sur le modèle VCR, mais également sur le modèle PTX. En effet, l'allodynie tactile induite par le PTX et les anomalies morphologiques observées ont été totalement prévenues par l'utilisation du NTZ. De plus, *Cck2r* est également surexprimé au niveau des GS dans le modèle PTX. L'utilisation du NTZ pourrait être une stratégie efficace dans la prévention des NPIC. Par ailleurs, le NTZ est actuellement en essai clinique de phase 2 dans le traitement de tumeurs neuroendocrines gastriques surexprimant CCK2R (Lloyd et al., 2020). De nombreuses autres tumeurs surexpriment également CCK2R comme le cancer colorectal ou encore certains cancers du poumon (Roy et al., 2016). De ce fait le NTZ pourrait en plus de son effet analgésique et neuroprotecteur, avoir un effet synergique avec les anticancéreux utilisés dans le traitement des cancers surexprimant CCK2R. Nous n'avons pas observé d'altération de l'activité cytotoxique du PTX en présence de NTZ sur des lignées de cancer du sein, *in vitro*. Néanmoins, des tests sur l'interaction entre NTZ et VCR sont à réaliser.

Les cibles pharmacologiques étudiées au cours de ma thèse sont des RCPG. Les RCPG constituent la plus grande superfamille de récepteurs transmembranaires. Leur fonction est de transposer des stimuli extracellulaires en réponses intracellulaires. Ces stimuli peuvent être très variés, allant de stimuli physiques à des signaux chimiques sous la forme d'ions ( $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ), en passant par des neurotransmetteurs chimiques (dopamine, noradrénaline, adrénaline, acétylcholine ou nucléotides), des peptides et des hormones protéiques (chimiokines ou opiacés), et des lipides. Ce type de récepteurs est de plus en plus étudié dans la modulation de la douleur. En effet, parmi les 61 familles de RCPG actuellement identifiées, 47 ont un rôle dans la modulation de la douleur soit 77 % d'entre eux (Stone and Molliver, 2009). Des études récentes ont montré un enrichissement de l'expression des RCPG dans des GS issus de vertébrotomie de patients atteints de douleurs neuropathiques comparé à des personnes saines (North et al., 2019), leur capacité à former des hétéromères avec d'autres RCPG est très intéressante. En effet, les RCPG peuvent se coupler à d'autres RCPG, cette dimérisation peut modifier les propriétés pharmacologiques, de

signalisation, de recyclage et de transport (Haack and McCarty, 2011). Il a été récemment montré que le récepteur CCK2R pouvait se dimériser avec les récepteurs opioïdes  $\mu$  diminuant ainsi leur affinité avec les opioïdes endogènes. Ce mécanisme ne serait pas spécifique du CCK2R, en effet des indices laissent à penser que les AT2R pourraient également interagir avec les récepteurs opioïdes (Király et al., 2021).

Le blocage de CCK2R et la stimulation des AT2R ont montré des effets prometteurs dans nos modèles murins. Néanmoins le passage entre étude préclinique et clinique est souvent difficile. Beaucoup de molécules ayant des résultats prometteurs en préclinique n'ont peu voire pas d'effet en clinique. L'une des raisons pourrait être la différence d'expression de certains gènes notamment dans les nocicepteurs. De manière générale, les sous-populations de nocicepteurs se définissent par l'expression du peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP) et/ou de la substance P pour la population peptidergique et par la fixation de IB4 et/ou l'expression du récepteur P2X3 pour la population non peptidergique (Basbaum et al., 2009). Bien que chez la souris, ces populations soient bien distinctes, chez le rat l'expression de CGRP et de l'IB4 se chevauche rendant la distinction entre neurones peptidergiques et non peptidergiques plus floue. Des études récentes ont montré que, chez l'Homme, ce chevauchement serait beaucoup plus important que chez le rat (Price and Flores, 2007; Taylor-Blake and Zylka, 2010). Le récepteur à la capsaïcine TRPV1 est également plus largement exprimé dans les GS chez l'Homme où la quasi-totalité des neurones l'expriment (Shiers et al., 2020), là où chez la souris TRPV1 est exclusivement exprimés par les nocicepteurs peptidergique (Cavanaugh et al., 2009).

# Partie V. Conclusions et perspectives

## Partie V. Conclusions et perspectives

---

### V.1. Conclusions

Les NPIC constituent des effets indésirables fréquents dû à la neurotoxicité des agents de chimiothérapie utilisés pour le traitement du cancer. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement préventif ou curatif dans le traitement de cet effet indésirable. La création de modèle préclinique permet de mieux comprendre la physiopathologie complexe des NPIC et les mécanismes spécifiques responsables de la neurotoxicité des différentes molécules de chimiothérapie. Ces modèles permettent ainsi de mieux comprendre l'apparition des symptômes, mais également de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les objectifs de ce travail étaient de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des NPIC, notamment dans la neuropathie induite par la VCR et par le PTX.

En continuité avec les travaux déjà réalisés dans l'équipe, nous avons cherché à évaluer si les modulateurs du SRA étaient également efficaces dans le traitement préventif de la NPIP. Nous avons démontré que le ramipril avait des effets analgésiques et neuroprotecteurs dans ce modèle, ces effets impliqueraient la participation des récepteurs AT2R.

Une analyse transcriptomique sur les GS issue de notre modèle de NPIV, nous a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la VCR et également de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique. En effet, notre modèle murin traité par la VCR surexprime CCK2R, ce récepteur a souvent été trouvé surexprimé dans des modèles de douleur. Le blocage de ce récepteur par différents antagonistes (proglumide, Ly225910 et le NTZ) a montré des effets analgésiques et neuroprotecteurs dans la survenue de la NPIV mais également dans celle induite par le PTX. L'utilisation du NTZ notamment pourrait être un choix thérapeutique intéressant, étant donné les résultats préliminaires obtenus et son utilisation en essai clinique de phase 2 dans le traitement des tumeurs neuroendocrines gastriques.

### V.2. Perspectives

Une étude complémentaire portant sur les interactions entre molécules candidates et molécules de chimiothérapie devra être réalisée pour évaluer l'effet du NTZ sur la

cytotoxicité de la VCR dans des lignées cellulaires de lymphomes comme cela a déjà été réalisée pour le PTX et le NTZ. Ces études permettront d'évaluer l'impact des traitements utilisés sur l'effet cytotoxique des chimiothérapies, et de ce fait s'assurer que le traitement avec les molécules candidates ne limite pas l'action de la chimiothérapie.

D'autres études pourraient également être réalisées *in vitro* pour mieux comprendre le mécanisme neurotoxique des différentes molécules utilisées. Ces tests *in vitro* pourraient être réalisés sur des cultures primaires de neurones issus de GS de souris, mais également sur des neurones sensitifs humains dérivés d'iPSC.

