APPORT DES MODELES EXPERIMENTAUX DANS LA COMPREHENSION DES DOULEURS EN CANCEROLOGIE :

*NEUROTOXICITE DES CHIMIOTHERAPIES

*SOURIS TRANSGENIQUE EXPRIMANT UN PEPTIDE ISSU DU SV40 : UN MODELE DE CANCER DU PANCREAS CHEZ LA SOURIS

Bernard CALVINO
Professeur de Physiologie

*Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris
* UMR ESPCI-CNRS 7637

APPORT DES MODELES EXPERIMENTAUX DANS LA COMPREHENSION DES DOULEURS

- Utilité de tout modèle expérimental :

  1-Quelles données nouvelles un modèle peut-il apporter dans la compréhension de la physiopathologie et des mécanismes qui sont à l'origine d'une maladie et de la douleur qui y est associée ?
- 2-Quelles hypothèses ce modèle peut-il permettre de formuler pour mettre au point de nouvelles thérapies pour traiter la maladie et/ou soulager la douleur qui y est associée ?

Douleurs cancéreuses : douleurs mixtes

*douleurs par excès de nociception (inflammation, sensibilisation des nocicepteurs) et dues au développement des métastases.

*douleurs neuropathiques chroniques iatrogènes liées aux traitements du cancer (radiothérapies, chimiothérapies neurotoxiques) et liées à la poussée tumorale (compression des structures nerveuses)

DOULEUR AIGUË
DOULEUR SYMPTÔME

***D'installation récente**

***Signal d'alarme utile : permet le diagnostic**

DOULEUR CHRONIQUE

DOULEUR SYNDROME - DOULEUR MALADIE

*Douleur persistante au cours du temps :
« Elle ne protège pas l'Homme, elle le diminue » - René LERICHE

LE RÔLE DU TEMPS :

PASSAGE DE LA DOULEUR AIGUË A LA DOULEUR CHRONIQUE

- Une douleur chronique n’est pas une douleur aiguë qui se prolonge dans le temps
- Neuroplasticité synaptique et cellulaire

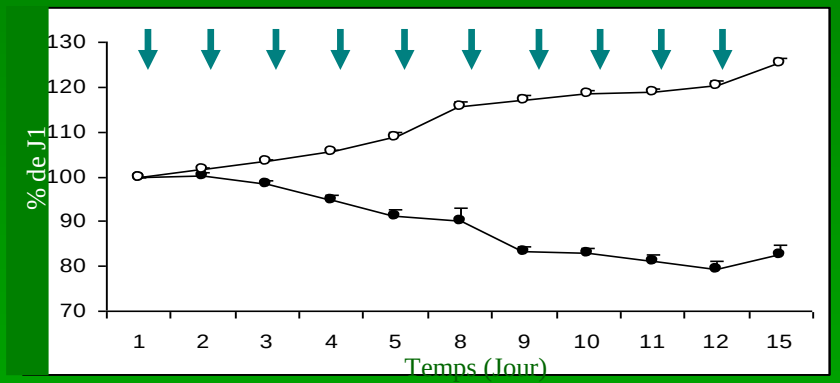
MODELES VINCRISTINE-OXALIPLATINE Etude comportementale - Paramètres cliniques - K. Thibault (Thèse-2006)

Evolution du poids:

- Vincristine

-différence statistiquement significative entre les animaux traités vincristine et les animaux contrôles dès J2 ($p \leq 0.05$)
-les animaux vincristine perdent du poids la première semaine et se stabilise la deuxième semaine.

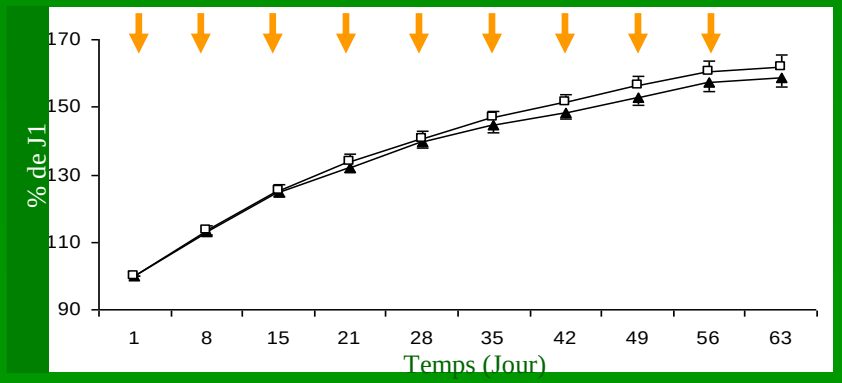
Injection de vincristine i.p. (0.1mg/kg)



- Oxaliplatine

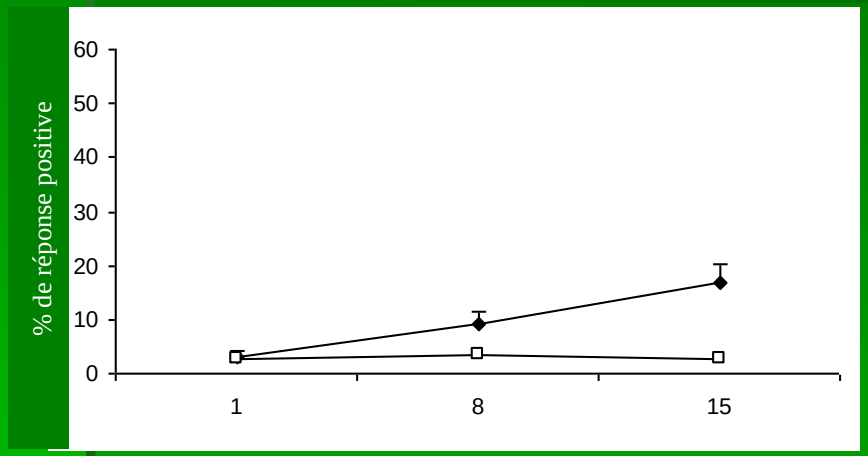
-aucune différence statistiquement significative entre les animaux traités vincristine et les animaux contrôles.
-les animaux traités à l'oxaliplatine présentent un gain de poids normal tout au long du traitement.

Injection d'oxaliplatine i.p. (4mg/kg)

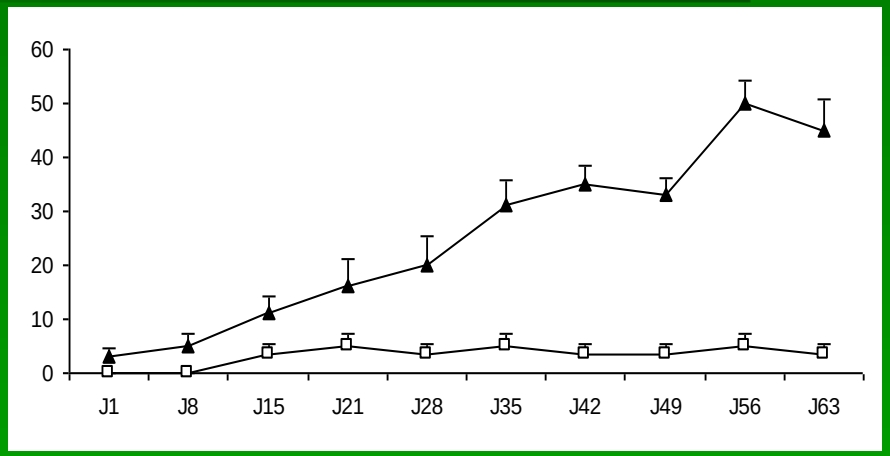


Allodynie mécanique dynamique

Test du pinceau souple:



Vincristine



Oxaliplatine

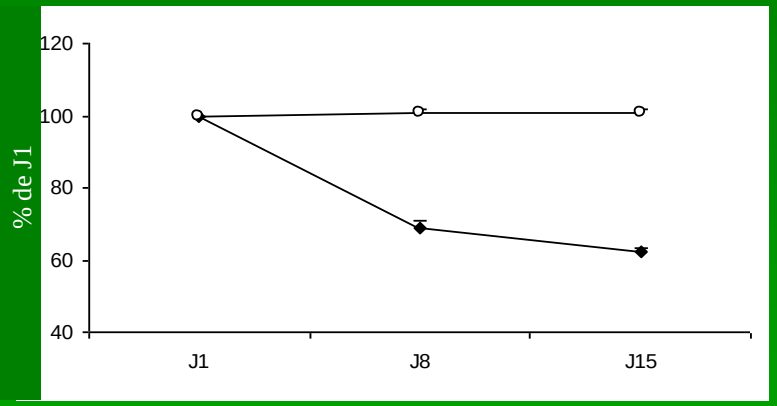
Conclusion

-le traitement vincristine entraine une augmentation du % de réponses positives dès J8 ($p \leq 0.05$), qui continue d'augmenter à J15 ($p \leq 0.001$).