*In vivo*, des tests sur des modèles sont envisagés pour mieux évaluer l'effet des molécules dans un contexte plus proche de la clinique. En effet, nos modèles sont dépourvus de tumeurs, or le cancer en lui-même peut provoquer des symptômes douloureux (Magee et al., 2019) qui se rajoutent aux douleurs induites par la chimiothérapie. Les modèles syngéniques permettront d'évaluer l'effet des molécules sur la NPIC et sur la tumeur directement sans altération du système immunitaire de la souris. En effet, dans les modèles syngéniques, les animaux sont greffés avec les cellules d'une tumeur provenant d'un animal de la même lignée, permettant l'utilisation d'animaux immunocompétents.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- Abiodun, O.A., and Ola, M.S. (2020). Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.026>.
- Aley, K.O., Reichling, D.B., and Levine, J.D. (1996). Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 73, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00020-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00020-6).
- Al-Mazidi, S., Alotaibi, M., Nedjadi, T., Chaudhary, A., Alzoghaibi, M., and Djouhri, L. (2018). Blocking of cytokines signalling attenuates evoked and spontaneous neuropathic pain behaviours in the paclitaxel rat model of chemotherapy-induced neuropathy. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 22, 810–821. <https://doi.org/10.1002/ejp.1169>.
- Anand, U., Facer, P., Yiangou, Y., Sinisi, M., Fox, M., McCarthy, T., Bountra, C., Korchev, Y., and Anand, P. (2013). Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) localization and antagonist-mediated inhibition of capsaicin responses and neurite outgrowth in human and rat sensory neurons. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 17, 1012–1026. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00269.x>.
- Apfel, S.C., Lipton, R.B., Arezzo, J.C., and Kessler, J.A. (1991). Nerve growth factor prevents toxic neuropathy in mice. *Ann. Neurol.* 29, 87–90. <https://doi.org/10.1002/ana.410290115>.
- Araiza-Saldaña, C.I., Pedraza-Priego, E.F., Torres-López, J.E., Rocha-González, H.I., Castañeda-Corral, G., Hong-Chong, E., and Granados-Soto, V. (2015). Fosinopril Prevents the Development of Tactile Allodynia in a Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. *Drug Dev. Res.* 76, 442–449. <https://doi.org/10.1002/ddr.21280>.
- Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., and Nurmikko, T. (2010). EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol.* 17, 1113-e88. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x>.
- Authier, N., Gillet, J.P., Fialip, J., Eschalier, A., and Coudore, F. (2000). Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Res.* 887, 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02910-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02910-3).
- Authier, N., Gillet, J.-P., Fialip, J., Eschalier, A., and Coudore, F. (2003). A New Animal Model of Vincristine-Induced Nociceptive Peripheral Neuropathy. *NeuroToxicology* 24, 797–805. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00043-3).
- Authier, N., Balayssac, D., Marchand, F., Ling, B., Zangarelli, A., Descoeur, J., Coudore, F., Bourinet, E., and Eschalier, A. (2009). Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics* 6, 620–629. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.07.003>.
- Balayssac, D., Ferrier, J., Descoeur, J., Ling, B., Pezet, D., Eschalier, A., and Authier, N. (2011). Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin. Drug Saf.* 10, 407–417. <https://doi.org/10.1517/14740338.2011.543417>.
- Ballaz, S.J., Akil, H., and Watson, S.J. (2007). The CCK-system mediates adaptation to novelty-induced stress in the rat: A pharmacological evidence. *Neurosci. Lett.* 428, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.035>.

- Barohn, R.J., Gajewski, B., Pasnoor, M., Brown, A., Herbelin, L.L., Kimminau, K.S., Mudarantkham, D.P., Jawdat, O., Dimachkie, M.M., Patient Assisted Intervention for Neuropathy: Comparison of Treatment in Real Life Situations (PAIN-CONTRoLS) Study Team, et al. (2021). Patient Assisted Intervention for Neuropathy: Comparison of Treatment in Real Life Situations (PAIN-CONTRoLS): Bayesian Adaptive Comparative Effectiveness Randomized Trial. *JAMA Neurol.* 78, 68–76. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2590>.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- Becari, C., B. Oliveira, E., and Salgado, M.C.O. (2011). Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011000900013>.
- Benbouzid, M., Gavériaux-Ruff, C., Yalcin, I., Waltisperger, E., Tessier, L.-H., Muller, A., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J., and Barrot, M. (2008). Delta-Opioid Receptors Are Critical for Tricyclic Antidepressant Treatment of Neuropathic Allodynia. *Biol. Psychiatry* 63, 633–636. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.06.016>.
- Benbow, S.J., Wozniak, K.M., Kulesh, B., Savage, A., Slusher, B.S., Littlefield, B.A., Jordan, M.A., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (2017). Microtubule-Targeting Agents Eribulin and Paclitaxel Differentially Affect Neuronal Cell Bodies in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Neurotox. Res.* 32, 151–162. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9729-6>.
- Bergemann, W., Consentius, K., Braun, H.E., Hirschmann, H., Marowski, B., Munck, A., Rehs, H.U., Stopik, D., and Wilke, G. (1981). [Duodenal ulcer - multicenter double-blind study with proglumide]. *Med. Klin.* 76, 226–229. .
- Bernard, A., Danigo, A., Bourthoumieu, S., Mroué, M., Desmoulière, A., Sturtz, F., Rovini, A., and Demiot, C. (2021). The Cholecystokinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management. *Pharm. Basel Switz.* 14, 1185. <https://doi.org/10.3390/ph14111185>.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F., and Forte, M.A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 273, 2077–2099. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x>.
- Bessaguet, F., Magy, L., Desmoulière, A., and Demiot, C. (2016). The therapeutic potential of renin angiotensin aldosterone system (RAAS) in chronic pain: from preclinical studies to clinical trials. *Expert Rev. Neurother.* 16, 331–339. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1150179>.
- Bessaguet, F., Danigo, A., Bouchenaki, H., Duchesne, M., Magy, L., Richard, L., Sturtz, F., Desmoulière, A., and Demiot, C. (2018). Neuroprotective effect of angiotensin II type 2 receptor stimulation in vincristine-induced mechanical allodynia. *Pain* 159, 2538–2546. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001361>.
- Bhattacharya, M.R.C., Gerds, J., Naylor, S.A., Royse, E.X., Ebstein, S.Y., Sasaki, Y., Milbrandt, J., and DiAntonio, A. (2012). A Model of Toxic Neuropathy in *Drosophila* Reveals a Role for MORN4 in Promoting Axonal Degeneration. *J. Neurosci.* 32, 5054–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4951-11.2012>.
- Bobylev, I., Joshi, A.R., Barham, M., Ritter, C., Neiss, W.F., Höke, A., and Lehmann, H.C. (2015). Paclitaxel inhibits mRNA transport in axons. *Neurobiol. Dis.* 82, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.006>.

- Boehmerle, W., Splittgerber, U., Lazarus, M.B., McKenzie, K.M., Johnston, D.G., Austin, D.J., and Ehrlich, B.E. (2006). Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18356–18361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607240103>.
- Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., and Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Sci. Rep.* *4*, 6370. <https://doi.org/10.1038/srep06370>.
- Bouchenaki, H., Danigo, A., Bernard, A., Bessaguet, F., Richard, L., Sturtz, F., Balayssac, D., Magy, L., and Demiot, C. (2021). Ramipril Alleviates Oxaliplatin-Induced Acute Pain Syndrome in Mice. *Front. Pharmacol.* *12*, 712442. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.712442>.
- Bouchenaki, H., Bernard, A., Bessaguet, F., Frachet, S., Richard, L., Sturtz, F., Magy, L., Bourthoumieu, S., Demiot, C., and Danigo, A. (2022). Neuroprotective Effect of Ramipril Is Mediated by AT2 in a Mouse MODEL of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Pharmaceutics* *14*, 848. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040848>.
- Boyce, M., David, O., Darwin, K., Mitchell, T., Johnston, A., and Warrington, S. (2012). Single oral doses of netazepide (YF476), a gastrin receptor antagonist, cause dose-dependent, sustained increases in gastric pH compared with placebo and ranitidine in healthy subjects. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *36*, 181–189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05143.x>.
- Boyce, M., Downen, S., Turnbull, G., van den Berg, F., Zhao, C.-M., Chen, D., and Black, J. (2015). Effect of netazepide, a gastrin/CCK2 receptor antagonist, on gastric acid secretion and rabeprazole-induced hypergastrinaemia in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *79*, 744–755. <https://doi.org/10.1111/bcp.12534>.
- Boyce, M., Moore, A.R., Sagatun, L., Parsons, B.N., Varro, A., Campbell, F., Fossmark, R., Waldum, H.L., and Pritchard, D.M. (2017). Netazepide, a gastrin/cholecystokinin-2 receptor antagonist, can eradicate gastric neuroendocrine tumours in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *83*, 466–475. <https://doi.org/10.1111/bcp.13146>.
- Boyette-Davis, J., Xin, W., Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2011). Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline. *Pain* *152*, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.030>.
- Boyette-Davis, J.A., Cata, J.P., Driver, L.C., Novy, D.M., Bruel, B.M., Mooring, D.L., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W.R., and Dougherty, P.M. (2013). Persistent chemoneuropathy in patients receiving the plant alkaloids paclitaxel and vincristine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 619–626. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2047-z>.
- Brandolini, L., Benedetti, E., Ruffini, P.A., Russo, R., Cristiano, L., Antonosante, A., d'Angelo, M., Castelli, V., Giordano, A., Allegretti, M., et al. (2017). CXCR1/2 pathways in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Oncotarget* *8*, 23188–23201. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15533>.
- Brozou, V., Vadalouca, A., and Zis, P. (2018). Pain in Platin-Induced Neuropathies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Ther.* *7*, 105–119. <https://doi.org/10.1007/s40122-017-0092-3>.
- Cao, X.-H., Byun, H.-S., Chen, S.-R., Cai, Y.-Q., and Pan, H.-L. (2010). Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of

brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* *114*, 1460–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06863.x>.

Carey, R.M., and Padia, S.H. (2018). Chapter 1 - Physiology and Regulation of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System. In *Textbook of Nephro-Endocrinology (Second Edition)*, A.K. Singh, and G.H. Williams, eds. (Academic Press), pp. 1–25.

Casey, E.B., Jellife, A.M., Le Quesne, P.M., and Millett, Y.L. (1973). Vincristine neuropathy. Clinical and electrophysiological observations. *Brain J. Neurol.* *96*, 69–86. <https://doi.org/10.1093/brain/96.1.69>.

Cavaletti, G., Cavalletti, E., Montaguti, P., Oggioni, N., De Negri, O., and Tredici, G. (1997). Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology* *18*, 137–145. .

Cavaletti, G., Cavalletti, E., Oggioni, N., Sottani, C., Minoia, C., D'Incalci, M., Zucchetti, M., Marmiroli, P., and Tredici, G. (2000). Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. *Neurotoxicology* *21*, 389–393. .

Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9075–9080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901507106>.

Ceredig, R.A., Pierre, F., Doridot, S., Alduntzin, U., Salvat, E., Yalcin, I., Gaveriaux-Ruff, C., Barrot, M., and Massotte, D. (2018). Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Duloxetine Anti-allodynic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/ejn.14093>.

Chakrabarty, A., Liao, Z., and Smith, P.G. (2013). Angiotensin II receptor type 2 activation is required for cutaneous sensory hyperinnervation and hypersensitivity in a rat hind paw model of inflammatory pain. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *14*, 1053–1065. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.04.002>.

Chen, Y., Yang, C., and Wang, Z.J. (2011). Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* *193*, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.085>.

Chien, L.-Y., Cheng, J.-K., Chu, D., Cheng, C.-F., and Tsaur, M.-L. (2007). Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 9855–9865. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-07.2007>.

Ciobica, A., Bild, W., Hritcu, L., and Haulica, I. (2009). Brain renin-angiotensin system in cognitive function: pre-clinical findings and implications for prevention and treatment of dementia. *Acta Neurol. Belg.* *109*, 171–180. .

Contreras, P.C., Vaught, J.L., Gruner, J.A., Brosnan, C., Steffler, C., Arezzo, J.C., Lewis, M.E., Kessler, J.A., and Apfel, S.C. (1997). Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice. *Brain Res.* *774*, 20–26. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)81682-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)81682-4).

- Cooper, T.E., Chen, J., Wiffen, P.J., Derry, S., Carr, D.B., Aldington, D., Cole, P., and Moore, R.A. (2017). Morphine for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5, CD011669. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011669.pub2>.
- Crawford, P., and Xu, Y. (2017). Topical Capsaicin for Treatment of Chronic Neuropathic Pain in Adults. *Am. Fam. Physician* 96. .
- Crawley, J.N., and Corwin, R.L. (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15, 731–755. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90104-x).
- Danigo, A., Nasser, M., Bessaguet, F., Javellaud, J., Oudart, N., Achard, J.-M., and Demiot, C. (2015). Candesartan restores pressure-induced vasodilation and prevents skin pressure ulcer formation in diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* 14, 26. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0185-4>.
- Danigo, A., Rovini, A., Bessaguet, F., Bouchenaki, H., Bernard, A., Sturtz, F., Bourthoumieu, S., Desmoulière, A., Magy, L., and Demiot, C. (2021). The Angiotensin II Type 2 Receptor, a Target for Protection and Regeneration of the Peripheral Nervous System? *Pharmaceuticals* 14, 175. <https://doi.org/10.3390/ph14030175>.
- Daugé, V., and Léna, I. (1998). CCK in Anxiety and Cognitive Processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 815–825. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00011-6).
- De Iuliis, F., Taglieri, L., Salerno, G., Lanza, R., and Scarpa, S. (2015). Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.04.011>.
- Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., and Dantony, E. (2019). Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. *Santé Publique Fr.* 372. .
- Dina, O.A., Chen, X., Reichling, D., and Levine, J.D. (2001). Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 108, 507–515. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00425-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00425-0).
- Dufresne, M., Seva, C., and Fourmy, D. (2006). Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* 86, 805–847. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2005>.
- Duggett, N.A., Griffiths, L.A., McKenna, O.E., de Santis, V., Yongsanguanchai, N., Mokori, E.B., and Flatters, S.J.L. (2016). Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience* 333, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.050>.
- Duggett, N.A., Griffiths, L.A., and Flatters, S.J.L. (2017). Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons. *Pain* 158, 1499–1508. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000939>.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., et al. (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.033>.

- Eckhoff, L., Knoop, A., Jensen, M.B., and Ewertz, M. (2015). Persistence of docetaxel-induced neuropathy and impact on quality of life among breast cancer survivors. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 51, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.11.024>.
- Elias, J.A.Z., Delfino, V.D.A., Barbosa, D.S., Fabris, B.A., and Matsuo, T. (2008). [Effects of ramipril and simvastatin on the oxidative stress of diabetic rats]. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52, 1131–1138. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000700009>.
- England, J.D., and Asbury, A.K. (2004). Peripheral neuropathy. *The Lancet* 363, 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16508-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16508-2).
- Evoy, K.E., Sadrameli, S., Contreras, J., Covvey, J.R., Peckham, A.M., and Morrison, M.D. (2021). Abuse and Misuse of Pregabalin and Gabapentin: A Systematic Review Update. *Drugs* 81, 125–156. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01432-7>.
- Fellner, S., Bauer, B., Miller, D.S., Schaffrik, M., Fankhänel, M., Spruss, T., Bernhardt, G., Graeff, C., Färber, L., Gschaidmeier, H., et al. (2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 110, 1309–1318. <https://doi.org/10.1172/JCI15451>.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpaa, M., Hansson, P., Jensen, T.S., et al. (2015a). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *Lancet Neurol.* 14, 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0).
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpaa, M., Hansson, P., Jensen, T.S., et al. (2015b). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *Lancet Neurol.* 14, 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0).
- Flatters, S.J.L., and Bennett, G.J. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.029>.
- Flatters, S.J.L., and Bennett, G.J. (2006). Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 122, 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.037>.
- Flatters, S.J.L., Fox, A.J., and Dickenson, A.H. (2004). Nerve injury alters the effects of interleukin-6 on nociceptive transmission in peripheral afferents. *Eur. J. Pharmacol.* 484, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.013>.
- Flatters, S.J.L., Xiao, W.-H., and Bennett, G.J. (2006). Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.* 397, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.013>.
- Flatters, S.J.L., Dougherty, P.M., and Colvin, L.A. (2017). Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. *Br. J. Anaesth.* 119, 737–749. <https://doi.org/10.1093/bja/aex229>.
- Fukuda, Y., Li, Y., and Segal, R.A. (2017). A Mechanistic Understanding of Axon Degeneration in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front. Neurosci.* 11, 481. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00481>.

Gao, J., Zucker, I.H., and Gao, L. (2014). Activation of central angiotensin type 2 receptors by compound 21 improves arterial baroreflex sensitivity in rats with heart failure. *Am. J. Hypertens.* 27, 1248–1256. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu044>.

de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472. .

Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A., Sasaki, A., and Kuraishi, Y. (2009a). Effects of the prostaglandin E1 analog limaprost on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 469–472. <https://doi.org/10.1254/jphs.08325sc>.

Gauchan, P., Andoh, T., Ikeda, K., Fujita, M., Sasaki, A., Kato, A., and Kuraishi, Y. (2009b). Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 732–734. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.732>.

Ghelardini, C., Desaphy, J.-F., Muraglia, M., Corbo, F., Matucci, R., Dipalma, A., Bertucci, C., Pistolozzi, M., Nesi, M., Norcini, M., et al. (2010). Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models. *Neuroscience* 169, 863–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.019>.

Ghione, S., Rosa, C., Mezzasalma, L., and Panattoni, E. (1988). Arterial hypertension is associated with hypalgesia in humans. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 12, 491–497. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.12.5.491>.

González, A., Granados, M.P., Salido, G.M., and Pariente, J.A. (2003). Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell. Signal.* 15, 1039–1048. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00067-6).

Gornstein, E., and Schwarz, T.L. (2014). The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.016>.

Gornstein, E.L., and Schwarz, T.L. (2017). Neurotoxic mechanisms of paclitaxel are local to the distal axon and independent of transport defects. *Exp. Neurol.* 288, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.015>.