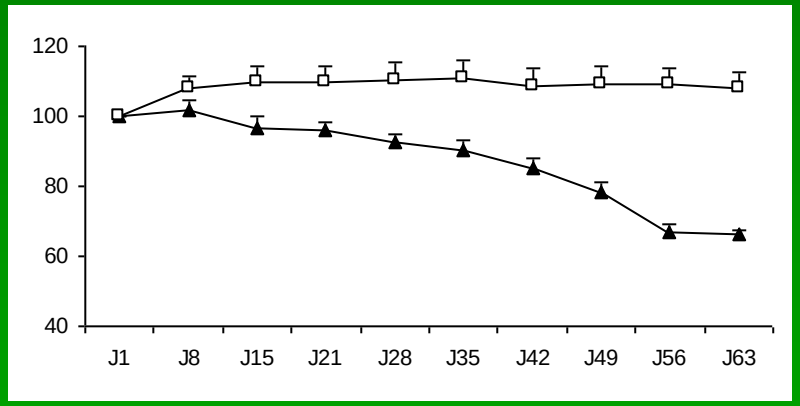
-le traitement oxaliplatine entraine une augmentation du % de réponses positives dès J15 ($p \leq 0.05$). On observe alors deux autres augmentations, l'une entre J28 et J35, l'autre entre J49 et J56.

Allodynie mécanique statique

Test de Von Frey:



Vincristine



Oxaliplatine

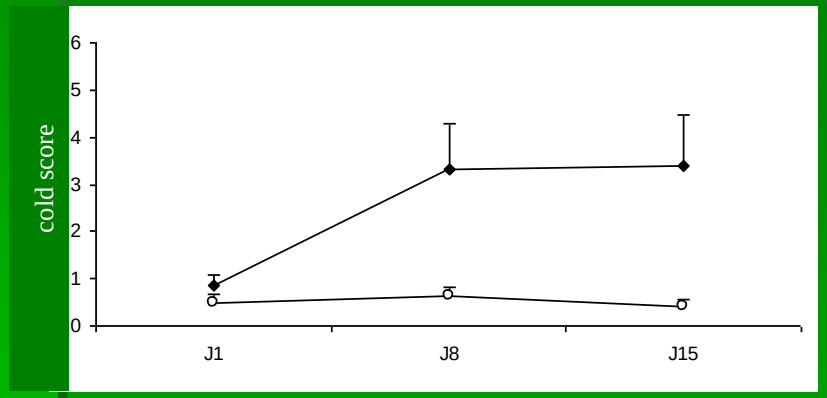
Conclusion

-le traitement vincristine entraine une diminution du seuil de réponse exprimé ici en % du seuil mesuré à J1, entre J1 et J8 ($p \leq 0.001$), qui continue de diminué à J15 ($p \leq 0.01$).

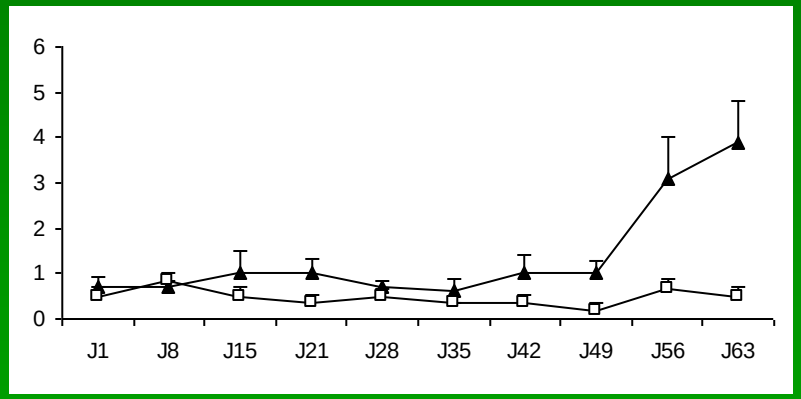
-le traitement oxaliplatine entraine une diminution du seuil de réponse à partir de J21 par rapport à J1 ($p \leq 0.05$). On observe une diminution progressive du seuil de réponse jusqu'à J56 où le seuil semble atteindre un plateau.

Allodynie thermique au froid

Test à l'acétone:



Vincristine



Oxaliplatine

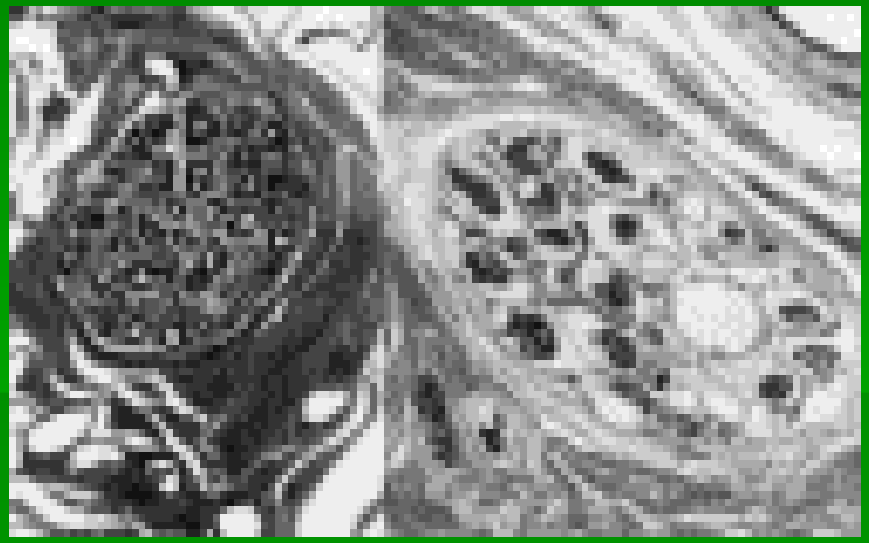
Conclusion

-le traitement vincristine entraine une augmentation du « cold score » qui consiste à mesurer les comportements stéréotypés en réponse à l'application d'une goutte d'acétone sur la face plantaire de la patte de l'animal (Flatters et al., 2004) entre J1 et J8 ($p \leq 0.05$), maintenue à J15.

-le traitement oxaliplatine entraine une augmentation du cold score à partir de J56 par rapport à J1 ($p \leq 0.05$), maintenu à J63.

Modèle vincristine :

Authier N. et al Neurotoxicology 24 (2003) 797-805



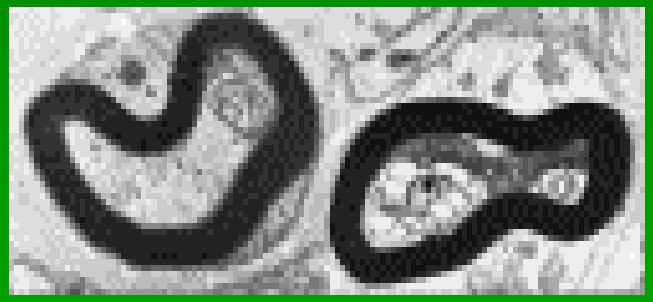
Marquage au bleu de toluidine d'une coupe semi-fine de tissu sous-cutané d'une patte postérieure (x130)

- Fig. gauche : animal contrôle
- Fig. droite : animal traité à la vincristine.

Noter la dégénérescence et le gonflement des fibres fines myélinisées et des fibres non myélinisées

Modèle vincristine :

Authier N. et al Neurotoxicology 24 (2003) 797-805



Coupe ultra-fine d'une fibre nerveuse myélinisée

Fig. gauche (x37.000) : animal contrôle

Fig. droite (x15.000) : animal traité à la vincristine.

Noter la dégénérescence et le gonflement vacuolaire de la fibre fine myélinisée (noter que la gaine de myéline n'est pas altérée).

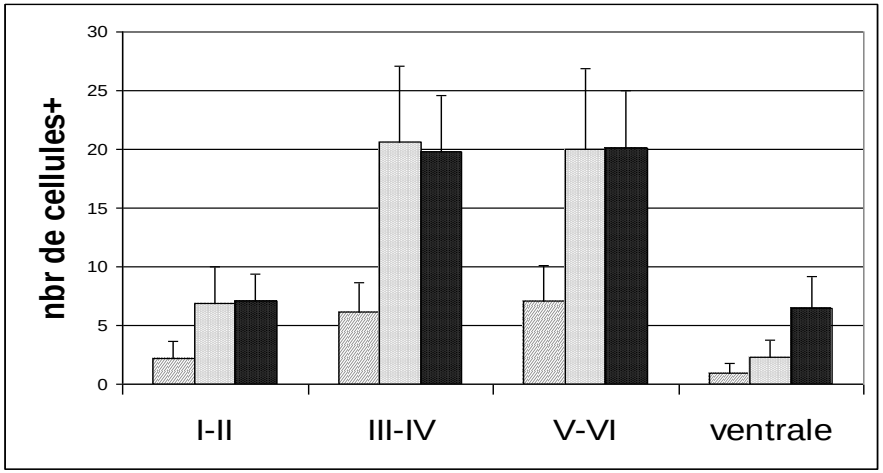
MODELE VINCRISTINE

K. Thibault (Master de Recherche-2005)

Étude immunohistochimique d'un marqueur d'activité des neurones intervenants dans les douleurs chroniques