Gragl, G., Finke, B., Schattner, S., Gierer, P., Mittlmeier, T., and Vollmar, B. (2007). Continuous intra-arterial application of substance P induces signs and symptoms of experimental complex regional pain syndrome (CRPS) such as edema, inflammation and mechanical pain but no thermal pain. *Neuroscience* 148, 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.024>.

Greenough, A., Cole, G., Lewis, J., Lockton, A., and Blundell, J. (1998). Untangling the effects of hunger, anxiety, and nausea on energy intake during intravenous cholecystokinin octapeptide (CCK-8) infusion. *Physiol. Behav.* 65, 303–310. .

Griebel, G. (1999). Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol. Ther.* 82, 1–61. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00041-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00041-2).

Haack, K.K.V., and McCarty, N.A. (2011). Functional Consequences of GPCR Heterodimerization: GPCRs as Allosteric Modulators. *Pharmaceuticals* 4, 509–523. <https://doi.org/10.3390/ph4030509>.

Haberberger, R.V., Barry, C., Dominguez, N., and Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Front. Cell. Neurosci.* 13. .

Hafko, R., Villapol, S., Nostramo, R., Symes, A., Sabban, E.L., Inagami, T., and Saavedra, J.M. (2013). Commercially Available Angiotensin II At2 Receptor Antibodies Are Nonspecific. *PLoS ONE* 8, e69234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069234>.

Hägg, S., Jönsson, A.K., and Ahlner, J. (2020). Current Evidence on Abuse and Misuse of Gabapentinoids. *Drug Saf.* 43, 1235–1254. <https://doi.org/10.1007/s40264-020-00985-6>.

Hakim, Z.S., Patel, B.K., and Goyal, R.K. (1997). Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 41, 353–360. .

Hanani, M., and Spray, D.C. (2020). Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 485–498. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>.

Hanewinkel, R., Ikram, M.A., and Van Doorn, P.A. (2016). Peripheral neuropathies. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 263–282.

Hara, T., Chiba, T., Abe, K., Makabe, A., Ikeno, S., Kawakami, K., Utsunomiya, I., Hama, T., and Taguchi, K. (2013). Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain* 154, 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.02.023>.

Harding, J.W., Sullivan, M.J., Hanesworth, J.M., Cushing, L.L., and Wright, J.W. (1988). Inability of [<sup>125</sup>I]Sar1, Ile8-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. *J. Neurochem.* 50, 554–557. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02946.x>.

Hashikawa-Hobara, N., Hashikawa, N., Inoue, Y., Sanda, H., Zamami, Y., Takatori, S., and Kawasaki, H. (2012). Candesartan cilexetil improves angiotensin II type 2 receptor-mediated neurite outgrowth via the PI3K-Akt pathway in fructose-induced insulin-resistant rats. *Diabetes* 61, 925–932. <https://doi.org/10.2337/db11-1468>.

Herranz, R. (2003). Cholecystokinin antagonists: Pharmacological and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 23, 559–605. <https://doi.org/10.1002/med.10042>.

Hill, D., Horwell, D.C., Hunter, J.C., Kneen, C.O., Pritchard, M.C., and Suman-Chauhan, N. (1993). Synthesis of a potent and selective non-peptide CCK-B/gastrin receptor antagonist tritiated ligand. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 885–888. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)80686-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80686-1).

Hökfelt, T., Skirboll, L., Everitt, B., Meister, B., Brownstein, M., Jacobs, T., Faden, A., Kuga, S., Goldstein, M., and Markstein, R. (1985). Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the nervous system. Co-existence with classical neurotransmitters and other neuropeptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 448, 255–274. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb29922.x>.

Hopkins, H.L., Duggett, N.A., and Flatters, S.J.L. (2016). Chemotherapy-induced painful neuropathy: pain-like behaviours in rodent models and their response to commonly used analgesics. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 10, 119–128. <https://doi.org/10.1097/SPC.000000000000204>.

Islam, B., Lustberg, M., Staff, N.P., Kolb, N., Alberti, P., and Argyriou, A.A. (2019). Vinca alkaloids, thalidomide and eribulin-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 24, S63–S73. <https://doi.org/10.1111/jns.12334>.

Ivy, A.C., and Oldberg, E. (1928). A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* 86, 599–613. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1928.86.3.599>.

Jackson, D.L., Graff, C.B., Richardson, J.D., and Hargreaves, K.M. (1995). Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 284, 321–325. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00449-u](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00449-u).

Jaggi, A.S., and Singh, N. (2011). Exploring the potential of telmisartan in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.017>.

Janes, K., Doyle, T., Bryant, L., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Ryerse, J., Bennett, G.J., and Salvemini, D. (2013). Bioenergetic deficits in peripheral nerve sensory axons during chemotherapy-induced neuropathic pain resulting from peroxynitrite-mediated post-translational nitration of mitochondrial superoxide dismutase. *Pain* 154, 2432–2440. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.032>.

Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., and Treede, R.-D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>.

Jin, H.W., Flatters, S.J.L., Xiao, W.H., Mulhern, H.L., and Bennett, G.J. (2008). Prevention of paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy by acetyl-L-carnitine: effects on axonal mitochondria, sensory nerve fiber terminal arbors, and cutaneous Langerhans cells. *Exp. Neurol.* 210, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.001>.

Juárez-Rojop, I.E., Granados-Soto, V., Díaz-Zagoya, J.C., Flores-Murrieta, F.J., and Torres-López, J.E. (2006). Involvement of cholecystokinin in peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response: *Pain* 122, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.018>.

Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>.

Kalra, J., Chaturvedi, A., Kalra, S., Chaturvedi, H., and Dhasmana, D.C. (2008). Modulation of pain perception by ramipril and losartan in human volunteers. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 52, 91–96. .

Kamei, J., and Zushida, K. (2001). The role of spinal cholecystokinin B receptors in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Res.* 892, 370–375. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03273-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03273-X).

Kaur, P., Muthuraman, A., and Kaur, J. (2015). Ameliorative potential of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ramipril) on chronic constriction injury of sciatic nerve induced neuropathic pain in mice. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* 16, 103–112. <https://doi.org/10.1177/1470320314556171>.

Kidd, G.J., Andrews, S.B., and Trapp, B.D. (1994). Organization of microtubules in myelinating Schwann cells. *J. Neurocytol.* 23, 801–810. <https://doi.org/10.1007/BF01268092>.

Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Kondo, T., Ozaki, M., and Kishioka, S. (2008a). The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 592, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.008>.

- Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., and Kishioka, S. (2008b). Up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in spinal cord contributes to vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Neurosci. Lett.* *445*, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.009>.
- Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Saika, F., and Kishioka, S. (2009). Involvement of inflammatory mediators in neuropathic pain caused by vincristine. *Int. Rev. Neurobiol.* *85*, 179–190. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85014-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85014-9).
- Kim, E., Hwang, S.-H., Kim, H.-K., Abdi, S., and Kim, H.K. (2019). Losartan, an Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, Alleviates Mechanical Hyperalgesia in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain by Inhibiting Inflammatory Cytokines in the Dorsal Root Ganglia. *Mol. Neurobiol.* *56*, 7408–7419. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1616-0>.
- Kim, J., Kim, J.H., Kim, Y., Cho, H., Hong, S.K., and Yoon, Y.W. (2009). Role of spinal cholecystokinin in neuropathic pain after spinal cord hemisection in rats. *Neurosci. Lett.* *462*, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.07.042>.
- Király, K., Karádi, D.Á., Zádor, F., Mohammadzadeh, A., Galambos, A.R., Balogh, M., Riba, P., Tábi, T., Zádori, Z.S., Szökő, É., et al. (2021). Shedding Light on the Pharmacological Interactions between  $\mu$ -Opioid Analgesics and Angiotensin Receptor Modulators: A New Option for Treating Chronic Pain. *Mol. Basel Switz.* *26*, 6168. <https://doi.org/10.3390/molecules26206168>.
- Klein, I., and Lehmann, H.C. (2021). Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics* *9*, 229. <https://doi.org/10.3390/toxics9100229>.
- Kopin, A.S., Lee, Y.M., McBride, E.W., Miller, L.J., Lu, M., Lin, H.Y., Kolakowski, L.F., and Beinborn, M. (1992). Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 3605–3609. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3605>.
- Kuliasha, C.A., Spearman, B., Atkinson, E.W., Furnoturewalla, A., Rustogi, P., Mobini, S., Nunamaker, E.B., Brennan, A., Otto, K., Schmidt, C., Judy J.w. Teeni. (2018). Robust and Scalable Tissue-Engineered Electronic Nerve Interfaces; pp. 46-49.
- Labandeira-Garcia, J.L., Rodríguez-Perez, A.I., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Lanciego, J.L., and Guerra, M.J. (2017). Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* *9*, 129. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129>.
- Lauria, G., Cornblath, D.R., Johansson, O., McArthur, J.C., Mellgren, S.I., Nolano, M., Rosenberg, N., and Sommer, C. (2005). EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur. J. Neurol.* *12*, 747–758. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2005.01260.x>.
- Lee, B.Y., and Hur, E.-M. (2020). A Role of Microtubules in Oligodendrocyte Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1062. <https://doi.org/10.3390/ijms21031062>.
- Léna, I., Dhôtel, H., Garbay, C., and Daugé, V. (2001). Involvement of D 2 dopamine receptors in the opposing effects of two CCK-B agonists in a spatial recognition memory task: role of the anterior nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* *153*, 170–179. <https://doi.org/10.1007/s002130000517>.
- Li, Y., North, R.Y., Rhines, L.D., Tatsui, C.E., Rao, G., Edwards, D.D., Cassidy, R.M., Harrison, D.S., Johansson, C.A., Zhang, H., et al. (2018). DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain.