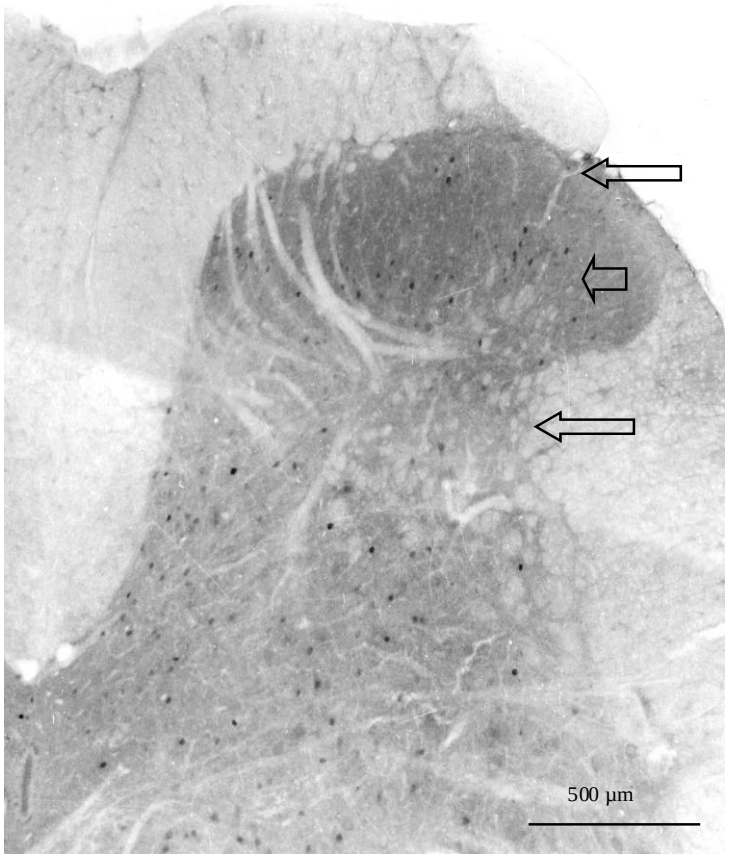
Proto-oncogène c-Fos

Étude de l'expression de la protéine c-Fos



Vincristine (J8 - J15)

Contrôle

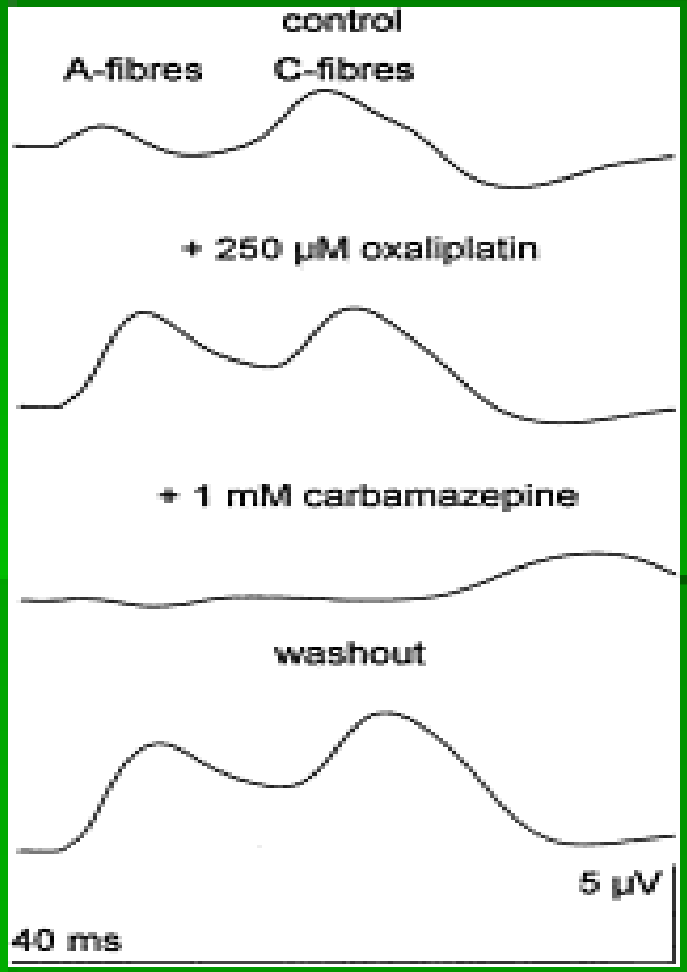


vincristine

MODELE OXALIPLATINE

INJECTION UNIQUE (I)

Adelsberger H et al - Eur. J. of Pharmacology 406 (2000) : 25-32.



Préparation de nerf vague de rat (haute densité de fibres C) :

- Potentiels d'action composés (Pac) mis en jeu (chocs électriques de 15µA, 100V, 0,1Hz) dans une solution contrôle ou 45 min temps après application de 250 µM d'oxaliplatine (Ox) dans le bain.
- L'addition de 1mM de carbamazépine (Cbz, molécule anti-épileptique bloqueur du Na_v) abolit complètement la composante des fibres A et réduit la composante des fibres C des Pac.
- Après lavage de la Cbz, le Pac peut de nouveau être détecté, avec des composantes identiques à celles enregistrées en présence d'Ox.

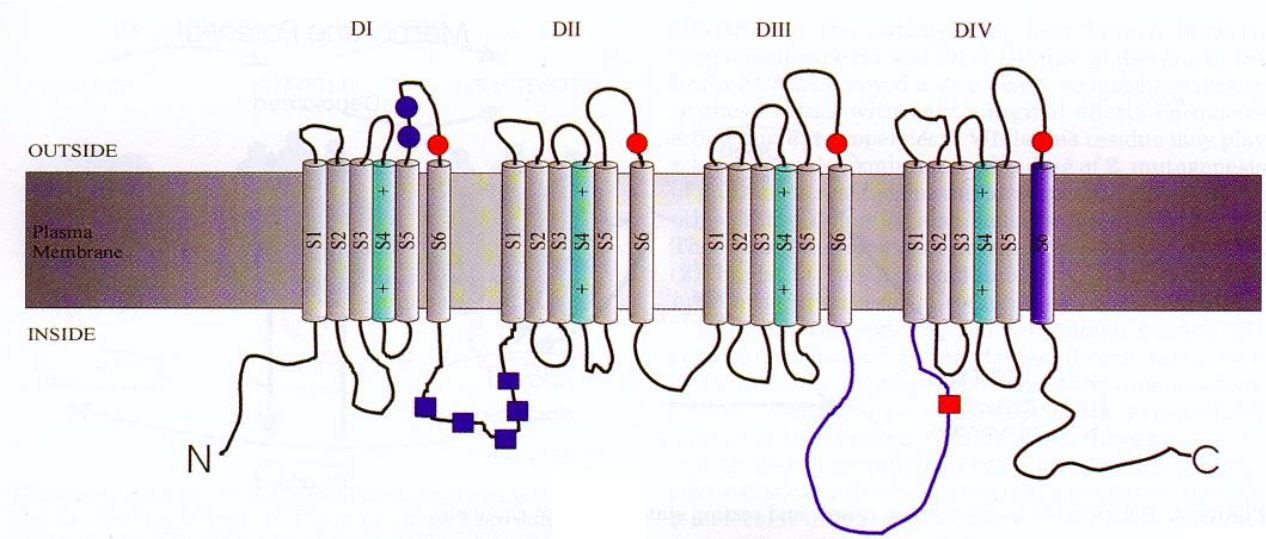
Voltage-gated sodium channels

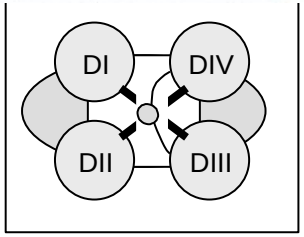
Topology of the α-subunit of voltage-gated sodium channels

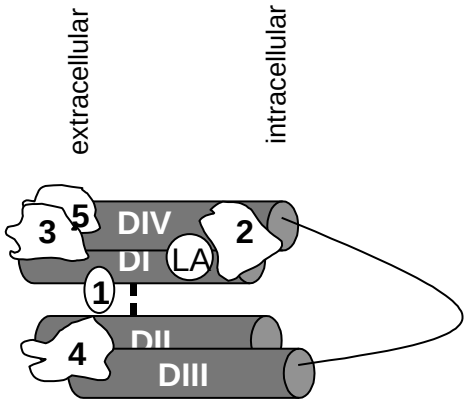
- **A:** The α-subunit is built up of 4 homologous transmembrane domains (DI-DIV) each containing six transmembrane segments (S1-S6). The extracellular and intracellular loops contain putative glycosylation and phosphorylation sites, as indicated. The IFM-motif is probalby crucial for channel inactivation.

- **B:** Transmembrane arrangement of DI-DIV domains around the channel pore.

- **C:**. Binding sites (1-5) of the α-subunit. LA: putative local anesthetic binding site. TTX: tetrodotoxin. (adapted from Denac et al. 2000).







P phosphorylation site

TTX-binding site

S4(+) voltage sensor

putative glycosylation site

IFM Isoleucine, phenylalanine, methionine

selectivity filter

CANAUX SODIQUES VOLTAGE-DEPENDANTS ET DOULEURS NEUROPATHIQUES

- La sous-unité alpha (Nav 1) constitue le senseur du voltage membranaire

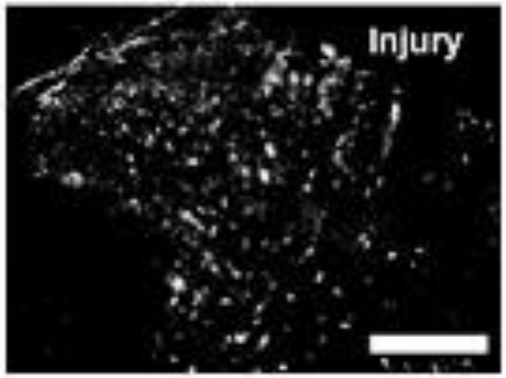
- Chez le rat, 9 isotypes ont été identifiés: Nav 1.1 à Nav 1.9; 7 sont exprimés dans les neurones sensoriels primaires; 5 sont sensibles à la TTX (1, 2, 3, 6, 7) et 2 résistantes (8, 9). Nav 1.3 n'est exprimé qu'au cours du développement embryonnaire.

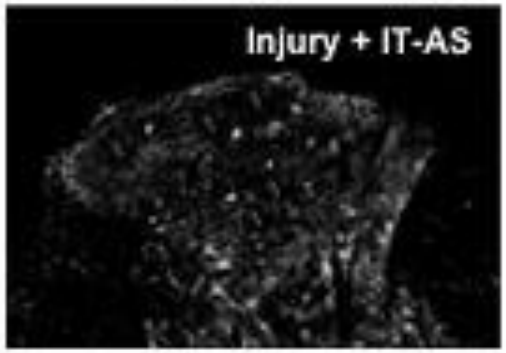
- Altération du pattern d'expression de certaines sous-unités dans des modèles de douleurs neuropathiques:

  -Nav 1.3 est surexprimé (neurones de petits et de gros diamètres) dans les modèles d'axotomie, de lésion partielle du sciatique et de diabète expérimental;

  -Nav 1.8, exprimé principalement dans les neurones de petit diamètre, est sous-exprimé dans les modèles de lésion partielle du sciatique et de diabète expérimental;

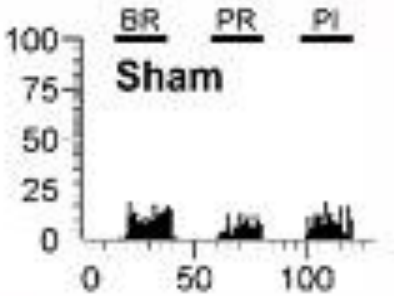
Role of NAV1.3: Spinal Injury Allodynia

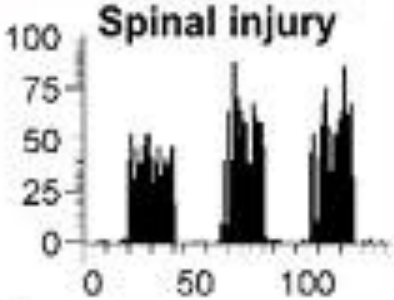




SPINAL T9 INJURY

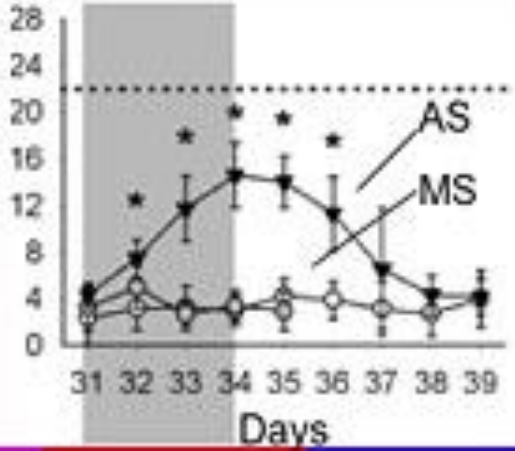
- Increases DH Nav1.3 protein and mRNA
- Activation of DH
- Evokes tactile allodynia





IT Nav1.3-AS REVERSES

- Evoked Nav1.3
- DN excitability
- Tactile allodynia

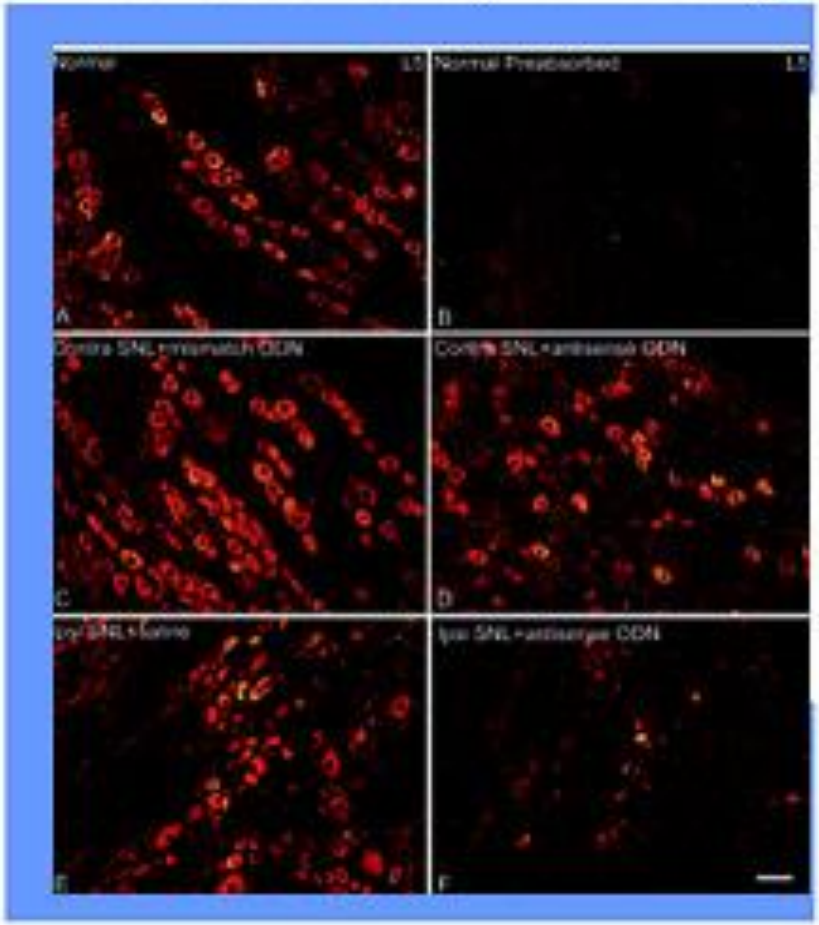


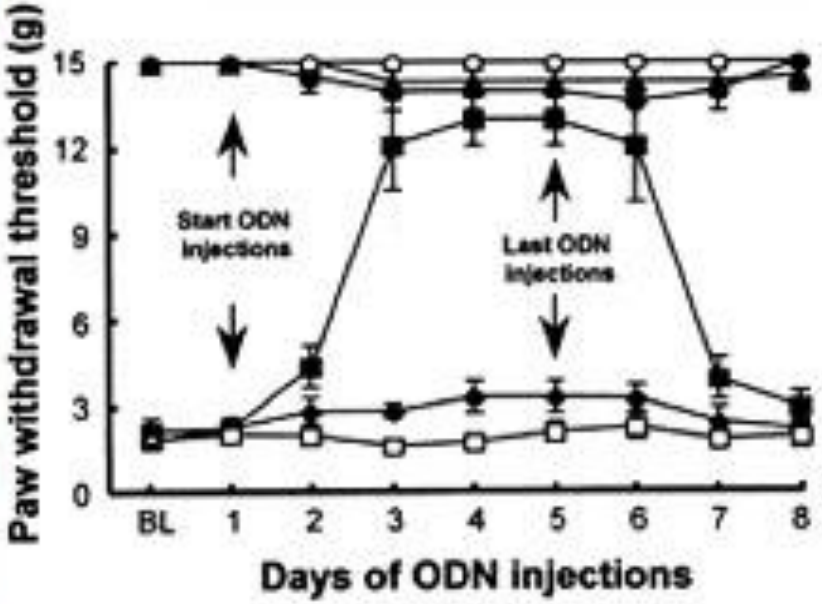
Hains BC, et al. *J Neurosci.* 2003;23:8881-8892. Copyright 2003 by the Society for Neuroscience.

Role of Nav1.8: Nerve Injury Allodynia

Intrathecal (IT) Nav1.8 antisense:

- Reduces DRG Nav1.8 protein expression
- Blocks tactile allodynia – Chung mononeuropathy