J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 38, 1124–1136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899-17.2017>.

Lignon, M.F., Bernad, N., and Martinez, J. (1991). Pharmacological characterization of type B cholecystokinin binding sites on the human JURKAT T lymphocyte cell line. *Mol. Pharmacol.* 39, 615–620. .

Liljencrantz, J., Björnsdotter, M., Morrison, I., Bergstrand, S., Ceko, M., Seminowicz, D.A., Cole, J., Bushnell, C.M., and Olausson, H. (2013). Altered C-tactile processing in human dynamic tactile allodynia. *Pain* 154, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.10.024>.

Lisse, T.S., Elias, L.J., Pellegrini, A.D., Martin, P.B., Spaulding, E.L., Lopes, O., Brochu, E.A., Carter, E.V., Waldron, A., and Rieger, S. (2016). Paclitaxel-induced epithelial damage and ectopic MMP-13 expression promotes neurotoxicity in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E2189-2198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525096113>.

Liu, T., van Rooijen, N., and Tracey, D.J. (2000). Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* 86, 25–32. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(99\)00306-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(99)00306-1).

Lloyd, K.A., Parsons, B.N., Burkitt, M.D., Moore, A.R., Papoutsopoulou, S., Boyce, M., Duckworth, C.A., Exarchou, K., Howes, N., Rainbow, L., et al. (2020). Netazepide Inhibits Expression of Pappalysin 2 in Type 1 Gastric Neuroendocrine Tumors. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 113–132. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.01.010>.

Loeser, J.D., and Melzack, R. (1999). Pain: an overview. *Lancet Lond. Engl.* 353, 1607–1609. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01311-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01311-2).

Loprinzi, C.L., Lacchetti, C., Bleeker, J., Cavaletti, G., Chauhan, C., Hertz, D.L., Kelley, M.R., Lavino, A., Lustberg, M.B., Paice, J.A., et al. (2020). Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* 38, 3325–3348. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>.

Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Sorkin, L.S., Stauderman, K.A., Williams, M.E., and Yaksh, T.L. (2001). Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1868–1875. .

Luo, Z.D., Calcutt, N.A., Higuera, E.S., Valder, C.R., Song, Y.-H., Svensson, C.I., and Myers, R.R. (2002). Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1199–1205. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041574>.

Magee, D., Bachtold, S., Brown, M., and Farquhar-Smith, P. (2019). Cancer pain: where are we now? *Pain Manag.* 9, 63–79. <https://doi.org/10.2217/pmt-2018-0031>.

Magy, L., and Vallat, J.-M. (2013). [Peripheral neuropathies]. *Rev. Prat.* 63, 277–283. .

Manjavachi, M.N., Passos, G.F., Trevisan, G., Araújo, S.B., Pontes, J.P., Fernandes, E.S., Costa, R., and Calixto, J.B. (2019). Spinal blockage of CXCL1 and its receptor CXCR2 inhibits paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. *Neuropharmacology* 151, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.014>.

Materazzi, S., Fusi, C., Benemei, S., Pedretti, P., Patacchini, R., Nilius, B., Prenen, J., Creminon, C., Geppetti, P., and Nassini, R. (2012). TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-

induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch.* 463, 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1071-x>.

Miller, L.J., and Gao, F. (2008). Structural basis of cholecystinin receptor binding and regulation. *Pharmacol. Ther.* 119, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.05.001>.

Miltenburg, N.C., and Boogerd, W. (2014). Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat. Rev.* 40, 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.04.004>.

Mogil, J.S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 859–866. <https://doi.org/10.1038/nrn3360>.

Moisset, X., Bouhassira, D., and Attal, N. (2021). French guidelines for neuropathic pain: An update and commentary. *Rev. Neurol. (Paris)* 177, 834–837. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2021.07.004>.

Moore, A.R., Boyce, M., Steele, I.A., Campbell, F., Varro, A., and Pritchard, D.M. (2013). Netazepide, a gastrin receptor antagonist, normalises tumour biomarkers and causes regression of type 1 gastric neuroendocrine tumours in a nonrandomised trial of patients with chronic atrophic gastritis. *PLoS One* 8, e76462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076462>.

de Mos, M., Huygen, F.J.P.M., Stricker, B.H.C., Dieleman, J.P., and Sturkenboom, M.C.J.M. (2009). The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: Suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of CRPS. *Pain* 142, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.032>.

Muralidharan, A., Wyse, B.D., and Smith, M.T. (2014). Analgesic efficacy and mode of action of a selective small molecule angiotensin II type 2 receptor antagonist in a rat model of prostate cancer-induced bone pain. *Pain Med. Malden Mass* 15, 93–110. <https://doi.org/10.1111/pme.12258>.

Mutt, V., and Jorpes, J.E. (1968). Structure of porcine cholecystinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur. J. Biochem.* 6, 156–162. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00433.x>.

Nadella, S., Ciofoaia, V., Cao, H., Kallakury, B., Tucker, R.D., and Smith, J.P. (2020). Cholecystinin Receptor Antagonist Therapy Decreases Inflammation and Fibrosis in Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 65, 1376–1384. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05863-5>.

Nagi, S.S., Marshall, A.G., Makdani, A., Jarocka, E., Liljencrantz, J., Ridderström, M., Shaikh, S., O'Neill, F., Saade, D., Donkervoort, S., et al. (2019). An ultrafast system for signaling mechanical pain in human skin. *Sci. Adv.* 5, eaaw1297. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1297>.

Nemoto, W., Nakagawasai, O., Yaoita, F., Kanno, S.-I., Yomogida, S., Ishikawa, M., Tadano, T., and Tan-No, K. (2013). Angiotensin II produces nociceptive behavior through spinal AT1 receptor-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation in mice. *Mol. Pain* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-38>.

Niesters, M., Dahan, A., Kest, B., Zacny, J., Stijnen, T., Aarts, L., and Sarton, E. (2010). Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. *Pain* 151, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.06.012>.

Nishida, K., Kuchiiwa, S., Oiso, S., Futagawa, T., Masuda, S., Takeda, Y., and Yamada, K. (2008). Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with

paclitaxel-induced neuropathy. *Cancer Sci.* 99, 1618–1625. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00877.x>.

Noble, F., and Roques, B.P. (1999). CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog. Neurobiol.* 58, 349–379. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00090-2).

Noble, F., Wank, S.A., Crawley, J.N., Bradwejn, J., Seroogy, K.B., Hamon, M., and Roques, B.P. (1999). International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol. Rev.* 51, 745–781. .

North, R.Y., Li, Y., Ray, P., Rhines, L.D., Tatsui, C.E., Rao, G., Johansson, C.A., Zhang, H., Kim, Y.H., Zhang, B., et al. (2019). Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain* 142, 1215–1226. <https://doi.org/10.1093/brain/awz063>.

Nozaki-Taguchi, N., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Ajakwe, R.C., and Yaksh, T.L. (2001). Vincristine-induced allodynia in the rat. *Pain* 93, 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00294-9).

Okubo, K., Takahashi, T., Sekiguchi, F., Kanaoka, D., Matsunami, M., Ohkubo, T., Yamazaki, J., Fukushima, N., Yoshida, S., and Kawabata, A. (2011). Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 188, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.004>.