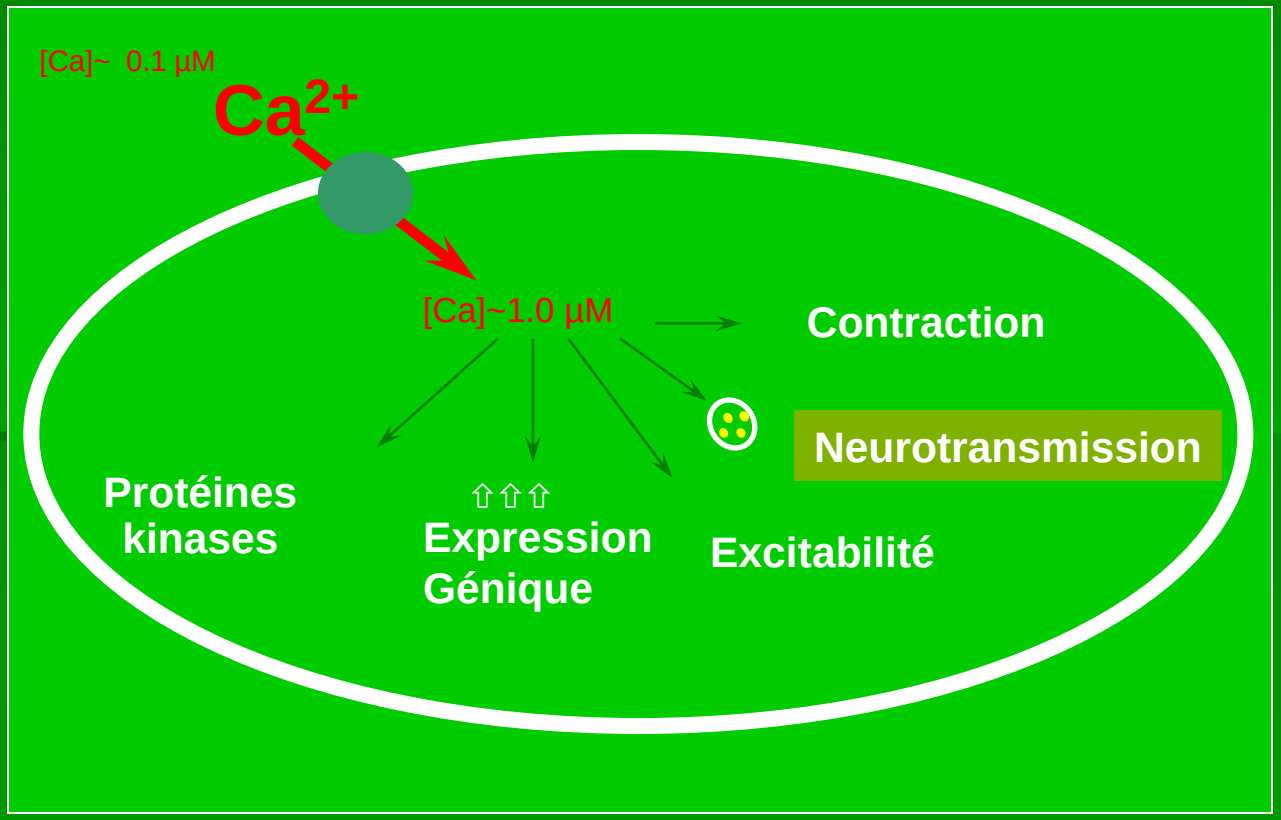




Lai J, et al. *Pain*. 2002;95:143-152.

RÔLE DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE CELLULAIRE

- Protéines de l'excitabilité
- Diversité de fonctions



MODELE OXALIPLATINE INJECTION UNIQUE (II)

Adelsberger H et al - Eur. J. of Pharmacology 406 (2000) : 25-32.

Grolleau F. et al – J. Neurophysiol. 85 (2001) : 2293-2297

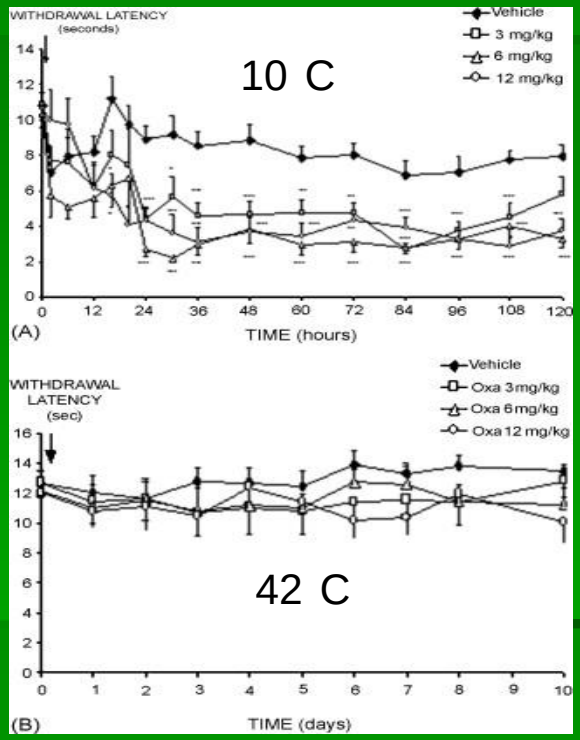
- L'activation du canal Na_v dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels le rôle des ions Ca^{2+}.
- L'acide oxalique, un chélateur des ions Ca^{2+} (il précipite rapidement avec les ions Ca^{2+}) pourrait ainsi diminuer la concentration extra-cellulaire de ces ions lorsqu'il est libéré au cours de l'entrée de l'Ox dans la cellule.
- Deux modes d'action de l'Ox peuvent être proposés:

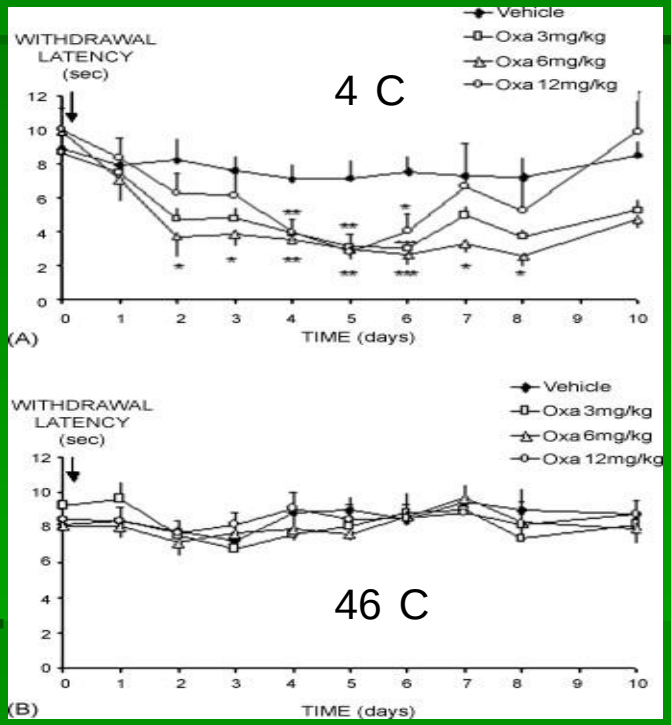
  -une modification (altération de leur inactivation) de la cinétique de fermeture de canaux Na_v calcium-sensibles, du fait de la baisse de concentration en calcium extra-cellulaire;

  -une perturbation du potentiel électrochimique transmembranaire du calcium pourrait indirectement altérer la cinétique d'inactivation du canal Na_v par un mécanisme régulateur dépendant du calcium intracellulaire

MODELE OXALIPLATINE
INJECTION UNIQUE (III)

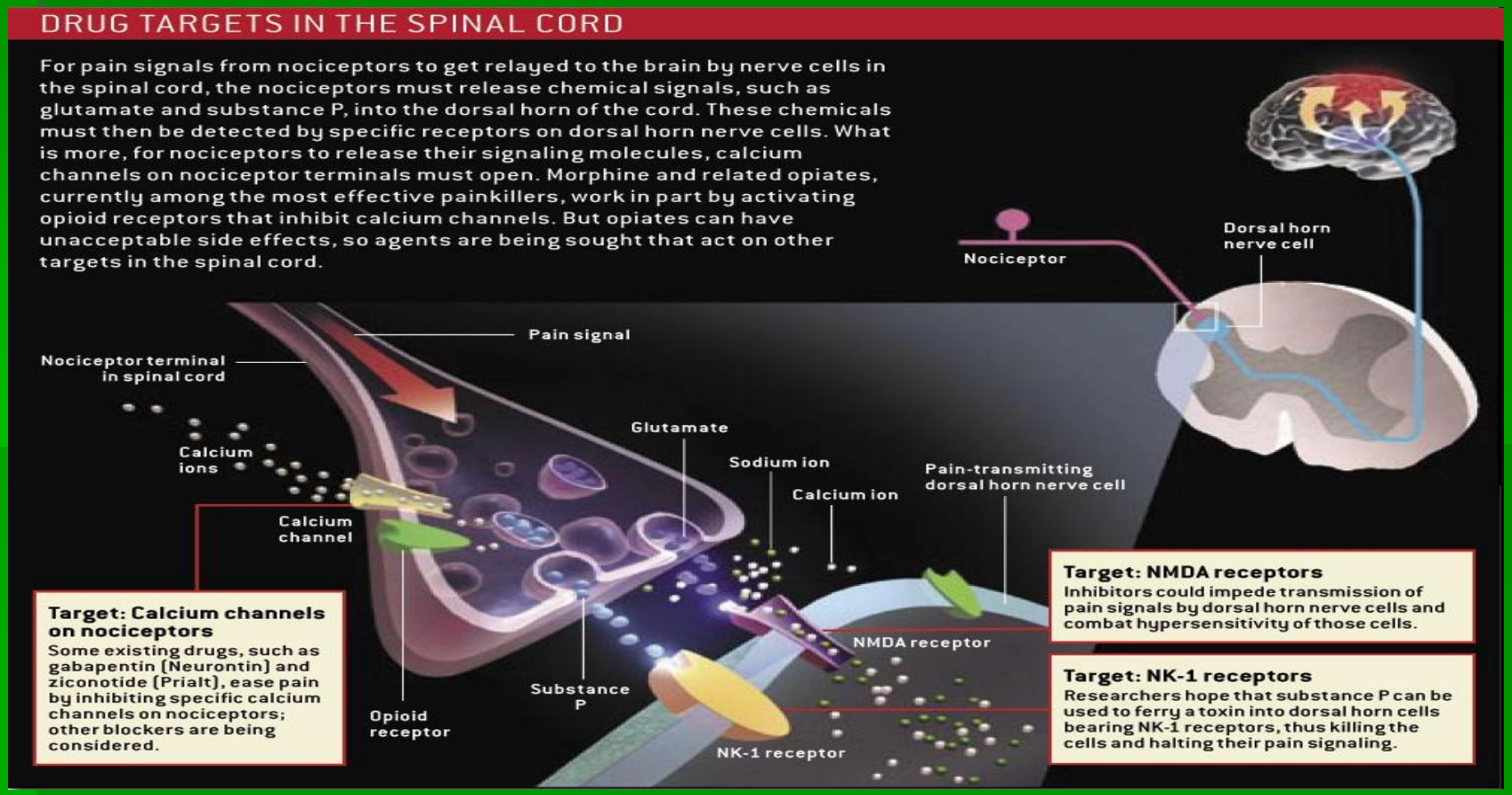
Ling B., Coudouré-Civiale M.A., Balayssac D., Eschalier A., Coudoure F and Authier N. - Toxicology (2007) 234 : 176-184



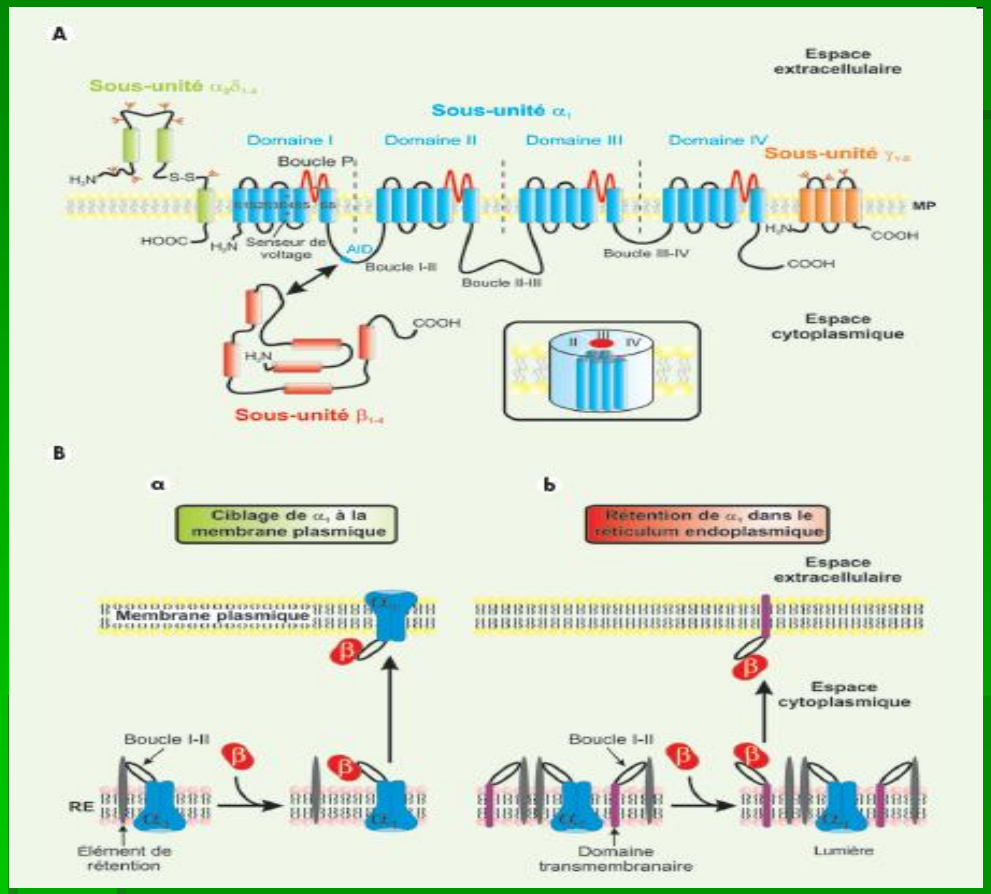


- **Effets aigus de l'injection**
- **Allodynies et hyperalgies thermiques au froid**
- **Allodynie mais absence d'hyperalgie mécanique**
- **Augmentation importante de SP-IR mais pas de CGRP-IR dans CDME (mise en jeu possible des fibres A de petit diamètre)**

Canaux calciques pré-synaptiques et libération de neurotransmetteurs



Structure du canal calcique



*La Gabapentine et la Prégabaline se fixent sur la sous-unité régulatrice α2-δ du canal calcique et en bloque le fonctionnement.

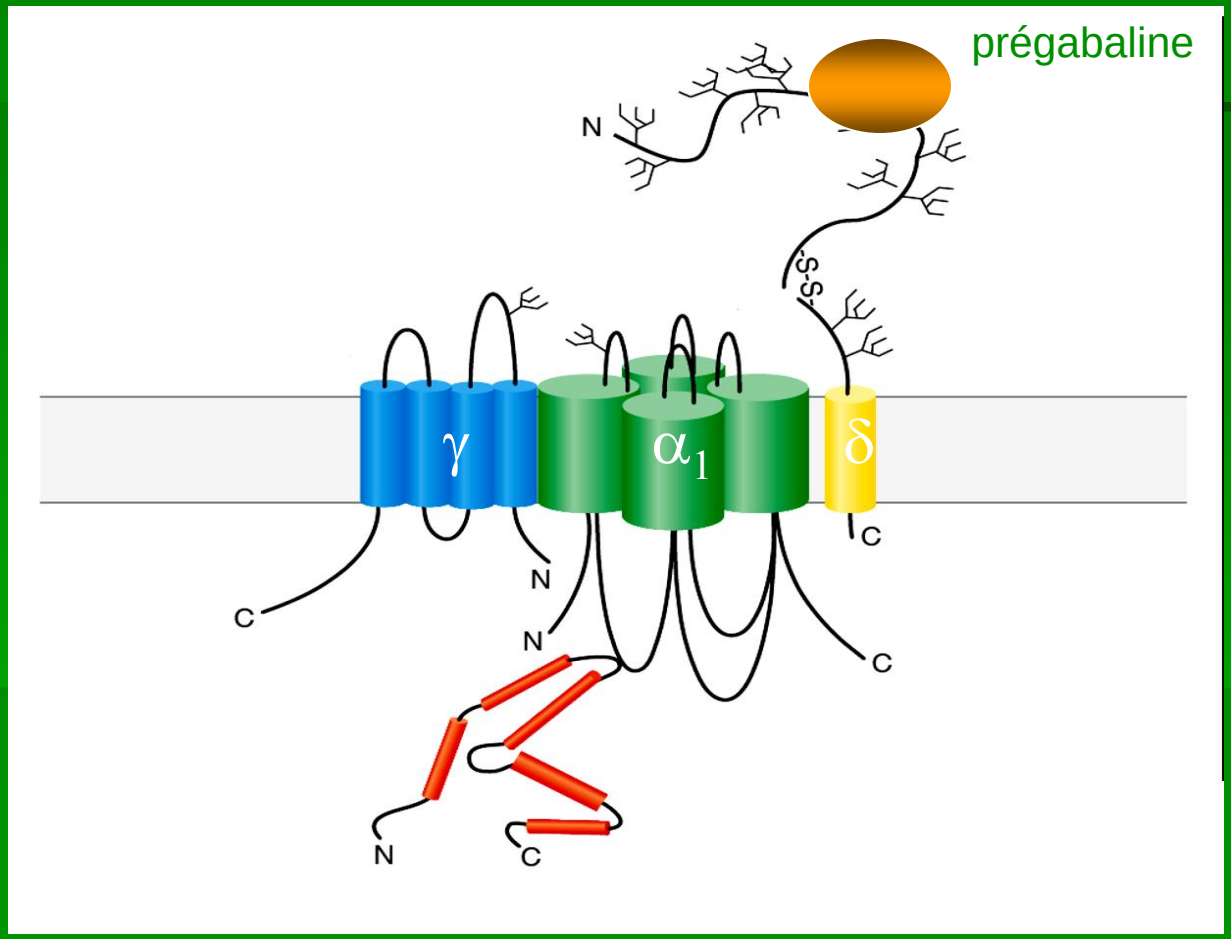
*L'ω-conotoxine bloque le pore du canal calcique et le rend imperméable au calcium

Weiss Norbert, De Waard Michel.

Les canaux calciques dépendants du voltage au cœur de la douleur.