Old, E.A., Nadkarni, S., Grist, J., Gentry, C., Bevan, S., Kim, K.-W., Mogg, A.J., Perretti, M., and Malcangio, M. (2014). Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain. *J. Clin. Invest.* 124, 2023–2036. <https://doi.org/10.1172/JCI71389>.

Patil, J., Schwab, A., Nussberger, J., Schaffner, T., Saavedra, J.M., and Imboden, H. (2010). Intra-neuronal angiotensinergic system in rat and human dorsal root ganglia. *Regul. Pept.* 162, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.03.004>.

Pavel, J., Tang, H., Brimijoin, S., Moughamian, A., Nishioku, T., Benicky, J., and Saavedra, J.M. (2008). Expression and transport of Angiotensin II AT1 receptors in spinal cord, dorsal root ganglia and sciatic nerve of the rat. *Brain Res.* 1246, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.099>.

Pavel, J., Oroszova, Z., Hricova, L., and Lukacova, N. (2013). Effect of subpressor dose of angiotensin II on pain-related behavior in relation with neuronal injury and activation of satellite glial cells in the rat dorsal root ganglia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 681–688. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9934-7>.

Pelegri-da-Silva, A., Martins, A.R., and Prado, W.A. (2005). A new role for the renin-angiotensin system in the rat periaqueductal gray matter: angiotensin receptor-mediated modulation of nociception. *Neuroscience* 132, 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.046>.

Peng, L., Bu, Z., Ye, X., Zhou, Y., and Zhao, Q. (2017). Incidence and risk of peripheral neuropathy with nab-paclitaxel in patients with cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* 26. <https://doi.org/10.1111/ecc.12407>.

Pereira, S., Fontes, F., Sonin, T., Dias, T., Fragoso, M., Castro-Lopes, J.M., and Lunet, N. (2015). Neurological complications of breast cancer: A prospective cohort study. *Breast Edinb. Scotl.* 24, 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.05.006>.

- Peters, C.M., Jimenez-Andrade, J.M., Jonas, B.M., Sevcik, M.A., Koewler, N.J., Ghilardi, J.R., Wong, G.Y., and Mantyh, P.W. (2007). Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Exp. Neurol.* 203, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.022>.
- Polomano, R.C., Mannes, A.J., Clark, U.S., and Bennett, G.J. (2001). A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94, 293–304. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(01)00363-3).
- Pongs, O. (2008). Regulation of excitability by potassium channels. *Results Probl. Cell Differ.* 44, 145–161. [https://doi.org/10.1007/400\\_2007\\_032](https://doi.org/10.1007/400_2007_032).
- Poplawski, G., Ishikawa, T., Brifault, C., Lee-Kubli, C., Regestam, R., Henry, K.W., Shiga, Y., Kwon, H., Ohtori, S., Gonias, S.L., et al. (2018). Schwann cells regulate sensory neuron gene expression before and after peripheral nerve injury. *Glia* 66, 1577–1590. <https://doi.org/10.1002/glia.23325>.
- Price, T.J., and Flores, C.M. (2007). Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J. Pain* 8, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.09.005>.
- Qureshi, A.A., Hosoi, J., Xu, S., Takashima, A., Granstein, R.D., and Lerner, E.A. (1996). Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide. *J. Invest. Dermatol.* 107, 815–821. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12330572>.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., et al. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 161, 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
- Ramchandren, S. (2017). Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 23, 1360–1377. <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000529>.
- Reed, C.B., Feltri, M.L., and Wilson, E.R. (2021). Peripheral glia diversity. *J. Anat.* <https://doi.org/10.1111/joa.13484>.
- Rice, A.S.C., Dworkin, R.H., Finnerup, N.B., Attal, N., Anand, P., Freeman, R., Piaia, A., Callegari, F., Doerr, C., Mondal, S., et al. (2021). Efficacy and safety of EMA401 in peripheral neuropathic pain: results of 2 randomised, double-blind, phase 2 studies in patients with postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *PAIN* 162, 2578–2589. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002252>.
- Rigoard, P., Buffenoir-Billet, K., Giot, J.-P., Delmotte, A., D’Houtaud, S., and Lapierre, F. (2009). Bases anatomiques des voies d’abord chirurgicales des nerfs du membre supérieur : à l’usage des jeunes neurochirurgiens. *Neurochirurgie* 55, 384–392. .
- Ritter, R.C., Covasa, M., and Matson, C.A. (1999). Cholecystokinin: proofs and prospects for involvement in control of food intake and body weight. *Neuropeptides* 33, 387–399. <https://doi.org/10.1054/npep.1999.0051>.
- Roca-Lapirot, O., Fossat, P., Ma, S., Egron, K., Trigilio, G., López-González, M.-J., Covita, J., Bouali-Benazzouz, R., Favereaux, A., Gundlach, A.L., et al. (2019). Acquisition of analgesic

properties by the cholecystokinin (CCK)/CCK2 receptor system within the amygdala in a persistent inflammatory pain condition: *PAIN* 160, 345–357. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001408>.

Rohit, null, Rao, C., and Krishna, G. (2006). Effects of captopril and losartan on thermal and chemical induced pain in mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 50, 169–174. .

Rossi, A., Pizzo, P., and Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1866, 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>.

Roy, J., Putt, K.S., Coppola, D., Leon, M.E., Khalil, F.K., Centeno, B.A., Clark, N., Stark, V.E., Morse, D.L., and Low, P.S. (2016). Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue. *Oncotarget* 7, 14605–14615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7522>.

Röyttä, M., and Raine, C.S. (1985). Taxol-induced neuropathy: further ultrastructural studies of nerve fibre changes in situ. *J. Neurocytol.* 14, 157–175. <https://doi.org/10.1007/BF01150269>.

Röyttä, M., and Raine, C.S. (1986). Taxol-induced neuropathy: chronic effects of local injection. *J. Neurocytol.* 15, 483–496. <https://doi.org/10.1007/BF01611731>.

Ruiz-Medina, J., Baulies, A., Bura, S.A., and Valverde, O. (2013). Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 17, 75–85. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00172.x>.

Sacerdote, P., Wiedermann, C.J., Wahl, L.M., Pert, C.B., and Ruff, M.R. (1991). Visualization of cholecystokinin receptors on a subset of human monocytes and in rat spleen. *Peptides* 12, 167–176. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90184-q](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90184-q).

Sahenk, Z. (1994). Taxol Neuropathy: Electrodiagnostic and Sural Nerve Biopsy Findings. *Arch. Neurol.* 51, 726. <https://doi.org/10.1001/archneur.1994.00540190110024>.

Sahenk, Z., Brady, S.T., and Mendell, J.R. (1987). Studies on the pathogenesis of vincristine-induced neuropathy. *Muscle Nerve* 10, 80–84. <https://doi.org/10.1002/mus.880100115>.

Saika, F., Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y., Maeda, T., Ozaki, M., and Kishioka, S. (2009). Suppressive effect of imipramine on vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1231–1234. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1231>.

Sakagawa, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hozumi, S., Nakagawasai, O., Tadano, T., Kisara, K., Ichiki, T., and Inagami, T. (2000). Pain threshold, learning and formation of brain edema in mice lacking the angiotensin II type 2 receptor. *Life Sci.* 67, 2577–2585. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00841-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00841-9).

Sasaki, A., Inomata, Y., Serizawa, K., Andoh, T., and Kuraishi, Y. (2013). Contribution of sensory C-fiber neuron injury to mechanical dynamic allodynia in a murine model of postherpetic neuralgia. *Neuroreport* 24, 137–141. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32835df4d9>.

Schreiber, S., Backer, M.M., and Pick, C.G. (1999). The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci. Lett.* 273, 85–88. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00627-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00627-8).

Sekiguchi, T. (2016). Cholecystokinin. In *Handbook of Hormones*, (Elsevier), pp. 177-e20B-3.

- Seretny, M., Currie, G.L., Sena, E.S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M.R., Colvin, L.A., and Fallon, M. (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis: *Pain* 155, 2461–2470. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>.
- Shepherd, A.J., Mickle, A.D., Golden, J.P., Mack, M.R., Halabi, C.M., de Kloet, A.D., Samineni, V.K., Kim, B.S., Krause, E.G., Gereau, R.W., et al. (2018). Macrophage angiotensin II type 2 receptor triggers neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E8057–E8066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721815115>.
- Sheps, D.S., Bragdon, E.E., Gray, T.F., Ballenger, M., Usedom, J.E., and Maixner, W. (1992). Relation between systemic hypertension and pain perception. *Am. J. Cardiol.* 70, 3F-5F. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(92\)90181-w](https://doi.org/10.1016/0002-9149(92)90181-w).
- Shiers, S., Klein, R.M., and Price, T.J. (2020). Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain* 161, 2410–2424. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001973>.
- Shim, H.S., Bae, C., Wang, J., Lee, K.-H., Hankerd, K.M., Kim, H.K., Chung, J.M., and La, J.-H. (2019). Peripheral and central oxidative stress in chemotherapy-induced neuropathic pain. *Mol. Pain* 15, 1744806919840098. <https://doi.org/10.1177/1744806919840098>.
- Siau, C., and Bennett, G.J. (2006). Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. *Anesth. Analg.* 102, 1485–1490. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000204318.35194.ed>.
- Siau, C., Xiao, W., and Bennett, G.J. (2006). Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: Loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp. Neurol.* 201, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.05.007>.
- Simões e Silva, A.C., Silveira, K.D., Ferreira, A.J., and Teixeira, M.M. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* 169, 477–492. <https://doi.org/10.1111/bph.12159>.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24, 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
- Smith, A.K., O'Hara, C.L., and Stucky, C.L. (2013a). Mechanical sensitization of cutaneous sensory fibers in the spared nerve injury mouse model. *Mol. Pain* 9, 61. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-61>.
- Smith, M.T., Wyse, B.D., and Edwards, S.R. (2013b). Small molecule angiotensin II type 2 receptor (AT<sub>2</sub>R) antagonists as novel analgesics for neuropathic pain: comparative pharmacokinetics, radioligand binding, and efficacy in rats. *Pain Med. Malden Mass* 14, 692–705. <https://doi.org/10.1111/pme.12063>.
- Smith, S.B., Crager, S.E., and Mogil, J.S. (2004). Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sci.* 74, 2593–2604. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.01.002>.
- Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.-S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1081–1083. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>.

- Staff, N.P., and Windebank, A.J. (2014). Peripheral Neuropathy Due to Vitamin Deficiency, Toxins, and Medications. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 20, 1293–1306. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000455880.06675.5a>.
- Steeds, C.E. (2016). The anatomy and physiology of pain. *Surg. Oxf.* 34, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.11.005>.
- Stone, L.S., and Molliver, D.C. (2009). In Search of Analgesia: Emerging Poles of GPCRs in Pain. *Mol. Interv.* 9, 234–251. <https://doi.org/10.1124/mi.9.5.7>.
- Takata, H., Takeda, Y., Zhu, A., Cheng, Y., Yoneda, T., Demura, M., Yagi, K., Karashima, S., and Yamagishi, M. (2012). Protective effects of mineralocorticoid receptor blockade against neuropathy in experimental diabetic rats. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01499.x>.
- Takeda, M., Tsuboi, Y., Kitagawa, J., Nakagawa, K., Iwata, K., and Matsumoto, S. (2011). Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol. Pain* 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-5>.
- Tambon, M., Ponté, C., Jouanjus, E., Fouilhé, N., Micallef, J., Lapeyre-Mestre, M., and the French Addictovigilance Network (FAN) (2021). Gabapentinoid Abuse in France: Evidence on Health Consequences and New Points of Vigilance. *Front. Psychiatry* 12. .
- Tanabe, Y., Hashimoto, K., Shimizu, C., Hirakawa, A., Harano, K., Yunokawa, M., Yonemori, K., Katsumata, N., Tamura, K., Ando, M., et al. (2013). Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 18, 132–138. <https://doi.org/10.1007/s10147-011-0352-x>.
- Tang, H., Pavel, J., Saavedra, J.M., and Brimijoin, S. (2009). Type-1 angiotensin receptors are expressed and transported in motor and sensory axons of rat sciatic nerves. *Neuropeptides* 43, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.01.001>.
- Tanner, K.D., Levine, J.D., and Topp, K.S. (1998). Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J. Comp. Neurol.* 395, 481–492. .
- Tari, C., Fournier, N., Briand, C., Ducet, G., and Crevat, A. (1986). Action of vinca alkaloides on calcium movements through mitochondrial membrane. *Pharmacol. Res. Commun.* 18, 519–528. [https://doi.org/10.1016/0031-6989\(86\)90147-5](https://doi.org/10.1016/0031-6989(86)90147-5).
- Tasnim, A., Rammelkamp, Z., Slusher, A.B., Wozniak, K., Slusher, B.S., and Farah, M.H. (2016). Paclitaxel causes degeneration of both central and peripheral axon branches of dorsal root ganglia in mice. *BMC Neurosci.* 17, 47. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0285-4>.
- Taylor-Blake, B., and Zylka, M.J. (2010). Prostatic Acid Phosphatase Is Expressed in Peptidergic and Nonpeptidergic Nociceptive Neurons of Mice and Rats. *PLOS ONE* 5, e8674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008674>.
- Thibault, K., Van Steenwinckel, J., Brisorgueil, M.-J., Fischer, J., Hamon, M., Calvino, B., and Conrath, M. (2008). Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* 140, 305–322. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.09.006>.
- Topp, K.S., Tanner, K.D., and Levine, J.D. (2000). Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral

neuropathy in the rat. *J. Comp. Neurol.* 424, 563–576. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000904\)424:4<563::AID-CNE1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000904)424:4<563::AID-CNE1>3.0.CO;2-U).

Torii, H., Yan, Z., Hosoi, J., and Granstein, R.D. (1997). Expression of neurotrophic factors and neuropeptide receptors by Langerhans cells and the Langerhans cell-like cell line XS52: further support for a functional relationship between Langerhans cells and epidermal nerves. *J. Invest. Dermatol.* 109, 586–591. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12337516>.

Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2006). *Principles of anatomy and physiology* (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons).

Tortora, G.J. and Grabowski, S.r. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*.

Uçeyler, N., Kobsar, I., Biko, L., Ulzheimer, J., Levinson, S.R., Martini, R., and Sommer, C. (2006). Heterozygous P0 deficiency protects mice from vincristine-induced polyneuropathy. *J. Neurosci. Res.* 84, 37–46. <https://doi.org/10.1002/jnr.20873>.

Vanderhaeghen, J.J., Signeau, J.C., and Gepts, W. (1975). New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature* 257, 604–605. <https://doi.org/10.1038/257604a0>.

Vasquez, S., Guidon, M., McHugh, E., Lennon, O., Grogan, L., and Breathnach, O.S. (2014). Chemotherapy induced peripheral neuropathy: the modified total neuropathy score in clinical practice. *Ir. J. Med. Sci.* 183, 53–58. <https://doi.org/10.1007/s11845-013-0971-5>.

Verstappen, C.C.P., Koeppen, S., Heimans, J.J., Huijgens, P.C., Scheulen, M.E., Strumberg, D., Kiburg, B., and Postma, T.J. (2005). Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. *Neurology* 64, 1076–1077. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154642.45474.28>.

Vydyanathan, A., Wu, Z.-Z., Chen, S.-R., and Pan, H.-L. (2005). A-type voltage-gated K<sup>+</sup> currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not isolectin B4-negative primary sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 93, 3401–3409. <https://doi.org/10.1152/jn.01267.2004>.

Wang, M.S., Davis, A.A., Culver, D.G., and Glass, J.D. (2002). WldS mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy. *Ann. Neurol.* 52, 442–447. <https://doi.org/10.1002/ana.10300>.

Wank, S.A. (1995). Cholecystokinin receptors. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 269, G628–G646. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.5.G628>.

Wank, S.A. (1998). G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family. *Am. J. Physiol.* 274, G607–613. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.4.g607>.

Warwick, R.A., and Hanani, M. (2013). The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 17, 571–580. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00219.x>.

Watanabe, Y., Saito, H., and Abe, K. (1993). Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 32, 479–486. .

Watson, J.C., and Dyck, P.J.B. (2015). *Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management*. *Mayo Clin. Proc.* 90, 940–951. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.05.004>.

Weng, H.-R., Cordella, J.V., and Dougherty, P.M. (2003). Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* 103, 131–138. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00445-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00445-1).

Whissell, P.D., Bang, J.Y., Khan, I., Xie, Y.-F., Parfitt, G.M., Grenon, M., Plummer, N.W., Jensen, P., Bonin, R.P., and Kim, J.C. (2019). Selective Activation of Cholecystokinin-Expressing GABA (CCK-GABA) Neurons Enhances Memory and Cognition. *ENeuro* 6. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0360-18.2019>.