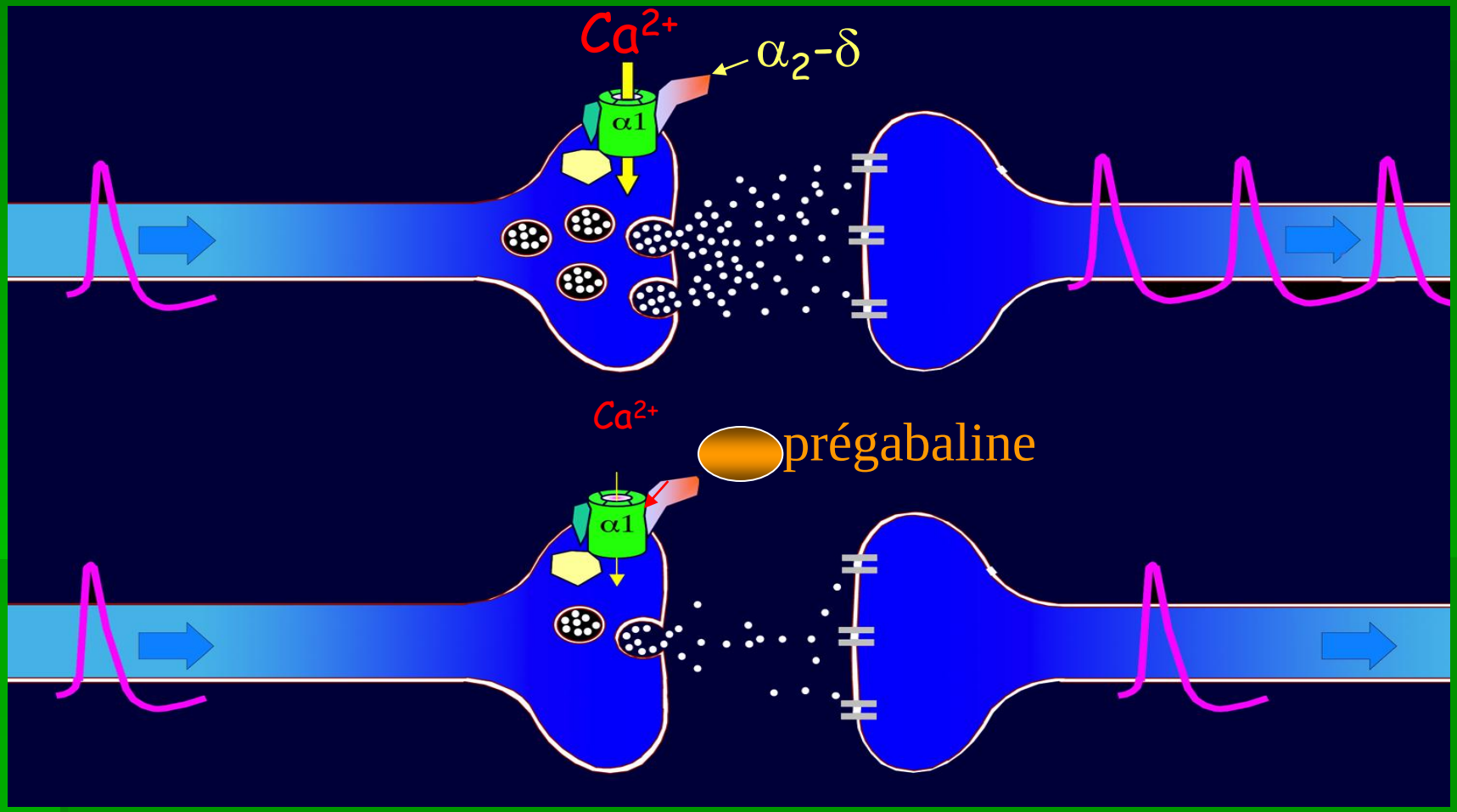
Médecine/Sciences 2006 ; 22 : 396-404.

LA PRÉGABALINE SE FIXE À LA SOUS-UNITÉ α2-δ

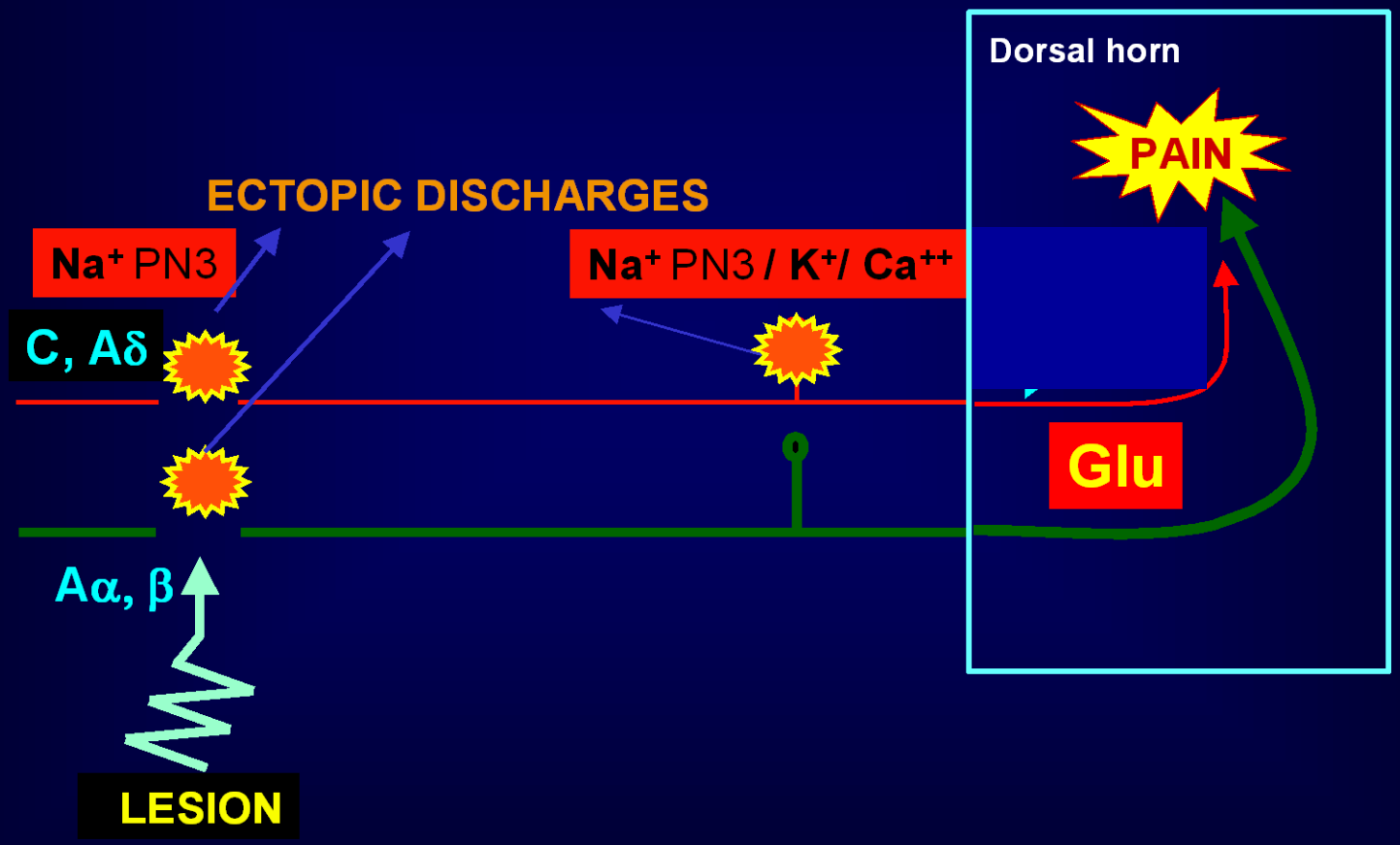


Arikkath and Campbell 2003

CONCLUSION : LA PRÉGABALINE, EN SE LIANT À LA SOUS-UNITÉ α2-δ, RÉDUIRAIT L'EXCITABILITÉ

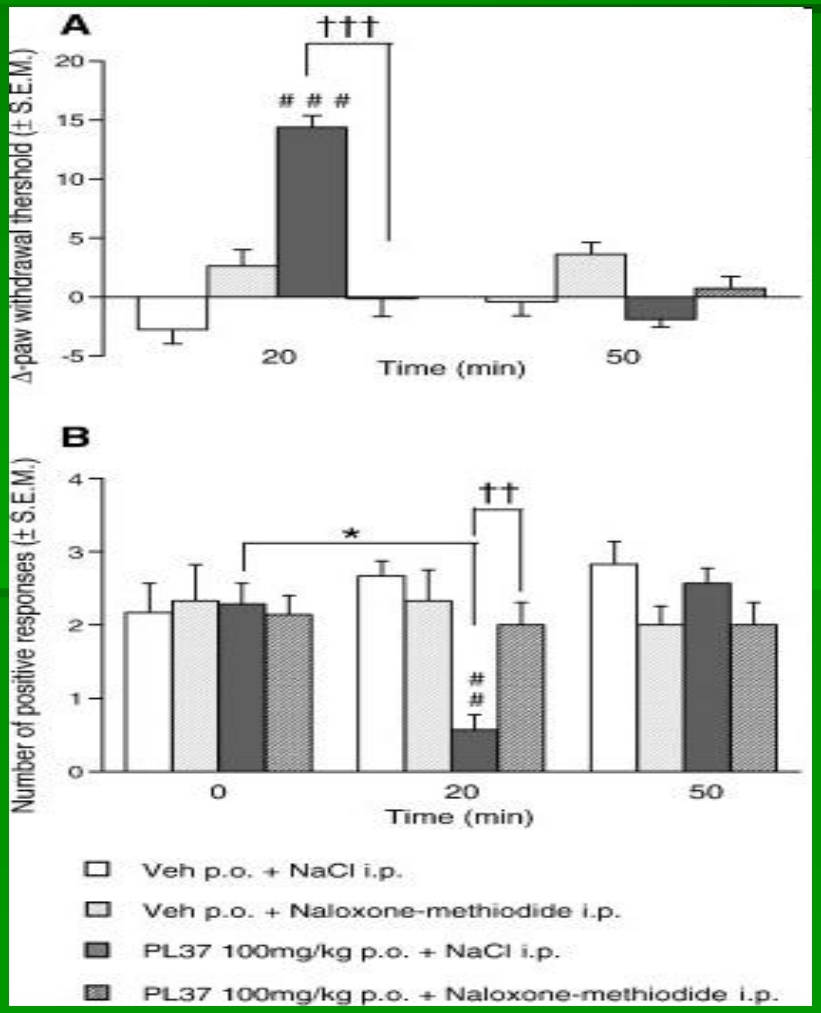


Peripheral modifications in neuropathic pain

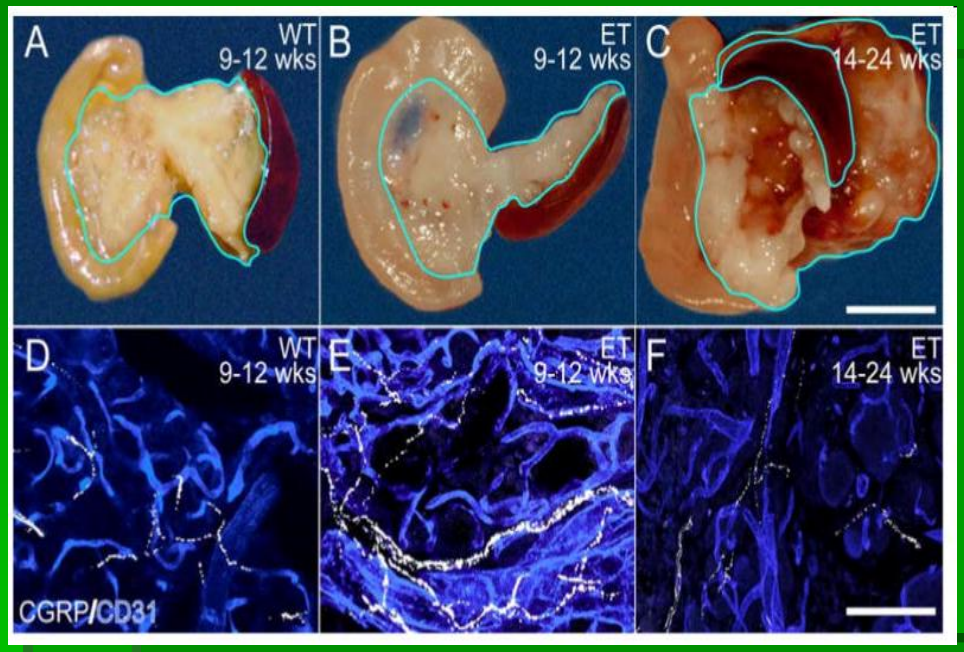


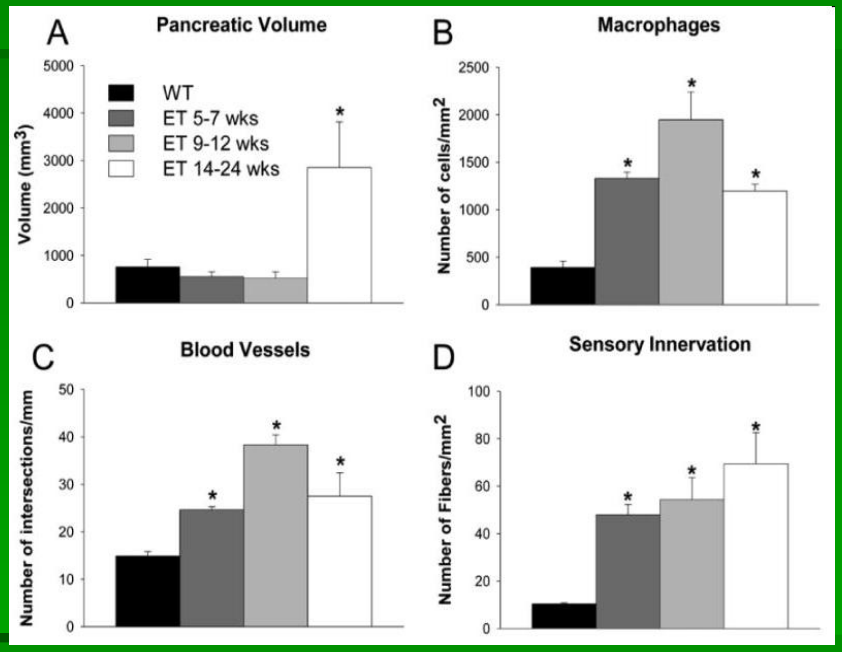
Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine

Thibault K et al - European J. of Pharmacology 600 (2008) 71-77



SOURIS TRANSGENIQUE EXPRIMANT UN PEPTIDE ISSU DU SV40 : UN MODELE DE CANCER DU PANCREAS CHEZ LA SOURIS

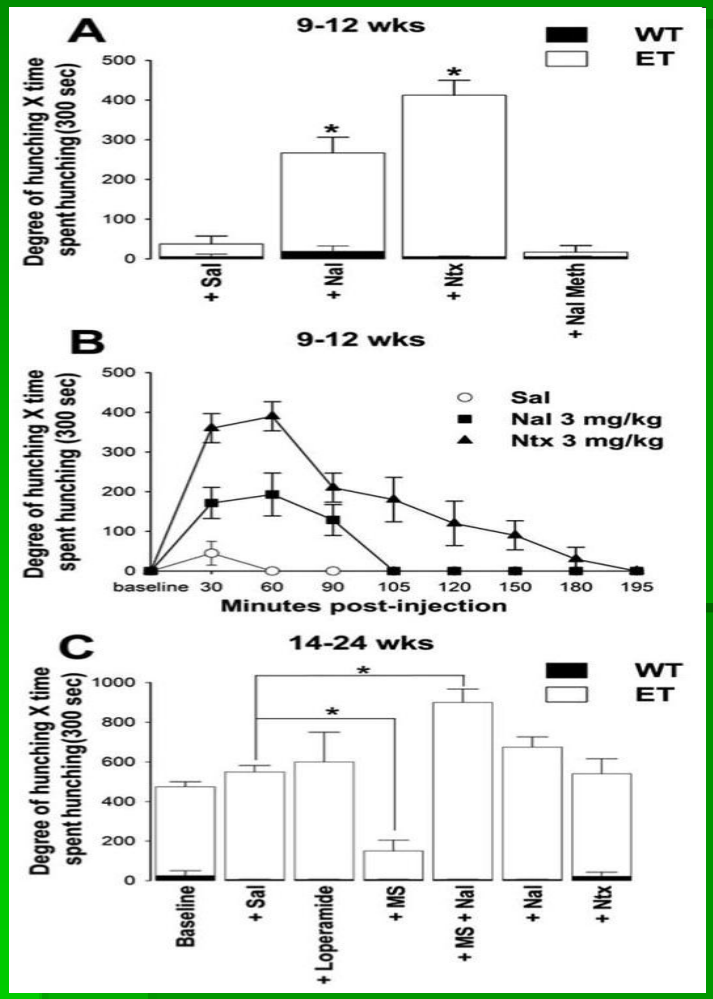




Changements histopathologiques (HP) associés au développement du cancer du pancréas:
A-C: pas de changements HP majeurs avant 14-24 s. malgré la présence de nodules palpables plus précoces (9-12s.)
D-F: augmentation de la densité des capillaires et des fibres sensorielles (CGRP) (9-12s.) suivie d'une nécrose tissulaire (14-24s.)

Quantification des changements histo-pathologiques associés au développement du cancer pancréatique.

PHASES PRECOCES DE DOULEURS PANCREATIQUES DANS CE MODELE DE CANCER DU PANCREAS CHEZ LA SOURIS



- 9-12 s. Effet révélateur de la naloxone, la naltrexone, mais pas de la naloxone-methiodide (3 mg/kg s.c.) sur le comportement douloureux viscéral spontané (« hunching », posture de voûtement du dos) associé au cancer;
- 14-24 s. Comportement spontané important, non affecté par le lopéramide (agoniste opioide périphérique) mais réduit par la morphine(10 mg/kg s.c.), un effet antagonisé par la naloxone (3 mg/kg s.c.).

Endogenous Opioids Inhibit Early Stage Pancreatic Pain in a Mouse Model of Pancreatic Cancer - Sevcik M.A. et al

Gastroenterology. (2006) 131(3): 900–910

CONCLUSION (I)

- L’étude des modèles animaux de douleurs neuropathiques devraient permettre de résoudre l’une des énigmes majeure de la douleur du cancer :

  « pourquoi l’intensité de la douleur est-elle tellement variable d’une tumeur à l’autre, ou même d’un patient à l’autre portant la même tumeur ? »

CONCLUSION (II)

« La Clé du succès dans ce champ de recherche repose certainement sur la prise en compte de la biologie des tumeurs, en association avec notre meilleure compréhension des évènements à l'origine de la douleur cancéreuse, aux niveaux d'organisation de la biologie moléculaire et cellulaire, et de son prolongement dans le temps »

Patrick W. MANTYH - Pain : 96 (2002) 1-2.