Widmaier, E.P., Raff, H., Strang, K.T., Vander, A.J. (2013) *Physiologie humaine: les mécanismes du fonctionnement de l'organisme*.

Wiesenfeld-Hallin, Z., and Xu, X.-J. (1996). The role of cholecystokinin in nociception, neuropathic pain and opiate tolerance. *Regul. Pept.* 65, 23–28. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00068-7](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00068-7).

Windebank, A.J., and Grisold, W. (2008). Chemotherapy-induced neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 13, 27–46. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00156.x>.

Wu, Z., Wang, S., Wu, I., Mata, M., and Fink, D.J. (2015). Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor- $\alpha$  in neuropathic pain caused by paclitaxel. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 19, 889–898. <https://doi.org/10.1002/ejp.613>.

Xiao, W.H., and Bennett, G.J. (2008). Chemotherapy-evoked neuropathic pain: Abnormal spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons and its suppression by acetyl-L-carnitine. *Pain* 135, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.06.001>.

Xu, J., Wang, W., Zhong, X.-X., Feng, Y.-W., Wei, X.-H., and Liu, X.-G. (2016). Methylcobalamin ameliorates neuropathic pain induced by vincristine in rats. *Mol. Pain* 12, 1744806916657089. <https://doi.org/10.1177/1744806916657089>.

Xu, J., Zhang, L., Xie, M., Li, Y., Huang, P., Saunders, T.L., Fox, D.A., Rosenquist, R., and Lin, F. (2018). Role of Complement in a Rat Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 200, 4094–4101. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701716>.

Yamamoto, T., and Nozaki-Taguchi, N. (1995). Role of cholecystokinin-B receptor in the maintenance of thermal hyperalgesia induced by unilateral constriction injury to the sciatic nerve in the rat. *Neurosci. Lett.* 202, 89–92. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12213-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12213-3).

Yang, G., Gray, T.S., Sigmund, C.D., and Cassell, M.D. (1999). The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res.* 817, 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01236-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01236-0).

Yang, Y., Zhang, Y.-G., Lin, G.-A., Xie, H.-Q., Pan, H.-T., Huang, B.-Q., Liu, J.-D., Liu, H., Zhang, N., Li, L., et al. (2014). Spinal Changes of a Newly Isolated Neuropeptide Endomorphin-2 Concomitant with Vincristine-Induced Allodynia. *PLoS ONE* 9, e89583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089583>.

Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J.G., Philippov, P.P., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* 231, 2570–2581. <https://doi.org/10.1002/jcp.25349>.

Yang, Y., Li, Q., He, Q.-H., Han, J., Su, L., and Wan, Y. (2018). Heteromerization of  $\mu$ -opioid receptor and cholecystokinin B receptor through the third transmembrane domain of the  $\mu$ -

opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystokinin octapeptide. *Exp. Mol. Med.* 50, 64. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0090-5>.

Yared, J.A., and Tkaczuk, K.H. (2012). Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des. Devel. Ther.* 6, 371–384. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S28997>.

Yin, K., Deuis, J.R., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2016). Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystokinin 2 receptor as an analgesic target. *Mol. Pain* 12. <https://doi.org/10.1177/1744806916665366>.

Yu, S., Zhang, Y., Zhao, X., Chang, Z., Wei, Y., Sun, Y., Jiang, D., Jiang, X., and Tao, J. (2019). Cholecystokinin Type B Receptor-Mediated Inhibition of  $\alpha$ -Type K<sup>+</sup> Channels Enhances Sensory Neuronal Excitability Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase and C-Src-Dependent Jnk Pathway. *Cell Commun. Signal. CCS* 17. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0385-8>.

Zajączkowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., and Wordliczek, J. (2019). Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20061451>.

Zaks-Zilberman, M., Zaks, T.Z., and Vogel, S.N. (2001). Induction of proinflammatory and chemokine genes by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine and human breast cancer cell lines. *Cytokine* 15, 156–165. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0935>.

Zemel, B.M., Ritter, D.M., Covarrubias, M., and Muqeem, T. (2018). A-Type KV Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons: Diversity, Function, and Dysfunction. *Front. Mol. Neurosci.* 11.

Zhang, H., and Dougherty, P.M. (2014). Enhanced excitability of primary sensory neurons and altered gene expression of neuronal ion channels in dorsal root ganglion in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Anesthesiology* 120, 1463–1475. <https://doi.org/10.1097/ALN.000000000000176>.

Zhang, H., Boyette-Davis, J.A., Kosturakis, A.K., Li, Y., Yoon, S.-Y., Walters, E.T., and Dougherty, P.M. (2013). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptor CCR2 in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 14, 1031–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.03.012>.

Zhang, H., Li, Y., de Carvalho-Barbosa, M., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Albrecht, P.J., and Dougherty, P.M. (2016). Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *J. Pain* 17, 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.011>.

Zhang, X., Dagerlind, A., Elde, R.P., Castel, M.N., Broberger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., and Hökfelt, T. (1993). Marked increase in cholecystokinin B receptor messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neuroscience* 57, 227–233. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90057-m](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90057-m).

Zivkovic, S.A., and Lacomis, D. (2005). Severe sensory neuropathy associated with long-term linezolid use. *Neurology* 64, 926–927. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000152883.53691.5B>.

## **Etude de deux cibles pharmacologiques dans la prévention des neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie : récepteurs AT2 et CCK2**

---

Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie (NPIC) sont un effet indésirable commun des agents de chimiothérapie anticancéreuse. La symptomatologie des NPIC se caractérise surtout par des troubles sensitifs : douleurs, fourmillements, altérations de la sensibilité thermique et mécanique. Ces troubles affectent fortement la qualité de vie des patients, et peuvent conduire à une diminution des doses, voire à un arrêt du traitement anticancéreux neurotoxique. La prise en charge actuelle des NPIC repose principalement sur l'utilisation de molécules recommandées dans le traitement des douleurs neuropathiques, et dont l'efficacité reste très modeste. Récemment, nous avons démontré que la modulation du système rénine-angiotensine avait des propriétés analgésiques et neuroprotectrices dans des modèles murins de NPIC induites par la vincristine (NPIV) et l'oxaliplatine. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence qu'un traitement préventif par le ramipril prévenait la survenue de la neuropathie induite par le paclitaxel (NPIP) et que cet effet était médié par AT2R. Nos modèles murins de NPIV et de NPIP ont permis de mettre en évidence une surexpression du récepteur à la cholécystokinine de type 2 (CCK2R) au niveau des ganglions spinaux. L'utilisation d'antagonistes de CCK2R (proglumide, Ly225910, nétazépide) a empêché le développement de l'allodynie tactile et diminuer les atteintes nerveuses induites par la VCR et par le PTX. Les études précliniques menées au cours de cette thèse mettent en lumière deux cibles thérapeutiques prometteuses, AT2R et CCK2R, dans la prévention des NPIC.

---

Mots-clés : neuropathie, douleur, chimiothérapie, système rénine-angiotensine, CCK2R, proglumide, Ly225910

## **Study of two pharmacological targets in the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: AT2 and CCK2 receptors**

---

Chemotherapy-induced peripheral neuropathies (CIPN) are a common side effects of chemotherapeutic agents. CIPN symptoms are mainly sensitive: pain, tingling or alterations of thermal and tactile sensitivity. These disorders strongly affect the quality of life of the patients, and may lead to a reduction of the doses, or even to neurotoxic anticancer treatment discontinuation. Current CIPN management consists in the administration of medications recommended in the treatment of neuropathic pain, with very low efficacy. Recently, we demonstrated that modulation of the renin-angiotensin system show analgesic and neuroprotective effects in models of neuropathy induced by vincristine (VIPN) and oxaliplatin. Here, we demonstrated that preventive treatment with ramipril prevented the occurrence of paclitaxel-induced neuropathy (PIPn) and that this effect was mediated by AT2R. Our mouse models of VIPN and PIPn demonstrated overexpression of the cholecystokinin type 2 receptor (CCK2R) in the spinal ganglia. The use of CCK2R antagonists (proglumide, Ly225910, netazepide) prevented the development of tactile allodynia and decreased all nerve damages induced by VCR and PTX. The preclinical studies carried out during this thesis highlight two promising therapeutic targets, AT2R and CCK2R, in the prevention of CIPN.

---

Keywords : neuropathies, pain, chemotherapy, renin-angiotensin system, CCK2R, proglumide, Ly225910

